

59. H. v. Euler und K. Josephson: Über Darstellung eines hochaktiven Invertins und über dessen Schwefel-Gehalt.

(Eingegangen am 27. Dezember 1922.)

I. Zur Methodik der Reinigung des Invertins¹⁾.

In der vorhergehenden Mitteilung²⁾ haben wir die Darstellung eines Invertins von der Wirksamkeit $If = 216$ (Minutenwert 0.27) beschrieben. Wir wollen hier zunächst das bedeutend einfachere Verfahren angeben, mit welchem wir unter Verwendung von »gealtertem Autolysesaft« (Willstätter³⁾) zu Präparaten von ähnlichen Reinheitsgraden ($If = 182$; Minutenwert 0.32) gelangt sind.

Ausgangsmaterial war ein Autolysesaft von $If = 0.48$, welcher ca. 1 Monat teils bei Zimmertemperatur, teils — zur Beschleunigung des Alterungsvorganges — bei 35° gestanden hatte. Zusatz von Alkohol erzeugte eine ungewöhnlich geringe Fällung, da die durch Alkohol fällbaren hochmolekularen Verunreinigungen teilweise in einfachere Stoffe gespalten worden waren. Durch Behandlung der Fällung mit Wasser wurde die Lösung Xa erhalten, deren Inversionsfähigkeit If den Wert 3.6 besaß. (Zwecks Raumersparnis beschränken wir uns hier auf die Angabe der aus den Inversionskonstanten und dem Trockensubstanzgehalt ausgerechneten Zahlen für If .) Die Lösung, 1250 ccm, wurde auf 5 l verdünnt und mit 250 ccm Tonerdehydrat-Emulsion, enthaltend 8.5 g Al_2O_3 , versetzt. Das Sorbat wurde abgesaugt, mit destilliertem Wasser gewaschen und mit 800 ccm 1-proz. Kaliumarseniat + 0.1 % Ammoniak eluiert. Die Behandlung des Sorbates mit der Elutionsflüssigkeit dauerte etwa 30 Min. Nachdem die Elution abgesaugt war, wurde die schwach ammoniakalische Lösung mit $MgCl_2$ versetzt, wodurch die Arsensäure zum größten Teil ausfiel. Nach Abfiltrieren der Fällung wurde mit Essigsäure neutralisiert und die Aktivität bestimmt. Die Elutionsausbeute betrug 70 %. Bei der hierauf folgenden 16-stündigen Dialyse veränderte sich die Aktivität nicht; $If = 40$. Der Reinheitsgrad war somit von der gleichen Größenordnung wie bei den mit unserem älteren Verfahren mit Kaolin sorbierten Präparaten.

Die Lösung XaA (840 ccm) wurde auf 5 l verdünnt und mit 50 ccm Tonerdehydrat-Emulsion (1.7 g Al_2O_3) versetzt. Die Sorption der Saccharase war beinahe vollständig. Die Elution (465 ccm; Elutionsausbeute 60 %) wurde dialysiert, und zwar zuerst gegen reines destilliertes Wasser und dann gegen destilliertes Wasser, welches durch Zusatz von Salpetersäure schwach angesäuert war ($p_H = 3.5$). Während der Dialyse trübte sich die Enzymlösung; nach 24 Stdn. wurde die Dialyse abgebrochen und die Lösung mit Kieselgur behandelt. Nach Abfiltrieren der Kieselgur war die Lösung vollkommen klar; die Dialyse konnte nun während weiterer 48 Stdn. gegen

¹⁾ Als »Invertine« wollen wir die aus Hefezellen und ähnlichem Material gewonnenen Enzympräparate bezeichnen, welche aus dem Autolysesaft der Hefe oder durch Extraktion der getrockneten Zellen gewonnen werden und Rohrzucker enzymatisch invertieren, also Saccharase als Hauptbestandteil enthalten. Invertin bezeichnet dann also eine natürliche Enzymgruppe, wie Emulsin, Pankreatin u. a. Saccharase nennen wir das reine, spezifisch Rohrzucker spaltende Enzym.

²⁾ B. 56, 446 [1923].

³⁾ vergl. Willstätter und Wassermann, II. 123, 181 [1922].

angesäuertes Wasser ($p_H = 3.5$) und schließlich noch 48 Stdn. gegen reines destilliertes Wasser weitergeführt werden. Durch Anwendung einer sauren Außenflüssigkeit bei der Dialyse hofften wir, den Aschengehalt des Präparates herabzudrücken, da die Dialyse evtl. beigemengter Metallsalze dadurch erleichtert werden konnte. Indessen zeigte das Präparat nach der Dialyse doch den gewöhnlichen Aschengehalt (2.86%). Um die beabsichtigte Wirkung zu erzielen, muß vielleicht die Dialyse noch weiter verlängert werden.

Unter dem Einfluß der insgesamt 6-tägigen Dialyse und der eingeschalteten Behandlung mit Kieselgur sank die Aktivität um nur 10%. Das solchermaßen mittels einer Alkohol-Fällung und 2 Tonerde-Sorptionen gereinigte Invertin zeigte eine Aktivität entsprechend $If = 182$ (Minutenwert 0.32).

Bei der Prüfung des Präparates mit verschiedenen Reagenzien gaben folgende positiven Ausschlag:

Molischs Reagens. Millons Reagens (Rotfärbung bei der Untersuchung der 2.5-proz. Lösung des Präparates). Starke Salpetersäure färbte die 2.5-proz. Invertinlösung gelb. Biuretreaktion (2.5-proz. Invertin).

Es verdient vielleicht erwähnt zu werden, daß die 2.5-proz., durch Eindunsten im Vakuum erhaltene Enzymlösung nicht ganz klar war. Auch eine analoge Lösung von etwas niedrigerer Konzentration zeigte eine schwache Opaleszenz. Beim Aufbewahren dieser Lösung unter Toluol nahm die Trübung zu, so daß eine beabsichtigte Prüfung mit kolloidalem Eisen nicht ausgeführt werden konnte.

Was die Reaktion von Molisch betrifft, so gaben alle unsere Invertin-Lösungen, selbst die verdünnten, einen positiven Ausschlag. Auch das in der vorhergehenden Mitteilung beschriebene Präparat $If = 216$ gab schwache Rotfärbung, wenn $\frac{1}{2}$ ccm Enzymlösung von 0.022% mit 1 ccm konz. Schwefelsäure behandelt wurde.

Somit gab die Lösung des Invertinpräparates typische Eiweiß-Reaktionen.

II. Schwefel-Gehalt von Invertin-Präparaten.

Der Schwefelgehalt von früheren Präparaten wurde in der vorhergehenden Mitteilung erwähnt. Um die daselbst ausgesprochenen Zweifel hinsichtlich der Herstammung dieses Schwefels zu beseitigen, wurde bei der Herstellung des oben beschriebenen Präparates XaAA nur solche Tonerde zur Sorption verwendet, welche aus Aluminiumchlorid hergestellt worden war.

Bei der Prüfung des neuen Präparates XaAA mit alkalischer Bleilösung, wobei eine bedeutend größere Enzymmenge zur Anwendung kam als früher, konnte nunmehr deutliche Schwarzfärbung nach 10 Min. langem kräftigem Kochen beobachtet werden. Das Präparat enthält also leicht abspaltbaren, organisch gebundenen Schwefel.

Zur quantitativen Bestimmung des S-Gehaltes wurde ein Präparat nach den Vorschriften von Pregl verbrannt:

23.76 mg Sbst.: 0.681 mg Asche, 0.65 mg $BaSO_4$.
Gef. Asche 2.86, S 0.38.

Welchem Bestandteil unserer Invertinpräparate der Schwefel zugehört, kann natürlich noch nicht entschieden werden. Die Möglichkeit, den Schwefel mittels alkalischer Bleisalzlösung abzuspalten, deutet darauf hin, daß der Schwefel hier in ähnlicher Weise vorhanden bzw. gebunden ist, wie in den Proteinen. Die Anwesenheit einer SH-Gruppe in der Saccharase ist schon früher (Fermentf. Bd. 4 [1920]) in Erwägung gezogen worden.

Folgende Berechnung wollen wir unter den schon früher gemachten Vorbehalten mitteilen, da sie für unsere weiteren Versuche begleitend ist: Ein S-Gehalt von 0.38% in einem Präparat von $I_f = 182$ würde unter Voraussetzung, daß der Schwefelgehalt der aktiven Saccharase zugeschrieben werden kann, einem S-Gehalt von 0.48% eines Präparates von $I_f = 230$ entsprechen. Falls dieser S-Gehalt einem Atom Schwefel entspricht, so berechnet sich das Verbindungsgewicht des Saccharase-Moleküls zu 6700. Dieser Wert ist etwas höher als diejenigen Zahlen, welche aus den Vergiftungsversuchen mit Silbersalz, mit Brom und aus der Analyse einer Silberfällung (»Silber-saccharase«) erhalten wurden.

Folgende Zusammenstellung enthält die nach den verschiedenen Methoden gewonnenen Verbindungsgewichte:

Silber-Inaktivierung ¹⁾	4000—5000
Analyse der Silberfällung ²⁾	5000—6000
Brom-Inaktivierung ³⁾	4000—5000
S-Gehalt	6000—7000.

Wenn auch, wie wiederholt bemerkt, die Berechnungsweisen, welche diesen Zahlen zugrunde liegen, viel Hypothetisches enthalten, so ist die Übereinstimmung der Größenordnung doch bemerkenswert. Im besonderen muß natürlich berücksichtigt werden, daß die Berechnung sich auf die Annahme $I_f = 230$ für reine Saccharase gründet. Hierbei ist ferner nicht nur eine unbewiesene Annahme über die Grenze der Reinigung gemacht, sondern auch vorausgesetzt, daß die Aktivität im wesentlichsten auf der Aktivität einer einzigen Saccharase-Molekülarart von maximaler Aktivität beruht. Abgesehen hiervon, bleibt natürlich die Möglichkeit offen, daß die Saccharase mehr als 1 Atom S enthält.

60. Alfred Coehn und Heinrich Tramm: Zum Mechanismus photochemischer Vorgänge, II.: Das Verhalten trocknen Knallgases.

(Eingegangen am 28. Dezember 1922.)

In der ersten Mitteilung⁴⁾ war gezeigt worden, daß ein Gemisch von Kohlenoxyd und Sauerstoff nach so weitgehender Entfernung von Feuchtigkeitsspuren, daß es am Funken weder explodiert, noch auch nur sich entzündet, von ultraviolettem Licht mit derselben Geschwindigkeit vereinigt wird wie ein feuchtes Gemisch.

Die Rolle des Wasserdampfes bei der Dunkelreaktion kann auch nach den Untersuchungen von Wieland⁵⁾ und von v. Wartenberg⁶⁾ nicht als aufgeklärt gelten. Denn — wie in der Dissertation von H. Tramm in ausführlicherer Darlegung gezeigt wird — ist einerseits bei hoher Temperatur die Bildung der als Zwischenkörper angenommenen Ameisensäure nur in minimaler Menge möglich und kann andererseits ein Gemisch von Ameisensäure und Sauerstoff . . . , das nach der Annahme der genannten Autoren Träger der Explosion sein soll, . . im Funken überhaupt nicht

¹⁾ Euler und Myrbäck, Sv. Kem. Tidskr. 34, Nr. 12 [1922].

²⁾ Euler und Josephson, B. 56, 446 [1923].

³⁾ Euler und Josephson, II. 125 [1923].

⁴⁾ B. 54, 1148 [1921].

⁵⁾ B. 45, 679, 2606 [1912].

⁶⁾ B. 53, 2192 [1920].