

**268. H. v. Euler und K. Josephson:
Über eine Silberverbindung der Saccharase.**

[Aus d. Chem. Laborat. d. Hochschule Stockholm.]

(Eingegangen am 4. Juli 1922.)

Durch das quantitative Studium der Inaktivierung der Saccharase hat der eine von uns in Gemeinschaft mit mehreren Mitarbeitern versucht, Anhaltspunkte über die Bildung von Derivaten der Saccharase zu gewinnen. Schon die ersten genaueren Untersuchungen über die Inaktivierung dieses Enzyms durch Silbersalze¹⁾ hatten uns zu der Annahme geführt, daß es sich bei dieser, wie sich zeigte, vollständig reversibeln Inaktivierung (Vergiftung) um eine Verbindung der Saccharase mit Silber handelt. Daß sich ein solcher Körper tatsächlich bildet, haben wir experimentell dadurch festgestellt, daß eine mit der Inaktivierung parallel gehende Konzentrationsabnahme der freien Silber-Ionen in der Lösung nachgewiesen wurde, und zwar in einem Grad, welcher, wenigstens der Größenordnung nach, mit der Annahme der Bildung einer Silber-saccharase wohl vereinbar war²⁾.

Seitdem sind die Inaktivierungsmessungen an reineren Enzympräparaten wiederholt und noch weiter verfolgt worden, und es hat sich dabei durch die Messungen von Myrbäck³⁾ herausgestellt, daß für jede Acidität eine Vergiftungsgrenze existiert, über welche hinaus weitere Silberzusätze die Aktivität des Enzyms nicht mehr beeinflussen. Die diesbezüglichen Beobachtungen sind bereits mitgeteilt worden, und ihre Diskussion wird an anderer Stelle erfolgen.

Im Anschluß an Arbeiten, welche bezwecken, über die chemische Zusammensetzung der Saccharase selbst Aufschlüsse zu erhalten⁴⁾), haben wir versucht, eine Silberverbindung der Saccharase zu isolieren. Wir sind dabei zu einer Substanz gelangt, welche zwar noch recht weit davon entfernt ist, die reine Silber-saccharase darzustellen, deren Zusammensetzung aber bereits in mancher Hinsicht Interesse verdient.

¹⁾ Euler u. Svanberg, Fermentforsch. 3, 330 u. 4, 29 [1920]

²⁾ Euler u. Svanberg, Fermentforsch. 4, 142 [1920].

³⁾ Euler u. Myrbäck, H. 121 [1922] und Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi 8 [1922].

⁴⁾ Euler u. Svanberg, H. 112, 282 [1921] und Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi 8, Nr. 12 [1921].

⁵⁾ Euler u. Josephson, Sv. Akad. Vet. Arkiv f. Kemi 8 [1922] und Sv. Kem. Tidskr. 34, 74 [1922].

Darstellung.

Während wir zur Untersuchung der Saccharase selbst eine Enzym-Lösung angewandt haben, welche durch die Konstante $I_f = 107$ bezw. durch den Ausdruck $\pm 0^\circ = 0.43$ Min. charakterisiert ist¹⁾, haben wir die hier beschriebene Silber-saccharase aus einer schwächeren Lösung dargestellt, nämlich von $I_f = 42$. Diese Lösung gab nach 5-stündiger Hydrolyse mit 5-proz. Schwefelsäure zufolge eines Reduktionsversuches mit Fehlingscher Lösung (Mikro-Bertrand) eine Reduktion entsprechend einem Gehalt von ca. 70% Glykose.

Die Saccharase-Lösung wurde im Vakuum eingengt, bis sie etwa 1-proz. wurde, worauf ein Überschuß von Silbernitrat zugesetzt wurde. Zunächst blieb die Lösung scheinbar unverändert, erst nach einigen Stunden trat eine bräunliche Färbung in der immer noch klaren Lösung auf. Wurde zu der mit Silbernitrat versetzten Lösung starker Alkohol (in einer Menge, durch welche in der silberfreien Enzymlösung eine Fällung noch nicht eintritt) zugegeben, so fiel eine braune Substanz aus, welche durch Zentrifugieren leicht von der überstehenden Lösung geschieden werden konnte. Die abzentrifugierte Fällung löste sich in Wasser (mit brauner Farbe); sie wurde aufs neue mit Alkohol gefällt und zentrifugiert. Hierauf wurde die Fällung mit Alkohol und schließlich mit Äther gewaschen. Nach vollständiger Entfernung des Äthers im Vakuum zeigte die Substanz immer noch eine schwach rotbraune Färbung.

Untersuchung der silberhaltigen Fällung.

Um eine Vorstellung vom Reinheitsgrad dieser Fällung zu gewinnen, wurde ihr Gehalt an Kohlehydraten untersucht, und zwar sowohl nach einer auf die Reaktion von Molisch gegründeten Methode als durch Bestimmung der Reduktionsfähigkeit der Lösung nach vorausgegangener Hydrolyse. Aus den Ergebnissen der erstgenannten Methode würde man auf einen Kohlehydrat-Gehalt von rund 50% schließen können. Zur Bestimmung der Reduktionsfähigkeit wurden 3.28 mg Substanz, aufgelöst in 5 ccm Wasser, verwendet. Nach 5-stündiger Hydrolyse mit 5-proz. Schwefelsäure erfolgte die Untersuchung mit Fehlingscher Lösung. Bei der Titration wurden 1.45 ccm KMnO_4 (0.039-n.) verbraucht, was 1.5 mg Glykose entspricht. In angenäherter Übereinstimmung mit dem Resultat der Mikro-Untersuchung nach Molisch berechnet sich hieraus ein Kohlehydrat-Gehalt von 46%.

¹⁾ Bezügl. der Darstellung verweisen wir auf die Angaben in der demnächst erscheinenden Monographie Euler, Chemie d. Enzyme, II. Tl., S. 182 u. ff. und auf eine Arbeit von K. Josephson in Vet. Akad. Arkiv f. Kemi 8 [1922].

Dieser Kohlehydrat-Gehalt dürfte zum größten Teil auf einer Verunreinigung des Präparates mit Hefengummi beruhen. Durch die Alkohol-Konzentration, welche sich bei der Fällung einstellte, wurde nämlich auch der Hefengummi, welcher im Ausgangsmaterial enthalten war, gefällt.

Das Hauptgewicht haben wir auf die Bestimmung der relativen Mengen von N und P in dieser Silberverbindung gelegt, es wurde aber auch gleichzeitig eine vollständige Verbrennung durchgeführt, und zwar hat uns hierbei die Mikromethodik von Pregl sehr gute Dienste geleistet. Die Ausführung der C- und H-Verbrennungen nach dieser Methode verdanken wir Hrn. Lic. phil. Allan Bernton.

2.717 mg Sbst.: 4.136 mg CO₂, 1.841 mg H₂O. — 6.07 mg Sbst.: 0.275 mg N (Mikromethode von Kjeldahl-Bang). — 6.07 mg Sbst.: 3.37 mg Molybdat (mitt. Ammonium-phosphomolybdats). — 11.275 mg Sbst.: 0.605 mg AgJ (mikroanalytisch als Jodsilber gewogen). — 1.398 mg Sbst.: 0.063 mg = 4.5% Glührückstand.

Man erhält also für die Silberverbindung:

	Ag	P	N	C	H	O
%	2.5	0.81	4.5	41.5	7.6	43.1
%/Atomgew. . .	0.023	0.026	0.32	3.5	7.6	2.7

Zum Vergleich teilen wir ein früher an einem Saccharase-Präparat von $t_f = 107$ ($\pm 0^\circ = 0.43$ Min.) erhaltene Analyse mit:

	P	N	C	H	O
%	1.0	5.0	44.3	8.7	41.0
%/Atomgew. . .	0.032	0.36	3.7	8.7	2.6

Bezüglich der Übereinstimmung zwischen den für die Saccharase selbst und ihre Silberverbindung erhaltenen Zahlen wollen wir zunächst das Verhältnis N:P hervorheben; dasselbe ergibt sich für die Saccharase zu 5.5, während für die Silberverbindung 5.0 gefunden wurde. C und H sind, wie zu erwarten, bei der Saccharase selbst etwas höher als bei der Silberverbindung. Bemerkenswert halten wir das Verhältnis Ag:P, welches 1.1 beträgt; eine vollständigere Annäherung an den theoretischen Wert ließ sich unter den vorliegenden Umständen kaum erwarten. In Übereinstimmung mit den Silber- und Phosphor-Bestimmungen wurde der Aschengehalt zu 4.5% gefunden. Nimmt man an, daß der Glührückstand aus reinem Silbermetaphosphat bestand, so berechnet sich hieraus der Silbergehalt der Substanz zu 2.6 (statt 2.5, direkt gef.).

Willstätter und Racke¹⁾ haben bei der Analyse ihrer sehr wirksamen, mit Hilfe ihrer ausgezeichneten Methodik gewonnenen Saccharase-Präparate meist sehr hohe Glührückstände erhalten, und zwar lieferten Präparate von den

¹⁾ Willstätter u. Racke, A. 425, 1 [1921] und 427, 111 [1922].

Zeitwerten 0.73 und 0.86 sogar 44.8 und 21.6% Asche. Indessen gelang es ihnen auch, ascheärmere Präparate zu gewinnen, z. B. eines vom Zeitwert 1.0 mit 3% Glührückstand. Worauf der hohe Aschengehalt der Präparate Willstätters beruht, können wir nicht beurteilen.

Das Präparat Willstätters und Rackes vom Zeitwert 1.0 enthält 5.2% Stickstoff. Das neue Präparat vom Zeitwert 1.4, das noch hefe gummihaltig ist, enthält nur 4.0% N und, auf aschefreie Substanz berechnet, 41.7 C und 7.1 H, während das durch den Zeitwert 1.0 gekennzeichnete ähnliche Präparat 44.3 C aufweist.

Es ist eingangs erwähnt worden, daß die quantitativen Bestimmungen der Inaktivierung in Verbindung mit den elektrometrischen Bestimmungen über die Bindung des Silbers an Saccharase-Präparate sich bezüglich der Zusammensetzung der Saccharase auswerten lassen. Aus den von Myrbäck für verschiedene Aciditäten erhaltenen Konzentrations-Kurven der Inaktivierung kann mit ziemlicher Annäherung ein Grenzwert der Silber-Vergiftung per Gewichtseinheit Enzympräparat extrapoliert werden. Für 0.3 mg eines Präparates vom Zeitwert 0.58 Min. ($I_f = 80.0$) wurde ein Inaktivierungsgebiet von 0.014—0.010 mg Ag-Ion festgestellt. Unter der durch die Kohlehydrat-Bestimmungen gestützten Annahme, daß das analysierte Saccharase-Präparat 40% Kohlehydrat¹⁾ enthält, würden hiernach im Mittel

¹⁾ Unter Abrechnung von 40% reduzierender Verunreinigung wären für die hypothetische reine Saccharase, für welche wir einstweilen die Inversionsfähigkeit $I_f = 185$ ($\pm 0^\circ = 0.25$ Min.) extrapolieren, die Prozentgehalte von Ag, P und N im Verhältnis 6:10 zu erhöhen. Bezüglich des C- und H-Gehaltes müssen die vom verunreinigenden Kohlehydrat gelieferten Mengen CO_2 und H_2O von den gefundenen Mengen abgezogen werden. Bei dieser Bestimmung wurden 2.717 mg Sbst. verwendet; die Menge der nicht zur Saccharase gehörigen Kohlehydrate betrug 1.09 mg.

1.09 mg $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$; 1.77 mg CO_2 , 0.61 mg H_2O .

Zieht man diese Zahlen von den für Silber-saccharase gefundenen ab, so würde sich für die reine Substanz ergeben:

39.6% C und 8.4% H,

und die Zusammensetzung würde sich folgendermaßen stellen:

	%	%/Atomgew.	%/Atomgew. 0.044
Ag	4.2	0.039	0.9
P	1.35	0.044	1.0
N	7.5	0.54	12
C	39.6	3.3	75
H	8.4	8.4	190
O	38.9	2.5	57

Hieraus würde sich als Mindest-Molekulargewicht für die Silberverbindung rund 2300 ergeben und für die Saccharase selbst rund 2200. Auf Grund von Diffusionsmessungen haben kürzlich Euler und G. Ericson (Koll. Ztschr. 31, 3 [1922]) an einem Saccharase-Präparat vom Zeitwert 0.55 Min. ein scheinbares Molekulargewicht von 20000 gefunden. Wie schon früher gelegentlich betont wurde, ist dieser Wert sehr wahrscheinlich durch Polymerisation (Nebenvalenzen) beeinflusst (etwa 8—10 Mindestmoleküle auf 1 Partikel).

0.012 mg Ag 0.3 mg Saccharase entsprechen, und man erhält in guter Übereinstimmung mit den Analysen der Silberverbindung das Atomverhältnis Ag:P = 1.1.

In ähnlicher Weise ist dann versucht worden, die Inaktivierung der Saccharase durch Halogen mit der analytisch gemessenen Halogenaufnahme der Präparate in Verbindung zu setzen. Diese Versuche, welche in einer vorläufigen Mitteilung beschrieben worden sind, haben aber bis jetzt noch zu keinem endgültigen Ergebnis geführt.

**269. Karl Freudenberg und Erich Vollbrecht:
Der Gerbstoff der einheimischen Eichen. (10. Mitteilung
über Gerbstoffe und ähnliche Verbindungen ¹⁾.)**

(Eingegangen am 10. Juli 1922.)

Die Untersuchung des Gerbstoffs der Edelkastanie, über die vor einiger Zeit einige Angaben gemacht wurden ²⁾, mußte aus zwei Gründen zurückgestellt werden. Zunächst hatte sich gezeigt, daß die Blätter der Eiche dieselbe neue Gerbstoffart in einem besser erhaltenen Zustande beherbergen und deshalb als Ausgangsmaterial vorzuziehen sind; weiterhin hatte sich ergeben, daß die zum Abbau nötige Tannase in ihrer bisherigen Form nicht genügte. Nachdem inzwischen das Enzym untersucht und in viel stärkeren Präparaten zugänglich gemacht worden ist ³⁾, konnte die Untersuchung wieder aufgenommen werden, und zwar nunmehr am Gerbstoffe von *Quercus pedunculata*.

Daß frische Pflanzenteile verwendet werden müssen, ist schon früher ausgesprochen worden ⁴⁾, deshalb wurde als Ausgangsmaterial unverwelktes Eichenlaub gewählt und damit der Weg in das bisher unzugängliche Gebiet des Eichen-Gerbstoffs erschlossen ⁵⁾. Da inzwischen K. Feist und R. Schön ⁶⁾ bei der Untersuchung des Rinden-Gerbstoffs der Eiche gleichfalls zu dem Entschluß gelangt sind, den Blatt-Gerbstoff zu untersuchen, wollen wir in Kürze über unsere einstweilen gewonnenen Ergebnisse berichten ⁷⁾.

¹⁾ 9. Mitteilung: B. 55, 1734 [1922].

²⁾ K. Freudenberg und H. Walpuski, B. 54, 1698 [1921].

³⁾ K. Freudenberg und E. Vollbrecht, H. 116, 277 [1921].

⁴⁾ K. Freudenberg: Die Chemie der natürl. Gerbstoffe, Berlin 1920, S. 136.

⁵⁾ vergl. K. Freudenberg: Naturwiss. 8, 903 [1920].

⁶⁾ Ar. 258, 317 [1920].

⁷⁾ Eine ausführliche Mitteilung folgt später in Liebigs Annalen.