

analoge Gesetze wie für die verwandten Hydride gelten. Wir hoffen darüber in einiger Zeit berichten zu können.

Anhangsweise möchten wir noch erwähnen, daß Versuche, die wir gemeinsam mit Hrn. A. Marschall ausgeführt haben, dafür sprechen, daß auch ein gasförmiger Bleiwasserstoff existiert. Er bildet sich aus der Magnesiumlegierung in noch wesentlich geringerer Menge als der Wismut- oder Zinnwasserstoff; bessere Ausbeuten erzielten wir durch ein elektrolytisches Reduktionsverfahren, das auch für die Gewinnung von Wismutwasserstoff empfehlenswert ist. Näheres wird in einer demnächst erscheinenden Mitteilung angegeben werden.

227. Hugo Haehn: Die Zerlegung der Kartoffel-Tyrosinase in Komponenten.

[Vorläufige Mitteilung.]

(Eingegangen am 24. September 1919.)

In einer längeren Arbeit über die »Melanin-Bildung im autolyisierenden Kartoffelpreßsaft«, die soeben in der Biochemischen Zeitschrift¹⁾ erscheint, habe ich kurz darauf hingewiesen, daß in der Tyrosinase vermutlich ein Enzymkomplex vorliegen müsse, so daß man die Tyrosinase-Reaktion, die Umwandlung von Tyrosin in Melanin durch die Tyrosinase, in 3 Phasen zerlegen müsse: erstens in eine Oxydation des Benzolkerns, zweitens in einen Abbau des Alaninrestes nach der Streckerschen Reaktion, und drittens müsse eine Synthese aus den Spaltprodukten zum großen Melaninmolekül stattfinden. Diese drei Reaktionen würden drei verschiedene Enzyme erfordern, und man müßte in der Tyrosinase ein Gemenge von Enzymen annehmen, wie es auch schon Bach und Chodat²⁾ getan haben.

Die praktische Melanin-Reaktion zerfällt in zwei sichtbare Phasen. Gibt man zu 5 ccm einer 0.05-proz. Tyrosinlösung mit 0.04 % Soda-gehalt 3—5 Tropfen Kartoffelpreßsaft, so erhält man sehr bald, in etwa 30—60 Minuten, eine rosarote Färbung, die mit der Zeit stärker wird. Diesen roten Stoff will ich mit Prämelanin bezeichnen. Später, nach Stunden, aber ganz langsam, geht die rote Färbung in Violett, dann in Bräunung bis Schwärzung über. Der schwarze Stoff, das Melanin, bildet sich an der Oberfläche und erfüllt allmählich das

¹⁾ Dort auch ausführliche Literatur.

²⁾ C. Oppenheimer, Die Fermente, II S. 770 [1913].

ganze Glas. Je nach der Stärke der Dispersion des kolloidalen Farbstoffes erhält man grünlich-schwarze, braun-schwarze und rein schwarze Färbungen. Läßt man 24 Stdn. und länger bei Zimmertemperatur stehen, so bildet sich die grobdisperse, pechschwarze Phase, und das Melanin fällt in Flocken aus.

Der gegebene Weg zur Zerlegung der Tyrosinase in Komponenten ist die Ultrafiltration, da hier der Enzymsaft keine unerwünschte Verdünnung erleidet, wie es z. B. bei dem Dialyseverfahren von Buchner und Antoni¹⁾ der Fall ist. Harden und Young²⁾ benutzten bekanntlich zur Trennung der Zymase von ihrem Ko-Enzym das Martin-Gelatinefilter, während man jetzt zu solchen Operationen die leicht zugänglichen Membranfilter der Firma de Haën in Hannover anwenden kann. Wird der Kartoffelpreßsaft nach Zsigmondy mittels Membranfilter Nr. 64 filtriert, so erhält man ein Filtrat, das die Tyrosinase-Reaktion ohne weiteres gibt. Die Filterporen sind also so weit, daß alle Komponenten hindurchgesaugt werden. Benutzt man das Filter Nr. 100, so resultiert ein hellbraunes Filtrat, das eine Tyrosinlösung nicht mehr in Melanin überführen kann. Wird der Filtrerrückstand in Wasser aufgenommen und mit Tyrosin geprüft, so tritt eine schwache, aber noch deutliche Tyrosinase-Reaktion ein. Kommt ein Gemisch von Filtrerrückstand und Filtrat zur Reaktion, so haben wir wieder die typische starke Melaninbildung.

Der Versuch lehrt mithin, daß durch diese Art der Filtration keine vollkommene Zerlegung in zwei inaktive Komponenten möglich war. (Tab. I.) Da nun augenblicklich die Filtergrößen zwischen 64 und 100 nicht zur Verfügung standen, so benutzte ich den Bechholdschen Filtrierapparat mit dem Filter 4½ %, weil sich 3 und 6 % nicht bewährt hatten. Ich habe bis jetzt den Eindruck, daß eine rein mechanische Trennung allein nicht zur restlosen Fraktionierung führt, sondern daß eine chemische Spaltung zu Hilfe genommen werden muß. Ich habe deshalb den Kartoffelpreßsaft erst einer 24-stündigen Autolyse bei Zimmertemperatur unterworfen; die Selbstauflösung des Zellinhaltes soll den Plasmakomplex zerstören, damit die einzelnen Enzyme von gewissen Hüllen befreit und so der Trennung leichter zugänglich werden. Darauf wurde ultrafiltriert, die Komponenten sich wieder 1—2 Tage selbst überlassen zur weiteren Selbstverdauung, alsdann durch gewöhnliche Filter öfters geklärt und nun erst die Prüfung mittels Tyrosinlösung vorgenommen. Trotz Ein-

¹⁾ Buchner u. Antoni, H. 46, 141 [1905].

²⁾ Ausführliche Literaturangaben in Buchners Arbeit, Bio. Z. 8, 520, 522 [1908].

haltens der genauen Vorschrift gelingt nicht immer die vollkommene Trennung, auch wenn Saft von derselben Kartoffelsorte zur Verwendung kam. Kleinere Variationen in der Zusammensetzung des Kartoffelpreßsaftes scheinen die Ursache zu sein. Wenn die Fraktion I, d. i. der in Wasser aufgenommene Filtrerrückstand, pechschwarz aussieht, also viel Melanin enthält, so ist er in der Regel nicht brauchbar, da das Pigment etwas von der Fraktion II, dem Filtrat, zurückhält. Gelingt es durch Filtration das Melanin zu entfernen, so ist die Komponente praktisch rein. Einmal trat vollkommene Sedimentierung des schwarzen Stoffes ein, wodurch eine wasserhelle Fraktion I, vollkommen frei von Fraktion II, erhalten wurde. Durch all diese Operationen wird leider die Oxydationskraft der Enzyme merklich geschwächt.

Ist die Trennung geglückt, so gibt weder das Filtrat (Fraktion II) noch der in Wasser aufgenommene Rückstand (Fraktion I) mit Tyrosin eine Rotfärbung und spätere Schwärzung, wohl aber das Gemisch beider Komponenten. Die Fraktion I wird zunächst mit α -Tyrosinase, die Fraktion II mit Aktivator bezeichnet, ohne daß damit bestimmte Eigenschaften schon ganz festgelegt werden sollen. Die meisten Versuche sind so ausgefallen, daß in Fraktion I noch eine Spur von Fraktion II zurückblieb, so daß Fraktion I, für sich geprüft, nach längerer Zeit eine schwache Rosafärbung gibt zu dem Zeitpunkte, wenn das Komponentengemisch bereits sehr stark rot gefärbt und im Begriff ist, in schwarz überzugehen. Auf Tabelle 2 sind die Versuche zusammengestellt, die die beste Trennung bisher ergaben. Der Kartoffelpreßsaft der Knolle Silesia, der 24 Stdn. der Autolyse unterworfen worden war, gab zwei Fraktionen, von denen die Fraktion I noch mehrmals durch ein gewöhnliches Filter filtriert werden mußte. Auf Tyrosinlösung geprüft, gab sie in 2 Stdn. keine Rötung (Nr. 1 u. 2). Auch Fraktion II war in dieser Zeit wirkungslos geblieben (Nr. 3 u. 4). Das Fraktionsgemisch hingegen zeigte in dieser Zeit eine starke Rotfärbung. Nach 4 Stdn. war der Unterschied ebenfalls noch so groß, obgleich Fraktion I bereits eine ganz schwache Rötung verriet, ein Anzeichen, daß winzige Mengen von Fraktion II noch zurückgeblieben waren. Nach 20 Stdn. Einwirkungsdauer sind die Unterschiede scheinbar geringer geworden. Dies ist so zu erklären, daß die Reaktion des Fraktionsgemisches bereits vor Ablauf dieser langen Zeit zum Stillstand gekommen ist, während Fraktion I indessen Gelegenheit hatte, weiteres Melanin zu bilden, wodurch sich die Distanz zwischen beiden Versuchen etwas ausgleichen konnte.

Versuche 7 und 8 zeigen, daß das Enzymgemisch durch Kochen zerstört wird. Von den einzelnen Fraktionen ist nur II kochbeständig,

wie aus Versuchen 9–12 hervorgeht. Demnach kann die Tyrosinase zerlegt werden in einen kochfesten (Aktivator) und einen thermolabilen Stoff (α -Tyrosinase).

Dieser Versuch gab Anlaß zu dem Gedanken, ob es nicht möglich sei, mit dem Filtrat des aufgekochten Originalpreßsaftes, kurzweg Kochsaft genannt, den inaktiven Filterrückstand zu aktivieren. In der Tat gelingt der Versuch, wie aus Tabelle 3 ersichtlich ist. Wir beobachten zunächst, daß sowohl Fraktion I (Nr. 1 und 2) wie auch der Kochsaft (Nr. 3 und 4) an sich in den ersten beiden Stunden namentlich fast ohne Wirkung sind, während das Gemisch beider eine starke Rötung der Tyrosinlösung geben (Nr. 5 und 6).

Überraschend wirkte nun der Versuch, der die Aktivierung des Filterrückstandes mit der Asche des Kochsaftes zeigte (Tabelle 4). Während z. B. Versuche 1 und 2, nur mit Fraktion I angesetzt, in den ersten beiden Stunden noch wasserhelle Lösungen aufwiesen, beobachtet man in dem Gemisch mit der Aschelösung eine sehr lebhaft Reaktion (Nr. 3 und 4). Nach 20 Stunden Reaktionszeit ist wieder wie gewöhnlich das scharfe Resultat etwas verwischt, da mittlerweile Versuche 3 und 4 vorzeitig zum Stillstand gekommen sind, während 1 und 2 in diesem langen Zeitraum Gelegenheit zur Bildung winziger Melaninmengen hatten.

Wir haben also hier die interessante Beobachtung gemacht, daß das Gelingen der Tyrosinase-Reaktion von einem anorganischen Salz bzw. einem Salzgemisch abhängig ist. Dieses Ergebnis gibt natürlich Anlaß zu wichtigen Schlüssen, die aber vor der Hand nicht diskutiert werden sollen. Auch wird sich durch diese Beobachtung die Methodik der Trennung der Komponenten erheblich vervollkommen lassen.

Im Anschluß hieran sollte noch geprüft werden, ob eine Steigerung der Tyrosinase-Wirkung des Originalpreßsaftes mit Hilfe von Kochsaft möglich ist. Mischt man gleiche Mengen von Preßsaft mit Kochsaft, so ist eine Verstärkung der Reaktion kaum wahrzunehmen; wird das Mischungsverhältnis 1:4 gewählt (Tabelle 5, Versuche 3 und 4), so tritt der Vorteil des Kochsaftzusatzes hervor. Recht deutlich wird dies, wenn man 0.03 ccm Preßsaft mit 0.4 ccm Kochsaft versetzt (Versuche 7 und 8). Aus diesen Experimenten ist zu ersehen, daß die Tyrosinase von Natur aus reichlich mit Fraktion II versehen ist und sich deshalb nur ein ganz großer Überschuß von Kochsaft bemerkbar macht. Der Einwand, daß im Kochsaft nur ein schwaches Präparat vorliege, wird hinfällig durch die Versuche der Tabelle 3, die eine kräftige Wirkung des Kochsaftes auf Fraktion I gezeigt haben. Vollständig ist diese Angelegenheit jedoch noch nicht geklärt.

Es ist anzunehmen, daß die Aschensalze des Kochsaftes ebenfalls so wirken und nun ergibt sich die Bedeutung dieser Beobachtung für die Beurteilung der Melaninbildung in den verschiedenen Kartoffelsorten.

In welcher Art die Zerlegung der Tyrosinase erfolgt ist, das hat sich bis jetzt noch nicht erkennen lassen. Ob ein System Ko-Enzym (= wäre hier ein anorganischer Katalysator) und Hauptenzym wie bei der Zymase vorliegt oder ob es sich um ein Oxydasesystem im Bach-Chodatschen Sinne, nämlich um eine spezifische Oxygenase + anorganischem Katalysator neben anderen z. B. desamidierenden Enzymen handelt, das werden weitere Versuche entscheiden. Es ist auch möglich, daß beide Systeme nebeneinander wirksam sind. Nach der in der Einleitung angeführten Theorie müßte ja die Tyrosinase ein Enzymkomplex sein. Ob es gelingen wird, diesen in der gewünschten Weise weiter zu zerlegen, das werden die kommenden Versuche lehren.

Bei der Anstellung derartiger Versuche spielen antiseptische Mittel eine wichtige Rolle und es war daher zu prüfen, ob solche Reagenzien einen Einfluß auf den Enzymprozeß der Tyrosinase ausüben. Während die Versuche mit Thymol genau so schnell verliefen wie ohne Zusatz, so hatten Chloroform und Fluornatrium (0.3% Zusatz) hemmenden Einfluß. Übersichtet man das Reaktionsgemisch mit Toluol, so müßte eigentlich wegen Luftabschluß die Oxydation ausbleiben. Selbst wenn Toluol in Zentimeterhöhe darüber steht, tritt trotzdem mit Tyrosinlösung und Preßsaft die Tyrosinase-Reaktion in der gewöhnlichen, nur etwas verlangsamten Weise ein. Offenbar ist Toluol in der Lage, den Sauerstoff der Luft durch sich zu übertragen (Tabelle 6).

Um diese bisher unbekannte Eigenschaft des Toluols weiter zu untersuchen, wurde luftfreie alkalische Pyrogallol-Lösung mit Toluol 2 cm hoch überschichtet. In einer Stunde zeigte sich schon ein deutlicher tief schwarzbrauner Ring an der Berührungsstelle mit dem Toluol (Tabelle 7 Nr. 1 und 2). War die Toluolschicht 8 cm hoch, so verlief die Reaktion ebenfalls so gut positiv, nur etwas langsamer (Nr. 3 und 4). Ein Abschluß mit farblosem Paraffinöl lieferte keine Pyrogallol-Reaktion, während Essigester eine kleine braune Zone gab (Nr. 7—10). Terpentinöl ist als Sauerstoff-Überträger bekannt (Engler). Kam es hier in einer Schicht von Zentimeterhöhe in Anwendung, so beobachtet man keine Oxydation (Nr. 5 und 6). Geht der Versuch 20 Stunden, so tritt zwar eine geringe Reaktion ein, aber eine Wirkung wie bei dem Toluol wird bei weitem nicht erreicht. Dort ist jetzt die schwarzbraune Schicht mehrere Zentimeter breit. Auch nach 40 Stunden bleibt das Resultat in diesem Sinne.

Es sei noch bemerkt, daß ein zweiter Versuch mit besonders gereinigtem Toluol ebenso verlief.

Dieses merkwürdige Verhalten des Toluols im Vergleich zum Terpentinöl ließ nun die Frage reifen: Ist Toluol wirklich ein Sauerstoff-Überträger, namentlich in der 8 cm hohen Schicht, oder kann es auch hydroklastische Oxydationen ausüben wie Chinon und Isatin in der nach W. Traube modifizierten Streckerschen Reaktion? Es müßte also Wasser in seine Komponenten zerlegen, den Sauerstoff abgeben und den Wasserstoff vielleicht mit Hilfe von Katalysatoren addieren. Dies zu prüfen, wurde eine Pyrogallol-Reaktion in einer Wasserstoff-Atmosphäre angesetzt. Sie verlief negativ. Das Toluol wirkt hier nicht oxydierend, folglich muß es bei der anderen Versuchsanstellung in der Luftatmosphäre die Sauerstoff-Übermittlung bewirken.

Diese Eigenschaft des Toluols als Sauerstoff-Überträger zu kennen, ist natürlich beim Experimentieren mit Oxydasen von großer Bedeutung. Meine Versuche haben bereits einen merkwürdigen Fall geliefert.

Es sei mir noch gestattet, Hrn. Prof. Wilhelm Windisch und Hrn. Victor Bermann auch an dieser Stelle für die gütige Überlassung der Ultrafiltrierapparate bestens zu danken.

Experimenteller Teil.

Darstellung von Kartoffelpreßsaft: Kartoffel werden gewaschen und geschält und in einer Küchenreibemaschine zerkleinert. Hierbei beginnt schon die Verfärbung des Saftes, die Melaninbildung aus dem Tyrosin des Zellsaftes mittelst der Tyrosinase. Man preßt in einer Handpresse und befreit den nun dunkel gewordenen Saft von den Stärkekörnern und anderen Teilchen mit Hilfe einer Zentrifuge. Unter Toluol oder Thymol bei Zimmertemperatur gehalten, bleibt das Enzym mehrere Tage wirksam. Hierbei tritt zwar Abbau der Eiweißverbindungen ein wie in einer anderen Arbeit nachgewiesen wurde, aber die Tyrosinase leidet bei dieser Autolyse wenig.

Zerlegung der Tyrosinase in Komponenten. Die meisten Trennungen wurden mit dem Bechhold'schen Filtrierapparat unter Luftdruck ausgeführt, da zu dem Zsigmondyschen Membranfiltersaugapparat augenblicklich nicht die geeigneten Filtergrößen zur Verfügung standen. Das Bechhold-Filter 4 1/2 % lieferte in etwa 1 1/2—2 Stunden bei einem Luftdruck von 5—7 Atmosphären aus 20 ccm 24 Stunden lang bei Zimmertemperatur unter Thymol autolysiertem Originalpreßsaft ca. 18 ccm klares bräunliches Filtrat. Der Filterrückstand war dann nahezu »staubtrocken«. Er wurde vom Filter-

blatt entfernt und in 18 ccm Wasser suspendiert. Es entsteht hierbei eine pechschwarze Lösung, die in der Regel noch durch Fraktion II verunreinigt ist. Man läßt 24 Stunden unter Thymol stehen und filtriert durch ein gewöhnliches Filter so oft, bis eine hellere klare Lösung entstanden ist. Dabei bleibt das gebildete schwarze Pigment mit den Resten der Fraktion II auf dem Filter zurück. Zu dieser Reinigung eignet sich auch Bechholds Filter 1 $\frac{1}{2}$ ‰, wenn man zur Filtration $\frac{1}{2}$ — $\frac{3}{4}$ Atm. Druck anwendet.

Die Prüfung der Fraktionen geschieht mit einer schwach alkalischen Tyrosinlösung (Kahlbaum), wie es in den Tabellen angegeben wurde (Tab. 1 und 2).

Tabelle 1.

Zerlegung der Tyrosinase
mit Hilfe des Membranfilters Nr. 100.

Prüfung der einzelnen Fraktionen und des Fraktionsgemisches mit Hilfe einer Tyrosinlösung. — Preßsaft der Kartoffel Silesia, 48 Stunden unter Thymol autolysiert. Die Fraktionen vor der Prüfung 24 Stunden der Autolyse bei Zimmertemperatur unterworfen, dann durch Filtration durch gewöhnliches Filtrierpapier vom schwarzen Pigment befreit.

Zimmertemperatur.

Nr.	Tyrosinlös. 0.05 g Ty- rosin 0.04 g Soda 100 ccm Wasser	Zusatz von Preßsaft. 0.2 ccm jeder Fraktion	Beobachtung nach		
			1	2	20
			Stunden		
1.	5 ccm	Fraktion I } nicht	schwach	rosa	schwache
2.	5 »	» I } gekocht	rosa	»	Melaninbildung
3.	5 »	Fraktion II } nicht	wasserhell	wasserhell	wasserhell
4.	5 »	» II } gekocht	»	»	»
5.	5 »	Frakt. I + II } nicht	rosa	stark rot	starke
6.	5 »	» I + II } gekocht	»	» »	Melaninbildung
7.	5 »	Frakt. I + II, gekocht	fast	fast	fast wasserhell
8.	5 »	» I + II, »	wasserhell	wasserhell	» »
9.	5 »	Frakt. I, gekocht und gemischt mit	fast	fast	fast wasserhell
10.	5 »	Frakt. II, nicht gekocht	wasserhell	wasserhell	» »
11.	5 »	Frakt. II, gekocht und gemischt mit	rosa	stark rot	starke
12.	5 »	Frakt. I, nicht gekocht	»	» »	Melaninbildung

Tabelle 2.

Zerlegung der Tyrosinase
mit Hilfe des Bechhold-Filtere 4½%.

Prüfung der einzelnen Fraktionen und des Fraktionsgemisches mit Hilfe einer Tyrosinlösung. — Preßsaft der Kartoffel Silesia, 24 Stunden unter Thymol autolytisiert. Die Fraktionen vor der Prüfung 24 Stunden der Autolyse bei Zimmertemperatur unterworfen, dann durch Filtration durch gewöhnliches Filtrierpapier vom schwarzen Pigment befreit.

Zimmertemperatur.

Nr.	Tyrosinlös. 0.05 g Ty- rosin 0.04 g Soda 100 ccm Wasser	Zusätze von 0.2 ccm	Beobachtung nach		
			2	4	20
			Stunden		
1.	5 ccm	Frakt. I, nicht gekocht	wasserhell	{ ganz	{ Spur Melanin-
2.	5 "	" I, " "	"	{ schwachrosa	{ bildung
3.	5 "	Frakt. II, nicht gekocht	wasserhell	{ wasserhell	{ wasserhell
4.	5 "	" II, " "	"	{ "	{ "
5.	5 "	Frakt. I + II { nicht	stark rot	{ rot mit	{ starke Melanin-
6.	5 "	" I + II { gekocht	" "	{ einem Stich ins Schwarze	{ bildung; deutlich beginnende Sedi- mentierung
7.	5 "	Frakt. I + II, gekocht	{ hell mit	{ wie nach	{ wie nach 2 Stdn.
8.	5 "	" I + II, "	{ etwas gräuer Eigenfarbe	{ 2 Stunden	{ " " 2 "
9.	5 "	In je ein Gemisch von	{ wasserhell	{ wasserhell	{ wasserhell
10.	5 "	Frakt. I, gekocht und " II, nicht gekocht	"	{ "	{ "
11.	5 "	In je ein Gemisch von	{ stark rot	{ rot mit	{ starke Melanin-
12.	5 "	Frakt. II, gekocht und " I, nicht gekocht	" "	{ einem Stich ins Schwarze	{ bildung; deutlich beginnende Sedi- mentierung

Darstellung von Kochsaft. Kartoffelpreßsaft wird über freier Flamme in ganz schwach essigsaurer Lösung aufgekocht und von dem Eiweißgerinsel abfiltriert. Es resultiert eine klare dunkelgefärbte Lösung, die nach dem Abkühlen fertig zum Gebrauch ist. Man bewahrt sie bei Zimmertemperatur unter Toluol oder Thymol auf.

Dieser Kochsaft enthält also das wirksame Prinzip von Fraktion II, wie aus den Versuchen von Tabelle 3 hervorgeht.

Tabelle 3.

Ersatz der Fraktion II durch Kochsaft.

Zimmertemperatur.

Nr.	Tyrosinlös. 0.05 g Ty- rosin 0.04 g Soda 100 ccm Wasser	Zusätze	Beobachtung nach		
			1/2	2	20
			Stunden		
1.	5 ccm	0.4 ccm Fraktion I	wasserhell	{ ganz	violett gefärbt
2.	5 »	0.4 » » I	»	{ schwachrosa	» »
3.	5 ccm	0.4 ccm Kochsaft	wasserhell	wasserhell	wasserhell
4.	5 »	0.4 » »	»	»	»
5.	5 ccm	In je ein Gemisch von	stark rosa	stark rot	} Melanin- sedimentierung
6.	5 »	0.4 ccm Fraktion I 0.4 » Kochsaft	» »	» »	

Darstellung der Aschelösung aus Kochsaft. 35 ccm Kochsaft werden eingedampft, verkohlt und verascht. Der Rückstand löst sich bis auf einen kleinen Rest in wenig Königswasser. Man verdünnt mit 10 ccm Wasser und macht ganz schwach alkalisch. Hierbei scheidet sich Aluminiumhydroxyd aus. Man schüttelt gut durch und setzt mit einer Probe den Aktivierungsversuch an.

Tabelle 4.

Kann der Ascherückstand des Kochsaftes die Fraktion II ersetzen?

Asche von 35 ccm Kochsaft, in wenig Königswasser gelöst und mit 10 ccm Wasser verdünnt. Mit Natronlauge schwach alkalisch gemacht.

Zimmertemperatur.

Nr.	Tyrosinlös. 0.05 g Ty- rosin 0.04 g Soda 100 ccm Wasser	Zusatz von Fraktion I in ccm	Zusatz von Aschelösung in ccm	Beobachtung nach		
				1	2	20
				Stunden		
1.	5 ccm	0.4	—	wasserhell	wasserhell	Spur Melanin
2.	5 »	0.4	—	»	»	» »
3.	5 ccm	0.4	0.4	rosa	violettrot	} Melanin- niederschlag
4.	5 »	0.4	0.4	»	»	

Wir finden auf Tabelle 4, daß die Kochsaft-Asche die durch Ultrafiltration unwirksam gemachte Tyrosinase wieder aktivieren kann.

Tabelle 5.

Steigerung der Tyrosinasewirkung des Kartoffelpreßsaftes mit Hilfe von Kochsaft.

Preßsaft der Kartoffel Silesia, 4 Tage unter Toluol bei Zimmertemperatur autolysiert.

Zimmertemperatur.

Nr.	Tyrosinlös. 0.05 g Tyrosin 0.04 g Natriumcarbonat 100 cem Wasser	Zusatz von Preßsaft in cem	Zusatz von Kochsaft in cem	Beobachtung nach		
				1/2	1 1/2	20
				Stunden		
1.	5 cem	0.1	—	schwach rosa	rosa	violett gefärbt
2.	5 »	0.1	—	» »	»	» »
3.	5 cem	0.1	0.4	stark rosa	rotbraun	} Melanin- sedimentierung
4.	5 »	0.1	0.4	» »	»	
5.	5 cem	0.03	—	wasserhell	schwach rosa	—
6.	5 »	0.03	—	» »	» »	—
7.	5 cem	0.03	0.4	schwach rosa	rotbraun	—
8.	5 »	0.03	0.4	» »	»	—

Auf Tabelle 5 sehen wir, daß die Tyrosinasewirkung des Originalpreßsaftes durch Kochsaftzusatz noch gesteigert werden kann. Trotzdem der Preßsaft schon 4 Tage unter Toluol gelagert hatte, war er noch äußerst wirksam. Es war beabsichtigt, ihn auf diese Art zu schwächen, um dann die Wirkung des Kochsaftes mehr hervortreten zu lassen. Da dies nicht möglich war, so mußte eine kleine Dose Preßsaft mit einer größeren Menge Kochsaft gemischt werden, um einen sichtbaren Effekt zu erzielen.

Tabelle 6.

Einfluß verschiedener Desinfektionsmittel auf die Tyrosinase.
Preßsaft aus der Kartoffel Silesia, die 9 Monate im Keller gelagert hatte.

Zimmertemperatur.

Nr.	Tyrosinlös. 0.05 g Ty- rosin 0.04 g Soda 100 cem Wasser	Zusatz von Preß-saft in cem	Zusatz des Anti- septicums	Beobachtung nach	
				13/4	20
				Stunden	
1.	5 cem	0.2	Kontrolle	stark rot	Schwarzfärbung
2.	5 »	0.2	ohne Zusatz	» »	»
3.	5 cem	0.2	Chloroform	} fast keine Rötung	} Schwarzfärbung, nicht so stark wie bei 1
4.	5 »	0.2	»		
5.	5 cem	0.2	Thymol	} wie Kont- rollversuch	} wie 1
6.	5 »	0.2	»		
7.	5 cem	0.2	Toluol- schicht	} etwas schwächer als Kon- trollversuch	} violette Schwarz- färbung, heller wie 1
8.	5 »	0.2	1/2—3/4 cem		
9.	5 cem	0.2	Fluor- natrium	} schwachrosa	} Melaninflocken- niederschlag, Flüssigkeit wasserhell
10.	5 »	0.2	0.3 %		

Tabelle 7.

Gibt Toluol einen luftdichten Abschluß?

Terpentinöl, Essigester, Paraffinöl zum Vergleich.

Reagensgläser werden mit ausgekochter 3-proz. Pyrogallollösung gefüllt und mit der Abschlußflüssigkeit überschichtet. Jetzt überall Zusatz von 1 cem ausgekochter konzentrierter Natronlauge.

Zimmertemperatur.

Nr.	Abschlußflüssigkeit in Höhe nach cem	Resultat nach		
		1 Stunde	25 Stunden	40 Stunden
1.	Toluol 2 cm	} schwarzbrauner Ring von ca. 4 mm Stärke an der Grenzzone	} starke schwarz- braune Zone, 6 cm breit	} starke schwarz- braune Zone, 8 cm breit
2.	» 2 »			
3.	Toluol 8 cm	} schwarzbrauner Ring von ca. 3 mm Stärke	} starke schwarz- braune Zone, 2.5 cm breit	} starke schwarz- braune Zone, 3.5 cm breit
4.	» 8 »			
5.	Terpentinöl 1.5 cm	} keine Oxydation	} lichtbraune Zone, 1.5 cm breit	} braune Zone, 1.5 cm breit
6.	» 1.5 »			
7.	Essigester 4.0 cm	} brauner Ring von ca. 3 mm Stärke	} braune Zone, 1.0 cm breit	} braune Zone, 1.5 cm breit
8.	» 4.0 »			
9.	Paraffinöl 3.0 cm	} keine Oxydation	} sehr geringe Bräunung an der Berührungszone	} sehr geringe Bräunung an der Berührungszone
10.	» 3.0 »			

Tabelle 6 zeigt den Einfluß verschiedener Desinfektionsmittel auf die Tyrosinase. Die Versuche wurden wie alle anderen Experimente in Reagensgläsern angestellt bei Zimmertemperatur. Auch dieses Ergebnis wurde durch einen Parallelversuch kontrolliert. Die weiteren Einzelheiten sind aus der Tabelle ersichtlich.

Die Versuche der Tabelle 7 zeigen, daß Toluol ein ausgezeichnete Luftüberträger ist. Weitere Einzelheiten dort.

Zusammenfassung.

1. Die Kartoffel-Tyrosinase läßt sich zerlegen in einen thermolabilen Filtrerrückstand (α -Tyrosinase) und ein kochfestes Filtrat (Aktivator), die, beide für sich geprüft, die Tyrosinasereaktion nicht geben.

2. Das Gemisch der beiden Komponenten ist wieder aktiv.

3. Der inaktive Filtrerrückstand läßt sich durch Kochsaft aktivieren.

4. Auch die Kochsaft-Asche, in Wasser gelöst, vermag den unwirksamen Filtrerrückstand wieder zur normalen Tätigkeit anzuregen.

5. Toluol ist ein Sauerstoff-Überträger.

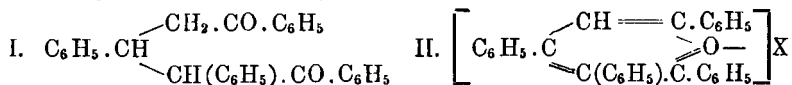
Berlin, Institut für Gärungsgewerbe.

228. W. Dilthey und Th. Böttler: Enol- und Ketoformen ungesättigter 1.5-Diketone. (Über Pyryliumverbindungen, V.)

[Aus dem Chemischen Universitätslaboratorium Erlangen.]

(Eingegangen am 9. Oktober 1919.)

Vor zwei Jahren hat der eine von uns¹⁾ mitgeteilt, daß das durch Anlagerung von Benzal-acetophenon an Desoxy-benzoin entstehende 1.5-Diketon (I.)²⁾ beim Kochen mit Eisenchlorid in Acetanhydrid-Lösung ein Pyryliumsalz II liefert. Wir haben dieses



Salz und seine Pseudobase näher untersucht und sind dabei zu bemerkenswerten Ergebnissen gelangt.

Da die Beständigkeit dieser Salze gegenüber hydrolysierenden Mitteln gering ist, gelingt die Isolierung der zugehörigen Pseudobase leicht, die aus Äther in fast farblosen prismatischen Nadeln vom Schmp. 112—113°³⁾ erhalten wird.

¹⁾ J. pr. [2] 95, 113 [1917].

²⁾ Knoevenagel, A. 302, 236 [1898].

³⁾ Diese Verbindung wird im folgenden der Kürze halber mit »Schmp. 112°« bezeichnet.