

149. R. Fricke: Über die Reinigung von Malz-Diastase durch Elektrodialyse und Elektroosmose (II.)¹⁾.

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

(Eingegangen am 18. März 1924.)

Da bei einem anderen, von der Firma E. Merck bezogenen Präparat »Diastase absolut« (ebenfalls hergestellt nach dem Verfahren von Lintner²⁾) die früher beschriebene Reinigung durch Elektrodialyse im Drei-zellen-Apparat bei Vergrößerung der die Fermentlösung aufnehmenden Mittelzelle, sowie bei Erhöhung der Konzentration der Fermentlösung auf Schwierigkeiten zu stoßen schien, wurde eine systematische Untersuchung der Quellen der auch schon früher beobachteten starken Fermentverluste bei der Reinigung vorgenommen, die zur Möglichkeit der Einhaltung wesentlich günstigerer Arbeitsbedingungen führte.

I. Das Membran-Material.

Um zu wirklich für Malz-Diastase vollkommen undurchlässigen Kollodium-Membranen zu gelangen, erwies es sich als erforderlich, jede Bläschenbildung oder sonstige Inhomogenität in der Eisessig-Kollodium-Schicht beim Ausgelatinieren in Wasser zu vermeiden³⁾. Vor allem ersteres hatte gewisse Schwierigkeiten. Schließlich gelang es mir in folgender Weise, ein stets einwandfreies Material zu erhalten:

Verwandt wurde eine vollkommen klare und bläschenfreie Lösung von 17 g Kollodiumwolle in 100 ccm Eisessig + 10–12 ccm 96-proz. Alkohols. (Zur letzten Sättigung verwendet man hier zweckmäßig trocknen Kollodiumstaub.) Von dieser sehr zähen-Flüssigkeit wurde eine zur Bildung der betr. Membranfläche genügende Menge vorsichtig auf eine genau horizontal gelagerte Glasscheibe gegossen und 3–4 Stdn. an der Luft liegen gelassen. Die Lösung breitete sich dann gleichmäßig aus und trocknete an der Oberfläche etwas ein. Nach dieser Zeit wurde die Platte in kaltes Wasser gelegt, wo die Kollodium-Membran ausgelatinierte und sich bald spontan vom Glase löste. Nach mehrtägigem Wässern der Membranen in destilliertem Wasser wurden sie so benutzt, daß ihre glatteste Fläche, d. h. die, welche vorher der Glasplatte angelegen hatte, der Fermentlösung, die andere dem Elektrodenraum zugekehrt war.

II. Das Anoden-Material.

Während für die Kathode ruhig ein Eisendrahtnetz Verwendung finden konnte, handelte es sich für die Anode, da mir kein »unangreifbares« Material zur Verfügung stand, darum, eine von Schwermetall-Verunreinigungen möglichst freie Kohle zu finden. Als gut brauchbar erwiesen sich von der Firma Gebr. Siemens & Co., Berlin-Lichtenberg, gelieferte Elektroden aus künstlichem Graphit, die nur eine verschwindende Menge Eisen enthielten, jedenfalls viel weniger von diesem in Salzform für Malz-Diastase sehr giftigen Material, als die früher verwandte Lichtbogenkohle.

III. Die pH-Bedingungen.

Als Hauptschädigungsquelle erwiesen sich die während der Elektrodialyse im Mittelraum sich herausbildenden pH-Verhältnisse, vor allem eine von der Anodenseite ausgehende und sich über den größeren Teil des

¹⁾ I.: Fricke und Kaja, B. 57, 310 [1924].

²⁾ vergl. z. B. Euler, »Chemie der Enzyme« II, I [1922], S. 111.

³⁾ Hauptsächlich bei der an der Kathodenseite gebrauchten Membran, weil diese durch die sich im Kathodenraum bildende Alkalihydroxyd-Lösung angegriffen wird.

Mittelraumes ausdehnende, starke Säuerung. Während nämlich Malz-Diastase bei Zimmertemperatur im alkalischen Gebiet noch bis jenseits $p_H = 10$ relativ gut haltbar ist, wird sie im sauren Gebiet schon bei Wasserstoffionen-Konzentrationen, die nur sehr wenig über der des Aciditätsoptimums, d. h. also unter $p_H = 4.5-4.7$ liegen, stark und schnell geschädigt. Diese Schädigung konnte in folgender Weise vermieden werden:

Der Anodenraum wurde wesentlich (ca. 6-mal) größer gemacht als der Kathodenraum⁴⁾. Dabei wurde die Anode, bestehend aus 3 durch Zwischenräume getrennten Graphitstäben, an das äußere Ende des Anodenraumes, d. h. möglichst weit von der Membran entfernt, angebracht, die aus einem Eisendrahtnetz bestehende Kathode dagegen dicht neben der den Kathodenraum vom Mittelraum trennenden Membran. Ferner wurde während der Reinigung der Mittelraum dauernd kräftig gerührt. Die Erneuerung des Wassers in den Elektrodenräumen geschah wieder, wie in der vorigen Mitteilung beschrieben, in Zeiträumen, da kontinuierliche Durchspülung keine besonderen Vorteile zu bieten schien.

Zur Kontrolle der p_H -Verhältnisse während der Elektrolyse diente die von Clark und Lubs⁵⁾ angegebene Reihe von Indicatoren⁶⁾, welche sich zur schnellen Orientierung über die ungefähre p_H -Lage, wie sie hier für unsere präparativen Zwecke genügte, ganz ausgezeichnet bewährte, wobei natürlich für die gegen Ende der Reinigung sich herausbildende, sehr schlecht gepufferte Lösung entsprechend stark verdünnte Farbstofflösungen usw. verwandt werden mußten⁷⁾.

Bei den einzelnen elektrodialytischen Reinigungen waren jedesmal drei Phasen zu unterscheiden: In der ersten bestand keine Gefahr der Säuerung der Mittelzelle, da die Fermentlösung dann noch gut gepuffert war. In der zweiten bestand eine solche Gefahr. Die p_H der ursprünglich fast genau neutralen Fermentlösung sank dann unter $6.0-5.0$. Durch rechtzeitige und häufigere Beschickung des Anodenraumes mit frischem destilliertem Wasser konnte aber bei der oben angegebenen Anordnung p_H leicht über 4.5 gehalten werden, und nur selten war es nötig, eine Spur Natronlauge in die Mittelzelle zu geben⁸⁾. Trotz dieser Säureungsgefahr in der Mittelzelle mußte aber auch das Wasser im Kathodenraum weiter häufiger erneuert werden, da Alkali die Kollodium-Membranen angreift.

In dieser zweiten Phase begann sich auch die vorher noch vollkommen klare Lösung zu trüben und zwar zunächst wohl hauptsächlich durch eine Säurefällung von Eiweißkörpern, die bei der früher benutzten, primitiveren Methode eine sehr große Rolle spielte. Ließ doch die neutrale, klare Ausgangslösung stets einen beträchtlichen Niederschlag fallen, wenn sie auf die für das Ferment optimale p_H von $4.5-4.7$ gebracht wurde.

In der dritten Reinigungsphase endlich waren die Elektrolyte soweit abgewandert und entfernt, daß, wenigstens bei den gewählten Abmessungen des Troges (s. o.) keine Säureungsgefahr mehr bestand. In dieser Phase wurde die Beschickung beider Elektrodenräume schon nach Erreichung zu-

⁴⁾ und ca. 3-mal größer als der Mittelraum.

⁵⁾ vergl. z. B. Michaelis »Praktikum der physik. Chemie für Biologen«, S. 36. Berlin 1922, J. Springer.

⁶⁾ Für Überlassung der Indicatoren möchte ich Hrn. Dr. W. Mevius, Priv.-Doz. für Botanik, auch an dieser Stelle bestens danken.

⁷⁾ Ebenso erforderte die Eigenfarbe der Lösungen entsprechende Vorsichtsmaßregeln.

⁸⁾ Bei Verwendung von bis zu 2.5-proz. Ausgangslösungen. Höhere Ausgangskonzentrationen erforderten in der zweiten Phase erhöhte Aufmerksamkeit und auch häufigen Zusatz von etwas Alkalilösung.

nehmend geringerer Stromstärken (z. B. $\frac{1}{2}$ — $\frac{1}{5}$ Milliampere pro qcm gegen Ende der Reinigung) gleichmäßig erneuert. Gegen Schluß der Reinigung wurde auch die Anode dicht an die betr. Membran gebracht.

Bei Beachtung aller soeben angegebenen Vorsichtsmaßregeln gelang es, mit Anwendung von 180—200 Volt Klemmenspannung die Lintner-Diastase fast vollkommen verlustlos zu reinigen. Ich erhielt z. B. wieder, wie früher, ein Präparat, das 2,4-mal so aktiv war, wie das Ausgangsmaterial, während jedoch der Trockengehalt der Lösung nur auf etwas unter die Hälfte der Ausgangslösung gesunken war, die Aktivität im Lösungsvolumen sich also erhalten hatte. In der Lösung⁹⁾ schwammen aber diesmal noch sehr feine, suspendierte, mit gewöhnlichem Filter nicht abfiltrierbare und sich sehr schlecht absetzende Eiweißflöckchen, die bei der früheren, primitiveren Methode durch Säurefällung offenbar alle zu Boden gerissen worden waren. Der Aschengehalt des erhaltenen Präparates war $<0.05\%$ ¹⁰⁾. Zugabe von kleinen Mengen KCl oder Fermentasche zur Lösung bei Erhaltung der p_H steigerte die Aktivität nicht, sondern verminderte sie.

Die vergleichenden Aktivitätsprüfungen geschahen diesmal so, daß wieder in jeder Beziehung vergleichbare Verdauungssätze (gleiche Stärkemengen, derselben Lösung entnommen, gleicher Trockengehalt an Ferment, gleiches Gesamtvolumen, Temperatur, p_H ¹¹⁾) hergestellt und bei beiden die Zeit bis zur Erreichung eines bestimmten Farbtones mit Jod gemessen wurde. Diese Zeit wurde dann der betreffenden Aktivität proportional gesetzt. Die Jodproben mußten natürlich auch stets vollkommen vergleichbar angestellt werden. In unserem Falle wurden stets abpipettierte 2ccm des Verdauungsansatzes mit einem Tropfen methylalkoholischer $n/20$ -Jodlösung versetzt. Wichtig war bei diesen Proben auch die Verwendung möglichst homogener und klarer Lösungen der löslichen Stärke (Kahlbaum)¹²⁾.

Die zweite Reinigung (durch Kataphorese bei neutraler Reaktion und 40 Volt Spannung) machte auch hier keine besonderen Schwierigkeiten, wenn auf die p_H -Verhältnisse geachtet wurde. So war es z. B. bei der Weiterreinigung des Präparates mit 0.05% Asche (s. o.) noch mehrfach erforderlich, das Wasser in den Elektrodenräumen zu erneuern, da noch genügend Elektrolyt aus der Fermentlösung abwanderte, um in einiger Zeit im Anodenraum saure und im Kathodenraum alkalische Reaktion hervorzurufen. Die Elektroden, von derselben Art wie bei der ersten Reinigung, wurden hier ein Stückchen von den für das Ferment undurchlässigen Membranen entfernt angebracht. In einem Sechszellen-Apparat erhielt ich aus dem oben erwähnten Präparat mit $<0.05\%$ Asche ein solches, das mehr als die 6-fache Aktivität besaß, wie das ursprüngliche Ausgangsmaterial. Hierbei ist zu erwähnen, daß das Ausgangsmaterial (Diastase absolut, Merck) schon an sich eine 5-mal so große Aktivität besaß, wie das früher ver-

⁹⁾ p_H war etwas über 6.5.

¹⁰⁾ Es ist anzunehmen, daß auch der Aschengehalt, der früher (l. c.) beschriebenen reinen Präparate noch wesentlich unter 1% lag, da die Bestimmungen nur mit kleineren Mengen Substanz vorgenommen wurden.

¹¹⁾ Die p_H -Einstellung auf das Optimum für Malz-Diastase geschah durch HCl, und zwar diesmal mit den Clarkschen Indicatoren Bromphenolblau und Methylrot, in der früheren Arbeit dagegen mit Methylorange.

¹²⁾ Die 1-proz. Lösungen wurden hergestellt durch 20—30 Min. langes Erwärmen auf dem Wasserbade unter häufigerem Umschütteln. Erwärmt man wesentlich länger (z. B. einen Tag), so erhielt man nach dem Wiederauffüllen zum alten Volumen Stärkelösungen, die beträchtlich schneller abgebaut wurden.

wandte¹³⁾, trotzdem z. B. der Aschengehalt beider der Menge nach derselbe war (5%).

Die erhaltene, ungefähr 0.1-proz. Lösung des hochaktiven Materials war wasserklar, hielt sich aber sehr schlecht¹⁴⁾ und ließ schon nach wenigen Tagen unter starkem Nachlassen der Aktivität einen Niederschlag fallen.

Zu erwähnen bleibt noch, daß das Ferment sehr langsam wanderte, so daß eine elektroosmotische Reinigung bei neutraler Reaktion viele Tage dauerte. Toluol oder ein anderes Konservierungsmittel bei den Reinigungen zuzusetzen, ist mindestens bei der ersten, solange größere Stromstärken erreicht werden, überflüssig, da der Stromdurchgang selbst genügend desinfiziert.

Bei einem Teil der oben beschriebenen Versuche hatte ich mich der Unterstützung durch Hrn. G. Maas zu erfreuen.

Münster i. Westf., den 15. März 1924.

150. Arthur Franz und Hermann Lutze:

Eine neue Kohlenstoff-Bestimmung auf nassem Wege.

[Aus d. Organ. Abteil. d. Zentrallaboratoriums Premnitz (Westhavelland: der Köln-Rottweil-Aktiengesellschaft.)

(Eingegangen am 28. März 1924.)

Es sind einige Stoffe bekannt geworden, bei denen die Verbrennung nach Liebig versagte; für diese kann die C-Bestimmung auf nassem Wege nach Messinger¹⁾ mittels Dichromats und Schwefelsäure ausgeführt werden, wengleich hierbei auf die Bestimmung des Wasserstoffs verzichtet werden muß. Diese Einschränkung hat jedoch nur für die rein wissenschaftliche Analyse Bedeutung. Denn in der praktischen Analyse begnügt man sich meistens mit der Bestimmung eines Teiles des zu untersuchenden Stoffes, besonders dann, wenn es sich um Ermittlung des Reinheitsgrades oder der Konzentration einer Lösung handelt. Für derartige Untersuchungen organischer Stoffe würde eine Bestimmung des Kohlenstoffs vollständig ausreichen, und diese könnte nach dem Messingerschen Verfahren oder nach einer seiner späteren Abwandlungen¹⁾ gemacht werden, wenn nicht dieses Verfahren wegen teilweiser Bildung von Kohlenoxyd eine sehr umständliche Apparatur und weiterhin eine sehr sorgfältige Überwachung des chemischen Vorganges verlangte.

Ein sehr einfaches und billiges Verfahren zur Bestimmung von Kohlenstoff auf nassem Wege, das auch an Forschungsstätten recht nützlich werden kann, läßt sich für wasserlösliche organische Stoffe auf die Beobachtung gründen, daß solche Stoffe beim Erwärmen ihrer verd. wäßrigen Lösungen mit Persulfat — es wurde immer mit dem Kaliumsalz gearbeitet — quantitativ zu Kohlendioxyd oxydiert werden.

Zur Ausführung der Analyse dient ein einfacher Apparat, der nach der folgenden Beschreibung leicht zusammengestellt werden kann. Ein kurz- und weithalsiges Rundkölbchen von 100–150 ccm Inhalt wird mit einem doppelt durchbohrten Gummi-

¹³⁾ l. c. ¹⁴⁾ p_H war ca. 6.5.

¹⁾ Houben-Weyl, Methoden d. organ. Chem., 2. Aufl., 1921, Bd. 1, S. 40.