

so errechnet sich aus obiger Drehung eine Ausbeute an α -Methyl-glucosid von 81 %. Diese Zahl wird aber etwas zu günstig sein, da infolge der Flüchtigkeit der Amide beim Eindampfen der Lösung etwas verlorengegangen sein kann. Der wirkliche Wert der Ausbeute wird also zwischen 71 % und 81 % liegen; er ist als ungefährer Mittelwert mit 75 % angenommen.

Einem Einwand mußte bei dieser Berechnungsart der Ausbeute aus der Drehung noch begegnet werden, nämlich dem, daß die spez. Drehung von Methyl-glucosid eine andere ist, wenn drei Mol. Acetamid und ein Mol. Trichlor-acetamid in der wäßrigen Lösung zugegen sind. Ein entsprechender Versuch mit einem künstlich hergestellten Gemisch von reinem α -Methyl-glucosid mit obigen Mengen an Amidem ergab, daß diese Befürchtung unzutreffend ist. Die spez. Drehung war innerhalb der Fehlergrenzen identisch mit der von reinem α -Glucosid allein.

Schließlich wurden noch Versuche angestellt, wie die Temperatur bei der Umsetzung des Tetrachlor-Körpers mit Methylalkohol und Silbercarbonat die Ausbeute an α -Glucosid beeinflusst. Es wurde im Gegensatz zu den anderen Versuchen bei Zimmer-Temperatur gearbeitet.

2.82 g Tetrachlor-Körper wurden in 80 ccm wasserfreiem Äther gelöst, 120 ccm Methylalkohol und 5 g Silbercarbonat zugegeben und etwa 60 Stdn. bei Zimmer-Temperatur geschüttelt. Von Vorversuchen war bekannt, daß die Umsetzung etwa 50 Stdn. erfordert. Nach dieser Zeit wurde im Vakuum auf die Hälfte eingedunstet, um den Äther zu vertreiben, dann mit Ammoniak verseift und nach 24-stdg. Stehen ganz eingedampft. Der Rückstand löste sich in Wasser nur unvollständig, unter Abscheidung einer Flüssigkeit, die auf Grund der starken Isonitril-Reaktion und des hohen Chlorgehalts wohl im wesentlichen Trichlor-essigsäure-methylester war. Da die Trübung durch Filtrieren nur teilweise fortzuschaffen war, mußte in einem Gemisch von Wasser und Aceton polarisiert werden. Auf 250 ccm aufgefüllt, wurde im 2-dcm-Rohr eine Drehung von $+0.66 \pm 0.01^0$ gefunden. Unter Vernachlässigung etwaiger Verluste berechnet sich ein Gehalt an α -Methyl-glucosid von 54 %.

In einem Kontrollversuch wurde noch festgestellt, daß weder die Gegenwart von Aceton, noch die der Säureamide die spez. Drehung wesentlich beeinflusst.

Das Arbeiten in der Siedehitze ist bei weitem vorteilhafter und gestattet einen viel größeren Anteil des Tetrachlor-Körpers in α -Glucosid zu verwandeln.

Daß die Versuche bei dem Interesse, das die Synthese von α -Glucosiden beanspruchen kann, fortgesetzt werden, bedarf wohl keiner besonderen Betonung.

252. Richard Willstätter: Zur Frage der protein-artigen Natur der Saccharase.

(Eingegangen am 15. Juni 1926.)

Hinsichtlich der Schlußfolgerungen, die sich aus den Analysen zahlreicher und verschiedenartiger Präparate von Saccharase ziehen lassen, suchen die an der Arbeit beteiligten Forscher, wie die Mitteilung „Saccharase (VI.)“ von H. v. Euler und K. Josephson¹⁾ zeigt, Übereinstimmung zu erzielen.

¹⁾ B. 59, 1129 [1926].

Es wird von Nutzen sein, die Ansichten über die Bedeutung der Protein-substanzen für die Zusammensetzung der Saccharase und anderer Enzyme noch schärfer auszudrücken, damit noch bestehende Unterschiede in den Auffassungen zu klärenden weiteren Analysen anregen können.

Meine Versuche zur Reinigung der Saccharase waren von dem Gedanken geleitet, das Enzym immer von denjenigen Begleitstoffen zu befreien, die auf Grund von Analysen weniger reiner Präparate als wesentlich für die Zusammensetzung und Natur des Enzyms galten. Jede neue Hypothese über den chemischen Aufbau der Saccharase rief neue Fragen für die präparative und analytische Arbeit hervor und wurde deshalb dankbar aufgenommen und verfolgt. Die Enzympräparate wurden planmäßig von den einzelnen Bestandteilen, deren Bedeutung für die Zusammensetzung des Enzyms zur Erörterung stand, mehr und mehr, bis zur Bedeutungslosigkeit, befreit. Dabei gelang es zwar nicht, beispielsweise die Saccharase von allen nachweisbaren Begleitstoffen ganz zu befreien, aber doch immer von denjenigen, auf die es gerade ankam. Das Ergebnis war, daß sich die Saccharase von chemisch definierbaren hochmolekularen Stoffen, wie Kohlehydraten, Phosphorverbindungen und Proteinsubstanzen, ohne Einbuße an Aktivität, sogar an Beständigkeit, gänzlich oder fast ganz befreien ließ. Für den Aufbau der Saccharase unentbehrliche kolloide Stoffe sind analytisch noch nicht definiert worden.

Im Folgenden soll nochmals geprüft werden, ob es berechtigt ist, den tryptophan-haltigen Begleitstoff der Saccharase nach H. v. Euler und K. Josephson zu den Bestandteilen des Enzyms, zu den Bausteinen des „gewaltigen Enzym-Moleküls“, zu zählen und ihm eine biologisch wichtige Rolle zuzuschreiben, oder aber ob die tryptophan-haltige Substanz, wie es meine Folgerung aus den veröffentlichten Analysen war, ein für die Natur der Saccharase bedeutungsloser Begleitstoff, so etwa wie Hefegummi, ist.

Meine III., IV. und V. Arbeit²⁾ über Invertin führten als eine nützliche Vorbereitung für die Anwendung der Adsorptionsmethode des Altern der Hefe-Autolysate ein; der proteolytische Abbau veränderte die Saccharase-Begleiter derart, daß das Adsorptionsverhalten günstiger wurde, die Adsorptionswerte bedeutend anstiegen. Den so gewonnenen Präparaten war aber ein früher nicht zu beobachtender hoher Gehalt an Proteinsubstanzen eigen, die durch die Millon-Probe gekennzeichnet waren. Dies waren so reichlich und hartnäckig anhaftende Begleitstoffe, daß ihre Beseitigung als eine Probe auf die Abtrennbarkeit der Proteinsubstanzen gelten konnte. Quantitative Versuche über die Millon-Reaktion lehrten dann (Abhandlung V und VIII³⁾), daß bei neutraler Reaktion gewonnene, frische Autolysate und daraus bereitete Präparate völlig frei von den für die Millon-Reaktion verantwortlichen, vermutlich tyrosin-haltigen Begleitern waren.

Von da an suchten wir die Autolysate immer rascher zu bereiten und in frischem Zustand zu verarbeiten. Solches Material war in unseren Händen, als H. v. Euler und K. Josephson⁴⁾ den Tryptophan-Gehalt ihrer

²⁾ R. Willstätter, J. Graser und R. Kuhn, H. **123**, 1 [1922]; R. Willstätter und W. Wassermann, H. **123**, 181 [1922]; R. Willstätter und K. Schneider, H. **133**, 193 [1923/24].

³⁾ H. **133**, 193, und zwar 224 [1923/24]; H. **142**, 257, und zwar 291 [1924/25].

⁴⁾ B. **57**, 859 [1924].

Saccharase-Präparate entdeckten. Die Stockholmer Präparate von S. W. 3.7 und 4.0 enthielten 4.93 und 5.58%, die Präparate meines Laboratoriums (Abhandlung VIII⁵⁾) von S. W. 6.67 und 3.57 sogar 8.9 und 9.2. Dazu kam später ein Präparat (Abhandlung X⁶⁾) vom S. W. 8.55 mit 8.6% Tryptophan und Präparate (Abhandlung XII⁷⁾) von S. W. 8.4, 11.9 und 9.7 mit Tryptophan-Gehalten von 2.0, 3.9 und 3.5%. Zum Zwecke des Vergleichs schlug ich vor, die analytischen Angaben, z. B. Gehalte an Hefegummi, am Träger der Millon-Reaktion, an tryptophan-haltiger Substanz auf 1 S. E. zu beziehen. So berechnet, betragen die Tryptophan-Mengen in den erwähnten letzten Saccharase-Proben (0.12, 0.16 und 0.18 mg auf 1 S. E.) nur $\frac{1}{4}$ bis $\frac{1}{8}$ von den Werten der Stockholmer und Münchener Präparate des Jahres 1924.

Es ist auch daran zu erinnern, daß schon ein allerdings weniger gutes, weitgehend inaktiviertes Präparat meiner I. Arbeit⁸⁾ über Invertin von Tryptophan frei war, und daß auch wiederholt wohldefinierte, gute Saccharase-Proben von Tryptophan quantitativ befreit wurden, nämlich ein Präparat der Abhandlung VIII vom direkt bestimmten S. W. 4.16 und eines der XII. Abhandlung vom indirekt bestimmten S. W. 4.17. Es sollte genügen, in irgendeinem Falle Saccharase ohne Tryptophan darzustellen, um die Belanglosigkeit dieses Bestandteils zu erweisen.

Der Forderung von H. v. Euler und K. Josephson, es müßten zur Abtrennung des Tryptophans, um dessen Entbehrlichkeit erkennen zu lassen, reproduzierbare Methoden angegeben werden, war damit noch nicht genügt. Aber unsere Erfahrungen weisen doch auf einen neuen Weg hin, der sicher zu Saccharase-Präparaten von niedrigem, praktisch bedeutungslosem Tryptophan-Gehalt führt.

Die Vermehrung des Enzyms in der Hefe nach dem Verfahren der Gärung bei niedrigster Zucker-Konzentration von R. Willstätter, Ch. D. Lowry und K. Schneider (Abhandlung IX⁹⁾) lieferte uns Hefen mit 15- bis 20-mal mehr Saccharase, aber nach den Analysen der Abhandlung X¹⁰⁾ mit unverändertem Tryptophan-, überhaupt Eiweiß-Gehalt. Während wir in Münchener Bierhefe auf 1 S. E. **150 mg** Tryptophan, in den zugehörigen Autolysaten 68—76 mg antrafen, betrug das Tryptophan in invertin-reicher Hefe 13, im Autolysat nur 2.5 mg auf 1 S. E. Und allein die Dialyse genügte, um von dieser Tryptophan-Menge mehr als 90% zu entfernen und uns ein Ausgangsmaterial von S. W. 2.5 mit nur **0.23 mg** Tryptophan auf 1 S. E. (1.16 und 1.25% der Trockensubstanz) in die Hände zu geben. Da in den maßgebenden Präparaten des Stockholmer Laboratoriums 0.67 und 0.70 mg auf 1 S. E. trafen, so ist der Tryptophan-Gehalt des neuen Ausgangsmaterials, noch ehe die Reinigung mittels einer der Adsorptionsvorhaben begann, nur $\frac{1}{3}$ von demjenigen der früheren guten Präparate, nicht einmal der tryptophan-reichsten.

⁵⁾ R. Willstätter und K. Schneider, H. **142**, 257 [1924/25].

⁶⁾ R. Willstätter, K. Schneider und E. Bamann, H. **147**, 248 [1925], und zwar S. 274.

⁷⁾ R. Willstätter, K. Schneider und E. Wenzel, H. **151**, 1 [1925/26], und zwar S. 22.

⁸⁾ R. Willstätter und F. Racke, A. **425**, 1 [1920/21]; vergl. R. Willstätter und K. Schneider, H. **142**, 257 [1924/25], und zwar S. 304.

⁹⁾ H. **146**, 158 [1925]. ¹⁰⁾ H. **147**, 248 [1925], und zwar S. 259.

Wenn ich auch an diesem Punkte die Arbeit abzubereiten genötigt war, so darf ich doch auf die Methode hinweisen, nach der man dieses neuartige Ausgangsmaterial verarbeiten muß, um auf einfache Weise das Tryptophan noch weitergehend abzutrennen. Die aus invertin-reichster Hefe durch „gebrosene Freilegung unter Neutralisation“ gewonnenen Autolysate sollen vor der Dialyse der Alterung unterworfen werden, wobei erfahrungsgemäß der tryptophan-haltige durch andere Begleitstoffe verdrängt wird. Dann ist nach einer Dialyse von sehr langer Dauer die Reinheitssteigerung durch Adsorptionsmethoden auszuführen.

Es erscheint als nicht unbedenklich, Folgerungen hinsichtlich des Stickstoff-, Schwefel-, Protein-Gehaltes und dergl. auf Analysen der Präparate von If = 303 und 320, d. i. S. W. 6.5 bis 6.9, zu gründen, nachdem doch der Reinheitsgrad der Saccharase bis auf Saccharase-Werte von 10 bis gegen 12 gesteigert worden ist.

Die Steigerung des Reinheitsgrades hat noch nicht zu dem Ende geführt, daß ein Enzym in einem für die Analyse geeigneten Zustand vorlag. Immerhin ist die Adsorptionsmethode so leistungsfähig geworden, daß außer allen möglichen, chemisch nachweisbaren Begleitstoffen auch so hartnäckig anhaftende, wie es inaktiviertes Enzym ist, abgetrennt werden konnten. Aus dem Adsorptionsverhalten der reinsten Saccharase-Präparate läßt sich schließen, daß sie schon einen hohen Bruchteil von Enzym enthalten.

253. J. Houben und E. Pfankuch: Über Imino-lactone und Salze ungesättigter Nitrile.

[Aus d. Chem. Laborat. d. Biolog. Reichsanstalt Berlin-Dahlem.]

(Eingegangen am 10. Mai 1926.)

Primäre Alkohole bilden nach den Untersuchungen von Pinner¹⁾ mit Nitrilen und Halogenwasserstoff in recht allgemeiner Reaktion die Salze von Imino-äthern. Auch die später untersuchten²⁾ sekundären Alkohole, sowie Phenole reagieren in demselben Sinne, während die Umsetzung mit tertiären Alkoholen durch Wasser-Abspaltung verhindert wird.

Wie im Folgenden gezeigt wird, reagieren Hydroxyl- und Cyan-Gruppen unter dem Einfluß von Halogenwasserstoff auch dann miteinander, wenn sie der gleichen Molekel angehören, sofern das Hydroxyl in δ -Stellung zur Cyan-Gruppe steht. Es vollzieht sich eine intramolekulare Anlagerung unter Ringschluß und Entstehung von Imino- δ -lactonen, charakterisiert durch die Gruppierung $\text{O}-\overset{|}{\text{C}}:\text{NH}$. Diese Gruppierung ist gekennzeichnet dadurch, daß sich die NH-Gruppe leicht in die Oximino-, Hydrazon-, Phenyl-hydrazon- usw. Gruppe überführen läßt, nach dem gleichen Verfahren, welches von Houben³⁾ zur Überführung der Imino- in Oximino-kohlensäureester und der Imino-äther in Hydroximsäure-ester benutzt worden ist.

Nur einzelne Imino-lactone waren bisher bekannt, wenn auch auf gänzlich andere Weise dargestellt. Gabriel⁴⁾ erhielt ein Imino-phthalid durch Er-

¹⁾ Die Imidoäther. Berlin 1892.

²⁾ Houben und Blaese, Dissertation d. letzteren, Berlin 1923.

³⁾ J. Houben und E. Schmidt, B. 46, 2447, 3616 [1913]; Houben und E. Pfankuch, J. pr. [2] 105, 20 [1922].

⁴⁾ Gabriel, B. 20, 2235 [1887], 31, 2732 [1898].