

Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft.

1934, Nr. I.

— Abteilung B (Abhandlungen) —

10. Januar.

**1. W. Grassmann, L. Zechmeister, R. Bender und G. Tóth:
Über die Chitin-Spaltung durch Emulsin-Präparate (III. Mitteil. über
enzymatische Spaltung von Polysacchariden).**

[Aus d. Chem. Laborat. d. Bayer. Akademie d. Wissenschaften in München u. d. Chem.
Institut d. Universität Pécs, Ungarn.]
(Eingegangen am 7. November 1933.)

Theoretischer Teil.

Chitin und seine dextrin-artigen Abbauprodukte werden, wie wir kurz berichtet haben, von Pilz-Auszügen¹⁾ und von Emulsin-Präparaten²⁾ gespalten³⁾. In der Fortführung unserer Versuche wurden einerseits Chitodextrin-Präparate verschiedener Molekulargröße, sowie Präparate von Chitobiose und Chitotriose, andererseits Emulsin-Präparate verschiedener Herkunft und verschiedenen Reinheitsgrades zur Untersuchung herangezogen. Das von uns zunächst (I. c.) angewandte Mercksche Emulsin-Präparat zerlegt nach neuen Versuchen niedrigermolekulare Oligosaccharide aus Chitin erheblich langsamer als höhermolekulare Glieder derselben Reihe; Chitobiose und -triose werden kaum gespalten. Das ist aber nicht das allgemeine Verhalten der Emulsin-Präparate.

Vom rohen, lediglich entölten Mandel-Pulver werden nämlich die beiden N-haltigen Oligosaccharide nur wenig langsamer zerlegt als das höhermolekulare Chitodextrin. Auch das nach B. Helferich und S. Winkler⁴⁾ durch Tannin-Fällung gereinigte Emulsin zeigt ihnen gegenüber noch eine beträchtliche Wirksamkeit, dagegen erweisen sich die durch fraktionierte Fällung mit Silberacetat weitergereinigten Präparate als kaum wirksam. Zwischen dem Spaltungsvermögen für Chitodextrin und dem für die Biose und Triose besteht also keineswegs Parallelität. Das relative Spaltungsvermögen für die beiden Substrate schwankt bei verschiedenen Enzym-Präparaten mindestens im Verhältnis 1:30.

Wir erblicken in diesen Ergebnissen einen Hinweis darauf, daß die Verhältnisse hier ähnlich gelagert sein können, wie bei der enzymatischen

¹⁾ A. 503, 174. Die dort (Tab. 2) mitgeteilten Versuche beziehen sich nicht, wie irrtümlich angegeben, auf Chitodextrin, sondern auf Chitin.

²⁾ B. 65, 1706 [1932].

³⁾ Spaltung des Chitins durch den Darmsaft der Weinbergs-Schnecke, vergl. P. Karrer u. Mitarb., *Helv. chem. Acta* 12, 616, 986 [1929].

⁴⁾ *Ztschr. physiol. Chem.* 209, 269 [1932].

Hydrolyse der Cellulose, wo zwischen einer Polysaccharase (Spaltung hochmolekularer Substrate) und einer Oligosaccharase (Hydrolyse niedermolekularer Cellulose-Abbauprodukte) zu unterscheiden ist⁵⁾.

Der von uns früher vertretenen Auffassung, wonach die Spaltbarkeit der Chitodextrine durch Emulsin als Argument für die β -glucosidische Natur des Chitins zu bewerten sei, wird, wie wir ausdrücklich betonen möchten, durch unsere neuen, umfassenderen Versuche die experimentelle Stütze entzogen. Die Frage, welche Konfiguration vom chitin-spaltenden Enzym bevorzugt wird, bleibt also weiterhin offen.

Ein Vergleich verschiedener Emulsin-Präparate in bezug auf ihr Spaltungsvermögen für Salicin, Cellobiose, Cellodextrin, Chitodextrin, Chitotriose und -biose (Tabelle 1) zeigt nämlich, daß nur die Cellobiase-Wirksamkeit der Emulsin-Präparate einigermaßen mit der Wirkung gegenüber dem „Standard-Substrat“ der β -Glucosidase⁶⁾, Salicin, parallel geht. Vergleicht man, wie dies in Tabelle 1, I–IV geschehen ist, solche Mengen der einzelnen Präparate, die hinsichtlich der β -Glucosidase- bzw. Cellobiase-Wirksamkeit übereinstimmen, so findet man die größte Wirksamkeit gegenüber Chitodextrin beim entölten Mandel-Pulver (β -Glucosidase-Wert 0.033), eine nur sehr geringfügige bei den weitgehend nach Helferich und Winkler (l. c.) gereinigten Präparaten (β -Glucosidase-Wert über 4), während Präparate mittlerer Reinheit eine Zwischenstellung einnehmen. Der Träger des Spaltungsvermögens gegenüber Chitodextrin, das im rohen Ausgangsmaterial demjenigen gegen Cellobiose größenordnungsmäßig gleich ist, wird also im Gange des von Helferich und Mitarbeiter (l. c.) ausgearbeiteten Reinigungsverfahrens zum allergrößten Teile abgetrennt.

Das chitin-spaltende Ferment ist demnach offenbar nicht mit der β -Glucosidase identisch. Es scheint sich von ihr auch hinsichtlich der Verteilung im Mandelkern zu unterscheiden. Die Häute der Mandeln bzw. die ihnen benachbarten Teile des Kerns, die durch Abschälen oder durch Aussieben des mäßig fein gepulverten Materials leicht angereichert werden können, zeigen nämlich eine verhältnismäßig hohe Chitinase-Wirksamkeit, der nur ein geringer β -Glucosidase-Gehalt gegenübersteht. Die verhältnismäßig chitinase-reichen Lösungen, die bei der Extraktion dieses Materials erhalten werden, lassen sich, beispielsweise durch Tonerde C_7 , ohne größeren Verlust von der β -Glucosidase, die leicht adsorbierbar ist, fast vollständig befreien. Wir sind so zu Lösungen gelangt, von welchen die Cellobiose rund 70-mal langsamer zerlegt wird als Chitodextrin, während umgekehrt die nach Helferich und Winkler gereinigten Präparate das Chitodextrin mindestens 50-mal langsamer spalten als Cellobiose. Die Verschiebung des Zeitwert-Quotienten im Verhältnis 1:3500, die wohl leicht weiter gesteigert werden könnte, dürfte, auch unter Berücksichtigung möglicher Affinitäts-Unterschiede, für die Nicht-identität der beiden Enzyme beweisend sein.

Es wird noch zu untersuchen sein, inwiefern N-haltige Kohlenhydrate in den Mandeln vorkommen.

⁵⁾ W. Grassmann, L. Zechmeister, G. Tóth u. R. Stadler, A. **503**, 167 [1933].

⁶⁾ R. Weidenhagen, Ztschr. Ver. Dtsch. Zucker-Ind. **79**, 596 [1929].

Beschreibung der Versuche.Tabelle 1: Vergleich der Chitinase- und β -Glucosidase-Wirkung verschiedener Emulsin-Präparate.(Die Angaben beziehen sich auf die Titrationsprobe von 4 ccm; $m/_{25}$ -Acetat-Puffer, $pH = 4.45$; $t = 30^{\circ}$.)

Enzym-Material	mg	β -Glucosidase-Wert ⁷⁾	Substrat	mg	Spaltung (ccm $n/_{50}$ -Jodlsg.) nach Stdn.		
					2	8	24
I)							
Mandelpulver, entölt	29.7	0.03	Cellobiose	13.7	0.78	1.84	2.44
„	29.7	0.03	Cellodextrin	13.7	0.03	0.25	0.76
„	29.7	0.03	Chitodextrin III (höhermolekular)	13.7	0.62	1.17	2.28
„	29.7	0.03	Chitotriose	26.9	0.50	0.92	1.41
„	29.7	0.03	Chitobiose	18.2	0.42	0.80	1.43
II)							
Emulsin Merck ..	6.0	0.2	Chitodextrin I (höhermolekular)	13.7	0.43	1.10	1.26
„	6.0	0.2	Chitodextrin II (niedermolekular)	13.7	0.07	0.35	0.40
„	5.56	0.175	Cellobiose	13.7	0.78	2.07	2.98
„	5.56	0.175	Cellodextrin	13.7	0.01	0.01	0.21
„	5.56	0.175	Chitodextrin III ...	13.7	0.36	0.61	1.04
„	5.56	0.175	Chitotriose	26.9	0.04	0.04	0.07
„	5.56	0.175	Chitobiose	18.2	0.00	0.00	—0.04
III)							
Durch Tannin-Fällung vorgereinigtes Präparat ⁷⁾	2.0	0.49	Cellobiose	13.7	0.98	2.27	3.35
„	2.0	0.49	Cellodextrin	13.7	0.03	0.04	0.32
„	2.0	0.49	Chitodextrin III ...	13.7	0.30	0.59	1.03
„	2.0	0.49	Chitotriose	26.9	0.04	0.16	0.30
„	2.0	0.49	Chitobiose	18.2	0.00	0.09	0.54
IV)							
Durch Ag-Fällung gereinigtes Präparat ⁸⁾	0.235	4.17	Cellobiose	13.7	1.04	2.72	3.59
„	0.235	4.17	Cellodextrin	13.7	0.04	0.09	0.34
„	0.235	4.17	Chitodextrin III ...	13.7	0.02	0.04	0.27
„	0.235	4.17	Chitotriose	26.9	0.03	0.06	0.13
„	0.235	4.17	Chitobiose	18.2	0.03	0.03	0.10
V)							
Restlsg. nach Adsorption an Ton- erde C γ (vergl. Vers.), 0.8 ccm	4.8	0.0014	Cellobiose	13.7	0.02	0.06	0.08
desgl.	4.8	0.0014	Cellodextrin	13.7	0.02	0.07	0.10
desgl.	4.8	0.0014	Chitodextrin III ...	13.7	0.27	0.75	1.07
desgl.	2.4	0.0014	Chitodextrin III ...	13.7	0.20	0.50	0.78
desgl.	4.8	0.0014	Chitotriose	26.9	—0.20	—0.12	0.05
desgl.	4.8	0.0014	Chitobiose	18.2	—0.14	—0.07	0.00

⁷⁾ Bestimmt mit Salicin, vergl. R. Weidenhagen, Ztschr. Ver. Dtsch. Zucker-Ind. 79, 591 [1929].⁸⁾ Nach B. Helferich u. S. Winkler, Ztschr. physiol. Chem. 209, 269 [1932].

1. Enzym-Präparate und Substrate. a) 750 g süße Mandeln wurden in der Mandel-Mühle zerkleinert, unter 350 Atm. abgepreßt und der wieder gemahlene Preßkuchen mit Äther 2-mal gewaschen. Wir erhielten hieraus 320 g rohes, entöltes trocknes Mandel-Pulver (Tabelle 1, I). Aus dem Mandel-Pulver stellten wir nach B. Helferich und S. Winkler (l. c.) durch fraktionierte Tannin-Fällung und Ag-Acetat-Fällung Emulsin-Präparate verschiedenen Reinheitsgrades dar. Die Ergebnisse enthält Tabelle 1, III und IV, sowie Tabelle 2.

b) Chitodextrin I. 6.88 % N, Jodzahl 20.9⁹⁾, ungefähr der Pentaose-Stufe entsprechend. — Chitodextrin III: Jodzahl und Molekulargröße wie bei I, jedoch aus einer anderen Darstellung stammend und sicher nicht vollkommen identisch. — Chitodextrin II: 6.63 % N, Jodzahl 34.0⁹⁾, entsprechend der Tetraose bis Triose, wohl eher Tetrasaccharid-Stufe. — Chitotriose, dargestellt durch Verseifen eines noch nicht gereinigten Acetates; möglicherweise etwas biose-haltig. — Chitobiose. Stammt aus analysen-reinem Octaacetat und dürfte rein sein, wenn auch nicht krystallisiert. (Alle diese Präparate enthalten Acetyl am Stickstoff.)

2. Abtrennung der β -Glucosidase von der „Chitinase“: 10.4 g des entölten Pulvers wurden mittels eines Haarsiebes in 1.15 g eines gröberen, vorwiegend aus Häuten bestehenden Pulvers (reich an Chitinase, aber relativ arm an β -Glucosidase, Tab. 2, Vers. 6) und in 9.24 g eines feineren, vorwiegend aus dem Inneren der Mandelkerne stammenden Pulvers, das den Hauptteil der β -Glucosidase enthält, zerlegt (vergl. Tab. 2, Vers. 7). 2 g des Häute-Pulvers wurden mit 25 ccm Toluol-Wasser extrahiert und nach 12-stdg. Stehen abgeschleudert. Der gewonnene Extrakt enthielt annähernd das gesamte chitin-spaltende Enzym, die Rückstände waren nur noch wenig wirksam (Tab. 2, Vers. 8).

Tabelle 2: Chitodextrin-Spaltung durch Emulsin-Präparate verschiedenen Reinheitsgrades.

(Die Angaben beziehen sich auf die Titrationsprobe von 4 ccm, Bedingungen wie Tabelle 1, V.)

Vers. Nr.	Enzym-Material	β -Glucosidase-Wert	mg	Chitodextrin-Spaltung (ccm n_{50}° -Jodlösg.) nach 7 Stdn.
1	Rohes, entöltes Pulver	0.0189	16	0.55
2	Tannin-Vorfällung	0.033	14.8	1.05
3	Tannin-Hauptfällung	0.30	3.7	0.90
4	desgl.	0.30	14.8	2.32
5	Mit Ag - Acetat gereinigtes Emulsin	3.9	0.48	0.34
6	Abgesiebte Häute	0.0049	14.8	0.90
7	Pulver, nach Absieben der Häute	0.0234	14.8	0.52
8	Toluol-Wasser-Auszug aus den Häuten	0.08	8.8	0.84

⁹⁾ Die Jodzahlen in der Reihe der N-haltigen Polysaccharide schwanken merklich mit den Versuchs-Bedingungen und sind meist etwas größer als es dem tatsächlichen Mol.-Gew. entspricht. Die Schätzung der Kettenlänge auf Grund der J-Zahl führt also hier zu Maximalwerten; bei der Anwendung von 0.02-n. Jodlösg. bzw. NaOH wird diese Fehlerquelle stark eingeschränkt.

14 ccm Extrakt, mit 8 ccm $n/5$ -Acetat-Puffer, $p_H = 4.0$ und einer Suspension von 40 mg Tonerde C γ versetzt, wurden abgeschleudert und erneut mit 20 mg Tonerde C γ vermischt und nochmals abzentrifugiert. — 0.5 ccm der Rohlösung spalten 198 mg Salicin im Vol. von 5 ccm (Bedingungen nach Weidenhagen, l. c.) in 60 Min. zu 29 %, die entsprechende Menge der Restlösung in 130 Min. zu nur 0.7 %. — 0.4 ccm der Rohlösung bewirken bei der Einwirkung auf 13.7 g Chitodextrin in 7 Stdn. Spaltung entspr. 0.84 ccm $n/50$ -Jodlösung, die entsprechende Menge der Restlösung unter den gleichen Bedingungen 0.69 ccm $n/50$ -Jodlösung.

Auch anderen Adsorbenzien gegenüber scheint die Chitinase, im Gegensatz zur β -Glucosidase, verhältnismäßig schwer adsorbierbar zu sein (Tab. 3).

Tabelle 3: Adsorptionsversuche zur Trennung von β -Glucosidase und Chitinase.

(Im Adsorptions-Ansatz von 10 ccm sind enthalten 5 ccm Rohauszug nach Tabelle 2, Nr. 8; $p_H = 4.0$, eingestellt mit $n/10$ -Acetat-Puffer.)

Adsorbens	mg	Gehalt an Salicinase in % der ursprünglichen Menge	Chitinase-Wirkung (0.04 ccm Rohlösg. bzw. entspr. Menge der Restlösung; 13.7 mg Chito- dextrin, 7 Stdn) ccm $n/50$ -Jodlösg. *)
— (Rohlösg.)	—	100	0.84
Kaolin	100	—	0.80
AlO.OH ¹⁰⁾	20	—	0.71
Bauxit	100	48	0.73
Tonerde C γ	20	12	0.80

*) Bedingungen wie Tab. I.

Der Einhundertjahres-Stiftung der Münchener Universität, sowie der Münchener Universitäts-Gesellschaft danken wir ergebenst für Unterstützung unserer Arbeit.

2. Paresh Chandra Dutta: Untersuchungen über indigoide Farbstoffe, IV. Teil: 2.1-Naphthathiophen-phenanthren-indigos.

[Aus d. Laborat. d. G. B. B. College, Muzaffarpur, Bihar u. Orissa (Indien).]

(Eingegangen am 25. September 1933.)

Als Fortsetzung meiner Arbeiten über Thionaphthen-phenanthren-indigos, die im I. Teil¹⁾ und in dem kürzlich in den „Berichten“²⁾ veröffentlichten II. Teil über 1.2-Naphthathiophen-phenanthren-indigos niedergelegt sind, begann ich die vorliegende Untersuchung in der Absicht, den Einfluß der Stellung des Schwefels im Naphthalinkern auf die Farbe der Naphthathiophen-phenanthren-indigos zu prüfen. Es handelt sich um indigoide Farbstoffe, die durch Kondensation von 2.1-Naphthoxy-thiophen mit Phenanthrachinon und seinen verschiedenen Derivaten gewonnen wurden. Diese Kondensation wurde meistens in der eisessigsauren Lösung der Komponenten durch Salzsäure erreicht. Die hier beschriebenen Verbindungen sind allgemein kräftiger

¹⁰⁾ vergl. R. Willstätter, H. Kraut u. O. Erbacher, B. **54**, 2458 [1925].

¹⁾ Journ. Indian chem. Soc. **9**, 99 [1932].

²⁾ B. **66**, 1226 [1933].