

nach obigem Verfahren mit Eisenchlorid tiefviolette Nadeln der Zusammensetzung 2 [Anisal-(o-chlor-benzal)-aceton]:1 FeCl₃ ergab: Schmp. 155—156° u. Z.

0.1828 g Sbst.: 0.0195 g Fe₂O₃, 0.1083 g AgCl.

C₃₆H₃₀O₂Cl₄Fe. Ber. Cl 14.69, Fe 7.7. Gef. Cl 14.65, Fe 7.4.

Uranylchlorid.

Addukte mit Uranylchlorid sind besonders schön und leicht zu erhalten. Versetzt man z. B. eine Lösung von Dibenzal-aceton in Eisessig mit einer ebensolchen von Uranylchlorid, so scheiden sich alsbald kleine, goldgelbe Blättchen von der Zusammensetzung [(C₆H₅.CH:CH)₂CO]₂·UO₂Cl₂ aus. Schmp. 264° unter Zersetzung, die schon gegen 200° deutlich erkennbar ist.

8.68 mg Sbst.: 3.0 mg U₃O₈. — C₃₄H₂₈O₄Cl₂U. Ber. U 29.45. Gef. U 29.32.

Noch leichter gelingt in analoger Weise die Darstellung der entsprechenden Verbindung aus Dianisal-aceton, [(p-)CH₃O.C₆H₄.CH:CH)₂CO]·UO₂Cl₂, welche violettrote, sechseckige Blättchen bildet, die beim Erhitzen im Röhrchen von 150° ab Zersetzungserscheinungen aufweisen, aber erst gegen 258° schmelzen.

0.1492 g Sbst.: 0.0450 g U₃O₈. — 6.6324 mg Sbst.: 1.9964 mg U₃O₈.

C₃₈H₃₆O₈Cl₂U. Ber. U 25.7. Gef. U 25.58, 25.54.

Addukte mit Vanadin(2)-chlorid.

Hier gelang es nur, die Verbindung mit Dianisal-aceton zu fassen. Dieselbe krystallisiert aus Eisessig in braungelben Nadeln und enthält ebenfalls 2 Mol Keton auf 1 VCl₂.

0.0509 g Sbst.: 0.0065 g V₂O₅.

[(p-)CH₃O.C₆H₄.CH:CH)₂CO]·VCl₂. Ber. V 7.2. Gef. V 7.06.

Erlangen und Bonn.

54. R. Fricke und P. Kaja¹⁾: Über Ferment-Reinigung durch Elektro-Dialyse und Elektro-Osmose, I.: Malz-Diastase.

[Aus d. Chem. Institut d. Universität Münster i. W.]

(Eingegangen am 14. Dezember 1923.)

Die Schwierigkeiten und Umständlichkeit der bisher zur Ferment-Reinigung verwandten Methoden, nicht zuletzt auch der in Willstätters Hand so erfolgreichen Methode der auswählenden Adsorption, legten den Gedanken nahe, ob bei Fermenten nicht eine Reinigung auf elektrolytischem und elektroosmotischem Wege einfacher zum Ziele führe. Als erstes Versuchsobjekt wählten wir Malz-Diastase, deren Reinigung bisher meist durch Fällung und Dialyse vorgenommen wurde²⁾, und erzielten hier auch bald gute Erfolge.

Als Ausgangspräparat diente uns die sogen. »Diastase absolut« von Merck. Diese stellt ein leicht gelblich-graues Pulver dar, welches mit einem unlöslichen Rückstand von ca. 12% der angewandten Menge in Wasser von Zimmertemperatur gut löslich ist. Die Lösung besitzt braune Farbe und gibt kräftige Eiweiß-Reaktionen (Fällungs- und Färbungsreaktionen). Der N-Gehalt des Präparates

¹⁾ Dissertat., Münster 1923.

²⁾ vergl. über Reinigung von Malz-Diastase bei Euler »Chemie der Enzyme«, II. Teil, 1. Abschnitt [1922], S. 110 ff.

betrug 6,14%, der Aschengehalt 5,05%. In der Asche wurden gefunden: Ca, Mg, K, PO_4 , Cl, Spuren von Na und SO_4 . Zur Konservierung der Lösungen wurde Toluol verwandt, nachdem seine Unschädlichkeit auf die Aktivität von in Lösung befindlicher Malz-Diastase nachgewiesen war.

Die Aktivität des Präparates bzgl. Stärke-Abbau war so, daß 1 ccm 5-proz. Diastase-Lösung 10 ccm einer 1-proz. Lösung von löslicher Stärke

Zeit nach Herstellung der Lösung	Abbauzeit von 10 ccm 1-proz. Stärke-Lösung mit 1 ccm 5-proz. Diastase-Lösung
1. Tag	75 Minuten
2. "	70 "
3. "	64 "
5. "	56 "
6. "	52 "
7. "	54 "
8. "	55 "
12. "	55 "
18. "	55 "

(Kahlbaum) bei Zimmertemperatur (23°) in 55 Min. bis zum vollkommenen Verschwinden einer Färbung mit Jod abbaute. Diese Zahlen galten aber nur für einige Tage alte Diastase-Lösungen, denn es zeigte sich, daß die Aktivität der bei Zimmertemperatur stehenden Diastase-Lösungen in den ersten Tagen nach der Herstellung bis zu einem ziemlich konstanten Maximalwert zunahm. Diese Verhältnisse mögen etwas illustriert werden durch die Tabelle, in der die Ab-

bauzeiten für die eben erwähnten Konzentrationen an verschiedenen Tagen nach Herstellung der Fermentlösung wiedergegeben sind.

Erste Reinigung (durch Elektrodialyse).

Für die erste Reinigung des Fermentes wurde ein elektrolytischer Dreizellenapparat aus Steinzeug⁹⁾ benutzt. Die zur Aufnahme der Fermentlösung bestimmte Mittelzelle wurde von den beiden seitlichen Elektrodenzellen getrennt durch zwei Kollodium-Membranen, die durch gleichmäßiges Aufgießen von etwa 33 ccm 12-proz. Eisessig-Kollodium-Lösung auf eine Glasplatte von 14×18 cm und Ausgelatinieren durch vorsichtiges Einlegen der Glasplatte in kaltes Wasser hergestellt waren. Vor dem Gebrauch blieben die Membranen noch eine Reihe von Tagen in häufiger gewechseltem destilliertem Wasser liegen. Ihre Undurchlässigkeit für Malz-Diastase wurde durch besondere Ultrafiltrationsversuche festgestellt. Als Anode wurde Lichtbogenkohle, als Kathode ein Eisendrahtnetz benutzt.

Bevor der Apparat zur Fermentreinigung diente, wurde nach Füllung aller Zellen mit destilliertem Wasser unter 220 Volt Klemmenspannung mehrere Tage Strom hindurchgeschickt, wobei wir das Wasser in den Elektrodenzellen häufiger erneuerten. Diese Behandlung bewirkte sowohl die Austreibung der zellen in den Membranen noch haftenden Essigsäure-Reste, als auch eine gewisse Reinigung der Anodenkohle.

Es wurde nun der Mittelraum mit je nachdem 1—5-proz. neutraler Fermentlösung, die beiden Seitenzellen mit frischem destilliertem Wasser beschickt und eine Klemmenspannung von 220 oder in anderen Versuchen 22 Volt angelegt. Die mit einem Milliampèremeter verfolgte Stromstärke war zuerst minimal, stieg aber bald durch Abwandern von Elektrolyt aus der Mittelzelle in die Elektrodenräume an. Hatte die Stromstärke eine gewisse Größe erreicht (0,0045—0,006 Amp. pro qcm), so wurde das destillierte Wasser in den Elektrodenräumen erneuert, wodurch die Stromstärke wieder bis fast auf Null sank, dann erneut anstieg und so fort. Die Erneue-

⁹⁾ Bezogen von den Deutschen Ton- und Steinzeugwerken, Berlin-Charlottenburg.

rung des Wassers der Außenzellen hatte neben der Entfernung der aus dem Ferment abgewanderten Elektrolyte die Bedeutung, daß durch die so bewirkte Kleinhaltung der Stromstärke die Temperatur im Mittelraum nicht zu hoch stieg (nicht über 30°) und so eine Schädigung des Fermentes durch zu hohe Temperatur vermieden wurde.

Das Wiederansteigen der Stromstärke nach Füllung der Elektrodenräume mit destilliertem Wasser ließ um so mehr nach, je weniger Elektrolyt aus dem Ferment noch abwanderte, d. h. je weiter die Reinigung fortschritt. Das Durchleiten des Stromes wurde fortgesetzt, bis die Stromstärke nicht mehr merklich über die bei Füllung des Troges mit destilliertem Wasser vorhandene anstieg, d. h. bis kein Elektrolyt mehr aus dem Ferment entwich, was in einigen Tagen erreicht war.

Bei diesen »elektrodialytischen« Reinigungen zeigte die Fermentlösung stets folgende Veränderung: Sie trübte sich nach einiger Zeit und ließ einen weißlichen, flockigen Niederschlag fallen, wobei die braune Lösung wesentlich hellerfarbig wurde. Der Niederschlag erwies sich durch die Art seines Ausfallens und durch starke Eiweiß-Reaktionen als mindestens teilweise aus Globulinen bestehend.

Nach beendeter Reinigung und Abfiltration des Niederschlages war der Trockengehalt der Lösung in der Mittelzelle stets beträchtlich vermindert, nämlich auf 13—18% des ursprünglichen. Das darin noch vorhandene Ferment dagegen hatte seine Aktivität auf das 2.1—2.5-fache des Ausgangspräparates erhöht (beurteilt nach den Zeiten bis zum Verschwinden jeder Färbung mit Jod bei Vergleichsansätzen mit gleichem Trockengehalt an Ferment, gleichem Stärkegehalt und gleichem Gesamtvolum).

Zur weiteren Untersuchung wurde die gereinigte Fermentlösung durch vorsichtiges (langsames), teilweises Ausfrierenlassen konzentriert. Es zeigte sich nun, daß die Fermentlösung keine Eiweiß-Reaktionen⁴⁾ mehr gab bis auf eine ganz schwache Millonsche Reaktion. Die Reaktion auf Kohlenhydrate nach Molisch war dagegen stark positiv. Der Aschengehalt war von 5 auf 1% gesunken. In der Asche wurden nur noch nachgewiesen: K, PO₄ und SO₄. Der N-Gehalt hatte sich von 6.14 auf 3.51% vermindert.

Zweite Reinigung (durch Elektrosmose).

Es mußte weiterhin möglich sein, das seinem Verhalten nach offenbar kolloide Ferment im Stromgefälle elektrosmotisch zum Wandern zu bringen und es so von beigemengten anderen Kolloiden, die entgegengesetzt oder aber gleichgerichtet schneller bzw. langsamer wanderten, zu trennen. Nach Michaelis⁵⁾ wandert die Diastase bei neutraler und saurer Reaktion vorwiegend kathodisch, bei alkalischer anodisch. Wir hatten demnach in den von uns verwandten neutralen Lösungen eine positive Ladung des Fermentes zu erwarten.

Es wurde nun die der ersten Reinigung unterworfen gewesene Lösung (z. B. 0.7-proz.) in den Mittelraum eines elektrosmotischen 5-Zellenapparates gebracht. Die Grenzen des Mittelraumes nach den beiden Nachbarzellen zu bestanden aus Pergamentmembran oder aus mit 2-proz. Eisessig-Kollodium-Lösung imprägniertem, in Wasser ausgelatiniertem und gut ausgewaschenem Filtrierpapier, d. h. aus Materialien, deren Durchlässigkeit für

⁴⁾ Negativ waren Biuret- und Xantoprotein-Reaktion, außerdem die Fällungsproben mit Uranylacetat, Bleiacetat und Phosphorwolframsäure.

⁵⁾ Bio. Z. 17, 231 [1909].

Malz-Diastase im Ultrafiltrationsapparat festgestellt war. Die Grenzen der Seitenzellen gegen die Elektrodenräume dagegen bestanden wieder aus den für Diastase undurchlässigen 12-proz. Eisessig-Kolloidum-Membranen.

Nach Füllung aller Räume bis auf den mit Fermentlösung beschickten Mittelraum mit destilliertem Wasser wurde 22 Volt Klemmenspannung angelegt. Nach etwa 5 Tagen hatte sich der Stoff folgendermaßen auf die 3 mittleren Zellen verteilt: 39% waren in der Mittelzelle geblieben, 32% in die der Anode benachbarte Zelle gewandert und nur 16% in die der Kathode benachbarte. Die restlichen etwa 13% saßen in der Membranfeuchtigkeit oder adsorptiv in den Membranen oder in den Elektrodenräumen. Die Aktivität des Stoffes in der Mittelzelle war von 2.4 auf 0.8 gesunken (bezogen auf die Stärke-Abbaugeschwindigkeit des Ausgangspräparates = 1 vergl. oben). Das anodisch gewanderte Material zeigte überhaupt keine Aktivität. Dagegen handelte es sich bei den 16% kathodisch gewandelter Substanz um eine hoch-reine Diastase, deren Aktivität 4.6 (gegen das Ausgangspräparat = 1) betrug.

Auch bei diesem reinsten Präparat waren die Eiweiß-Reaktionen bis auf schwache Millonsche Reaktion negativ, die Molischsche Reaktion auf Kohlenhydrate sehr stark positiv⁶). Die Verbrennung ergab: 56.4% C, 7.9% H, 3.28% N.

Versuche, die elektroosmotische Reinigung mit 220 Volt Klemmenspannung vorzunehmen, schlugen fehl, indem sich hierbei lediglich die Aktivität in der Mittelzelle verringerte, in keiner anderen Zelle aber Aktivität auftrat⁷). Es ist anzunehmen, daß bei dem hier in den Membranen vorhandenen hohen Spannungsgefälle (hoher Widerstand der Membranen, das Ferment beim Durchwandern evtl. als guter Depolarisator durch eine Art Elektrostenolyse zerstört wurde. Durch Adsorption an den Membranen traten ebenfalls stets Verluste auf.

Die Versuche werden sowohl für Malz-Diastase, als auch für andere Fermente fortgesetzt. Hefe-Autolysat erfuhr z. B. schon bei der ersten Reinigung Vervierfachung der Invertin-Aktivität bei Verschwinden der Eiweiß-Reaktionen bis auf schwache Xanthoprotein-Reaktion (Versuche von Frh. E. Hofmeister).

Münster i. W., den 10. Dezember 1923.

55. R. Fricke und P. Kaja¹): Über Inhomogenität und sonstige Eigenschaften von Malz-Diastase.

[Aus d. Chem. Institut d. Universität Münster i. W.]

(Eingegangen am 14. Dezember 1923.)

Nach Eulers auf Grund der bisherigen Literaturangaben wohl begründeter Auffassung²) besteht die Malz-Diastase aus mindestens 2 verschiedenen Komponenten, einer stärke-verflüssigenden und einer die verflüssigte Stärke bis zur Maltose abbauenden. Die bisherige Wahrscheinlichkeit dieser Auffassung mußte zur Gewißheit werden, wenn man die Unabhängigkeit dieser 2 Wirkungen der Diastase voneinander unzweideutig nachweisen konnte.

⁶ Dies steht in Übereinstimmung mit einem Befund von Fränkel und Hamburg, Hofm. Beitr. 8, 389 [1906].

⁷ vergl. ähnliche Beobachtungen von Fränkel und Hamburg, l. c., bei 110 Volt Klemmenspannung.

¹ Dissertat., Münster i. W. 1923.

² Euler, Chemie der Enzyme II 1, S. 116 ff. [1922]; vergl. auch U. Olsson, H. 126, 29 [1922].