

225. E. Hoyer: Ueber fermentative Fettspaltung.

[2. Mittheilung.]

(Vorgetragen in der Sitzung vom 14. März 1904 vom Verfasser.)

Im November 1902 wurde von W. Connstein, E. Hoyer und H. Wartenberg an dieser Stelle die erste Mittheilung über fermentative Fettspaltung veröffentlicht¹⁾. In dem verflissenen Jahre wurde das Gebiet im wesentlichen in technischer Richtung bearbeitet. Es gelang, nach vielfachen Versuchen im grossen Maassstabe ein technisch brauchbares und concurrenzfähiges Fettspaltungsverfahren²⁾ auszuarbeiten, welches nunmehr in einer Anzahl Seifen- resp. chemischer Fabriken sich Eingang verschafft hat. Eine ganze Reihe von Publicationen³⁾ in fachwissenschaftlichen Zeitschriften beweist zur Genüge die sich bei Anwendung des Verfahrens ergebenden Vortheile.

Doch auch in wissenschaftlicher Beziehung wurde der Process gefördert, wenn auch naturgemäss technische Gesichtspunkte hierbei maassgebend waren.

I. Versuche zur Isolirung des Enzyms.

Die Hauptarbeit war selbstverständlich der Frage der Reindarstellung resp. Anreicherung des fettspaltenden Agens gewidmet. Dieselbe war durch die gestellte technische Forderung begründet,

1. mit möglichst wenig fester Samensubstanz eine möglichst hohe und rasche Fettspaltung zu erzielen;
2. sollte bei der darauffolgenden Trennung der Emulsion eine möglichst glatte Scheidung in Fettsäure und Glycerinwasser erfolgen;
3. sollten diese Letzteren möglichst rein, d. h. frei von fremden Bestandtheilen, sein.

Die nach dieser Richtung hin angestellten Versuche können in zwei Gruppen getheilt werden, nämlich in Versuche, eine Fermentlösung herzustellen, und in solche, das Enzym auf mechanischem Wege zu isoliren oder auch nur anzureichern. Es sei vorweg bemerkt, dass alle Versuche, eine Fermentlösung herzustellen, bisher negativen Erfolg hatten; wohl gelang es dagegen, eine gewisse Anreicherung des Fermentes zu erzielen.

Als Ausgangsmaterial wurde ausschliesslich Ricinussamen verwandt; denn wenn auch viele andere Pflanzensamen mehr oder weni-

¹⁾ Diese Berichte 35, 3988 [1902].

²⁾ Deutsches Reichspatent No. 145413 vom 22. 4. 02.

³⁾ »Der Seifenfabrikant« 1902, No. 47 und 48 (O. Heller), 1903, No. 11 (O. Heller), No. 25 (W. Connstein), No. 45 (E. Hoyer); »Seifensiederzeitung« 1903 No. 45 und 46 (E. Hoyer), No. 47 (M. Steffan).

ger fettspaltende Fermente enthalten¹⁾, so ist Ricinussamen — wenigstens bis jetzt — dasjenige Material geblieben, welches am billigsten und leichtesten beschaffbar ist.

A. Versuche zur Darstellung einer Fermentlösung²⁾.

Zunächst wurden zahllose Versuche angestellt, um aus dem entschälten und entölten oder auch nicht entölten Samen mittels geeignet erscheinender Lösungsmittel, in erster Linie natürlich Wasser, Kochsalz- oder Glycerin-Lösungen in verschiedensten Concentrationen bei verschiedenen Temperaturen wirksame Fermentlösungen herzustellen. Immer erhielten wir ein völlig unwirksames Filtrat und einen in seiner fettspaltenden Wirkung stark reducirten Samenrückstand. Auch eine Uebertragung des Buchner'schen Hefepresssaftverfahrens auf den Ricinussamen hat bisher kein positives Resultat ergeben. Das Buchner'sche Verfahren setzt bekanntlich voraus, dass sich das die alkoholische Gärung verursachende Enzym innerhalb der schwer zerstörbaren Hefezellen in gelöster Form befindet. Durch Zerreiben der Hefe mit Infusorienerde werden die Hefezellen zertrümmert, und das Enzym kann nunmehr durch starken Druck in Form einer wässrigen Fermentlösung gewonnen werden. Die Zellen des Ricinussamens sind demgegenüber äusserst leicht zerstörbar. Schon beim Zerquetschen oder Zerreiben des Samens werden auch die Zellwände zerissen³⁾.

Man erhält dabei eine infolge ihrer grossen Oelgehaltes salbenartige Masse und beim Pressen derselben in einer Buchner'schen hydraulischen Presse bei sehr hohem Druck immer nur ein mehr oder weniger getrübbtes Ricinusöl von sehr geringen fettspaltenden Eigenschaften. Die zurückbleibenden Presskuchen haben dagegen im frischen Zustande noch die volle Wirksamkeit der ungespressten Samen. Näheres über dieses Pressöl wird weiter unten berichtet.

B. Versuche, das Enzym aus dem Ricinussamen auf mechanischem Wege zu isoliren.

Die roheste mechanische Trennung ist diejenige, welche direct durch die menschliche Hand vorgenommen werden kann. In der

¹⁾ Vergl. die höchst beachtenswerthe Arbeit von Fokin, Journ. d. Russischen physik.-chem. Ges. 35, 831 u. 1197 [1903].

²⁾ Dieses Kapitel ist hauptsächlich von unserem leider zu früh verstorbenen Mitarbeiter H. Wartenberg bearbeitet worden.

³⁾ Nach E. Strassburger (Botanisches Practicum, 2. Aufl. 1887, 43—45) besteht der Zellinhalt der Zellen des Ricinussamens aus Aleuronkörnern, die in einer fettreichen Grundsubstanz eingelagert sind. Innerhalb der Ersteren befinden sich runde Körper (Globoide) und Eiweisskrystalle.

Annahme, dass in den Samen eine verschiedenartige Vertheilung des Enzyms vorhanden sein könnte, wurden die schwach gekeimten und entschälten Samen halbirt und die Samenhälften an dem Keimling, sowie die ihm abgekehrten Hälften für sich gesammelt und extrahirt, alsdann zu einem Spaltungsversuch verwendet. Ebenso wurde stark gekeimter Samen von Schalen und Keimlingen befreit, sowie diese Letzteren für sich nach Entfernung des Oeles durch Extraction auf ihre Wirksamkeit hin geprüft.

Versuch 1.

0.1 g Samenpulver wurden mit 10 ccm Ricinusöl und 10 ccm Essigsäure-(2 pCt.)-Chloralhydrat-(1 pCt.)-Lösung verrührt:

Spaltung nach 72 Stdn.	Samenhälften		stark gekeimte Samen	
	ohne Keimling	mit Keimling	ohne Keimlinge	Keimlinge
	51 pCt.	40 pCt.	3 pCt.	1 pCt.

Aus dem Versuche geht hervor, dass während der Keimung in der dem Keimling benachbarten Samenhälfte das Enzym schwächer, in der entfernteren Samenhälfte stärker wirksam ist. Man kann also schon hier eine gewisse sehr geringfügige Trennung von schwächer und stärker spaltenden Samenhälften vornehmen: eine biologisch recht interessante, practisch allerdings unverwerthbare Thatsache.

Im stark gekeimten Samen ebenso wie im Keimling ist so gut wie gar kein Ferment mehr vorhanden, d. h. in dem Lebensprocess der Ricinusbohne wird in dem Maasse, wie das Ricinusöl zum Wachsthum des Keimlings aufgebraucht wird, auch das Ferment nach Ausnutzung seiner spaltenden Function unwirksam.

Ein weiterer Fingerzeig für die Bearbeitung der Themas beruht in der Feststellung der Thatsache, dass das bei dem Pressen von Ricinussamen erhaltliche trübe Oel wirksame Bestandtheile enthält. Diese feine Trübung setzt sich speciell bei dem Ricinusöl in Folge seiner hohen Viscosität nur langsam ab. Durch Verdünnen mit Aether oder Schwefelkohlenstoff und Filtriren kann man ein feines Pulver gewinnen, welches hohe fettspaltende Eigenschaften besitzt.

Versuch 2 am 7. 11. 02.

50 g frisch gepresstes trübes Ricinusöl wurden mit 10 g Essigsäure (2 pCt.) angerührt.

Spaltung nach 24 Stdn.	75 pCt.
------------------------	---------

Obiger Versuch liess vermuthen, dass man event. durch Zuführung von grossen Mengen Oel zu dem gemahlene Ricinussamen und durch wiederholtes Anrühren und Pressen grössere Mengen Ferment herausholen könnte.

Versuch 3 am 28. 11. 02.

200 g Cottonöl und 100 g Ricinussamen entschält und entölt (= 50 pCt. vom Oel) wurden mit 100 g Sand $\frac{1}{2}$ Std. verrieben und durch ein dünnes Leinentuch gepresst. Das so erhaltene trübe Pressöl wurde

- a. für sich mit 20 pCt einer 2-procentigen Essigsäure angerührt: Spaltung nach 3 Stdn. 81 pC.,
- b. mit dem 5-fachen Gewicht Cottonöl und 20 pCt. der obigen Essigsäure verrührt: Spaltung nach 20 Stdn. 82 pCt.

Wurde das trübe Oel klar filtrirt mit Säurewasser angerührt, so erfolgte keine Spaltung. Von dem weissen Filtrückstand wurden 0.1 g mit 10 g Ricinusöl und 2 ccm Essigsäure (2 procentig) angesetzt: Spaltung nach 16 Stdn. 70 pCt. nach 2 Tagen 80 pCt.

Das Anreiben mit Oel und Auspressen kann nun solange fortgesetzt werden, bis bei dem Auspressen nur noch wenig oder gar keine Samentheile mehr durch das Tuch hindurchgehen. Man behält schliesslich einen kleinen Samenrückstand, welcher aus groben Samentheilen und Samenhäutchen besteht und nur noch sehr schwache fettspaltende Wirkung besitzt.

Anstatt Oel, kann man man zum Anreiben auch angesäuertes Wasser benutzen. Der Effect ist derselbe; nur dass man beim Auspressen jetzt nicht mehr ein trübes Oel, sondern eine milchartige Emulsion erhält.

Versuch 4 am 19. 2. 04.

33 g geschälter und ölhaltiger Samen wurden mit ca. 80 ccm einer 0.1-procentigen Essigsäure (30°) verrieben und die entstandene Emulsion durch dünnes¹⁾ Leinen gepresst. Der Rückstand wurde wiederum mit Essigsäure angerührt, ausgepresst u. s. f. Die Procedur wurde 6—7 Mal wiederholt. Im Ganzen wurden 540 g Essigsäure verwandt und die so erhaltene Milch mit 900 g Leinöl verrührt. Die Samenmenge betrug somit 3.6 pCt. vom Oel, die Wassermenge 60 pCt.

Spaltung nach 24 Stunden. 79 pCt.

In den Rückstand waren 26 pCt. der Trockensubstanz des oben angewandten Samens zurückgeblieben. Dass in diesem, trotz des wiederholten Auswaschens, wirksame Bestandtheile ihrer Ausnutzung entzogen waren, ergab ein Spaltungsversuch, bei welchem in 24 Stunden noch eine Spaltung von 12 pCt. erzielt wurde.

Versuch 5 am 22. 2. 04.

Um die mühsame Manipulation des wiederholten Pressens zu umgehen, wurde versucht, die bei dem Anreiben von ölhaltigen Samen mit dünner Essigsäure sich ergebende Emulsion auf der Centrifuge zu separiren. Man erhält so zu oberst eine weisse, sahnenartige Ricinusölemulsion. Diese wurde in verschiedenen Verhältnissen mit je 100 g Leinöl und 30 g einer 0.25-procentigen Essigsäure angerührt und ergab:

¹⁾ Ein zu dichtes Gewebe lässt bei dem Pressen zu wenig wirksame Samenbestandtheile hindurch.

Bei einem Zusatz der Ricinusoëlemulsion von	nach	1	2	5 Tagen
10 pCt.		54 pCt.	74 pCt.	86 pCt.
15 pCt.		76 pCt.	87 pCt.	—

Das bei dem Centrifugiren abfallende trübe Wasser enthielt kein wirksames Ferment mehr, wohl aber der feste Rückstand. Dagegen waren beträchtliche Mengen albuminöser Samentheile in Lösung gegangen, sodass es möglich erscheint, durch saures Wasser unwirksame Bestandtheile aus dem Samen herauszulösen und auf diese Weise den Samen vorzureinigen¹⁾.

Es wurde ferner versucht, mittels Schlämmen in verschiedenen Solventien eine Trennung der Samenbestandtheile nach ihrem specifischen Gewicht zu erzielen.

Rührt man den zermahlenden Samen mit Aether oder einem dünnflüssigen Oel, z. B. Cottonöl, an, so setzen sich zunächst auf dem Boden des Gefässes Schalenreste ab; darauf folgen grobe Samentheile, die dem Zerreiben entgangen sind; schliesslich setzt sich langsam eine ganz feine Samenmasse ab. Man kann so durch wiederholtes Schlämmen drei bis vier verschieden schwere Samenfractionen isoliren, die sich in ihrer spaltenden Kraft nur wenig von einander unterscheiden. Die oberste und feinste Samenfraction ist am fermentreichsten, die unterste am fermentärmsten. Eine scharfe Trennung der einzelnen Fractionen ist bei dieser Methode nicht möglich, und es gelingt hier höchstens, eine an activer Substanz mehr oder weniger angereicherte Samenfraction von einem relativ fermentarmen Rückstand zu trennen²⁾.

Das Resultat aller dieser Versuche möchte ich in folgende Worte zusammenfassen: Eine quantitative mechanische Isolirung des fettspaltenden Enzyms gelingt mittels der angeführten Methoden nicht, wohl aber eine gewisse Anreicherung, indem unwirksame Bestandtheile sich aus dem Samen entfernen lassen. Nicht zu vermeiden ist dabei eine infolge der Unvollkommenheit der Trennungsmethoden eintretende allgemeine Herabminderung der Enzymwirkung, welche in technischer Beziehung die Vortheile einer solchen Anreicherung vorläufig noch fraglich erscheinen lässt.

II. Das Zerreiben des Samens.

Eine grosse Serie von Versuchen galt der Klärung der Frage, ob längeres oder kürzeres Zermahlen des Ricinussamens auf die Höhe der Spaltung von Einfluss ist.

¹⁾ Diese Versuche wurden in unserem Laboratorium durch Hrn. Dr. F. Wiedermann ausgeführt.

²⁾ Nicloux hat sich diese Trennung nach dem specifischen Gewicht in einem neuerdings ihm ertheilten französischen Patent No. 335.902 v. 14. 10. 03. schützen lassen, indem er behauptet, eine Scheidung von wirksamem Protoplasma von völlig unwirksamem Aleuron erzielen zu können.

Dass hierbei nur geschälter Samen verwandt wurde, bedarf wohl kaum der Erwähnung, da die harten Schalen nur störend wirken konnten. Das Zermahlen des Samens wurde unter Zusatz von mässigen Quantitäten Oel oder Säurewasser vorgenommen, damit einerseits das Mahlen des Samens erleichtert, andererseits eine störende Ueberhitzung des Samens, wie sie ohne Zusatz von Oel oder Wasser eintrat, vermieden wird.

Die Versuche ergaben alle insgesamt, dass, wenn eine gewisse feine Zermahlung des Samens erreicht ist, ein weiteres Mahlen einen nur relativ wenig höheren Spaltungseffect erzeugt, der keinesfalls zu der zu leistenden Arbeit des Mahlens in einem Verhältniss steht. Dieses Versuchsergebniss steht in Uebereinstimmung mit der bereits erwähnten Thatsache, dass die Zellen des Ricinussamens sich überaus leicht zerstören lassen, wobei das Enzym rasch seine volle Wirkung entfalten kann.

Versuch 6 am 9. 11. 03.

50 g geschälter Samen werden einmal mit 50 g Cottonöl, ein zweites Mal mit 50 g Essigsäure (0.6-procentige) verrieben. Von Zeit zu Zeit wurden Proben gezogen und jedesmal 6.6 g der zermahlenden Samenmasse enthaltend 3.3 g Samen mit 100 g Cottonöl und 60 g Essigsäure (0.6-procentige) emulsionirt. Nach 24 Stunden war folgende Spaltung zu constatiren:

Der Samen war	5	10	15	20	25	30	45	Minuten
mit Oel	78	78	81	80	81	82	—	pCt.
mit Säurewasser zerrieben	78	83	83	83	84	84	84	» Spaltung erzielt.

Ein Zusatz von Sand während des Zerreibens befördert dasselbe nicht.

Für technische Zwecke empfiehlt sich demnach ein kurzes, aber energisches Zerreiben oder Zerquetschen des geschälten Samens, wie es mittels einer Farbenreibmühle oder Seifenpilirmaschine bestens erreicht wird.

III. Wichtigkeit des Säurezusatzes.

In unserer zu Anfang dieser Arbeit citirten ersten Mittheilung über diesen Gegenstand wurde ausgesprochen, dass die Anwesenheit von Säure oder sauren Salzen für den Spaltungsprocess erforderlich ist. »Das Concentrationsoptimum lag bei den hierher gehörigen, von uns untersuchten Säuren und Salzen zwischen $\frac{n}{10}$ bis $\frac{n}{3}$ «. Nach dem Stande unserer jetzigen Kenntniss über diesen Punkt ist es nothwendig, obigen Ausspruch durch den Zusatz »bei Anwendung von grösseren Mengen Samen« etwas zu modificiren. Sämmtliche Versuche waren dort mit sehr grossen Samenmengen (20—30 pCt. und mehr vom Oel) angestellt worden, d. h. unter Bedingungen, für welche

auch jetzt die dort angeführte hohe Säureconcentration volle Berechtigung hat.

Demgegenüber lehren die nachfolgenden neuesten Versuche, dass man bei richtiger Wahl der Säuremenge in der Samenmenge ganz bedeutend zurückgehen kann. Um diese Thatsache ganz genau zu ergründen, war es nothwendig, von einem ganz bestimmten Verhältniss von Samen- und Wasser-Menge zu der zu spaltenden Oelmenge auszugehen. Die stufenweise Abänderung der Säureconcentration ergab so ganze Tabellen, aus denen hervorgeht, dass zwischen der Samen- und absoluten Säure-Menge ein ganz bestimmtes Verhältniss besteht, und dass man bei Abänderung der Samenmenge zu gleicher Zeit auch die Säuremenge variiren muss. Auch bestehen zwischen den einzelnen untersuchten Säuren z. Th. recht bedeutende Unterschiede; so z. B. liegt das Concentrationsoptimum der sonst recht ähnlichen Ameisensäure und Essigsäure ganz verschieden:

Versuch 7 am 24. 11. 03.

Es wurden je 100 g Leinöl mit einer Emulsion aus 3.3 g geschältem und zerriebnem Ricinussamen und 60 ccm Ameisen- oder Essig-Säure verrührt. Die Spaltung nach 18—19 Stunden betrug bei einer

Säureconcentration von . . .	0.01	0.02	0.04	0.06	0.03 pCt.	
bei der Ameisensäure . . .	2	3	83	86	79 »	
» » Essigsäure	—	—	18	83	83 »	
Säureconcentration von . . .	0.10	0.15	0.20	0.30	0.50	0.70 pCt.
bei der Ameisensäure . . .	64	43	16	7	5	3.5 »
» » Essigsäure	84	—	—	73	56	41 »

Während also bei der Ameisensäure bei einer Concentration von 0.04 pCt. bereits annähernd das Spaltungsoptimum erreicht ist, erfordert die Essigsäure unter sonst gleichen Bedingungen eine Concentration von 0.06 pCt. Während aber bei Letzterer noch bei einer Concentration von 0.1 pCt. eine gleichmässig hohe Spaltung erzielt wird, ist bei der Ameisensäure bereits bei 0.08 pCt. eine Verminderung der Spaltung ersichtlich. Noch deutlicher tritt diese Verschiedenheit beider Säuren bei einer Verminderung der Samenmenge zu Tage, wobei natürlich gleichzeitig eine weniger hohe Spaltung des Oeles erreicht wird:

Versuch 8 am 26. 11. 03.

Je 100 g Leinöl wurden mit einer Emulsion aus 1.7 g geschältem Samen und 60 ccm Säure verrührt. Nach 18—19 Stunden betrug die Spaltung bei einer

Säureconcentration von . . .	0.02	0.04	0.06	0.08	0.10	0.30 pCt.
bei der Ameisensäure . . .	6	63	60	43	21	5 »
» » Essigsäure	2	15	65	66	67	37 »

Versuch 9 am 25. 11. 03.

Derselbe Versuch wurde angestellt unter Anwendung von nur 1 pCt. geschältem Samen. Die Spaltung nach 18—19 Stunden betrug bei einer

Säureconcentration von .	0.001	0.02	0.04	0.06	0.08	0.10 pCt.
bei der Ameisensäure .	2	16	41	30	16	6 »
» » Essigsäure . .	2	3	26	46	47	49 »

Eine Verminderung der zum Ansatz benutzten Wassermenge macht eine Erhöhung der Säureconcentration erforderlich:

Versuch 10 am 19. 1. 04.

Je 100 g Leinöl wurden mit 3.3 g Samen (entschält) und 30 g Essigsäure verrührt und ergaben bei einer

Säureconcentration von	0.10	0.12	0.14	0.16	0.18 pCt.	
in 22 Stdn. eine Spaltung von . .	72	79	81	83	83 »	
Säureconcentration von . .	0.20	0.22	0.24	0.26	0.28	0.30 pCt.
in 22 Stdn. eine Spaltung von	84	84	84	84	85	83 »

Während also bei 60 pCt. Wasser im Versuch 7 eine Concentration von 0.06 pCt. zur Erzielung des Spaltungsoptimums ausreichte, erfordern 30 pCt. Wasser annähernd eine Verdoppelung der Säureconcentration.

Sehr ähnlich in ihrer Wirkung sind Schwefelsäure und Oxalsäure. Von beiden Säuren wird das Optimum der Fettspaltung ziemlich gleich schnell erreicht und etwa gleich schnell wieder verlassen.

Versuch 11 am 8. und 11. 12. 03.

Es wurden je 100 g Leinöl mit 3.3 g Samen (geschält) und 40 g Säurewasser zugesetzt. Die Spaltung nach 19 Stunden war bei einer

Säureconcentration von	0.01	0.02	0.04	0.06	0.08	0.10	0.12 pCt.
bei Schwefelsäure . .	2	—	20	75	82	82	79
» Oxalsäure	—	3	46	71	76	77	74 »
Säureconcentration von	0.14	0.16	0.18	0.20	0.20	0.30 pCt.	
bei Schwefelsäure	67	45	—	8	3	»	
» Oxalsäure	63	45	21	7	3	»	

Die beiden Versuchsreihen zeigen hinsichtlich der Höhe der Spaltung gewisse Unterschiede, d. h. Oxalsäure scheint die Spaltung weniger zu begünstigen als Schwefelsäure. Ich glaube jedoch nicht, dass dieser Unterschied ein thatsächlicher ist, sondern dass er mehr ein zufälliger ist. Da die Versuchsreihen nicht zu gleicher Zeit angesetzt wurden, so kann der Unterschied sehr wohl durch verschiedene Ansatztemperatur bewirkt sein. Aus Versuch 14 ist zu ersehen, dass auch mit Oxalsäure unter sonst gleichen Bedingungen eine höhere Spaltung zu erzielen ist.

Ganz abweichend von den bisher betrachteten Säuren verhält sich dagegen Buttersäure. Für diese ist zur Erreichung des Spaltungsoptimums

timums eine weit höhere Concentration nothwendig. Aber auch noch wesentlich höhere Concentrationen sind noch nicht von störendem Einfluss auf die Höhe der Spaltung, d. h. Buttersäure lässt in dieser Beziehung den grössten Spielraum zu.

Versuch 12 am 14. 12. 03.

Je 100 g Leinöl wurden mit einer Emulsion aus 3.3 g geschältem Samen und 40 g Säurewasser verrührt.

Concentration der Buttersäure .	0.01	0.05	0.10	0.20	0.30	0.5	1 pCt.		
Spaltung nach 19 Stdn.	2	3	24	69	87	87	85	»	

Auch die absolute Spaltungshöhe ist bei der Buttersäure unter den untersuchten Säuren die höchste, sodass man vielleicht hoffen darf, dass sich schliesslich eine noch geeignetere Säure als Buttersäure wird finden lassen. Untersuchungen nach dieser Richtung sind noch im Gange.

Dass die Schnelligkeit der Spaltung eine Function der Samenmenge ist, beweist der nächstfolgende Versuch:

Versuch 13 am 6. 1. 04.

100 g Cottonöl wurden mit 3.5 g geschältem Ricinussamen und 30 g einer 0.1-procentigen Oxalsäure emulsionirt.

Spaltung nach 21 Stdn. 77 pCt.

Der Versuch wurde mit der Abänderung wiederholt, dass nicht 100 g, sondern nur 50 g Cottonöl verwendet wurden.

Spaltung nach 6 Stdn. 79 pCt.

Durch Verdoppelung der Samenmenge ist demnach eine vierfache Beschleunigung der Fermentwirkung erzielt worden. Aus demselben Versuche geht hervor, dass die absolute Säuremenge, nicht aber die Säureconcentration von Bedeutung ist. Specieell bewiesen wurde dies durch den nächsten Versuch:

Versuch 14 am 4. 1. 04.

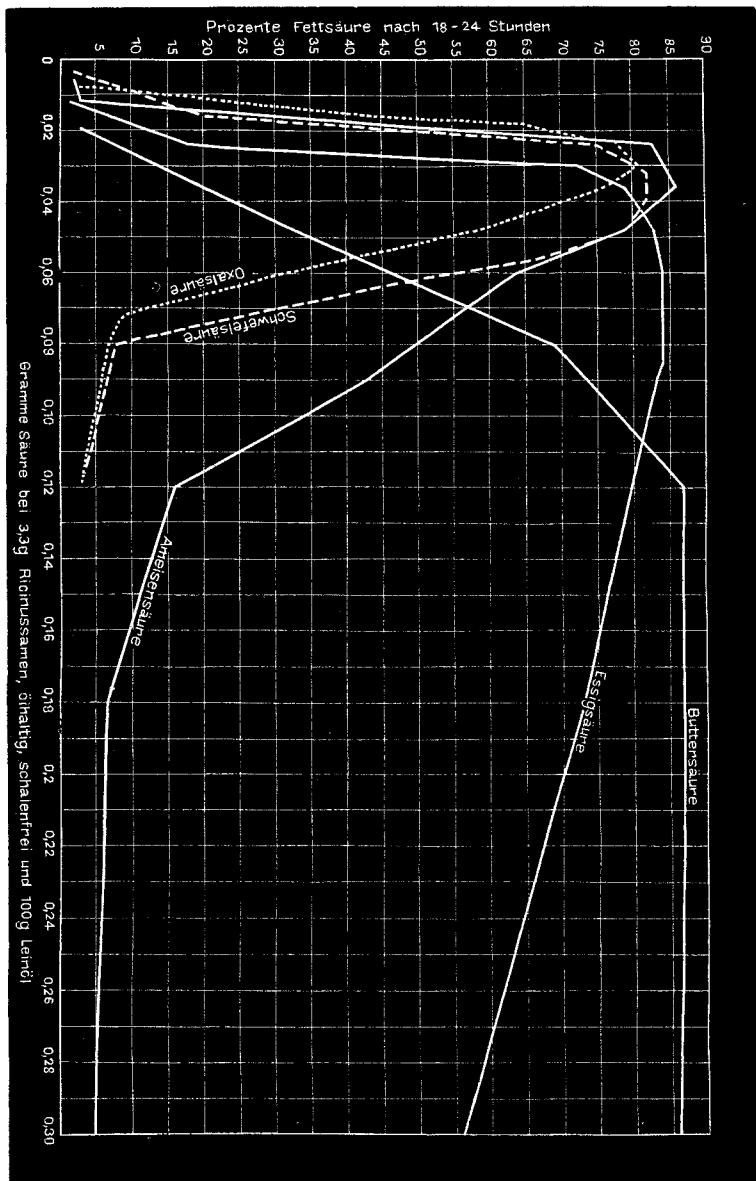
Je 100 g Leinöl wurden mit einer Emulsion aus 3.3 g geschältem Samen und 30 resp. 60 g Oxalsäure-Lösung verrührt. Bei einer Säureconcentration von

	0.16	0.14	0.12	0.10	0.08	0.06	0.05	0.04	0.03 pCt.		
betrug die Spaltung bei Anwendung von											
Wasser .	30 pCt.	72	73	78	81	78	72	—	—	—	»
	60 »	—	—	9	32	59	76	81	78	64	»

d. h. während zur Erzielung des Spaltungsoptimums bei 30 g Wasser eine Concentration der Oxalsäure von 0.1 pCt. erforderlich ist, genügt bei 60 g Wasser eine Concentration von 0.05 pCt.

Hieraus lässt sich folgende technische Nutzenanwendung ziehen: Man wird in der Wassermenge soweit zurückgehen, als es ohne Schädigung der Spaltungshöhe geschehen kann, und erreicht damit, nach Trennung des Ansatzes eine grösstmögliche Glycerinconcentration.

Um nun die Wirkungen der verschiedenen Säuren miteinander vergleichen zu können, ist es zweckmässig, die Spaltungsresultate gra-



phisch zu veranschaulichen. Auf der beigefügten Zeichnung sind auf der Ordinate die Procente gebildeter Fettsäure, auf der Abscisse die

für eine Spaltung von 100 g Leinöl mittels 3.3 g geschältem, ölhaltigem Samen nothwendigen absoluten Säuremengen in Grammen aufgetragen. Diese Umrechnung in Gramme Säure ist nur ein Nothbehelf. Die vorstehenden Versuchstabellen waren untereinander nicht ganz vergleichbar, da mit verschiedenen Mengen Wasser gearbeitet wurde. Wie durch Versuch bewiesen worden, ist die Menge des zur Spaltung verwandten Wassers unwesentlich; allein maassgebend ist lediglich die absolute Säuremenge; und daher ist obige Umrechnung berechtigt. Die Versuche sind ferner nicht nach genau gleicher Zeit unterbrochen, auch nicht bei absolut gleicher Temperatur angestellt worden, wodurch natürlich gewisse Fehler nicht zu vermeiden waren. Trotzdem zeigt das obige Bild so auffallende Gesetzmässigkeiten, dass man wohl berechtigt ist, aus demselben allgemeine Schlussfolgerungen zu ziehen:

1. Für eine bestimmte Samen- resp. Ferment-Menge ist eine bestimmte absolute Menge Säure zur Erzielung eines optimalen Spaltungseffectes nothwendig.

2. Alle oben geprüften Säuren (Schwefel-, Oxal-, Ameisen-, Essig-, Butter-Säure) sind in annähernd gleicher Weise zur Auslösung der Enzymwirkung befähigt.

3. Die Grenzen, innerhalb welcher die absolute Säuremenge schwanken darf, sind für die einzelnen Säuren verschieden und scheinen von der Dissociationsfähigkeit der Säuren abzuhängen. Stark dissociirte Säuren verlangen genau einzuhaltende Mengenverhältnisse, schwächer dissociirte Säuren gestatten grössere Schwankungen.

4. Der Umstand, dass zur Erzielung des Spaltungsoptimums bei gleicher Samenmenge eine bestimmte Mindestmenge einer Säure nothwendig ist, lässt vermuthen, dass während der Fettspaltung die Säure mit dem Samen in chemische Wechselwirkung tritt.

Wie bereits in der ersten Mittheilung erwähnt worden war, kann man auch anstatt Essigsäure, Ameisensäure etc. mit Fettsäure Spaltungen erzielen, nur muss man dann relativ sehr viel mehr Säure anwenden. Im nachfolgenden Versuche wurde nun unter Fortlassung der sonst benutzten Säure zum neuen Ansatz eine gewisse Menge eines alten Ansatzes, in welchem eine Spaltung bereits erfolgt war, zugegeben.

Versuch 15, am 22. Februar 1904.

Je 100 g Leinöl wurden mit 3.3 g geschälten Samen und 30 g Wasser, sowie mit verschiedenen Mengen eines alten Leinölansatzes emulsionirt:

Bei Zusatz von	Fettsäuregehalt	Spaltung nach		
		zu Anfang	1	2
100 pCt.	34 pCt.	70	79	91 pCt.
50 »	21 »	49	72	91 »
25 »	12 »	19	46	87 »

des alten Ansatzes

Der Versuch lehrt, dass eine technisch genügende Spaltung auch hier, wenn auch erst nach längerer Zeit, erfolgt. Praktisches Interesse hat der Versuch nicht, da man den Zusatz von Säure (Schwefelsäure oder Oxalsäure) zur Trennung der Emulsion doch nicht umgehen kann und somit immer etwas Säure in das Glycerinwasser hineinbekommt.

Ein Versuch, Kohlendioxyd anstatt der üblichen Säure anzuwenden, führte dagegen zu keinem Resultat. Nach 5 Stunden war eine Fettsäurezunahme von nur 2 pCt. zu constatiren.

Es ist überaus interessant, dass ähnliche Gesetzmässigkeiten bezüglich der Säureconcentration auch für die längst bekannten proteolytischen Enzyme der Pflanzensamen festgestellt worden sind. So z. B. verlangt das durch Fällen von Ananassaft mit Kochsalz erhaltliche Bromelin¹⁾ bei Verdauungsversuchen, welche mit rohem Eieralbumin angestellt wurden, genau bestimmte Säureconcentrationen, welche bei den einzelnen Säuren innerhalb verschiedener Grenzen liegen. Das Säureoptimum der Salzsäure liegt z. B. bei 0.025 pCt., das der Essigsäure zwischen 0.25—1 pCt.

Wie in unserer ersten Mittheilung über fermentative Fettspaltung angedeutet wurde, könnte man sich sehr wohl vorstellen, dass die sich während der Keimung des Pflanzensamens bildende Säure²⁾ die bis dahin ruhende Enzymwirkung des Samens auslöst und gleichzeitig sowohl die Hydrolyse der aufgespeicherten Eiweissstoffe, wie die der Fette bewirkt.

Laboratorium der Vereinigten chemischen Werke, Actiengesellschaft.
Im März 1904.

226. August Klages und Sebastian Heilmann: Arylirte Aethylene und ihre Reduction zu Arylparaffinen.

(Eingegangen am 24. März 1904.)

Vor etwa Jahresfrist hat der Eine von uns eine Synthese diarylylirter Aethylene, zu denen auch die symmetrisch gebauten Stilbene gehören, in diesen »Berichten« (35, 2646 [1902]) beschrieben und durch typische Beispiele belegt. Wir haben inzwischen das Studium dieser Reaction³⁾ in der üblichen Weise weitergeführt. Da Hr. Hell⁴⁾

¹⁾ Vergl. Green-Windisch »Die Enzyme«, S. 201.

²⁾ Vergl. ebenda, S. 209.

³⁾ Heilmann, Dissert., Heidelberg 1904.

⁴⁾ Diese Berichte 37, 227, 453 [1904].