

das in 11 prozentige Salzsäure ging. Mitunter (z. B. bei *Rosa indica moschata*) beobachteten wir nur bei kurzem Extrahieren die normalen Spaltungsprodukte, dagegen bei langsamem Extrahieren an Stelle des Phyltorhodins *g* ein viel stärker basisches Phyltorhodin, das seiner ätherischen Lösung schon durch einprozentige Salzsäure reichlich entzogen wurde.

In einem Teile dieser Untersuchung hat Herr L. Forsén uns vortrefflich unterstützt; wir danken ihm dafür bestens.

## Untersuchungen über Chlorophyll;

von *Richard Willstätter.*

(Mitteilung aus dem chemischen Laboratorium des schweizerischen Polytechnikums.)

### XI. Über Chlorophyllase;

von *Richard Willstätter* und *Arthur Stoll.*

(Eingelaufen am 10. Oktober 1910.)

#### Inhaltsübersicht.

- I. Einleitung.
- II. Methode der Untersuchung. 1. Die Chlorophylllösungen. 2. Phytolbestimmung. 3. Bestimmung des Äthoxyls. 4. Berechnung des umgewandelten Chlorophylls. 5. Ausführung der Versuche mit Chlorophyllase.
- III. Enzymatische Alkoholyse des Chlorophylls (Äthanololyse). 1. Dynamik bei einer bestimmten Versuchsanordnung. 2. Wiederholte Anwendung des Enzyms. 3. Variable Enzymmenge. 4. Variable Konzentration des Substrates. 5. Zusatz von Wasser. 6. Einfluß der Temperatur. 7. Reaktion des Mediums. 8. Verschiedenheit der Ernten, Einfluß des Trocknens, Altern des Enzyms.

- IV. Methanolyse des Chlorophylls. 1. Reaktionsgeschwindigkeit.  
2. Krystallisiertes Methylchlorophyll.
- V. Hydrolyse mittels Chlorophyllase.
- VI. Umkehrung der Alkohololyse.
- VII. Verbreitung der Chlorophyllase. 1. Enzymreiche Pflanzen.  
2. Enzymarme Pflanzen.
- VIII. Chlorophyllase mit Chlorophyll aus andern Pflanzen. 1. Brenn-  
nesseln mit Enzym aus *Heracleum* und *Galeopsis*. 2. Dar-  
stellung von krystallisiertem Chlorophyll aus Brennnesseln.
- IX. Chlorophyllase mit Phäophytin (Alkohololyse, Hydrolyse).
- X. Pankreas- und Ricinuslipase mit Chlorophyll und Phäophytin.

### I. Einleitung.

Die voranstehende Untersuchung hat ergeben, daß das Chlorophyll stets Phytol enthält und zwar als ein Drittel des Moleküls. Daraus folgt, daß in dem krystallisierten Chlorophyll von Borodin, das frei von Phytol ist, kein unverändertes natürliches Pigment vorliegt. Es ist nun die Frage zu untersuchen, durch was für eine Reaktion die Borodinschen Krystalle gebildet werden.

Borodin<sup>1)</sup> selbst, der beim Behandeln mikroskopischer Schnitte grüner Blätter mit Alkohol und Austrocknen der Präparate unter Deckgläsern die Chlorophyllkrystalle entdeckt hat, zweifelte daran, ob die merkwürdigen Gebilde reines krystallisiertes Chlorophyll seien, oder viel wahrscheinlicher eine bestimmte chemische Verbindung des Chlorophylls mit einem noch unbekanntem Stoffe.

N. A. Monteverde<sup>2)</sup> hat in seiner Untersuchung über „Das Absorptionsspektrum des Chlorophylls“ beobachtet, daß in den alkoholischen Extrakten aus grünen Blättern sich stets zwei grüne Farbstoffe befinden: amorphes und krystallisiertes Chlorophyll. In den lebenden Blättern aber, nahm Monteverde an, sollte nur das

<sup>1)</sup> Botanische Zeitung 40, 608 (1882).

<sup>2)</sup> Acta Horti Petropolitani 13, Nr. 9, 123 (1893).

krystallisierende Chlorophyll enthalten sein, „da dieses, ebenso wie der grüne Farbstoff lebender Blätter, im Petroläther unlöslich ist“.

Das phytolhaltige (d. i. das sog. amorphe) Chlorophyll kann indessen nicht aus dem phytolfreien bei oder nach der Extraktion hervorgehen. Auch braucht es nicht auf Unlöslichkeit in Petroläther zu beruhen, wenn der grüne Farbstoff der Blätter von diesem nicht extrahiert wird. Vielmehr gründet sich das Verhalten der Blätter gegen dieses Lösungsmittel<sup>1)</sup> nach A. Arnaud<sup>2)</sup> darauf, daß das Chlorophyll durch Kapillarkräfte im Blattgewebe zurückgehalten wird, nach der ähnlichen Anschauung von M. Tswett<sup>3)</sup> ist es begründet in der Bindung des Farbstoffes an das Skelett der Chloroplasten durch molekulare Adsorptionskräfte. R. Willstätter und M. Benz<sup>4)</sup> haben das krystallisierte Chlorophyll darzustellen gelehrt und es zum ersten Mal chemisch untersucht; es war ein nützlicher Schritt, so lange das phytolhaltige Chlorophyll noch nicht isoliert werden konnte, einen Farbstoff der Untersuchung zugänglich zu machen, der noch mit dem Pigment des Blattes in wesentlichen Merkmalen übereinstimmt: im Absorptionsspektrum, in der chemischen Indifferenz, dem Magnesiumgehalt und in den Spaltungsprodukten Phytochlorin und Phytorhodin. Die Art und Weise der Bildung der Borodinschen Krystalle ist von Willstätter und Benz nicht untersucht worden. Wohl

---

<sup>1)</sup> Das Verhalten der Blätter gegen Petroläther ist nicht, wie W. Palladin und E. Stanewitsch [Biochem. Zeitschr. **26**, 357 (1910) und Berichte der Deutschen Botan. Gesellsch. **28**, 120 (1910)] annehmen, dafür beweisend, daß das Chlorophyll in der Pflanze in chemisch gebundenem Zustand enthalten ist, nämlich an Phosphatide (Lipoide) gebunden. Wenn man Chlorophyll aus Lösungen in völlig extrahiertes Pflanzenmehl oder in Tierkohle überführt, so tritt es wieder in dieselbe physikalische Bindung, die von Benzin nicht gelöst wird.

<sup>2)</sup> Compt. rend. **100**, 751 (1885).

<sup>3)</sup> Arbeit. d. Naturf. Ges. Kasan **35**, 86 (1901).

<sup>4)</sup> Diese Annalen **358**, 267 (1907).

mußte es auffallen<sup>1)</sup>, daß frische Blätter, um durch Ausziehen mit Alkohol und Überführen in Äther oder Petroläther das Chlorophyll zum Auskrystallisieren zu bringen, längere Zeit mit dem Lösungsmittel zu behandeln waren. Und es erschien daher als recht gut möglich, „daß dabei eine Veränderung im Molekül des Chlorophylls erfolgt, die seine Löslichkeitsverhältnisse und sein Krystallisationsvermögen beeinflusst“.

Klarer und richtiger hat M. Tswett über das Verhältnis von genuinem zu krystallisiertem Chlorophyll geurteilt. Er spricht mit Bestimmtheit aus, daß das krystallisierbare Chlorophyll erst durch die Behandlung der Blätter bei der Extraktion entstehe. Seine ausführliche Untersuchung<sup>2)</sup>: „Physikochemische Struktur des Chlorophyllkornes“ ist leider nur russisch in den Arbeiten der Naturf. Gesellschaft Kasan erschienen; kleinere Auszüge sind in Tswetts spätere Mitteilungen übergegangen, namentlich in die neue Abhandlung<sup>3)</sup>: „Über die Natur des sog. krystallisierbaren Chlorophylls“.

Tswett betont hauptsächlich den Gegensatz zwischen der Unlöslichkeit des krystallisierbaren Chlorophylls in Petroläther und der Löslichkeit des möglichst rasch aus den Blättern isolierten Chlorophylls. Beweisend ist dieses Argument allerdings nicht. Willstätter und Benz hatten nämlich angenommen, Chlorophyll zeige in reinem Zustand andere Löslichkeitsverhältnisse als im Gemisch mit einer großen Menge von Begleitern. Und in der Tat ist in einer unveröffentlichten Arbeit von Willstätter und Hug das phytolhaltige Chlorophyll rein dargestellt worden und es hat sich als fast unlöslich<sup>4)</sup> in Petroläther erwiesen. Nach Tswett aber ist die normale Kraussche

<sup>1)</sup> R. Willstätter, F. Hocheder und E. Hug, diese Annalen **371**, 6 (1909).

<sup>2)</sup> Bd. **35**, 1901; 268 Seiten.

<sup>3)</sup> Biochem. Zeitschr. **10**, 414 (1908).

<sup>4)</sup> Löslich ist es indessen in alkoholhaltigem Petroläther, also in der petrolätherischen Schicht bei der Kraus'schen Reaktion.

Reaktion, die Überführbarkeit des Chlorophylls aus Weingeist in Petroläther, „ein Gesetz<sup>1)</sup> für jeden normalen Chlorophyllauszug“, Abweichungen davon deuten auf die Veränderung der Pigmente hin. Daher betrachtet<sup>2)</sup> Tswett das grüne Pigment von Borodin als „eine Verbindung der Chlorophylline mit einem dritten, unbekanntem Stoff“, die „unter Einwirkung noch unbekannter Faktoren des Zellchemismus aus den genuinen Chlorophyllinen entsteht“. <sup>3)</sup>

Mit dieser Betrachtung des krystallisierten Chlorophylls ist die Frage aufgeworfen, aber nicht gelöst, welche Reaktion seine Bildung bedingt.

Wir haben gefunden, daß in den chlorophyllhaltigen Pflanzen aller Klassen ein Enzym vorkommt, in manchen Pflanzen reichlich, in andern spärlich, das bei der Behandlung der frischen oder getrockneten Blätter mit Alkohol die Alkohololyse des Chlorophylls bewirkt. Dabei wird Phytol abgespalten.

Die Untersuchung der Reaktion war zunächst gehemmt durch einen experimentellen Fehler. Wir hatten im krystallisierten Chlorophyll zwei Methoxylgruppen nach Zeisel bestimmt und das Jodmethyl identifiziert<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup> Arbeit. d. Naturf. Ges. Kasan 35, 108 (1901).

<sup>2)</sup> Arbeit. d. Naturf. Ges. Kasan 35, 111 (1901).

<sup>3)</sup> Die Anerkennung der Untersuchung von Tswett ist uns durch manche z. T. noch nicht gelöste Widersprüche zwischen seinen und unseren Beobachtungen erschwert worden. Tswett beschreibt die völlige Umkehrung der Krausschen Reaktion nämlich auch bei Pflanzen wie *Urtica*, die unter den üblichen Bedingungen keine Borodinschen Krystalle liefern und bei denen wir die Umkehrung nicht erreichten [R. Willstätter, F. Hocheder und E. Hug, diese Annalen 371, 7 (1909)]. Auch erzielt Tswett diese Umkehrung durch Behandlung mit Chloroform, Benzol und Äther. So kann das krystallisierte Chlorophyll nicht entstehen. Erst jetzt ist es erklärlich, daß dabei Hydrolyse des Chlorophylls stattfindet. Es sind gewiß sehr verschiedenartige Änderungen des Chlorophylls, welche die Umkehrung der Krausschen Reaktion bedingen.

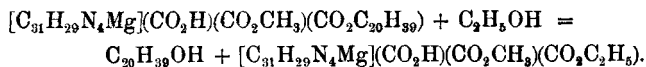
<sup>4)</sup> R. Willstätter, F. Hocheder, E. Hug, diese Annalen 371, 26 (1909).

nach der Angabe von F. Feist<sup>1)</sup> in Form von Trimethylphenylammoniumjodid. Dieses Verfahren war irreführend. Man arbeitet mit einer alkoholischen Dimethylanilinlösung. Es zeigt sich, daß damit Jodmethyl reagiert, Jodäthyl nicht. Und so haben wir dieses bei der qualitativen Prüfung des Jodalphyls neben dem Jodmethyl übersehen. Als wir in einer noch unveröffentlichten Untersuchung von Willstätter und Utzinger statt einer 10-prozentigen alkoholischen Lösung unverdünntes Dimethylanilin anwandten, krystallisierte rasch Trimethylphenylammoniumjodid, langsam Dimethyläthylphenylammoniumjodid aus. Dann haben wir Dimethylanilin ersetzt durch alkoholisches Trimethylamin, dessen Jodmethylat und Jodäthylat quantitativ entstehen und sich schön trennen lassen.

Das krystallisierte Chlorophyll enthält nicht zwei Methoxylgruppen, sondern ein Methoxyl und ein Äthoxyl, während das phytolhaltige ein Methoxyl neben einem Phytolrest aufweist.

In alkoholischer Lösung erleidet Chlorophyll keine Änderung. Aber unter der Wirkung des Enzyms wird es durch den Alkohol umgewandelt, also bei der Einwirkung der Blattsubstanz auf den Extrakt. *Dabei finden wir in jeder Phase der Reaktion den eintretenden Äthylalkohol äquivalent dem abgespaltenen Phytol. Die Reaktion ist daher Alkohololyse des Chlorophylls.*

Chlorophyll enthält drei Carboxyle. Eines ist wahrscheinlich frei, ein zweites mit Methylalkohol, das dritte mit Phytol verestert. Einzig und allein dieses reagiert unter der Enzymwirkung mit dem Alkohol, gemäß der Gleichung:



<sup>1)</sup> Ber. d. d. chem. Ges. 33, 2094 (1900). — H. Meyer, Analyse und Konstitutionsermittlung organischer Verbindungen. II. Aufl., S. 725.

Das Enzym zählt zu den Esterasen, aber es läßt sich in seiner Wirkung nicht durch andere Esterasen vertreten, durch die Lipase aus Ricinussamen und die Pankreaslipase. Andererseits ist für das in den Blättern aufgefundene Enzym das Chlorophyll spezifisches Substrat. Man kann ihm noch Phäophytin unterschieben, aber es reagiert damit schon schlechter, und mit einem gewöhnlichen Wachse, z. B. Walrat, ist noch keine Reaktion erzielt worden. Wir schlagen daher für die neue Esterase nach ihrem Substrat den Namen „*Chlorophyllase*“ vor. Dieses Enzym, das in außerordentlicher Verbreitung das Chlorophyll begleitet, wird in der Pflanze nicht ohne Bedeutung für das Chlorophyll sein. Es ist wahrscheinlich, daß die Chlorophyllase die Synthese der Phytolestergruppe vermittelt.

Für die Alkoholyse, die sich mit der Chlorophyllase so schön ausführen läßt, hat A. Haller<sup>1)</sup> in seinen wichtigen Untersuchungen eine Methode gefunden in der Einwirkung von alkoholischer Chlorwasserstoffsäure auf Fette und Wachse. Die Säureempfindlichkeit des Chlorophylls verbietet die Anwendung des Verfahrens von Haller. Mit den bekannten lipatischen Enzymen ist eine Alkoholyse noch nicht ausgeführt worden, und es ist auch uns weder mit Ricinus- noch mit Pankreaslipase eine Alkoholyse gelungen.

Die Dynamik der Chlorophyllasewirkung haben wir zu untersuchen begonnen. Die physikalisch-chemische Behandlung ist noch nicht erschöpfend, aber so weit, wie wir sie geführt haben, war sie notwendig zur Erklärung der Beobachtungen, und nützlich, um der präparativen Behandlung des Chlorophylls neue Wege zu erschließen. Nach der Äthanolyse, aber unter anderen Bedingungen ist die Methanolyse gelungen, durch die sehr charakteristische Methyl-derivate des Chlorophylls

---

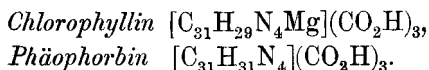
<sup>1)</sup> Compt. rend. **143**, 657 (1906); **144**, 462 (1907); **146**, 259 (1908). — A. Haller und Youssoufian, Compt. rend. **143**, 803 (1906).

entstehen, sowie die Hydrolyse des Chlorophylls, die wir in feuchter ätherischer Lösung des Phytolesters ausführen.

Die Reaktionsmöglichkeiten, die das Enzym bietet (das Pigment von Borodin ist jetzt nicht mehr das einzige kristallisierte Chlorophyll), erheischen eine Erweiterung der Nomenklatur. Die freie Tricarbonsäure, die dem Chlorophyll zugrunde liegt, ist Chlorophyllin genannt worden. Für den Monomethylester, der durch Hydrolyse des Chlorophylls entsteht, schlagen wir den Namen „*Chlorophyllid*“ vor, und für das magnesiumfreie Derivat „*Phäophorbid*“. Von diesen wichtigen Stammsubstanzen leiten sich Reihen von Alkylverbindungen ab:

<i>Chlorophyllid</i> ,		<i>Phäophorbid</i> ,
<i>Phytylchlorophyllid</i> =		<i>Phytylphäophorbid</i> =
<i>Chlorophyll</i> ,		<i>Phäophytin</i> ,
<i>Äthylchlorophyllid</i> = <i>Chlorophyll</i>		<i>Äthylphäophorbid</i> (bisher
von Borodin,		Phäophorbin genannt),
<i>Methylchlorophyllid</i> ,		<i>Methylphäophorbid</i> .

Nur eine kleine Änderung wird dadurch erforderlich. Das nur vorläufig beschriebene „Phäophorbin“, das magnesiumfreie Derivat des „kristallisierten Chlorophylls“, über welches eine ausführliche Arbeit noch zu veröffentlichen ist, soll *Äthylphäophorbid* heißen und die magnesiumfreie Tricarbonsäure, die Muttersubstanz des Phäophytins, die in naher Beziehung zum Phytochlorin und Phytorhodin steht, ist künftig „*Phäophorbin*“ zu nennen:



## II. Methode der Untersuchung.

Die Veränderung, welche das Chlorophyll bei der Berührung seiner alkoholischen Lösung mit der Blattsubstanz erleidet, besteht im Verlust von Phytol und in der Aufnahme von Äthylalkohol. Der Gang der Reak-



tion kann daher entweder durch die Ermittlung der Phytolzahl oder des Äthoxyls bestimmt werden an dem schwer löslichen Chlorophyllderivat, das durch Behandlung mit Oxalsäure abgeschieden wird.

### 1. Die Chlorophylllösungen.

Die voranstehende Arbeit von Willstätter und Oppé weist nach, daß es notwendig ist, die getrockneten Pflanzen rasch zu extrahieren, um den wahren Phytolgehalt des Chlorophylls zu finden. Das Sinken der Phytolzahl bei längerer Dauer der Extraktion wird nicht durch eine Reaktion in der Chlorophylllösung bedingt; es erfolgt nur bei der fortdauernden Einwirkung der Blattsubstanz auf den Extrakt. Läßt man nämlich den filtrierten Extrakt für sich stehen, so ändert sich die Phytolzahl nicht.

a) Galeopsis tetrahit gab bei raschem Extrahieren die Phytolzahl 31,3 (0,2954 : 0,0927 g). Derselbe Extrakt gab nach zehntägigem Stehen mit gefällttem Calciumcarbonat die Phytolzahl 30,9 (0,4041 : 0,1249 g). Der Extrakt mit dem zugehörigen extrahierten Galeopsismehl drei Tage unter zeitweisem Schütteln angesetzt, liefert Phäophorbid mit 2,7 Proz. Phytol (0,7473 : 0,0204 g).

b) Extrakt aus *Urtica dioica* ergab bei schneller Verarbeitung die Phytolzahl 32,2 (0,6379 : 0,2054 g), beim Stehen des klaren Extraktes nach 33 Tagen 31,2 (0,5505 : 0,1718 g), hingegen bei ebenso langem Stehen der Chlorophylllösung mit dem Bodenkörper nur 21,1 Proz. Phytol (0,5753 : 0,1218 g).

Um für unsere Untersuchung Lösungen von möglichst unversehrtem Rohchlorophyll zu gewinnen, extrahieren wir daher die gemahlene Blätter nach der von Willstätter und Oppé beschriebenen „*raschen Methode*“ und zwar auf eine neue Weise, nach dem „*Nutschenverfahren*“, das sich bei unsern Arbeiten mit größeren Quantitäten außerordentlich bewährt hat.

1 kg Galeopsismehl wird in einer Porzellanschale

während 5 Minuten mit 0,5 Liter Alkohol (96 prozentig) angefeuchtet, gleichmäßig bearbeitet und dann auf die Nutsche dicht aufgeschichtet. Hierauf gießt man 0,5 Liter Alkohol auf und beginnt mit dem Maschinenvakuum kurz anzusaugen. Endlich wird unter abwechselndem Zugießen und Absaugen noch etwa 1 Liter Alkohol nachgefüllt. In 20 Minuten, vom Beginn des Anfeuchtens gerechnet, ist 1 Liter Extrakt abgeflossen, der 3,7 g krystallisiertem Chlorophyll farbäquivalent<sup>1)</sup> ist.

Beim Nachwaschen mit Alkohol erhält man in weiteren 35 Minuten noch eine schwächere Lösung, nämlich 0,9 Liter mit 0,8 g Chlorophyllwert. Dann läßt sich dem Mehle bei quantitativem Extrahieren noch 1,1 g Chlorophyll entziehen, so daß also die Chlorophyllausbeute in dem brauchbaren Extrakt 65 Proz., die gesamte in einer Stunde extrahierte Menge 80 Proz. vom Chlorophyllgehalt des Materials beträgt. Bei vielen ähnlichen Versuchen mit der Nutsche fanden wir bestätigt, daß man durch rasches Extrahieren, also in etwa einer Stunde, nicht mehr als  $\frac{4}{5}$  vom Chlorophyll in Lösung bringen kann; das letzte Fünftel geht schwerer aus dem Mehl heraus.

In etwa derselben Zeit und mit gleicher Ausbeute lassen sich auf der Nutsche auch 2—3 kg Pflanzenmehl verarbeiten.

Bei präparativen Arbeiten hat das Nutschenverfahren den Nachteil, daß die Ausbeute an Chlorophyll geringer ist als beim langsamen Extrahieren in der Flasche oder mit dem Perkulator. Ferner werden die Lösungen verdünnter als bei dem in der X. Abhandlung beschriebenen raschen Perkolieren. Die Nutschenextrakte haben aber den Vorteil, daß sie weniger von den Begleitstoffen des Chlorophylls enthalten und daß sie infolge ihrer größeren Reinheit relativ mehr Phäophytin abscheiden. Für den

<sup>1)</sup> Siehe die quantitative Bestimmung von Chlorophyll nach R. Willstätter, F. Hocheder und E. Hug, diese Annalen 371, 11 (1909).

Vergleich verschiedenartiger Rohchlorophylllösungen führen wir den Quotienten ein:  $\frac{\text{als Phäophytin gefälltes Chlorophyll}}{\text{gelöstes Chlorophyll}}$  und bezeichnen diese Zahl als *Fällungskoeffizienten*. Dieser Koeffizient ist bei den Nutschenextrakten und bei Schnellperkolaten vergleichsweise günstig, wie folgendes Beispiel zeigt:

18 kg Brennesselmehl wurden in zwei Perkolatoren 48 Stunden lang maceriert, dann perkoliert; sie lieferten 54 g Phäophytin, d. i. 3 g aus 1 kg.

Hingegen gewannen wir aus 44 kg Brennesseln in 4 Perkolatoren bei raschem Perkolieren an der Saugpumpe 208 g reines Phäophytin, d. i. 4,8 g aus 1 kg.

Für den Zweck der vorliegenden Untersuchung war es nicht wichtig, gute Ausbeute an Chlorophyll zu erzielen, sondern solche Lösungen, daß nach der Einwirkung des Enzyms die Ausfällung des Phäophytins in möglichst guter Ausbeute erfolgte. Wenn sich nämlich nur ein Bruchteil des Chlorophylls beim Ansäuern mit Oxalsäure abschied, so konnte eine Fraktionierung der Gemische von Phäophytin und Phäophorbid eintreten und dadurch der Wert der Phytolbestimmung beeinträchtigt werden. Andererseits durfte man nicht durch starkes Einengen und durch Zusatz von Wasser die Ausfällung vervollständigen, da sonst das Phäophytin weniger rein ausfiel und sich auch durch Umscheiden nicht zuverlässig rein erhalten ließ. Nur wenn wir Enzymreaktionen mit Wasserzusatz in der alkoholischen Lösung ausführten, so nahm das enzymhaltige Pflanzenmehl Verunreinigungen aus der Chlorophylllösung auf und das Phäophytin schied sich am Ende auf Zusatz der Oxalsäure reichlich und rein aus.

Da der Fällungskoeffizient bei den Nutschenextrakten ohne Einengen und Wasserzusatz immerhin nur etwa 0,6 betrug, so mußte geprüft werden, ob der ausfallende und der in der Mutterlauge hinterbleibende Anteil von Phäophytin in der Phytolzahl übereinstimmen.

a) Eine Chlorophylllösung aus Brennesseln gab nach

der enzymatischen Alkoholyse beim Ansäuern und zweitägigen Stehen 0,6 g Phäophytin mit der Phytolzahl 15,3 (0,3128 : 0,0480 g); die Mutterlauge lieferte beim Eindampfen auf die Hälfte und zweitägigen Stehen weitere 0,5 g mit 15,1 Proz. Phytol (0,3088 : 0,0468 g).

b) Ein Extrakt aus Galeopsis lieferte nach der Alkoholyse 0,75 g beim Stehen abgeschiedenes Phäophytin mit der Phytolzahl 2,4 (0,3809 : 0,0093 g); die Mutterlauge schied nach dem Einengen zum halben Volumen noch 0,45 g aus mit 3,8 Proz. unreinem Phytol (0,3475 : 0,0133 g).

Es hat sich also gezeigt, daß Phäophytin und Phäophorbid ungefähr in dem Verhältnis gemischt ausfallen, wie sie in der Lösung enthalten sind. Wir konnten uns daher in der Mehrzahl der Beispiele damit begnügen, den bei zweitägigem Stehen der angesäuerten Chlorophylllösung ausfallenden Anteil des Phäophytins zu analysieren.

## 2. Phytolbestimmung.

Die Phytolzahl haben wir für die Chlorophyllösungen vor und nach der Einwirkung der Chlorophyllase im wesentlichen nach der veröffentlichten Methode<sup>1)</sup> ermittelt, aber entsprechend dem neuen Zweck der Bestimmung mit größerer Genauigkeit. Wenn es sich aber darum handelt, die Phytolzahl des Phäophytins und Chlorophylls so hoch und genau als möglich zu bestimmen, so finden wir eine Verbesserung der Methode in der Extraktion mit Methylalkohol. Die Chlorophyllase wirkt nämlich, wie im folgenden gezeigt wird, in Holzgeist viel langsamer als in Weingeist. Wenn man daher mit Methylalkohol nach der raschen Methode extrahiert, so ist der Verlust an Phytol auf ein Minimum beschränkt. Holzgeist liefert allerdings verdünnte Extrakte und schlechte Ausbeute an Chlorophyll.

---

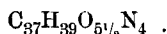
<sup>1)</sup> R. Willstätter, F. Hocheder und E. Hug, diese *Annalen* 371, 18 (1909).

Nach dem Nutschenverfahren lieferten z. B. 500 g *Heracleum* einen halben Liter methylalkoholischen Extrakt mit dem Gehalt von 0,8 g krystallisiertem Chlorophyll; hingegen gewannen wir mit Äthylalkohol schon aus 250 g die gleiche Chlorophyllausbeute, wenn wir an der Nutsche einen halben Liter Extrakt absaugten.

Diesen Nachteil bei Anwendung von Methylalkohol würde man durch die Extraktion möglichst trockener Pflanzenmehle mit absolutem Äthylalkohol vermeiden, weil bei Verminderung des Wassergehaltes die Chlorophyllase gleichfalls langsamer reagiert als in den üblichen alkoholischen Extrakten.

	Phytolzahl mit Methyl- alkohol	Analyt. Belege	Phytolzahl mit Äthyl- alkohol	Analyt. Belege
Galeopsis	32,7	0,3666:0,1197	31,5	0,5652:0,1784
<i>Heracleum</i>	33,1	0,2210:0,0732	30,6	0,5100:0,1558

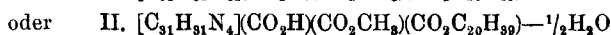
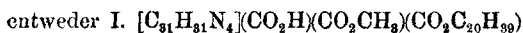
Die theoretische Phytolzahl ist nach unserer noch unvollständigen Kenntnis abzuleiten aus der Analyse des „krystallisierten Chlorophylls“ (Äthylchlorophyllids) und seines magnesiumfreien Derivates. Dieses Chlorophyllid liefert zwei Phäophorbide (Äthylphäophorbide), a und b. Nach genauen Bestimmungen, die in einer Arbeit von Willstätter und Utzinger mitgeteilt werden sollen, kommt dem *Äthylphäophorbid* a die Formel zu:



Das *Phäophorbid* b steht ihm in der Zusammensetzung nahe. Wir legen daher der Ableitung die Formel des Phäophorbids a zugrunde, die in folgender Weise aufzulösen ist:



Dann ist die analoge Phytolverbindung, *Phytolphäophorbid* oder *Phäophytin*



und die Formel des *Chlorophylls* (*Phytolchlorophyllids*)

entweder I.  $[C_{81}H_{29}N_4Mg](CO_2H)(CO_2CH_3)(CO_2C_{20}H_{39})$

oder II.  $[C_{81}H_{29}N_4Mg](CO_2H)(CO_2CH_3)(CO_2C_{20}H_{39}) - \frac{1}{2}H_2O$ .

Vielleicht ist in diesen Formeln die Wasserstoffzahl um zwei zu erhöhen.

Wir nehmen nach den Formeln II. den theoretischen Phytolgehalt an:

$$\text{für Chlorophyll } \frac{296,3}{900} = 32,9$$

$$\text{für Phäophytin } \frac{296,3}{877,6} = 33,8.$$

Für die Phytolbestimmung haben wir zumeist etwa 0,5 g Phäophytin verseift. Die ätherische Phytollösung ist von Anfang an in einem Helmkolben mit haarfeiner Kapillare im Wasserbad und nach dem Umfüllen in das kleine Wägehelmkölbchen im Vakuum zur Gewichtskonstanz eingedampft worden. Bei wiederholten Bestimmungen differierten die Werte sehr wenig.

Ein Phäophytin aus *Heracleum* gab bei zwei Bestimmungen die Phytolzahl 29,5 und 29,6 (0,5201:0,1537 g; 0,5315:0,1573 g); ein alkoholisierendes Präparat gab die Phytolzahlen 23,0 und 23,2 (0,5433:0,1252 g; 0,3731:0,0857 g); ein anderes die Werte 25,6 und 25,7 (0,4213:0,1080 g; 0,3102:0,0798 g).

Der Fettgehalt des Kahlbaumschen Äthers bewirkte gewöhnlich einen Fehler von ungefähr + 0,2 Proz. bei Anwendung von 0,5 g Phäophytin und kompensierte wohl den unvermeidlichen Phytolverlust bei der Isolierung.

Je 200 ccm Äther lieferten 0,0033 g und 0,0028 g fettigen Rückstand; bei Ausführung aller Reinigungsmanipulationen wie bei einer Phytolbestimmung betrug der Rückstand nur 0,0012 g. In letzter Zeit gab unser Kahlbaumscher Äther viel mehr Rückstand; es ist daher vorzuziehen, stets frisch gereinigten und destillierten Äther für die Bestimmungen anzuwenden.

## 3. Bestimmung des Äthoxyls.

Wir haben die Bestimmungen nach der Methode von Zeisel ausgeführt. Chlorophyll und Phäophytin enthalten ein Methoxyl und nehmen bei der Einwirkung der Chlorophyllase unter den gewöhnlichen Bedingungen eine Äthoxylgruppe auf; die teilweise umgewandelten Präparate enthalten also in wechselndem Verhältnis Methoxyl und Äthoxyl. Es ist daher unzweckmäßig, die Resultate als Methoxyl oder Äthoxyl anzugeben; wir führen statt dessen den Begriff *Jodsilberzahl* ein, den Quotienten

$$\frac{\text{gefundenes AgJ}}{\text{angewandte Substanz}} \cdot 100.$$

Die theoretische Jodsilberzahl des Äthylphäophorbids ist

$$\frac{469,6}{627,8} \cdot 100 = 74,9.$$

Die Zahl des Phäophytins

$$\frac{234,8}{877,6} \cdot 100 = 26,8.$$

Zwischen diesen beiden Werten liegen die Jodsilberzahlen der alkoholisierten Präparate.

Phäophytin z. B. aus *Galeopsis* von der Phytolzahl 31,3 gab die Jodsilberzahl 28,2 (0,2542 g gab 0,0746 g AgJ).

## 4. Berechnung des umgewandelten Chlorophylls.

## a) Aus der Phytolzahl:

Der Bruchteil des umgewandelten Chlorophylls wird mit Hilfe der Phytolzahl eines Gemisches von Phäophytin und Äthylphäophorbid bestimmt, ohne daß er mit dieser Zahl proportional geht.

Das partiell alkoholisierte Phäophytin besteht aus unverändertem Phäophytin ( $x$ ) und umgewandeltem, als Äthylverbindung vorhandenem ( $y$ ). Das letztere wird für die Rechnung als Phäophytin ( $z$ ) im Zustand vor der Reaktion ausgedrückt.

Das Phäophytin des ursprünglich vorhandenen

Chlorophylls ist  $x + z$ , das des umgewandelten ist  $z$ . Die Umwandlungszahl in Prozenten

$$u = \frac{z}{x + z} \cdot 100.$$

Das Molekulargewicht des Phäophytins aus dem angewandten Chlorophyll ist infolge der Alkoholyse, welche in kleinem Betrag schon bei der Extraktion eingetreten, nicht gleich dem Molekulargewicht von

Äthylphäophorbid + Phytol — Äthylalkohol,  
sondern gleich

$$M + \frac{Z_a}{Z_o} (\text{Phytol} - \text{Äthylalkohol}),$$

d. i.

$$M + \frac{Z_a}{Z_o} (296,3 - 46,05),$$

und zwar gilt dies nicht streng, aber mit genügender Annäherung für hohe Werte von  $Z_a$ .

Hierin bedeutet  $M$  das Molekulargewicht von Äthylphäophorbid ( $C_{37}H_{39}O_5\frac{1}{2}N_4 = 627,35$ ), ferner  $Z_o$  die Phytolzahl (33,8) des theoretischen Phäophytins,  $Z_a$  die Phytolzahl für den angewandten Extrakt. Mit  $Z_u$  wird im Folgenden die Phytolzahl nach der Reaktion bezeichnet.

$$\frac{z}{y} = \frac{M + \frac{Z_a}{Z_o} \cdot 250,25}{M} = 1 + \frac{250,25}{33,8 \cdot 627,35} \cdot Z_a,$$

$$\frac{250,25}{33,8 \cdot 627,35} = 0,011802 = n,$$

$$\frac{z}{y} = 1 + n \cdot Z_a,$$

$$\frac{x}{x + y} = \frac{Z_u}{Z_a},$$

$$x + y = 1,$$

$$x = \frac{Z_u}{Z_a}; \quad y = 1 - \frac{Z_u}{Z_a};$$

$$z = 1 + n(Z_a - Z_u) - \frac{Z_u}{Z_a}.$$



Also ergibt sich die Umwandlungszahl:

$$u = \frac{1 + n(Z_a - Z_u) - \frac{Z_u}{Z_a}}{\frac{Z_u}{Z_a} + 1 + n(Z_a - Z_u) - \frac{Z_u}{Z_a}} \cdot 100,$$

$$u_I = \left(1 - \frac{Z_u}{Z_a(1 + 0,011802)(Z_a - Z_u)}\right) \cdot 100. \quad (\text{I})$$

Für die Anwendung der Gleichung für monomolekulare Reaktion:

$$k = \frac{1}{t} \cdot l_n \frac{a}{a-u}$$

dient

$$\frac{a}{a-u} = \frac{Z_a(1 + 0,011802)(Z_a - Z_u)}{Z_u}.$$

b) *Aus der Jodsilberzahl:*

Wir nennen die Jodsilberzahl des Phäophytins aus dem angewandten Chlorophyll  $J_a$ , die nach der Reaktion  $J_u$ , die Differenz der Jodsilberzahlen von Äthylphäophorbid (74,9) und theoretischem Phäophytin (26,8)  $D_o (= 48,1)$ , von Äthylphäophorbid und Phäophytin des angewandten Chlorophylls  $D_a$ .

Für die Anwendung von nur wenig alkoholysiertem Chlorophyll, also bei hohem  $D_a$ , gilt mit guter Annäherung analog der Ableitung auf Grund der Phytolzahl:

$$\frac{x}{y} = \frac{M + \frac{D_a}{D_o} \cdot 250,25}{M} = 1 + \frac{250,25}{48,1 \cdot 627,35} D_a,$$

$$\frac{250,25}{48,1 \cdot 627,35} = 0,0082932 = n',$$

$$\frac{x}{y} = 1 + n' D_a,$$

$$26,8x + 74,9y = J_u,$$

$$x + y = 1,$$

$$x = \frac{74,9 - J_u}{48,1}; \quad y = \frac{J_u - 26,8}{48,1},$$

$$z = \frac{(n' \cdot D_a + 1)(J_u - 26,8)}{48,1},$$

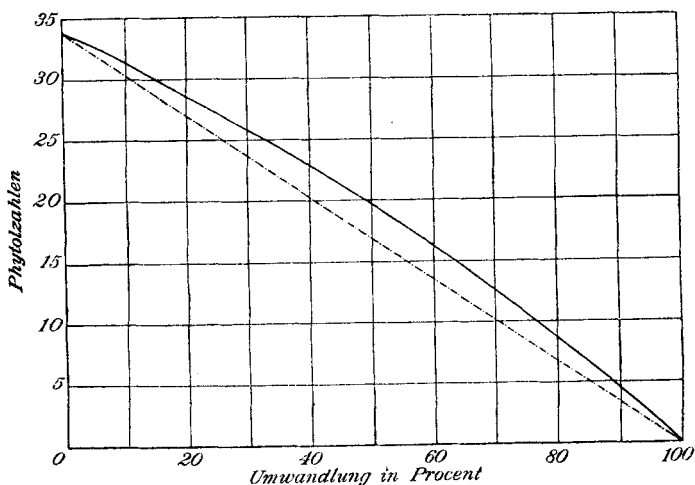
$$u_{II} = \frac{1}{1 + \frac{74,9 - J_u}{(1 + 0,0082932 D_a)(J_u - 26,8)}}. \quad (\text{II})$$

Anstatt die Umwandlung aus den Jodsilberzahlen vor und nach der Reaktion zu ermitteln, kann man auch das Ausgangsmaterial lediglich durch seine Phytolzahl ( $Z_a$ ) kennzeichnen und dann die Umwandlung ( $u$ ) mit Hilfe der Jodsilberzahl ( $J_u$ ) in folgender Weise berechnen:

$$\frac{x}{y} = 1 + 0,011802 \cdot Z_a = 1 + 0,0082932 \cdot D_a,$$

$$u_{III} = \frac{1}{1 + \frac{74,9 - J_u}{(1 + 0,011802 \cdot Z_a)(J_u - 26,8)}} \quad (III)$$

Die Beziehung zwischen Phytol- und Umwandlungszahl bringt die folgende Kurve (Fig. 1) zur Anschauung, die für jeden Wert von  $Z_a$  verschieden wird und hier unter der Voraussetzung  $Z_u = Z_o$  für  $u_I$  abgeleitet ist.



Figur 1.

c) *Beweis der Alkoholyse durch die Übereinstimmung beider Methoden.*

Bei der Bestimmung nach den beschriebenen Methoden ergeben sich in zwei Beispielen folgende Umwandlungszahlen des Chlorophylls:

$$\begin{array}{l} \text{I. Aus } Z_a = 30,9, \quad Z_u = 2,7, \\ \quad \quad \quad J_a = 29,9, \quad J_u = 70,2, \\ u_I = 93,4, \quad u_{II} = 92,8, \quad u_{III} = 92,7. \end{array}$$

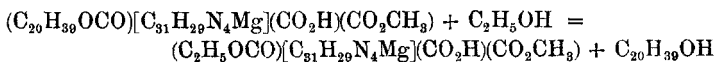
$$\begin{array}{l} \text{II. Aus } Z_a = 30,9, \quad Z_u = 11,0, \\ \quad \quad \quad J_a = 29,9, \quad J_u = 58,3, \\ u_I = 71,2, \quad u_{II} = 72,2, \quad u_{III} = 72,1. \end{array}$$

Analyt. Belege:<sup>1)</sup>

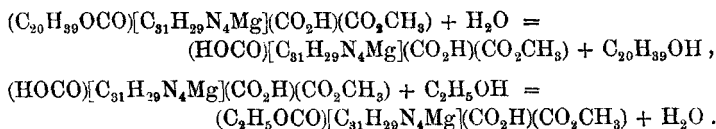
$$\begin{array}{ll} \text{I. } J_a & 0,3818:0,1140, \quad J_u \quad 0,2729:0,1917, \\ \text{II.} & \text{---} \quad \quad \quad J_u \quad 0,2431:0,1416, \\ & \text{---} \quad \quad \quad Z_u \quad 0,4637:0,0511. \end{array}$$

Die Übereinstimmung der aus Phytol- und Jod-silberzahlen abgeleiteten Umwandlungszahlen beweist, daß das eintretende Äthoxyl genau äquivalent ist dem austretenden Phytol. Die Reaktion ist daher Alkohololyse des Chlorophylls. Sie ist auf eine einzige Carboxylgruppe beschränkt.

Die Alkohololyse kann entweder erklärt werden als direkte Verdrängung des Phytols durch den niederen Alkohol unter der Wirkung der Chlorophyllase:



oder die Reaktion kann in zwei Phasen unter der Enzymwirkung verlaufen, indem zuerst Hydrolyse der Gruppe  $\text{COOC}_{20}\text{H}_{39}$ , dann Neuesterifizierung des freigewordenen Carboxyls erfolgen:



Es spricht zugunsten der ersten Annahme, daß in wäßrig alkoholischer Lösung ebenso wie in hochprozentiger die Neuesterifizierung der Abspaltung des Phytols äquivalent bleibt. Während die oben angeführten Versuche in etwa 92 prozentigem Alkohol ausgeführt

<sup>1)</sup> Die analytischen Belege werden nur mitgeteilt, wenn sie nicht im Vorangegangenen vorkommen oder zweckmäßiger in einem späteren Zusammenhang anzuführen sind.

sind, betrifft das folgende Beispiel die Enzymwirkung in 80 prozentiger alkoholischer Chlorophylllösung:

$$\begin{array}{ll} Z_a = 30,6, & Z_u = 7,4, \\ J_a = 29,9, & J_u = 61,9, \\ u_I = 81,0, & u_{II} = 78,9. \end{array}$$

Analyt. Belege:  $J_u$  0,3102:0,1920.

81 Proz. des Chlorophylls haben also Phytol verloren und 79 Proz. Äthylalkohol aufgenommen.

Erst in stark verdünntem Alkohol wird neben der Alkohololyse auch Hydrolyse bemerkbar durch die Divergenz der Phytol- und Jodsilberzahlen. Ein solches Beispiel der Chlorophyllasewirkung ist mit Phäophytin untersucht worden in einer Lösung, die 20 Volumprocente Wasser, 40 Alkohol und 40 Aceton enthielt.

$$\begin{array}{ll} Z_a = 32,9, & Z_u = 6,9, \\ - & J_u = 55,7, \\ u_I = 84,0, & u_{III} = 67,7. \end{array}$$

Die Differenz der beiden Umwandlungszahlen bedeutet, daß in ungefähr 16 Proz. des Phäophytins Hydrolyse erfolgt ist.

Hingegen beobachten wir nur Hydrolyse bei der Einwirkung der Chlorophyllase auf feuchte ätherische Chlorophyllösungen.

##### 5. Ausführung der Versuche mit Chlorophyllase.

J. Borodin hat bei der mikroskopischen Untersuchung zahlreicher Pflanzen beobachtet, daß sie für die Bildung der charakteristischen Chlorophyllkrystalle sehr ungleich geeignet sind und sogar bei ein und derselben Pflanze hat die Prüfung zu verschiedenen Zeiten wechselnde Resultate ergeben. N. A. Monteverde teilte nach dem Gehalt der Extrakte an krystallisierendem Chlorophyll die Pflanzen in drei Gruppen ein: solche, die überwiegend amorphes Chlorophyll liefern, zweitens Pflanzen, deren Extrakte amorphes und krystallisiertes Chlorophyll aufweisen und drittens solche, deren Alkoholauszug neben wenig amorphem Chlorophyll viel krystallisierbares enthält. Genauer läßt die in der VII. und

X. Abhandlung mitgeteilte vergleichende Untersuchung erkennen, bei welchen Pflanzen unter dem Einfluß längerer Berührung des Pflanzenmehles mit der alkoholischen Chlorophylllösung starke Abspaltung von Phytol erfolgt. Diese eignen sich besonders für die Versuche mit Chlorophyllase, weil sie viel Enzym enthalten und weil in ihren Extrakten die Wirkung des Enzyms keine Hemmung erleidet. Wir haben aus der Reihe von Pflanzen mit niedriger Phytolzahl bei langsamem Extrahieren hauptsächlich *Galeopsis tetrahit* L. und *Heracleum spondylium* L. ausgewählt, die wir reichlich selbst sammeln und trocknen konnten.

Als Enzym verwenden wir das Mehl der bei Zimmertemperatur getrockneten Blätter nach zuerst raschem, sodann erschöpfendem Extrahieren des Chlorophylls mit 96 prozentigem Alkohol, und zwar in alkoholfuchtem Zustand möglichst bald nach der Extraktion, spätestens einen Tag nachher. Wir verstehen also unter Chlorophyllase praktisch schlechtweg die gemahlene und extrahierten Blätter. Bei einigen Versuchen haben wir auch als Enzym einfach das Blattmehl ohne Vorbehandlung angewandt.

Die Menge des Enzyms bei den Versuchen bezeichnen wir als Bruchteil des Pflanzenmehles, welches dem Chlorophyllgehalt des angewandten Extraktes entspricht. Zum Beispiel liefert uns 1 kg *Galeopsis* einen Extrakt mit 3 g Chlorophyll, während der gesamte Chlorophyllgehalt des Mehles 5 g betragen hat; als  $\frac{1}{10}$ -Enzym bezeichnen wir dann 60 g, nämlich  $\frac{1}{10}$  desjenigen Materiales, welches 3 g Chlorophyll enthält.

Den Chlorophyllgehalt aller Lösungen definieren wir auf Grund der kolorimetrischen Bestimmung durch die Menge des äquivalenten krystallisierten Chlorophylls (Äthylchlorophyllids); die Angabe z. B., der Extrakt enthalte 3 g Chlorophyll, bedeutet also, daß er farbäquivalent ist 3 g kryst. Chlorophyll und daß darin 3 mal  $1,38 = 4,14$  g phytolhaltiges Chlorophyll gelöst ist.

Die Konzentration des Alkohols wird in Volumprozenten angegeben; die in dem Pflanzenmehl enthaltene Feuchtigkeit ist bei der Bestimmung des Wassergehaltes der Extrakte berücksichtigt.

Die Reaktion des enzymhaltigen Pflanzenmehles auf das gelöste Chlorophyll verläuft rascher, wenn das Mehl in der Flüssigkeit in Bewegung gehalten wird.

Chlorophylllösungen aus *Galeopsis* (je 1,3 g in 0,4 Liter,  $Z_a = 31,3$ ) wurden mit und ohne Schütteln an der Maschine 84 Stunden mit  $\frac{1}{10}$ -Enzym behandelt.

Analyt. Belege.

Ohne Schütteln	0,4102:0,0953 g,	$Z_a = 23,2$ ,	" = 32,3,
Mit Schütteln	0,3340:0,0355 g,	$Z_a = 10,6$ ,	" = 72,8.

Für alle Messungen rührten wir daher während der Dauer der Enzymwirkung und es hat sich gezeigt, daß das Enzym dadurch nicht geschwächt wird.

Die Extrakte wurden in Flaschen gefüllt und auf die einzuhaltende Temperatur gebracht; dann fügten wir das Enzympräparat hinzu und setzten in den für 4 Flaschen eingerichteten Thermostaten ein. Die Temperatur schwankte höchstens um  $\pm 0,1^\circ$ . Zur Vermeidung von Feuchtigkeit waren die Flaschen luftdicht verschlossen. Nach Ablauf der Reaktionszeit wurden die Lösungen möglichst schnell vom Mehl abgesaugt, kurz nachgewaschen und mit alkoholischer Oxalsäure gefällt; alle Phäophytinpräparate sind aus Chloroform mit Alkohol umgeschieden worden.

Die Geschwindigkeit der Reaktion läßt sich nicht an Proben messen; jede Zeit erfordert für die Bestimmung einen besonderen Versuch.

### III. Enzymatische Alkoholyse des Chlorophylls (Äthanolyse).

#### 1. *Dynamik bei einer bestimmten Versuchsanordnung.*

Die Bedingungen für die Untersuchung der Reaktionsgeschwindigkeit liegen hier — abgesehen von der langwierigen Bestimmung der Umwandlungszahl — besonders

ungünstig, sowohl wegen der Beschaffenheit des Enzyms, das außerordentlich verdünnt mit anderen Stoffen in der Form des ausgelaugten Pflanzenmehles angewandt wird, andererseits wegen der komplizierten und größtenteils unbekanntem Zusammensetzung des Blätterextraktes, welcher das Substrat enthält. Dennoch ist die Geschwindigkeitsmessung notwendig, nämlich zur Ermittlung geeigneter Versuchsbedingungen für die Umwandlung des Chlorophylls.

Die Reaktion der Chlorophyllase findet nicht in einem homogenen System statt, aber die Diffusionsverhältnisse könnten so sein, daß das heterogene System sich wie ein homogenes verhielte. Dann wäre es möglich, daß die Reaktion zwischen dem Chlorophyll und dem Äthylalkohol, dessen Konzentration außer Betracht bleiben darf, wie eine monomolekulare verlief.

Wir versuchen daher die Anwendung der Gleichung für monomolekulare Reaktionen:

$$k = \frac{1}{t} \cdot l_n \frac{a}{a-u},$$

kommen aber zu dem Ergebnis, daß die Konstante einen starken Gang hat, daß sie nämlich mit zunehmender Reaktionsdauer erheblich sinkt.

Die Erklärung hierfür ist einesteils darin zu suchen, daß das Enzym während der Reaktion zerstört oder geschwächt wird; im folgenden Abschnitt wird nämlich gezeigt, daß seine Wirksamkeit nicht unverändert bleibt. Außerdem wäre es möglich, daß ein Koenzym oder Aktivator, dessen Rolle später (s. Kap. VIII) nachgewiesen wird, eine Schwächung im Verlauf der Reaktion erleidet oder daß er verbraucht wird. Für noch wahrscheinlicher halten wir es aber, daß die Verhältnisse der Diffusion bei der eigentümlichen Beschaffenheit des enzymhaltigen Materiales unter unseren Versuchsbedingungen einen störenden Einfluß auf die Geschwindigkeit der Reaktion ausgeübt haben.

1. *Versuch.* Mit *Heracleum*; 92 prozentiger Alkohol; 25°. Die Pflanze war anfangs Mai gesammelt; das Mehl der Blätter enthielt im Kilogramm 4,8 g Chlorophyll. Je  $\frac{1}{2}$  Liter Extrakt mit dem Gehalt von 1,3 g Chlorophyll wurde ohne Zusatz von Kreide mit  $\frac{1}{10}$ -Enzym (d. i. 27,1 g Blattmehl vor dem Extrahieren) bearbeitet. Die Phäoptytinfällung betrug  $\frac{2}{3}$  der Theorie ohne Verarbeitung der Mutterlauge.

$$Z_a = 31,5 (0,6133 : 0,1936)$$

Zeit in Stunden	Analyt. Belege	$Z_u$	$u$	$k \cdot 10^9$
10	0,4957:0,1271	25,6	24,0	27,5
20	0,5047:0,1171	23,2	33,1	20,0
40	0,4979:0,0951	19,1	47,1	15,9
80	0,4917:0,0590	12,0	69,0	14,7

Wie die Kurven für die Reaktion und für die Konstante in der Figur 2 zeigen, sinken die Werte für die Geschwindigkeitskonstante anfangs rasch, nach der halben Umwandlungszeit aber nur noch langsam und ungefähr proportional mit der zunehmenden Versuchsdauer.

2. *Versuch.* Mit *Heracleum*; 80 prozentiger Alkohol; 25°.

Die Blätter wurden Ende Mai gesammelt, sie enthielten nach dem Trocknen im Kilogramm 5,6 g Chlorophyll, der Extrakt im Liter 3 g. Je  $\frac{1}{2}$  Liter behandelten wir unter Zusatz von 5 g Calciumcarbonat, der sich übrigens als unerheblich erwies, und Zufügen von Wasser mit  $\frac{1}{10}$ -Enzym (d. i. 26,8 g Blätter vor der Extraktion). Phäoptytinausbeute 70 Proz. der Theorie.

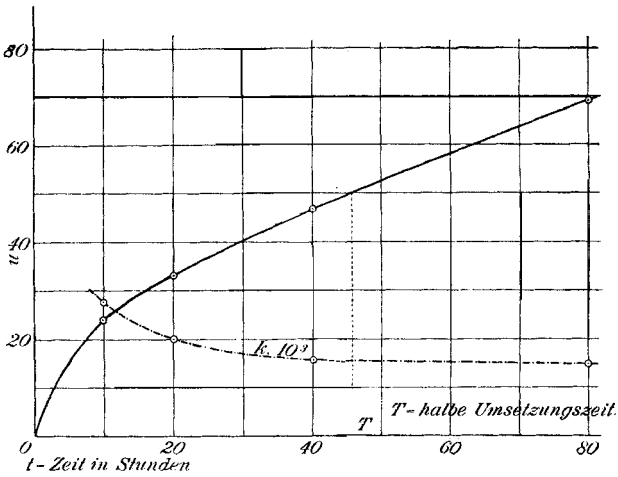
$$Z_a = 30,6 (0,5100 : 0,1558)$$

Zeit	Analyt. Belege	$Z_u$	$u$	$k \cdot 10^9$
5	0,4735:0,0610	12,9	65,1	210,7
10	0,5987:0,0444	7,4	81,0	166,1
20	0,5136:0,0280	5,4	86,4	99,8

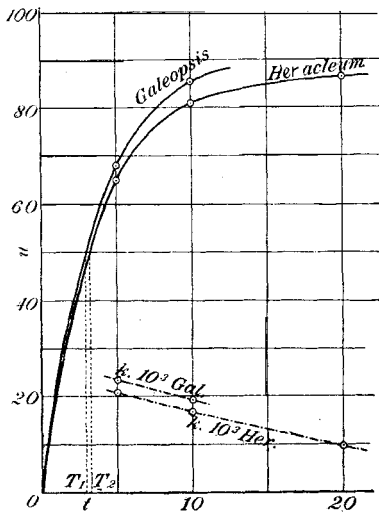
3. *Versuch.* Mit *Galeopsis*; 80 prozentiger Alkohol; 25°. Die Ernte (von Ende Juli) enthielt 4,8 g Chlorophyll im Kilogramm, der Extrakt 2,8 g im Liter. Wir hatten je  $\frac{1}{2}$  Liter mit  $\frac{1}{10}$ -Enzym und zwar diesmal in



der Form des nicht extrahierten Blättermehles (30 g) ohne Kreide, aber mit Wasserzusatz behandelt.



Figur 2.



Figur 3.

$$Z_a = 31,5 \text{ (0,5652:0,1784)}$$

Zeit	Analyt. Belege	$Z_u$	$u$	$k \cdot 10^3$
5	0,4057: 0,0504	12,4	67,9	232,4
10	0,4107: 0,0247	6,0	85,4	192,1

Die Reaktionskonstante der Versuch 2 und 3 (s. Fig. 3) sinkt proportional der wachsende Zeit und die Werte liegen fast in einer Geraden.

## 2. Wiederholte Anwendung des Enzyms.

Die Behandlung von Brennesselextrakten mit extrahiertem Galeopsismehl schien zunächst zu ergeben, daß die Chlorophyllase ohne wesentliche Schädigung öfters angewandt werden könne. Die Alkoholyse verlief in Brennesselextrakten bei allen Versuchen langsamer als in den Chlorophyllösungen aus *Heracleum* und *Galeopsis*. Nun erzielten wir bei der Behandlung mit dem Galeopsismehl, das nach der Extraktion einen Monat lang aufbewahrt worden war, ungefähr gleiche Phytolzahlen in 4 aufeinander folgenden Versuchen mit demselben Enzympräparat, zwischen welchen jedesmal eine Pause von 8—10 Tagen lag. Dasselbe ergab sich sogar bei 2 Versuchen mit je 15 tägiger Einwirkung von Chlorophyllase auf Brennesseextrakt.

In allen diesen Fällen war aber ein großer Überschuß von Enzym angewandt. Daher war das Resultat ein anderes, als wir auf die Schwächung des Enzyms mit den zumeist angewandten kleinen Enzymmengen bei der Alkoholyse in *Heracleum*extrakt prüften.

Wir ermittelten zunächst die Geschwindigkeit für eine Darstellung von Enzym und Extrakt in drei Versuchen von  $2\frac{1}{2}$ , 5 und 10 Stunden. Das Enzym von jedem Versuch ließen wir aufs neue  $2\frac{1}{2}$  Stunden auf die ursprüngliche Chlorophylllösung einwirken. Es zeigte sich, daß in den  $2\frac{1}{2}$  Stunden des ersten Versuches das Enzym ganz ungeschwächt geblieben ist. Das Enzym, welches 5 und 10 Stunden gearbeitet hatte, erwies sich als weniger wirksam und zwar in dem Maße, daß der Unterschied zwischen den Konstanten dieser drei Wiederholungsproben das Sinken unserer Reaktionskonstanten im allgemeinen wenigstens teilweise erklärt durch die Schwächung des Enzyms während der Versuchsdauer.

Mit *Heracleum*; 80 prozentiger Alkohol; 25°. Die Pflanze war Ende Juli gesammelt; für jeden Versuch diente  $\frac{1}{2}$  Liter Extrakt mit 1,4 g Chlorophyll; er wurde mit Wasser, Calciumcarbonat und mit  $\frac{1}{10}$ -Enzym (30 g vor der Extraktion) versetzt.

$$Z_a = 31,9 \text{ (0,2880 : 0,0917).}$$

Versuch	I	2 $\frac{1}{2}$ Std.	0,4020 : 0,1047	$Z_u$	$u$	$k \cdot 10^3$
„	II	5 „	0,5015 : 0,1156	23,0	23,8	108,7
„	III	10 „	0,4274 : 0,0728	23,0	34,8	85,4
Wiederholte Wirkung in 2 $\frac{1}{2}$ Stunden:						
Enzym von Versuch	I	0,4406 : 0,1140	25,9	24,2	110,7	
„	II	0,5163 : 0,1407	27,2	19,2	85,4	
„	III	0,5198 : 0,1461	28,1	15,7	68,3	

Der Gang der Konstanten muß allerdings außer der Schwächung des Enzyms noch andere Ursachen haben; denn der 5-Stundenversuch der ersten Reihe gibt ein schlechteres Resultat als die zweimal 2 $\frac{1}{2}$ -stündige Wirkung des Enzyms.

### 3. Variable Enzymmenge.

Um die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Enzymmenge kennen zu lernen, haben wir einen Parallelversuch mit der doppelten Enzymmenge ( $\frac{1}{5}$ ) gleichzeitig mit Versuch 2 des ersten Abschnittes ausgeführt. Die doppelte Enzymmenge bewirkt in 5 Stunden dieselbe Umwandlung wie die einfache in zehn.

Enzymmenge	Zeit	Analyt. Belege	$Z_u$	$u$	$\frac{u}{\sqrt{E \cdot t}}$
$\frac{1}{10}$	5	—	—	65,1	29,1
$\frac{1}{10}$	10	—	—	81,0	25,6
$\frac{1}{10}$	20	—	—	86,4	19,3
$\frac{1}{5}$	5	0,4989 : 0,0344	6,9	82,4	26,0

Das Beispiel stimmt also für die Schützschke Regel:

$$u = k\sqrt{E \cdot t},$$

bis die Substratkonzentration auf weniger als  $\frac{1}{5}$  zurückgegangen ist.

Noch genauer stimmt dafür bei gleichen Enzymmengen, wenn also  $E = 1$  gesetzt wird, der erste Versuch des 1. Abschnittes, mithin für die Regel, daß bei gleichen Enzymmengen die umgewandelten Substratmengen sich wie die Quadratwurzeln aus den Umwandlungszeiten verhalten.

$u$	$t$	$\frac{u}{\sqrt{E \cdot t}}$
24,0	10	7,6
33,1	20	7,4
47,1	40	7,5
69,0	80	7,7

Auch eine weitere Versuchsreihe mit Enzymmengen, die im Verhältnis 1:2:4 stehen, führt zu Resultaten, die sich der Schützschenschen Regel annähernd fügen. Parallel zum Beispiel des 2. Abschnittes und zwar zur ersten Benützung des Enzyms ist gleichzeitig mit der halben und mit der doppelten Menge derselben Darstellung von Enzym und Chlorophylllösung gearbeitet worden.

Enzymmenge	Zeit	Analyt. Belege	$Z_u$	$u$
$\frac{1}{20}$	$2\frac{1}{2}$	0,1447 : 0,0406	28,1	15,7
$\frac{1}{20}$	5	0,6324 : 0,1635	25,9	24,2
$\frac{1}{5}$	$2\frac{1}{2}$	0,5222 : 0,1105	21,2	41,0
$\frac{1}{5}$	5	0,5793 : 0,0897	15,5	59,3

Chlorophyllase	$2\frac{1}{2}$ Stunden		5 Stunden		10 Stunden	
	$u$	$\frac{u}{\sqrt{E \cdot t}}$	$u$	$\frac{u}{\sqrt{E \cdot t}}$	$u$	$\frac{u}{\sqrt{E \cdot t}}$
$\frac{1}{20}$	15,7	9,9	24,2	10,8	—	—
$\frac{1}{10}$	23,8	10,6	34,8	11,0	54,7	12,2
$\frac{1}{5}$	41,0	12,9	59,3	13,2	—	—

#### 4. Variable Konzentration des Substrates.

Auf den Einfluß der Substratkonzentration bezieht sich ein Versuch mit einem Extrakt, der a) in der üblichen Konzentration von 3 g Chlorophyll im Liter und b) in der halben Konzentration mit  $\frac{1}{10}$ -Enzym bearbeitet wurde.

Mit *Heracleum*; 80 prozentigem Alkohol; 25°.  $Z_u = 30,6$ .

a) 10 Stunden	0,5987 : 0,0444	7,4	81,0
b) 10 „	0,3345 : 0,0388	11,6	69,0

Da der Ansatz a) einer schon oben angeführten vollständigen Versuchsreihe entnommen ist, lassen sich die halben Umsetzungszeiten schätzen; sie betragen für die beiden Konzentrationen 3 und  $4\frac{1}{2}$  Stunden.

In einem anderen Beispiel haben wir mit einer Chlorophylllösung von a) nur der Hälfte, b) einem Viertel der üblichen Konzentration (also 1,5 und 0,75 g im Liter) gearbeitet, übrigens mit einem weniger wirksamen Enzympräparat.

Mit *Heracleum*; 80-prozentiger Alkohol;  $25^{\circ}$ ;  $\frac{1}{10}$ -Enzym.  
 $Z_a = 31,9$ .

a) 4 Stunden	0,3055 : 0,0817	26,7	21,1
b) 4 „	0,3150 : 0,0939	29,8	8,8

Die alkoholysierten Chlorophyllmengen verhalten sich hier ungefähr wie die Konzentrationen.

#### 5. Zusatz von Wasser.

Die Wirkung der Chlorophyllase wird begünstigt durch den Zusatz von Wasser zur alkoholischen Chlorophylllösung. Dies tritt bereits in den beschriebenen Beispielen zutage, obwohl diese nur mit irgend einem Pflanzenmaterial in hochprozentiger, mit einem anderen in mehr wasserhaltiger Lösung ausgeführt worden sind. Beim Arbeiten in 92-prozentigem Alkohol fanden wir nämlich für Chlorophyllösungen von 3 g im Liter mit  $\frac{1}{10}$ -Enzym in 10 Stunden Werte für  $k \cdot 10^3$  von 28 und 37, hingegen 166, 175 und 80 in 80-prozentigem Alkohol bei verschiedenen Darstellungen von Chlorophyll aus *Heracleum* und *Galeopsis*.

Daß die Reaktion in 80-prozentigem Alkohol reine Alkohololyse, nicht zugleich Hydrolyse ist, hat sich an der Äquivalenz zwischen eintretendem Äthylalkohol und abgespaltenem Phytol gezeigt (siehe Kap. II, Abschnitt 4).

Für den Vergleich der Geschwindigkeit in Alkohol von verschiedenem Wassergehalt wird zuerst an einem *Heracleum*extrakt nachgewiesen, daß ohne Enzym auch

in 80 prozentigem Alkohol in 10 Stunden bei 25° keine Veränderung des Phytolesters erfolgt.

$$\begin{aligned} Z_u &= 30,6 & 0,5100 : 0,1558 \\ J_u &= 30,6 & 0,1621 : 0,0496 \end{aligned}$$

Mit dem gleichen Extrakt und zwar in 92- und 80-prozentigem Alkohol wird nun folgender Parallelversuch ausgeführt, bei welchem als  $Z_a$  der Wert von  $Z_u$  des Versuches ohne Enzym gilt.

$\frac{1}{10}$ -Enzym; 10 Stunden; 25°.

In etwa 92 prozentigem Alkohol 0,5660 : 0,1102;  $Z_u = 19,5$ ;  
 $u = 43,7$ ;  $k \cdot 10^3 \approx 57,4$ .

In etwa 80 prozentigem Alkohol 0,4874 : 0,0458;  $Z_u = 9,4$ ;  
 $u = 75,4$ ;  $k \cdot 10^3 \approx 140,3$ .

Die halben Umsetzungszeiten lassen sich mit Anlehnung an die Kurven der Figuren 2 und 3 hinreichend genau schätzen; sie sind 14 und 4 Stunden.

Die Alkohololyse durch das Enzym erfordert also wasserhaltigen Alkohol. Die Verzögerung in hochprozentigem Alkohol bei der Chlorophyllase erinnert an Pankreaslipase. Nach H. Pottevin<sup>1)</sup> verläuft die Glyceridsynthese und nach W. Dietz<sup>2)</sup> die Fettsäureestersynthese bei Gegenwart von Wasser viel rascher.

### 6. Einfluß der Temperatur.

Wir suchen die günstigste Temperatur für die Alkohololyse, aber die Beobachtung erlaubt keine Folgerung für die Reaktion des Enzyms in der Pflanze. Das Temperaturoptimum in Äthylalkohol liegt niedrig, die Reaktionskonstante ist bei 35° kleiner als bei 25°, während für die Lipasen aus Ricinussamen und Pankreas das Optimum höher gefunden wird.

1. Beispiel. Extrakt aus *Stachys silvatica*,  $\frac{1}{10}$ -Enzym aus Galeopsis; 92 prozentiger Alkohol; 10 Stunden.

$$\begin{aligned} Z_a &= 31,9 \quad (0,3280 : 0,1045) \\ 25^\circ & \quad 0,4054 : 0,1114 & Z_u &= 27,4; & u &= 18,4. \\ 35 & \quad 0,4348 : 0,1281 & Z_u &= 29,4; & u &= 10,5. \end{aligned}$$

<sup>1)</sup> Annales de l'Institut Pasteur 20, 901, 916 (1906).

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. physiol. Chem. 52, 279 (1907).

2. *Beispiel.* Mit *Heracleum*;  $\frac{1}{10}$ -Enzym (alte Blätter), 92 prozentiger Alkohol; 10 Stunden.

	$Z_a = 30,6$		
25°	0,5660 : 0,1102	$Z_u = 19,5$ ;	$u = 43,7$ .
35	0,6056 : 0,1373	$Z_u = 22,7$ ;	$u = 32,1$ .

Um etwas genauer den Einfluß der Temperatur zu beobachten, haben wir die Temperaturintervalle 20—35° und 15—25° geprüft. Der Unterschied zwischen 25 und 35° wird geringer als in den ersten Beispielen, vielleicht nur, weil die Reaktionsdauer kleiner war; übrigens war auch der Wassergehalt bei den Versuchen verschieden.

3. *Beispiel.* Mit *Heracleum*;  $\frac{1}{10}$ -Enzym (junge Blätter) 80 prozentiger Alkohol; 4 Stunden.

	$Z_a = 31,9$		
20°	0,5452 : 0,1274	$Z_u = 23,4$ ;	$u = 33,3$ .
25	{ 0,4213 : 0,1080 } { 0,3102 : 0,0798 }	= 25,6;	= 25,3.
30		= 24,4;	= 29,7.
35	0,6113 : 0,1620	= 26,5;	= 21,9.

4. *Beispiel.* Mit *Heracleum*;  $\frac{1}{10}$ -Enzym (junge Blätter) 80 prozentiger Alkohol; 5 Stunden.

	$Z_a = 31,7$		
15°	0,4802 : 0,1010	$Z_u = 21,0$ ;	$u = 41,2$ .
20	0,4646 : 0,0890	= 19,1;	= 47,6.
25	0,4416 : 0,0957	= 21,6;	= 39,1.

Sicher geht aus den Versuchen nur hervor, daß das Temperaturoptimum für die erste Hälfte der Umwandlung bei ungefähr 20° liegt. Eine seltsame Erscheinung, die auch nach unseren mehrfachen Beobachtungen noch nachgeprüft werden sollte, ist das Zurückgehen und Wiederansteigen der Umwandlungszahl zwischen 20 und 30°. Es bestätigt sich hier, daß die Temperaturbeziehung und das Temperaturoptimum unter sehr verschiedenen Einflüssen stehen. Während man gewöhnlich das Optimum aus der Differenz zwischen der Reaktionsbeschleunigung bei steigender Temperatur und Verlangsamung durch Schädigung des Enzyms herleitet, wird die Alkoholyse

des Chlorophylls noch durch andere Faktoren kompliziert, vor allem die Empfindlichkeit des Substrates, sodann möglicherweise die Veränderung sonstiger Stoffe im Extrakt, zu welchen das Koenzym zählen kann. Der Gang der Umwandlungszahlen deutet an, daß zwischen 20 und 25° eine Schädigung des Systems die Beschleunigung überwiegt und daß sich dann dieses Verhältnis umkehrt.

Außer durch die beobachtete Schwächung des Enzyms wird es auch durch diese eigentümliche Beziehung zwischen Temperatur und Geschwindigkeit begreiflich, daß unter den bisherigen Versuchsbedingungen die Reaktion scheinbar nicht dem Gesetz der monomolekularen Reaktion folgt.

Bei höherer Temperatur, nämlich beim Kochen mit Alkohol, wird die Chlorophyllase zerstört, allerdings nur langsam.

Das Mehl von *Heracleum*blättern (32 g) wurde quantitativ extrahiert und mit 96 prozentigem Alkohol 40 Minuten lang am Rückflußkühler gekocht. Dann behandelten wir mit diesem Präparat als  $\frac{1}{10}$ -Enzym 0,5 Liter *Heracleum*extrakt mit dem Gehalt von 1,8 g Chlorophyll während 10 Stunden bei 25°. Für einen Vergleichsversuch diente dasselbe Enzymmaterial ohne Vorbehandlung in der Hitze.

$$Z_a = 30,6$$

Frisches Enzym	—	$Z_u = 19,5$	$u = 43,7$	$k \cdot 10^3 = 57,4$
Erhitztes Enzym	0,5807 : 0,1540	$= 26,5$	$= 17,4$	$= 12,7$

Beim Trocknen der Blätter für die Gewinnung des Enzyms ist daher höhere Temperatur zu vermeiden. Z. B. fanden wir *Lamium*kraut, das 2 Tage bei 50° getrocknet wurde, beinahe enzymfrei. Ein Versuch mit  $\frac{1}{10}$ -Enzym in 42 Stunden ergab nur ein Zurückgehen der Phytolzahl von 33,2 auf 31,8 (0,4532 : 0,1441).

Immerhin wird es nicht möglich sein, die Chlorophyllase durch Einwirkung von Alkoholdämpfen so rasch zu vernichten, wie es das Verfahren von E. Perrot und



A. Goris<sup>1)</sup> zur Sterilisierung von Arzneipflanzen, nämlich zur Gewinnung „stabilisierter“, enzymfreier Blätter vorschreibt.

#### 7. Reaktion des Mediums.

Die Beschaffenheit der Pflanzensubstanz, welche die Chlorophyllase außerordentlich verdünnt, erschwert es, die Alkoholyse in einer Lösung von bestimmter und konstanter niedriger Konzentration des Wasserstoff- oder Hydroxylions zu bewirken. Das enzymhaltige Pflanzenmehl ist imstande, Säuren und Basen zu absorbieren, es ist amphoterer Natur, indessen mehr sauer als basisch. Es läßt sich daher wohl annehmen, daß es die Reaktion der Lösung regulieren, daß es als „Puffer“<sup>2)</sup> wirken kann.

Enzym, d. h. extrahiertes Mehl aus 50 g Blättern von *Heracleum*, wurde mit 50 g Alkohol und 200 g Wasser angerührt; es absorbierte beim Einlaufen innerhalb 10 Minuten 60 ccm  $\frac{1}{20}$ -Salzsäure bis zum Eintritt saurer Reaktion auf Lackmus.

Die gleiche Menge Enzym absorbierte beim Rühren und Eintropfen von  $\frac{1}{20}$ -Barytwasser schnell 180 ccm bis zum Beginn alkalischer Reaktion auf Curcumapapier. Dann wurde sehr langsam noch weiteres Alkali bis zum Stehenbleiben der alkalischen Reaktion aufgenommen. An Wasser gibt das extrahierte Pflanzenmehl Säure ab.

Bei einem Versuch der Einwirkung des Enzyms auf das in Alkohol gelöste Kalksalz einer Alkylphthalestersäure hat das Pflanzenmehl die ganze Menge Calcium absorbiert.

Das Einhalten saurer Reaktion bei der Alkoholyse des Chlorophylls verbietet sich durch die große Empfindlichkeit des Substrates gegen Säure; das Chlorophyll wird zersetzt und verbraucht dabei Säure. Um nun, da

---

<sup>1)</sup> Bull. d. Sciences Pharmacol. 16, 381 (1909); Centralbl. 1909, II, 1271. L. Arousseau, Bull. d. Sciences Pharmacol. 17, 320 (1910); Centralbl. 1910, II, 905.

<sup>2)</sup> Siehe hierzu namentlich die Untersuchungen von S. P. L. Sörrensen, Biochem. Zeitschr. 21, 131, 187 (1909).

die Rohlösungen des Chlorophylls Säure enthalten können, ungefähr gleiche Bedingungen für die Versuche einzuhalten, haben wir sie meistens unter reichlichem Zusatz von gefällttem Calciumcarbonat angesetzt.

Ein besonderer Vergleich, den wir mit einer guten Rohchlorophylllösung aus *Heracleum* mit und ohne Calciumcarbonat angestellt haben, ließ übrigens keinen Einfluß dieses Zusatzes erkennen.

1,8 g Chlorophyll in 0,5 Liter 92 prozentigem Alkohol;  $\frac{1}{10}$ -Enzym; 10 Stunden;  $25^{\circ}$ .  $Z_a = 30,6$ .

Ohne Calciumcarbonat: (Belege siehe oben)  $Z_u = 19,5$ ;  $u = 43,7$ .

Mit 5 g Calciumcarbonat: 0,5076 : 0,0973  $Z_u = 19,2$ ;  $u = 44,7$ .

Ganz anders wirkt Magnesiumoxyd (*Magnesia usta*); die Reaktion wird stark verzögert.

Mit *Galeopsis*; 1,4 g Chlorophyll in 0,5 Liter 80 prozentigem Alkohol;  $\frac{1}{10}$ -Enzym; 10 Stunden;  $25^{\circ}$ .  $Z_a = 31,5$ .

Ohne *Magnesia*: —  $Z_u = 6,0$   $u = 85,4$ .

Mit 5 g *Magnesia*: 0,4205 : 0,0826  $Z_u = 19,6$   $u = 45,4$ .

### 8. *Verschiedenheit der Ernten, Einfluß des Trocknens, Altern des Enzyms.*

Bei der Verarbeitung verschiedener Ernten von chlorophyllasereichen Pflanzen glauben wir zu beobachten, daß der Gehalt an diesem Enzym in jungen Blättern relativ klein ist, und daß er eine Zeitlang wächst mit dem Alter des Blattes und der Zunahme des Chlorophyllgehaltes. Die schon mitgeteilten Beispiele der Enzymreaktionen ermöglichen folgenden Vergleich:

1. *Beispiel: Heracleum*; 92 prozentiger Alkohol;  $\frac{1}{10}$ -Enzym;  $25^{\circ}$ ; 10 Stunden.

a) Junge Blätter von Anfang Mai, Chlorophyllgehalt 4,8 g in 1 kg.

b) Ältere Blätter von Ende Mai, Chlorophyllgehalt 5,6 g in 1 kg.

a)  $Z_a = 31,5$ ,  $Z_u = 25,6$ ,  $u = 24,0$ .

b)  $Z_a = 30,6$ ,  $Z_u = 19,5$ ,  $u = 43,7$ .

2. *Beispiel: Heracleum*; 80 prozentiger Alkohol;  $\frac{1}{10}$ -Enzym;  $25^{\circ}$ ; 5 Stunden.

a) Ältere Blätter von Ende Mai, Chlorophyllgehalt 5,6 g in 1 kg.

b) Jüngere Blätter von Ende Juli, Chlorophyllgehalt 4,9 g in 1 kg.

$$\text{a) } Z_a = 30,6, \quad Z_u = 12,9, \quad u = 65,1.$$

$$\text{b) } Z_a = 31,9, \quad Z_u = 23,0, \quad u = 34,8.$$

Die Blätter sind für die Bereitung des Enzyms zu meist bei Zimmertemperatur getrocknet worden. Dadurch erleidet das Enzym keine Einbuße an Wirksamkeit. Bei der Behandlung einer Chlorophylllösung mit zerkleinerten frischen Blättern liegt nämlich die Reaktionskonstante zwischen den Werten, die Enzympräparate aus getrockneten Blättern mehrerer Ernten unter vergleichbaren Bedingungen ergeben haben.

1 kg frische Blätter von *Heracleum* haben wir viermal mit einer Syenitwalzenmühle gemahlen. Den Brei, der olive Farbe annahm, kneteten wir mit  $\frac{3}{4}$  Liter Alkohol tüchtig durch und saugten ihn auf der Nutsche ab. Nach wiederholtem Waschen mit Alkohol an der Pumpe war das Chlorophyll ganz entfernt, die zerkleinerten Blätter hatten sich dabei gehärtet. Nun wiederholten wir das Mahlen, Ausschütteln mit Alkohol und Absaugen und erhielten dann 625 g alkoholfuchtes enzymhaltiges Mehl, die ungefähr 250 g trockenem Material entsprachen. Von diesen wendeten wir daher als  $\frac{1}{10}$ -Enzym je 78,2 g an für  $\frac{1}{2}$  Liter *Heracleum*extrakt mit 1,5 g Chlorophyll. Die Ausbeute an Phäophytin betrug bei den zwei Versuchen der Alkohololyse je 1,25 g.

92 prozentiger Alkohol; 25°; —  $Z_a = 31,5$ .

10 Stunden 0,5433 : 0,1252;  $Z_u = 23,0$ ;  $u = 33,6$ ;  $k \cdot 10^3 = 41,0$ .

20 „ 0,5000 : 0,0895;  $Z_u = 17,9$ ;  $u = 51,0$ ;  $k \cdot 10^3 = 35,7$ .

Die halbe Umsetzungszeit ist also beim Versuche mit dem frischen Enzympräparat 19 Stunden, während sie bei Versuchen in 92 prozentigem Alkohol mit zwei verschiedenen Darstellungen des Enzyms aus getrockneten Blättern 46 und 14 Stunden betragen hat.

Aus den frischen Blättern läßt sich das Enzym mit dem Pflanzensaft unter der Presse abtrennen, aber zum kleineren Teil. Der Preßkuchen ist enzymatisch wirksamer als der Preßsaft. Immerhin liefert uns der Saft

die konzentrierteste Form des Enzyms, wenn wir ihn mit Alkohol fällen.

Wir zerkleinerten die von den Stielen befreiten Blätter von *Heracleum* mittels der Syenitwalzenmühle und behandelten den Brei mit einer hydraulischen Presse mit 250 Atmosphären Druck. Der Preßsaft betrug 700 ccm, der Rückstand 300 g.

Der Preßkuchen wurde wiederum gemahlen und in der üblichen Weise zuerst durch eine rasche und dann durch erschöpfende Extraktion mit Alkohol vom Chlorophyll befreit. Das alkoholfleuchte Präparat (Enzym a) verwendeten wir  $1\frac{1}{2}$  Tage nach der Darstellung.

Der Preßsaft gab ein schönes Enzympräparat beim Fällen mit dem doppelten Volumen Alkohol; der Niederschlag von dichten Flocken wurde durch häufiges Dekantieren mit Alkohol gewaschen und zentrifugiert. Der Brei in feuchtem Zustand war Enzym b.

Auf je  $\frac{1}{2}$  Liter *Heracleum*extrakt mit 1,5 g Chlorophyll ließen wir ein Zehntel der seinem Chlorophyllgehalt entsprechenden Menge von dem Präparat a und b (29 g Preßrückstand, alkoholfleucht, und Fällung aus 75 ccm Saft) einwirken.

80 prozentiger Alkohol mit Zusatz von  $\text{CaCO}_3$ ;  $25^\circ$ ; 10 Stunden.

$$Z_a = 30,6.$$

$$\text{a) } 0,6879 : 0,1333; \quad Z_u = 19,4; \quad u = 44,0.$$

$$\text{b) } 0,4724 : 0,1125; \quad Z_u = 23,8; \quad u = 28,0.$$

Das Enzym gehört also zum größeren Teil dem Protoplasma an.

Die Tätigkeit des Enzyms bewirkt, wie in dem Abschnitt „Wiederholte Anwendung“ gezeigt worden, erhebliche Abnützung. Außerdem wird es geschwächt beim Altern, und zwar beim Lagern des Blattmehles und in viel höherem Grade beim Aufbewahren des mit Alkohol extrahierten und wieder getrockneten Pulvers. Die Nutzanwendung war, das Enzympräparat möglichst kurz vor den Versuchen zu bereiten.

Als Beispiel sei die Behandlung eines Galeopsis-extraktes (92-prozentiger Alkohol) mit  $\frac{1}{10}$ -Enzym angeführt. Die Einwirkung unter Schütteln an der Maschine bei etwa  $20^\circ$  dauerte je 84 Stunden. Das Präparat bei der ersten Beobachtung war seit der Extraktion des Chlorophylls einen Monat alt; zwischen jedem Versuch und dem nächsten lag eine Pause von dreiviertel Monaten.

$$Z_a = 31,3 \text{ (0,2954 : 0,0927).}$$

Alter in Monaten	Analyt. Belege	$Z_u$	$u$	$k \cdot 10^3$
1	0,3340 : 0,0355	10,6	72,8	15,5
$1\frac{3}{4}$	1)	15,7	57,0	10,1
$2\frac{1}{2}$	0,3448 : 0,0656	19,0	47,0	7,6
$3\frac{1}{4}$	0,2372 : 0,0476	20,0	43,6	6,8

Dieser Einfluß des Alterns wird in der Fig. 4 anschaulich gemacht. Da die halben Umsetzungszeiten nicht bekannt sind, tragen wir die Umwandlungszahlen für gleiche Zeiten und die Altersstufen auf die Koordinaten auf.

Die Schwächung des Enzyms beim Aufbewahren der grünen Blätter zeigt der Vergleich eines Präparates, das aus Galeopsismehl nach dreijährigem Aufbewahren gewonnen worden, mit einem frischen Material. Obwohl dieses nur aus einer Frühernte stammte, war die halbe Umsetzungszeit viermal kleiner als bei dem gealterten Material.

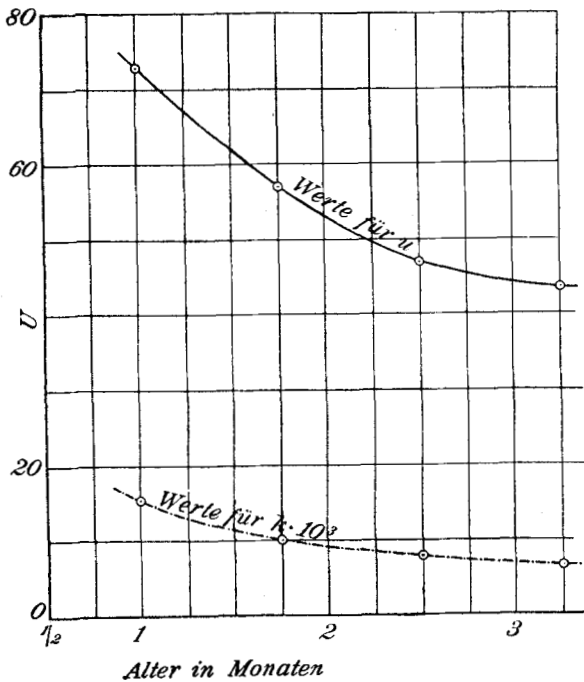
Galeopsisextrakt in 80 prozentigem Alkohol;  $\frac{1}{10}$ -Enzym;  $25^\circ$ ;  
10 Stunden. —  $Z_a = 31,5$ .

Ernte 1907: 0,5280 : 0,1063;  $Z_u = 20,1$ ;  $u = 43,8$ ;  $k \cdot 10^3 = 57,6$ .

Ernte 1910: — ;  $Z_u = 6,0$ ;  $u = 85,4$ ;  $k \cdot 10^3 = 192,1$ .

1) Mit dem  $1\frac{3}{4}$  Monate alten Enzym haben wir eine in dieser Arbeit nicht beschriebene Versuchsreihe ausgeführt, welche durch Interpolation  $Z_u$  für 84 Stunden anzugeben gestattet. —  $Z_a = 31,3$ .

10,5 Stunden;	$Z_u = 23,3$ ;	$u = 32,0$
21	„ ; „ = 21,8;	„ = 37,4
126	„ ; „ = 12,9;	„ = 65,4
168	„ ; „ = 11,6;	„ = 69,9.



Figur 4.

#### IV. Methanolyse des Chlorophylls.

##### 1. Reaktionsgeschwindigkeit.

Der Versuch, analog dem bekannten kristallisierten Chlorophyll ein Methylchlorophyll (Methylchlorophyllid) darzustellen, ist auf unerwartete Hindernisse gestoßen. Die Methanolyse unter der Wirkung des Enzyms verläuft träger als die Äthanolyse. Aber nicht so sehr durch die geringe Reaktionsgeschwindigkeit ist die Isolierung der gebildeten Methylverbindung erschwert worden, als dadurch, daß sie unter den Versuchsbedingungen sich in ein leicht lösliches Derivat umwandelt.

In hochprozentigem Methylalkohol wird die Enzymwirkung gehemmt; in wasserhaltigem Holzgeist anderer-

seits ist Chlorophyll zu wenig löslich, viel weniger als in Weingeist. Wenn wir präparativ analog wie bei der Darstellung des krystallisierten Chlorophylls verfahren, so erfolgte die Abspaltung von Phytol nur in geringem Maße und es gelang bei zahlreichen Versuchen nicht, auf diese Weise die Methylverbindung zu gewinnen.

Die Extraktion der Blättermehle, die etwa 7 Proz. Feuchtigkeit enthalten, mit Holzgeist nach dem raschen Verfahren liefert nur Extrakte mit 1,6—2 g Chlorophyll in 1 Liter. Versucht man mit einem solchen Extrakt ein weiteres Quantum des Materials auf der Nutsche zu extrahieren, so wird der Doppelsextrakt noch verdünnter als der einfache. Der Wassergehalt der zweiten Portion des Blattmehls bewirkt, daß ein Teil des Chlorophylls wieder ausfällt. Etwas höher kommt man mit der Chlorophyllkonzentration dadurch, daß man das derart auf der Nutsche mit einem fertigen Extrakt vorbehandelte Mehl mit frischem Holzgeist extrahiert.

Auf Zusatz von Wasser zum methylalkoholischen Extrakt wird das Chlorophyll größtenteils auf das Pflanzenmehl niedergeschlagen. Als wir zu einem *Heracleuma*auszug mit 0,8 g Chlorophyll in  $\frac{1}{2}$  Liter  $\frac{1}{10}$ -Enzym und 10 Proz. Wasser hinzufügten, hellte sich die Lösung auf und das Mehl wurde durch gefälltes Chlorophyll tiefgrün. Das Substrat ist dadurch der Umwandlung entzogen worden, denn nach zehnstündigem Rühren bei 25° lieferte das mit Holzgeist herausgewaschene Chlorophyll unversehrtes Phäophytin mit 33,1 Proz. Phytol, während ein genauer Vergleichsversuch in äthylalkoholischer Flüssigkeit zur Phytolzahl 11.6 führte.

In präparativem Maßstab haben wir daher mit Methylalkohol ohne Wasserzusatz zu arbeiten versucht. 1,2 kg *Heracleum*mehl setzten wir unter Zufügen von Calciumcarbonat mit 3 Litern Methylalkohol an. Die Einwirkung dauerte 5 Tage und wurde täglich durch stundenlanges Schütteln an der Maschine unterstützt.

Durch Absaugen erhielten wir dann den Extrakt A mit 2,4 g Chlorophyll und durch erschöpfendes Nachwaschen mit Holzgeist die Lösung B mit 1,8 g Chlorophyll. Teile der beiden Lösungen sind für die quantitative Bestimmung in Phäophytin übergeführt worden.

Phäophytin aus A enthielt 24,9 Proz. Phytol (0,5187 : 0,1290).

„ „ B „ 29,0 „ „ (0,3978 : 0,1154).

Besser war das Resultat der Methanolyse bei einer Geschwindigkeitsmessung in einem nur wenig Wasser enthaltenden Methylalkohol, der Chlorophyll noch hinlänglich löste: Wir bereiteten  $\frac{1}{2}$  Liter Extrakt mit 0,75 g Chlorophyll aus 400 g *Heracleum* (Ernte von Ende Juli) und feuchteten, um den Extrakt auf den gewünschten Wassergehalt zu bringen, das Enzym vor dem Eintragen mit 20 ccm Wasser an; als  $\frac{1}{10}$ -Enzym dienten 15 g nicht extrahiertes gutes Galeopsismehl.

*Heracleum*, 92 prozentiger Methylalkohol; 10 Stunden; 25°.

$$Z_a = 32,6 \text{ (0,4897 : 0,1597).}$$

$$Z_u = 27,4 \text{ (0,3970 : 0,1088); } u = 20,8; k \cdot 10^3 = 23,3.$$

Für die Methanolyse ist dieses Ergebnis nicht ungünstig, aber die Äthanolyse wäre unter gleichen Umständen ungefähr doppelt so weit gegangen.

## 2. *Krystallisiertes Methylchlorophyll.*

Die Gewinnung der Methylverbindung und damit der Nachweis der Methanolyse gelingt uns nach einem neuen Verfahren, nämlich durch Behandeln frischer Blätter mit 50—60 prozentigem Methylalkohol. Die Bedingungen sind einer noch unveröffentlichten Untersuchung von Willstätter und Isler über Chlorophyll aus frischen Blättern entnommen.

Der Versuch gelang sowohl mit enzymreichen Pflanzen (z. B. *Heracleum*) wie mit enzymarmen (*Urtica dioica*, *Ulva lactuca*), freilich mit sehr verschiedener Ausbeute. Die schönen Methylchlorophyllide, die wir so erhalten und die wir in einer folgenden Abhandlung genauer be-



schreiben wollen, sind nicht identisch; sie zeigen sehr charakteristische Unterschiede in den Spaltungsprodukten der entsprechenden Phäophorbine, in den Phytochlorinen und Phytorhodinen. Während das bekannte Äthylchlorophyllid ein Gemisch von Phytochlorin *e* und Phytorhodin *g* bei der Spaltung ergeben hat, liefert das Methylchlorophyllid aus *Heracleum* so gut wie reines Phytochlorin *e*, dasjenige aus *Ulva* Phytorhodin *g*, hingegen das aus *Urtica* das schwächer basische Phytochlorin *f* in einheitlichem Zustand.

Hier soll an diesen Chlorophylliden nur die Verdrängung des Phytols durch Methylalkohol analytisch bestimmt werden.

Das *Methylchlorophyllid* aus *Heracleum* krystallisiert aus Äther, worin es sehr schwer löslich ist, in stahlblau glänzenden Prismen, die meist zu Drusen gruppiert sind. Die Analyse nach der Methode von Zeisel mit der unter 0,03 mm Druck bei 105° getrockneten Substanz stimmt genau für zwei Methoxygruppen.

0,1855 g gab 0,1397 g AgJ.

Ber. für	$C_{36}H_{35}O_{5\frac{1}{2}}N_4Mg$	Gef.
Jodsilberzahl	73,9	75,3

Das abgespaltene Halogenalphenyl war reines Jodmethyl; mit alkoholischer Trimethylaminlösung haben wir daraus reines Tetramethylammoniumjodid (0,0964 g aus 0,1637 g Substanz) ohne eine Beimischung des leichter löslichen Trimethyläthylammoniumjodids erhalten.

Das *Methylphäophorbid* aus diesem Chlorophyllide bildet metallglänzende spindelförmige Krystalle.

0,2070 g gab 0,1397 g AgJ.

Ber. für	$C_{36}H_{37}O_{5\frac{1}{2}}N_4$	Gef.
Jodsilberzahl	76,6	74,5

*Brennesseln* lieferten ein *Methylchlorophyllid* von *anderen Eigenschaften*. Es ist in Äther schwer löslich, aber doch leichter als das Präparat aus *Heracleum* und es krystallisiert in ungleichseitig dreieckigen und in länglich sechseckigen Täfelchen.

0,1008 g (unter 0,03 mm bei 105° getrocknet) gaben 0,0713 g AgJ.

Ber. für $C_{96}H_{35}O_{5\frac{1}{2}}N_4Mg$	Gef.
Jodsilberzahl 73,9	70,7

### V. Hydrolyse mittels Chlorophyllase.

Hydrolyse des Chlorophylls, und zwar nur der Phytol-estergruppe, erfolgt in feuchter ätherischer Lösung.

Früher war beobachtet worden<sup>1)</sup>, daß auch mit Hilfe von ätherischen Pflanzenextrakten krystallisiertes Chlorophyll (Äthylchlorophyllid), wenn schon in sehr geringer Ausbeute, erhalten werden kann. Wir haben dies bestätigt gefunden und sogar aus ätherischem Extrakt von Brennesseln das krystallisierte Chlorophyll durch fünf-tägiges Digerieren mit extrahiertem Galeopsismehl gewonnen, nämlich aus 1 kg 0,6 g eines schönen Präparates, das in Krystallform, Löslichkeit und Verhalten mit dem beschriebenen krystallisierten Chlorophyll übereinstimmte. Aber diese Bildung des Äthylchlorophyllids ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß der angewandte Äther nicht alkoholfrei war. Die folgenden Versuche mit reinem Äther machen es unwahrscheinlich, daß der Äther unter der Wirkung des Enzyms die Äthoxylgruppe geliefert habe.

Die Abspaltung von Phytol in der feuchten ätherischen Lösung des Chlorophylls erfolgt langsam.

Ätherextrakt aus *Heracleum* (0,5 Liter mit 0,75 g Chlorophyll) wurde mit  $\frac{1}{10}$ -Enzym, nämlich mit 15 g nicht extrahiertem Galeopsismehl, das wir mit 10 ccm Wasser angefeuchtet hatten, unter Zusatz von Calciumcarbonat 10 Stunden bei 25° bearbeitet. Um aus einer solchen ätherischen Lösung reines Phäophytin zu isolieren, verdünnt man sie mit dem doppelten Volumen Alkohol und dampft im Vakuum bei etwa 20° auf das ursprüngliche Volumen ein. Dann scheidet sich Wachs aus, und das

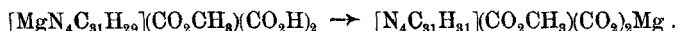
<sup>1)</sup> R. Willstätter und M. Benz, diese Annalen 358, 275 (1907).

Filtrat liefert mit Oxalsäure Phäophytin so rein, wie es aus alkoholischen Extrakten gewonnen wird. Das Phäophytin dieses Versuches gab die Phytolzahl 30,7 (0,3255:0,1000), während bei dem angewandten Extrakt eine sehr hohe Phytolzahl (etwa 33,5) anzunehmen ist; die Umwandlungszahl beträgt daher gegen 10.

Für die Untersuchung der Reaktion in präparativem Maßstabe haben wir das gesamte Pflanzenmehl mit dem ätherischen Extrakt tagelang in Berührung gelassen und dabei fast vollständige Abspaltung des Phytols erreicht.

1 kg Mehl von *Heracleum* ließen wir mit 3 Liter reinem Äther unter Zusatz von Calciumcarbonat und häufigem Schütteln drei Tage lang stehen. Von dem Extrakt, der beim Absaugen auf der Nutsche zu 3 Liter nachgewaschen wurde, ist ein Viertel auf Phäophytin verarbeitet worden. Das magnesiumfreie Derivat gab die Phytolzahl 4,5 (0,1595:0,0073).

Das Produkt der Enzymreaktion in Äther war kein Ester des Chlorophyllids, sondern dieses selbst, die freie Dicarbonsäure. Sie ist sehr leicht zersetzlich und erinnert darin an Phyllophyllin.<sup>1)</sup> Ihre chlorophyllgrüne ätherische Lösung scheidet nämlich beim Abdampfen und beim Stehen leicht an Stelle der komplexen Magnesiumverbindung das Magnesiumsalz des Phäophorbids aus:



Die Carbonsäure wirkt also auf den Komplex des eigenen Moleküls zersetzend ein. Chlorophyllid und Phäophorbid sollen den Gegenstand einer folgenden Arbeit bilden. Hier sind sie nur soweit zu beschreiben, als es für den Nachweis der Hydrolyse von Interesse ist. Dieser wird durch die Methoxylbestimmung der phytolfreien Verbindung geführt: Phytol ist ausgetreten ohne Ersatz durch Alhyl.

Von dem ätherischen Filtrat sind drei Viertel zur

<sup>1)</sup> R. Willstätter und H. Fritzsche, diese Annalen **371**, 33, 80 (1909).

Reinigung mit Talk geschüttelt und auf 300 ccm eingedampft worden. Die schön grüne Lösung schied 0,4 g und bei weiterem Einengen noch 1 g eines schwarzen krystallinischen Produktes ab, das in den üblichen Solvenzien fast unlöslich war. Es enthielt eine Beimischung von grünen Krystallblättchen, wahrscheinlich unzersetzten Chlorophyllids. Die Substanz ist ein Salz, beim Ansäuern und Ausäthern liefert sie olivfarbiges Phäophorbid. Das Magnesiumsalz gab bei der Phytolbestimmung nur eine Spur Ätherlösliches (1 Proz.).

Für die Analyse ist das Rohprodukt unter 0,1 mm Druck bei 105° getrocknet worden.

I. 0,2211 g gaben 0,0116 Asche (MgO).

II. 0,2394 g „ 0,0822 AgJ.

	Ber. für	Gef.	
	$C_{35}H_{54}O_6N_4Mg$	I	II
Mg	3,82	3,17 <sup>1)</sup>	—
Jodsilberzahl	36,9	—	34,4

Den gleichen Verlauf nahm der Versuch mit Brennesselextrakt. Wir bearbeiteten den ätherischen Auszug von 1 kg Brennesseln mit dem gesamten Heracleum-mehl des soeben beschriebenen Versuches sechs Tage lang und engten das Filtrat auf 700 ccm ein. Die prächtig chlorophyllgrüne Lösung lieferte keine Krystallisation einer grünen Substanz, sondern 2 g der schwarzen, harten, krystallinischen Kruste, die in den Eigenschaften mit dem Magnesiumsalz des Phäophorbids aus Heracleum übereinstimmte. Die Farbe der grünen Mutterlauge schlug bei weiterem Einengen in oliv um.

## VI. Umkehrung der Alkoholyse.

Wie die Ester- und Glyceridsynthese mit Pankreaslipase geglückt ist,<sup>2)</sup> so war zu erwarten, daß die Umwandlung des krystallisierten Chlorophyllids in den

<sup>1)</sup> Es sei noch dahingestellt, ob die Dicarbonsäure als zwei-basische Säure zu reagieren vermag.

<sup>2)</sup> J. H. Kastle und A. S. Loewenhardt, Am. Chem. Journ. **24**, 491 (1900); H. Pottevin, Compt. rend. **136**, 1152 (1903); **138**,

Phytolester mit Hilfe der Chlorophyllase gelingen würde. Allerdings ist es nicht leicht, günstige Bedingungen für die Reaktion zu finden. Das Enzym erfordert die Gegenwart von Wasser, Phytol ist darin unlöslich; auch fehlt die Kenntnis eines Aktivators für die Reaktion, wie ihn die Extrakte für die Alkohololyse zu enthalten scheinen.

In der Tat vermochten wir den Eintritt des Phytols nur in sehr geringem Betrag zu erzielen.

Als wir auf 1 g krystallisiertes Chlorophyll 20 g Phytol mit extrahiertem Galeopsismehl ein paar Tage einwirken ließen, gab das Chlorophyll ein Phäophorbidpräparat mit einem äußerst geringen Gehalt an Phytol (3 mg in 0,4 g).

Deutlicher war das Ergebnis bei Zusatz von Wasser.

Wir lösten 1 g krystallisiertes Chlorophyll in 25 g Phytol unter gelindem Erwärmen. Als Enzym diente mit Alkohol extrahiertes und mit Äther gereinigtes *Heracleummehl* (30 g). Wir vermischten es gründlich mit 10 ccm Wasser und dann in der Reibschale mit der Phytollösung des Chlorophylls. Nach fünftägigem Stehen unter zeitweisem Verreiben isolierten wir das Chlorophyll mit absolutem Alkohol und fällten das Äthylphäophorbid mit Oxalsäure. Die Ausbeute an der Fällung war schlecht (nach dem Umscheiden aus Chloroform 0,15 g), wahrscheinlich weil die Phytolalkoholmischung viel mehr als reiner Alkohol löste.

0,1307 g gaben 0,0058 g d. i. 4,4 Proz. Phytol. Die Phytolzahl 4,4 bedeutet, daß nur 10 Proz. des Äthylchlorophyllids phytolysiert worden sind.

## VII. Verbreitung der Chlorophyllase.

### 1. *Enzymreiche Pflanzen.*

Reich an Chlorophyllase in getrocknetem Zustand nennen wir diejenigen Pflanzen, deren Blattmehl bei 378 (1904); Bull. soc. chim. 35, 693 (1906); M. Bodenstein und W. Dietz, Zeitschr. f. Elektroch. 12, 605 (1906) und W. Dietz, Zeitschr. f. physiol. Chem. 52, 279 (1907).

langer Extraktion eine niedrige Phytolzahl gibt. Auch bei solchen Pflanzen treten, wenn man beliebige Ernten vergleicht, große Unterschiede auf. Für den Vergleich wäre es zweckmäßig, die halben Umwandlungszeiten bei gleichen Bedingungen anzugeben. Da hierzu größere Versuchsreihen erforderlich sind, vergleichen wir nur die Umwandlungen, die bei 25° in 10 Stunden unter Rühren durch  $\frac{1}{10}$  des dem Chlorophyllgehalt entsprechenden Pflanzenmehles bewirkt werden.

Die Extrakte enthalten 2,5 bis 3 g Chlorophyll im Liter; sie waren mit 96 prozentigem Alkohol bereitet und enthielten infolge der Feuchtigkeit des Mehles etwa 8 Volumprozent Wasser. Die frischen Blätter sind bei Zimmertemperatur getrocknet und 6 bis 10 Tage nach der Ernte verwendet worden, nur Stachys war ein halbes Jahr alt.

*Analyt. Belege:* 1 a) 0,3280 : 0,1045; b) 0,3929 : 0,1062  
 2 a) 0,3471 : 0,1153; b) 0,5116 : 0,1400  
 3 a) 0,5172 : 0,1682; b) 0,6281 : 0,1994  
 4 a) 0,3900 : 0,1282; b) 0,3783 : 0,1183

1. Sorbus aucuparia	$Z_a = 32,9$ ;	$Z_u = 31,3$ ;	$u = 6,6$ ;	$k \cdot 10^3 = 6,8$
2. Melittis melissoph.	32,5	31,2	5,5	5,6
3. Stachys silvatica	31,9	27,0	20,0	22,0
4. Lamium maculatum	33,2	27,3	23,1	26,3

Unter gleichen Bedingungen gaben verschiedene Ernten von Heracleum  $u = 24$  bis 44.

## 2. Enzymarme Pflanzen.

Die Chlorophyllase ist ein Enzym von der allgemeinsten Verbreitung. In allen Fällen, die geprüft wurden, hat es sich gezeigt, daß dieses Enzym das Chlorophyll begleitet und zwar in den Pflanzen aus den verschiedenen Klassen und den verschiedensten Lebensverhältnissen. Darauf deuteten bereits die Phytolzahlen in der Tabelle der X. Abhandlung hin. 24 rasch<sup>1)</sup> extra-

<sup>1)</sup> Die raschen Extrakte der Untersuchung von Willstätter und Oppé waren nicht durchwegs so schnell bereitet als die Extrakte für die Anfangsphytolzahlen in der vorliegenden Arbeit, und sie haben daher noch oft etwas zu tiefe Zahlen ergeben.

hierte, sowie 70 langsam extrahierte Pflanzen haben Phytolzahlen gegeben, die unter 30 liegen. In 31 Beispielen ist dort gezeigt worden, daß bei langsamem Extrahieren die Phytolzahlen deutlich niedriger ausfallen als bei raschem. Wir haben nun in einer Reihe von Pflanzen, die bei 2 Tage langem Extrahieren nur ein geringes Sinken der Phytolzahl ergeben, noch den sicheren Nachweis der Chlorophyllase durch länger dauernde Einwirkung des Blattmehles auf die alkoholische Chlorophylllösung geführt.

*Brennesseln.* Für 12 verschiedene Ernten von 5 Jahren haben Willstätter, Hocheder und Hug bei langsamem Extrahieren Phytolzahlen zwischen 26,6 und 29,8 beobachtet.

Käufliche Herba Urticae, für deren Extrakt die Phytolzahl 32,2 gefunden wurde, gab nach 33 Tagen  $Z_u = 21,1$  (siehe Kap. II, Abschn. 1). Daraus folgt  $u = 44$ . Wenn das Brennesselmehl dann noch länger auf den Extrakt einwirkte, so fand keine weitere Abspaltung von Phytol mehr statt. Ein Parallelversuch gab nach 100 tägigem Stehen und häufigem Schütteln  $Z_u = 22,8$  (0,5734:0,1310) und bei weiterem 50 tägigem Stehen unter täglichem Schütteln fast unverändert  $Z_u = 21,3$  (0,4749:0,1015). Die Extrakte blieben in der langen Zeit schön grün, aber sie gaben eine zu geringe Ausbeute an Phäophytin, nämlich etwa 1,5 g aus 1 kg.

Mit selbstgesammelten Brennesseln (Ernte Oktober, nach 2 Monaten verarbeitet) fanden wir diesen Grad der Umwandlung bestätigt. 33 tägiges Behandeln von 400 g mit 850 ccm Alkohol führte zu  $Z_u = 19,0$  (0,4221:0,0703). Unter Annahme des theoretischen Wertes für  $Z_a$  ist  $u = 52$ .

Das krystallisierte Äthylchlorophyllid läßt sich durch diese lange Behandlung aus den Brennesselextrakten nicht gewinnen.

*Gras.* Für fünf Ernten war früher bei zweitägigem Extrahieren die Phytolzahl über 31 gefunden worden,

nämlich im Durchschnitt 31,9. Aber auch hier zeigt sich die Chlorophyllase wirksam bei 32 tägiger Einwirkung. 800 g sind mit 2,2 Litern Alkohol angesetzt worden. Die Phäoptytinausbeute betrug 2,6 g; das Präparat enthielt 17,7 Proz. Phytol (0,5915:0,1046). Legt man für  $Z_a$  den theoretischen Wert 33,8 zugrunde, so folgt  $u = 56,0$ .

*Sambucus* hat unter denselben Bedingungen Phäoptytin von der Phytolzahl 3,7 ergeben (0,4968:0,0187). Aus seiner Mutterlauge krystallisierte noch reines Phäophorbid. Die Umwandlung hat 90 Proz. überschritten.

Um bei einigen enzymärmeren Pflanzen höhere Umwandlungszahlen zu erreichen, haben wir einige Beispiele mit Wasserzusatz untersucht. Da der Platanenextrakt sich infolge seines Säuregehaltes bei längerem Stehen trotz Zusatz von Calciumcarbonat zersetzte, ist in diesen Versuchen Magnesiumoxyd zugefügt worden. Wir haben für je 500 g Blattmehl 1200 ccm 96 prozentigen Alkohol und 120 ccm Wasser angewandt, die Versuchsdauer betrug in den folgenden Fällen 10 Tage.

Aspidium . . .	(0,3995 : 0,0188);	$Z_u = 4,7$ ;	$u = 89,7$
Equisetum . . .	(0,0509 : 0,0013);	„ = 2,6;	„ = 95
Taxus . . . .	(0,0213 : 0,0051);	„ = ca. 24 <sup>1)</sup> ;	„ = ca. 35
Avena . . . .	(0,4740 : 0,0334);	„ = 7,0;	„ = 84,3
Platanus . . . .	(0,1611 : 0,0416);	„ = 25,8;	„ = 30,2

In einigen anderen Fällen, namentlich bei der Grünalge *Ulva Lactuca* aus dem Mittelländischen Meer, ferner bei *Äsculus*, wofür sich auch bei langsamem Extrahieren des getrockneten Materials eine hohe Phytolzahl ergeben hatte, ist das Vorkommen der Chlorophyllase an der schon beschriebenen Bildung des krystallisierten Methyl-

<sup>1)</sup> Da *Taxus* bei langer Extraktion eine schlechte Phäoptytinausbeute und deshalb eine unsichere Umwandlungsphytolzahl lieferte, ließen wir frisch extrahiertes *Taxus*mehl auf kurz bereiteten *Heraclum*extrakt unter Zusatz von Wasser und Calciumcarbonat 5 Tage lang einwirken und fanden für  $Z_u$  29,6 (0,3828:0,1138). *Taxus* scheint sehr enzymarm zu sein.



chlorophyllids bei der Einwirkung von 50—66 prozentigem Holzgeist auf die frische Pflanze erkannt worden.

### VIII. Chlorophyllase mit Chlorophyll aus anderen Pflanzen.

#### 1. Brennessel mit Enzym aus *Heracleum* und *Galeopsis*.

Im Folgenden wird gezeigt, daß die sogenannten enzymarmen Pflanzen

1. Chlorophyllextrakte geben, welche mit dem besten Enzymmaterial schlechter reagieren, als die zum Enzym gehörenden Extrakte. Dies kann beruhen
  - a) auf der Gegenwart von schädigenden Stoffen in der *Lösung*;
  - b) auf dem Fehlen eines Koenzyms in der *Lösung*
2. extrahierte Blattmehle geben, welche mit den für die Alkoholyse geeignetsten Lösungen geringeren Umsatz bewirken als gutes Enzymmaterial. Dies kann beruhen:
  - a) auf geringem Gehalt an Enzym;
  - b) auf dem Fehlen eines Koenzyms im *Mehl* oder dem Vorhandensein eines schädigenden Stoffes im *Mehl*.

Zunächst lehren Versuche an Brennesseln und Platanenauszügen, daß diese mit Enzym aus *Galeopsis* und *Heracleum* besser reagieren, als mit ihren zugehörigen Enzympräparaten. Aber die Alkoholyse geht nie zu Ende, höchstens zu einer Umwandlung von zwei Dritteln und zwar unter Bedingungen, die weit hinausgehen über das für die quantitative Alkoholyse bei *Galeopsis* und *Heracleum* Erforderliche.

Das Verhalten der Brennesselextrakte gegen gutes Enzymmaterial soll an drei von vielen übereinstimmenden Versuchen beschrieben werden.

1. Chlorophylllösung aus Brennesseln (400 ccm mit 1,5 g Chlorophyll, 92 prozentiger Alkohol) schüttelten wir  $3\frac{1}{2}$  Tage lang ununterbrochen an der Maschine mit einem nach der Extraktion 2 Monate alten *Galeopsis*-

enzym ( $\frac{4}{10}$  d. i. 120 g vor der Extraktion). Die Alkohololyse erfolgte zu zwei Dritteln.

Ein Parallelversuch mit dem vierten Teil dieses Enzyms ergab die Umwandlung von einem Fünftel, nämlich  $Z_u = 28,8$  (0,6190:0,1787).

2. Bei einer anderen Ausführung wurde ein frisch extrahiertes Galeopsismehl angewandt, und zwar fast die vierfache Menge dieses besseren Enzympräparates, nämlich  $\frac{15}{10}$ -Enzym. Nach  $3\frac{1}{2}$  tägigem Digerieren unter häufigem Schütteln war nur der gleiche Umwandlungsgrad wie bei 1 erreicht.

3. Als Enzym diente frisch extrahiertes Heracleummehl, und zwar die ganze, dem Chlorophyllgehalt des Brennesselextraktes entsprechende Menge. Nach fünf-tägiger Einwirkung war wieder gerade zwei Drittel des Chlorophylls alkoholysiert. In ungefähr  $\frac{1}{30}$  bis  $\frac{1}{50}$  dieser Zeit wäre die nämliche Wirkung an Heracleumextrakt erreicht worden.

$$Z_a = 32,2.$$

1. 0,4271:0,0608;  $Z_u = 14,2$ ;  $u = 63,6$ .
2. 0,3617:0,0518; „ = 14,3<sup>1)</sup>; „ = 63,3.
3. 0,3343:0,0482; „ = 14,4; „ = 63,0.

Wie die Brennesselauszüge mit Heracleummehl schlecht reagieren, so wird das Chlorophyll des Heracleumextraktes gemäß dem folgenden Versuche nur in geringem Maße vom Brennesselmehl alkoholysiert. Wir behandelten

1. Heracleumextrakt (0,5 Liter mit 1,2 g Chlorophyll, 80 prozentiger Alkohol) bei  $25^{\circ}$  10 Stunden lang mit  $\frac{1}{10}$ -Enzym aus Brennesseln (vor der Extraktion 25 g);
2. den Extrakt des für den ersten Versuch ange-

---

<sup>1)</sup> Bei diesem Versuch ist die Umwandlung kontrolliert worden mit der Jodsilberzahl. Wir fanden  $J_u = 52,6$  (0,2479:0,1304) und daraus  $u_{II} = 60,8$ . Es ist hier zu erwähnen, daß die Phäophytinpräparate aus Brennesseln zu hohe Werte von  $J_a$  ergeben, z. B. bei  $Z_a = 32,2$  die Jodsilberzahl 34,0 (0,2239:0,0762) statt der theoretischen Zahl 26,8. Diese noch unerklärte Abweichung hat zur Folge, daß  $u_I$  und  $u_{II}$  hier erheblicher als sonst differieren.

wandten Brennesselmehles unter den nämlichen Bedingungen mit  $\frac{1}{10}$ -Enzym aus *Heracleum* des gleichen Versuches;

3. Platanenextrakt (0,5 Liter mit 1,2 g Chlorophyll, 80 prozentiger Alkohol) ebenso mit einem Zehntel von dem *Heracleum*enzym;

4. zum Vergleich unter genau denselben Bedingungen den *Heracleum*extrakt mit einem Zehntel des zugehörigen Blattmehles.

1. 0,3821 : 0,1090;  $Z_u = 28,5$ ;  $u = 14,1$ .
2. 0,4688 : 0,1360; „ = 29,0;
3. 0,3463 : 0,1060; „ = 30,6;
4. 0,3946 : 0,0932; „ = 23,6;  $u = 32,6$ .

Das erste Beispiel läßt auch im Zusammenhang mit vielen Erfahrungen an langsam hergestellten Brennessel-extrakten erkennen, daß Brennesselmehl das Chlorophyll des *Heracleum*extraktes kräftiger alkoholysiert als das Chlorophyll des Brennesselextraktes.

## 2. Darstellung von krystallisiertem Chlorophyll aus Brennesseln.

Während bei so lange dauernder Behandlung von Brennesseln mit Äthylalkohol, daß die Phytolzahl erheblich sinkt, „krystallisiertes Chlorophyll“ nicht isoliert werden kann, ist es allerdings in kleiner Menge bei der Einwirkung von *Galeopsis*- oder *Heracleum*enzym auf den alkoholischen Brennesselextrakt, in beträchtlicher Ausbeute bei der Behandlung des alkoholhaltigen ätherischen Extraktes beobachtet worden.

Die Isolierung des Äthylchlorophyllids in schönem Zustand gelingt ferner aus frischen Brennesseln, wenn sie durch Einlegen in wasserhaltigen Holzgeist für die Zerkleinerung vorbereitet und dann nach Abschleudern und Mahlen perkoliert werden. Wie in einer folgenden Arbeit von Willstätter und Isler ausgeführt wird, bleibt bei dieser Behandlung das Chlorophyll vor Veränderungen bewahrt, denen es bei der früher beschriebenen

Verarbeitung leicht unterliegt. Die so dargestellte Chlorophylllösung ist für die Behandlung mit der Chlorophyllase geeigneter als die gewöhnlichen Extrakte des getrockneten Materials. Nach dreitägigem Stehen unter häufigem Schütteln mit 800 g quantitativ extrahiertem Heracleummehl ist die aus 4 kg frischen Brennesselblättern gewonnene alkoholische Chlorophylllösung in Hälften aufgearbeitet worden. Aus der einen haben wir Phäophytin dargestellt. Die Phytolzahl betrug nur 10,2 (0,2226 : 0,0228); die Umwandlung erreichte also hier drei Viertel des Chlorophylls. Aus der anderen Hälfte ist wie bei der bekannten Gewinnung von krystallisiertem Chlorophyll der Farbstoff in Äther übergeführt worden; daraus krystallisierte das Äthylchlorophyllid in schönen drei- und sechseckigen Krystallen, die mit der früheren Beschreibung übereinstimmten, insbesondere auch in bezug auf die charakteristischen beiden Spaltungsprodukte: Phytochlorin e und Phytorhodin g.

### **IX. Chlorophyllase mit Phäophytin (Alkoholyse, Hydrolyse).**

Die Chlorophyllase ist auch fähig, den magnesiumfreien Phytolester Phäophytin umzuwandeln. Die Reaktion verläuft viel langsamer als die Alkoholyse des Chlorophylls in den geeigneten, rascher als die in den ungeeigneten Extrakten.

Eine Schwierigkeit für den Versuch liegt in der geringen Löslichkeit von Phäophytin in den Alkoholen. In reinem Ätheralkohol war das Resultat nicht gut; hingegen erfolgte eine, wenn auch langsame, so doch sehr weitgehende Umwandlung in wasserhaltigem Äther-Alkohol oder wasserhaltigem Aceton-Alkoholgemisch. Hierbei ist aber neben der Äthanolyse auch Hydrolyse zu beobachten.

Das Enzym war Heracleummehl, das nach dem üblichen Ausziehen mit Alkohol zuerst auf der Nutsche mit Äther gewaschen und dann mehrere Tage entweder mit Äther-Alkohol, der 10 Proz. Wasser enthielt, oder mit wasserhaltigem Aceton-Alkohol extrahiert worden.

Hierdurch wird tunlichst vermieden, daß wachsartige Verunreinigungen aus dem Pflanzenmehl in die ätherische Phäophytinlösung übergehen.

1. *Beispiel*: Das Ausgangsmaterial war Phäophytin aus *Sambucus nigra* von der Phytolzahl 32,9. Wir lösten die Substanz (1 g) in  $\frac{1}{4}$  Liter Äther und versetzten langsam mit dem gleichen Volumen Alkohol. Das Enzympräparat (150 g) war mit 50 ccm Wasser befeuchtet. Die Behandlung bei Zimmertemperatur unter Schütteln an der Maschine dauerte 72 Stunden. Zur Isolierung des Phäophytins nach der Reaktion wurde der Alkohol mit Wasser herausgewaschen, die ätherische Lösung nach dem Trocknen mit Natriumsulfat stark eingeeengt und das Phäophytin wiederholt aus wenig Chloroform mit Alkohol umgeschieden. Das Präparat (0,4 g) zeigte unter dem Mikroskop keine farlosen Beimischungen; aber es lieferte bei der Verseifung unreines, wachsartig erstarrendes Phytol, so daß der Phytolgehalt wohl zu hoch gefunden war.

$Z_u = 9,6$  (0,3154:0,0304); daraus berechnet sich die Umwandlungszahl 77.

2. *Beispiel*: Eine Verbesserung besteht im Zusatz von Rohchlorophyll. Bei einer genauen Wiederholung des ersten Versuches haben wir nur eine Abänderung getroffen. Die ätherische Phäophytinlösung ist statt mit Alkohol mit demselben Volumen Heracleumextrakt versetzt worden (aus 200 g durch rasche Extraktion bereitet). Neben dem Chlorophyll läßt sich das Phäophytin gut isolieren, wenn man den Äther verjagt und die alkoholische Flüssigkeit 2 Tage stehen läßt. Aus der Chlorophylllösung fällt das Phäophytin aus, nach dem Umscheiden (0,7 g) lieferte es bei der Phytolbestimmung ein paraffinähnliches Produkt; die kleine Menge des Alkohols war also unrein, die wahre Phytolzahl kleiner als die beobachtete.

$Z_u = 6,8$  (0,4479:0,0307); die Umwandlung erstreckte sich auf gegen 90 Proz.

3. *Beispiel*: Phäophytin ist in Aceton sehr leicht löslich, daher auch viel reichlicher in Aceton-Alkohol als in Äther-Alkohol. Die Lösung von 1 g in  $\frac{1}{2}$  Liter der Mischung gleicher Teile Aceton und Alkohol blieb klar auf Zusatz von 50 ccm Wasser bei 25°. Das Enzym wurde dann trocken eingetragen, sonst blieb die Versuchsanordnung wie im 1. Beispiel. Das Reaktionsprodukt ist durch starkes Verdünnen des Filtrates mit Äther und Herauswaschen von Aceton und Alkohol isoliert worden; es gab reineres Phytol. Die Jodsilberzahl des Phäophytins war zu tief; daraus folgt, daß neben der Alkohololyse in geringerem Grade Hydrolyse eingetreten ist, nämlich in etwa 16 Proz. des Materials.

$$0,3320 : 0,0230; Z_u = 6,9; u_I = 84,0;$$

$$0,2245 : 0,1251; J_u = 55,4; u_{III} = 67,7.$$

Es wird leicht sein, die Hydrolyse allein auszuführen, indem man den Alkohol bei diesem Versuch wegläßt.

Außer dem Phäophytin ist es bis jetzt nicht gelungen, mit Hilfe der Chlorophyllase ein anderes Substrat umzusetzen; *Walrat* wurde in Alkohol-Äther durch das Enzym nicht alkoholisiert.

### X. Pankreas- und Ricinuslipase mit Chlorophyll und Phäophytin.

Aus der Pankreasdrüse des Schweines haben wir nach den Angaben von H. Pottevin<sup>1)</sup> das Enzym dargestellt und seine sehr gute Wirksamkeit mittelst der Hydrolyse von Kokosfett kontrolliert.

Die Chlorophylllösung aus *Heracleum* (je 0,5 Liter mit 1,6 g Chlorophyll) haben wir mit je 1,5 g Pankreasenzym, also mit einem Vielfachen der für die Fettverseifung erforderlichen Menge 10 Stunden bei 35° unter Rühren und Beimischung von Calciumcarbonat behandelt, und zwar a) mit Zusatz von 50 ccm Wasser, b) ohne diesen Zusatz. Nach dem Abfiltrieren ist Phäo-

<sup>1)</sup> Bull. Soc. Chim. 35, 693 (1906).

phytin in sehr guter Ausbeute abgeschieden worden. Der Phytolgehalt war nur ein wenig erniedrigt.

$$a) 0,5315 : 0,1573; Z_u = 29,6;$$

$$b) 0,5201 : 0,1537; Z_u = 29,5.$$

Der Vergleich der Jodsilberzahlen für den angewandten Extrakt und für das Produkt des Versuches a) zeigt, daß die kleine Änderung nicht Alkoholyse war, sondern Hydrolyse. Es ist kein Alkohol eingetreten.

$$J_a = 30,6 (0,1621 : 0,0496); J_u = 30,5 (0,2748 : 0,0837).$$

Auch Phäophytin verlor unter den Bedingungen, die für die Reaktion mit Chlorophyllase geeignet waren, nur sehr wenig Phytol. Wir behandelten es auch mit sehr viel Pankreas, und zwar 1,5 g Phäophytin (aus Sambucus) in  $\frac{1}{2}$  Liter gleichteiliger Mischung von Alkohol und Aceton unter Zusatz von 50 ccm Wasser 20 Stunden lang bei 35°.

$$Z_u = 32,9; Z_u = 31,7; (0,5458 : 0,1732).$$

Daß die Lipase der Pflanzensamen von Alkohol paralysiert wird, ist schon in der schönen Untersuchung von W. Connstein, E. Hoyer und H. Wartenberg<sup>1)</sup> bemerkt worden. Da die übliche Untersuchung der Verseifung in der Titration der freien Säure bestand, konnte sich eine alkoholytische Wirkung der Beobachtung entzogen haben. Wir vermochten aber weder Walrat noch Chlorophyll (aus Brennesseln und aus Holunder) mit Ricinusenzym zu alkoholysieren.

Wir haben von dem Enzym, das wir aus geschälten Ricinussamen durch dreimaliges Verreiben mit Äther, dann mit Alkohol, und endlich noch wiederholt mit Äther bereiteten, schließlich eine außerordentlich große Menge angewandt, nämlich 35 g des staubfeinen Präparates (aus 100 g Samen). Damit bearbeiteten wir 1 Liter Chlorophylllösung aus Sambucus (2,2 g Chlorophyll) 72 Stunden lang unter Schütteln. Das in quantitativer Ausbeute isolierte Phäophytin ergab die Phytolzahl 32,4 (0,6635 : 0,2153), war also ganz unverändert.

<sup>1)</sup> Ber. d. d. chem. Ges. **35**, 3988, 4003 (1902).