(Aus dem physiologischen Institut zu Breslau.)

Ein weiterer Beitrag zum Chemismus des zuckerbildenden Blutfermentes.

Von

Dr. **Manfred Bial**,
prakt. Arzt.

Das diastatische Ferment des Blutes unterscheidet sich, wie ich in meinen bisherigen Arbeiten nachgewiesen habe, von anderen zuckerbildenden Fermenten durch den Chemismus der Fermentation, insofern als die Spaltung der Stärke durch Blutferment nicht wie bei den anderen Enzymen zur Bildung von Maltose und Dextrinen, sondern zur völligen oder nahezu vollständigen Umwandlung in Traubenzucker führt. Dies war konstatirt worden durch Untersuchung von Stärkelösungen, welche durch Einwirkung von Blut maximal fermentirt worden waren; die Reductions- und Polarisationskraft derselben stimmte gut zu der Annahme, dass die Lösung Traubenzucker enthielt und zwar in solcher Menge, als ob die Stärke fast oder ganz vollkommen in Dextrose übergegangen war. Ferner hatte die Analyse des aus dem Zucker dargestellten Osazons den für Glycosazon berechneten Stickstoffwerth ergeben.

Diese Angaben fanden ihre Bestätigung durch die Untersuchungen von F. R ö h m a n n ¹⁾, welchem es gelang, aus maximal fermentirten Lösungen den Traubenzucker als $2(\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6)\text{NaCl} + \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ in ansehnlichen Mengen darzustellen.

Des weiteren hatte ich zeigen können, dass das Blutferment auch die Fähigkeit hat, Maltose und Dextrin in Dextrose überzuführen.

1) Ber. d. d. chem. Ges. 25. 3654.

Im Hinblick hierauf konnte man annehmen, dass durch das diastatische Ferment des Blutes, wie bei den übrigen diastatischen Fermenten, zuerst eine Spaltung der Stärke in Maltose und Dextrine erfolge, dass die Besonderheit des Blutfermentes aber darin bestände, diese Anfangsprodukte in Dextrose weiter zu spalten. Es ergab sich daraus die Aufgabe, in den Anfangsstadien der Fermentation nach dem Auftreten der Maltose zu suchen; es liess sich hoffen, dass bei einem etwaigen Vorkommen derselben die Analyse sie unter den gebildeten Zuckerarten herausfinden würde. Demzufolge wurde entsprechend, wie schon früher beschrieben, verfahren; die saccharifizierte Flüssigkeit wurde enteiweissst, eingedampft und mit Methylalcohol die Ausfällung der Dextrine vorgenommen. Der alkoholische Extract wurde mit Wasser aufgenommen und mit salzsaurem Phenylhydrazin und essigsauerm Natron erhitzt; in den abgeschiedenen Osazonen wurde der Stickstoffgehalt nach Dumas bestimmt. Der N-Gehalt des Glycosazon's ist 15,64%, derjenige des Maltosazons 10,77%; fand sich also in den Frühstadien Maltose neben Glycose vor, dann musste der Gehalt der in diesem Stadium erhaltenen Osazone eine Mittelzahl zwischen den beiden bezeichneten ergeben. Diese Annahme fand sich vollkommen bestätigt, je früher der durch das diastatische Blutferment eingeleitete Saccharificationsprocess der Stärke abgebrochen wird, desto weiter entfernt liegt diese Mittelzahl von dem Stickstoffwerth des Glycosazons. Zum Beweise mögen folgende Protokolle dienen, denen ich zur Erklärung nur noch die Bemerkung zufüge, dass zur Erlangung genügender Mengen Osazon aus den Frühzeiten der Fermentation es nöthig ist, grosse Mengen Stärke der Einwirkung des Blutes auszusetzen, weil natürlich die Menge des bis dahin gebildeten Zuckers eine geringe ist.

Versuch I.

250 ccm 2% Stärkekleisters werden mit 100 ccm Blutserum vom Rind unter Zusatz von 5 ccm 10% Thymollösung 48 Stunden im Brütöfen digerirt. Es werden erhalten 2 gr Osazon.

Der N-Gehalt bestimmt aus 0,2075 gr beträgt

berechnet für Glycosazon:	erhalten:
15,64%	15,50%

Versuch II.

6000 ccm 2% Stärkekleisters werden mit 1200 ccm Blutserum vom Rinde unter Zufügung von 130 ccm 10% Thymollösung 3 Stunden im Brüt-ofen digerirt.

Erhalten wurden 6 gr Osazon, nachdem durch Titration von einer kleinen Probe der von den Dextrinen befreiten Flüssigkeit eine Reduktionskraft festgestellt war, als ob in ihr sich 8 gr Traubenzucker befänden.

Der N-Gehalt des Osazons ist = 14,82%, bestimmt aus 0,1651 gr.

Versuch III.

4000 ccm 2% Stärkekleisters werden mit 800 ccm Blutserum vom Rinde unter Zufügung von 80 ccm 10% Thymollösung 1 Stunde lang im Brüt-ofen digerirt.

Erhalten wird 0,75 gr Osazon, nachdem durch Titration von einer kleinen Probe der von den Dextrinen befreiten Flüssigkeit eine Reduktionskraft festgestellt war, als ob in ihr sich 1½ gr Traubenzucker befände.

Der N-Gehalt des Osazons ist = 13,77% (bestimmt aus 0,1820 gr).

Versuch IV.

8000 ccm 2% Stärkekleisters werden mit 1600 ccm Blutserum vom Rinde unter Zufügung von 160 ccm 10% Thymollösung ½ Stunde im Brüt-ofen digerirt.

Erhalten wird 0,5 gr Osazon, nachdem durch Titration von einer kleinen Probe der von den Dextrinen befreiten Flüssigkeiten eine Reduktionskraft festgestellt war, als ob in ihr sich 1 gr Traubenzucker befände.

Der N-Gehalt des Osazons ist = 13,01% (bestimmt aus 0,1934 gr).

So hatte sich denn ergeben, dass die zuckerbildende Kraft des Blutes in den Anfangsstadien neben Glycose auch Zucker erzeugt, dessen Osazon einen niedrigeren N-Gehalt hat als der des Glycosazons ist. Um denselben als Maltose ansprechen zu können, musste versucht werden, das Osazon dieses anderen Zuckers, das hypothetisch angenommene Maltosazon von dem Glycosazon zu trennen. Nun hatte ich schon in einer vorhergehenden Arbeit kurz darauf hingewiesen, wie vorthailhaft für solche Isolationsversuche die Theilung der sich während des Kochens ausscheidenden Osazone in zeitlich nach einander ausfallende Fractionen ist. Wegen der geringen Löslichkeit des Glycosazons in heissem Wasser muss dieses zuerst ausfallen, während das Maltosazon länger sich in Lösung erhält und zum Theil erst beim Erkalten sich nieder-

schlägt. Ich schlug im vorliegenden Fall denselben Weg ein; es folgen die bezüglichen Protokolle:

Versuch V.

2000 ccm 2^o/_o Stärkekleisters werden mit 400 ccm Blutserum unter Zufügung von 40 ccm 10^o/_o Thymollösung 3 Stunden im Brütöfen digerirt.

Bei Anstellung der Phenylhydrazinprobe wird als Fraction I bezeichnet alles, was sich im Verlauf der ersten ³/₄ Stunden des Kochens ausscheidet. Darauf wird abfiltrirt, in der folgenden ¹/₄ Stunde des Kochens scheidet sich Fraction II aus, darauf wird abfiltrirt und noch ¹/₂ Stunde gekocht. Darauf wird zur Zimmertemperatur abgekühlt.

Das Gewicht von Fraction I ist ca. 0,7 gr

„ „ „ „ II „ 0,1459 gr

„ „ „ „ III „ „ 0,1 gr.

Der N-Gehalt von Fraction I ist 14,89^o/_o (bestimmt aus 0,2257 gr).

„ „ „ „ II „ 11,7^o/_o (bestimmt aus 0,1459 gr).

Fraction III ging leider nachträglich durch ein Versehen verloren.

Versuch VI.

6000 ccm 2^o/_o Stärkekleisters werden mit 1280 ccm Blutserum vom Rinde 3 Stunden lang unter Zufügung von 160 ccm 10^o/_o Thymollösung im Brütöfen digerirt.

Bei Anstellung der Phenylhydrazinreaction wird 1¹/₂ Stunden gekocht, alles, was sich bis dahin ausscheidet, als Fraction I bezeichnet, darauf wird heiss filtrirt und zur Zimmertemperatur abgekühlt. Währenddessen hat sich Fraction II ausgeschieden, deren Gewicht 0,8 gr ist.

Fraction I wird nicht untersucht.

Der N-Gehalt von Fraction II beträgt bestimmt aus 0,2179 gr

berechnet für Maltosazon:	gefunden:
10,77 ^o / _o	10,69 ^o / _o .

Diese Methode des fractionirten Krystallisirens wird nur unter günstigen Bedingungen, besonders bei grossen Mengen Materials, zu einem so glatten Ergebniss führen, wie in dem obigen Fall. Sichere Resultate kann man, wie mir scheint, noch auf folgendem Wege erhalten:

Da das Maltosazon in heissem Wasser viel leichter löslich ist als das Glycosazon, so muss beim Auskochen eines Gemenges von Maltosazon und Glycosazon das Decoct nicht mehr die beiden Stoffe im ursprünglichen Verhältniss ihres Gemisches enthalten, sondern die Menge des Maltosazons muss gegenüber derjenigen des Glyco-

sazons sich vergrößert haben. Lässt man nun diese neue Mischung von Maltosazon und Glycosazon auskrystallisiren und setzt dann dieses Auskochen fort, so wird wieder mehr Maltosazon in Lösung gehen als Glycosazon und das Zahlenverhältniss der beiden Körper sich wiederum zu Gunsten des Maltosazons ändern. Man setze nun den Prozess so lange fort, bis man das Maltosazon rein hat. Ich füge noch hinzu, dass es vortheilhaft ist, diese Auskochungen erst nach dem Trocknen der Körper über Schwefelsäure vorzunehmen, da die Löslichkeitsverhältnisse der beiden Stoffe sich in diesem Zustande ausgeprägter zu verhalten scheinen und daher die Trennung erleichtert wird. Die Mutterlaugen wurden nicht weiter verarbeitet, weil die Flüssigkeiten beim Eindampfen Neigung zum Verschmieren zeigten. Nach diesem Principe wurde in folgendem Versuch verfahren:

Versuch VII.

3 gr Osazon I aus Versuch II werden mit 50 ccm Wasser 10 Minuten gekocht, worauf heiss abfiltrirt wird. Aus dem Filtrat scheidet sich durch Eindampfen 0,1256 gr Osazon II (nach dem Trocknen gewogen aus).

N-Gehalt des Osazons I: 14,82% N

N- „ „ „ II: 12,08% N.

Dieser Versuch zeigt, dass man auf die beschriebene Methode Maltosazon von Dextrosazon sondern kann. Ich habe den Versuch nicht bis zur Reindarstellung des Maltosazons fortführen können, da mir nicht genügende Mengen Osazone zu Gebote standen. Zur Gewinnung derselben müsste man von 20—30 gr Ursprungosazonen ausgehen. Um diese bei beständiger Fermentation zu erhalten, wäre es nöthig 20—30 Liter Stärkekleister der Fermentation durch Blut zu unterwerfen.

Es tritt also im Anfange der Einwirkung von Blut auf Stärke neben Glycose noch ein anderer Zucker auf, dessen Osazon einen niedrigeren Stickstoffgehalt hat als Dextrosazon; in dem einen Falle, wo die Trennung des Osazongemisches gut gelang, stimmte das fragliche Osazon in Elementarzusammensetzung und Löslichkeit mit Maltosazon überein. Weitere Untersuchungen werden diese Beobachtung sicherzustellen haben.

Der Frage, ob als Zwischenprodukt der Blutfermentation Maltose entsteht, suchte ich noch auf einem anderen Wege nahezu-

treten. Da das diastatische Ferment des Blutserums sein Charakteristikum findet in der Fähigkeit Maltose leicht in Dextrose zu spalten, so konnte man vielleicht hoffen, durch eine Abschwächung des Fermentes den Saccharificationsprozess in dem Stadium der Maltosebildung aufzuhalten. Ich konnte hierbei an frühere von mir gemachte Beobachtungen anknüpfen. Bei den Versuchen, das diastatische Ferment des Blutes zu isoliren, hatte sich gezeigt, dass ein Fermentextract, den man aus der Alkoholfällung des Blutes durch Behandeln mit Glycerin erhält, nicht mehr die Fähigkeit besitzt Maltose in Dextrose überzuführen. Dagegen hat er noch die Fähigkeit Stärke umzuwandeln, wie dies das Verschwinden der Blaufärbung mit Jod und das Auftreten der Reductionskraft beweist.

Diese Wirkung konnte zunächst als eine Wirkung des Glycerins aufgefasst werden. Ich hatte bereits früher angegeben, dass Glycerin die Umwandlung von Stärke durch das Blutserum beeinträchtigt und die Spaltung der Maltose vollkommen verhindert. Die letztere Angabe kann ich nicht mehr aufrecht erhalten. Das Glycerin ist allerdings ein die Fermentation an sich hindernder Stoff. Es beeinträchtigt auch die Umwandlung von Maltose in Dextrose durch Blutserum, hebt sie aber nicht vollkommen auf. In meinen ersten Versuchen war mir dies entgangen, da ich den Uebergang von Maltose in Dextrose nur an dem Verhalten von Reduction und Polarisation verfolgte. Wie ich mich aber inzwischen überzeugt habe, wird eine geringe Zunahme des Reductionswerthes durch den mit dem Enteiweissen verbundenen Zuckerverlust verdeckt. Durch die Darstellung der Osazone kann man sich dagegen überzeugen, dass auch bei Gegenwart von Glycerin in den angedeuteten Mengenverhältnissen (50 ccm 1% Maltoselösung, 5 ccm Serum, 1 ccm 10% Thymollösung) durch Blutserum eine, wenn auch geringe Umwandlung der Maltose in Dextrose vor sich geht. Dagegen beweist in den Versuchen mit Ferment-Extract, bei welchen ohne weiteres zu Anfang und Ende des Versuches Reductions- und Polarisationskraft bestimmt werden konnte, das Constantbleiben der Werthe, dass eine Zersetzung der Maltose nicht erfolgte.

Da diese Wirkung nicht auf das Glycerin zu beziehen war, musste die Behandlung mit Alcohol das Ferment in der besprochenen Weise beeinflusst haben. Daraus ergab sich die Aufgabe,

genauer zu untersuchen, wie die durch Alcohol aus Blut erhaltenen, das Ferment einschliessenden Niederschläge wirken, wenn man sie direkt, also ohne sie mit Glycerin zu extrahiren, in die Stärke- oder Maltoselösung einträgt.

Dies geschah auf folgendem Wege: Abgemessene Mengen Fermentpulvers, d. h. durch Alcoholfällung aus Blut erhaltenen, an der Luft getrockneten und fein pulverisirten Niederschlages wurde mit Stärkekleister unter Thymolzusatz verrührt und digerirt. Um einigermaßen zureichende Mengen Zuckers zu erhalten, musste, da der Alcohol das diastatische Ferment sehr schwächt, Tagelang die Digestion fortgeführt werden, doch verhütete der Thymolzusatz stets die Entwicklung von Bacterien in den Flüssigkeiten. Darauf wurde nach den schon früher beschriebenen Methoden enteieisst, Dextrine ausgefällt und der Zucker in das Osazon übergeführt und dessen Stickstoff bestimmt.

Es zeigte sich nun die eigenthümliche Thatsache, dass die Produkte der Fermentation sich verschieden verhielten, je nachdem der Alkohol lange oder kurze Zeit auf das Blut bei Bereitung des Fermentpulvers eingewirkt hatte.

Versuch VIII.

300 ccm Rindsblutserum wurden mit 3000 ccm 94% Alkohols gefällt und die Mischung eine halbe Stunde unter zeitweiligem Umrühren stehen gelassen. Darauf wird durch Filtrirpapier das Fermentpulver abfiltrirt und an der Luft getrocknet. Erhalten 30 gr.

Davon wurden 10 gr mit 1000 ccm 1% Stärkekleysters unter Zusatz von 20 ccm 10% Thymollösung 12 Tage lang im Brütöfen digerirt (da die lange Alkoholeinwirkung das Ferment sehr geschädigt hat). Nach Ausfällung der Dextrine zeigt die Reductionszahl einer kleinen Probe der Flüssigkeit einen Zuckergehalt an, der einer Menge von 0,5 gr Traubenzucker entspricht.

Die N-Bestimmung des Osazons ergibt

(gemacht aus 0,1645 gr Substanz)

berechnet für Maltosazon:

10,77% N

gefunden:

10,70% N.

Versuch IX.

200 ccm defibrinirten Hundeblyts werden mit 2000 ccm 94% Alkohols gefällt und die Mischung $\frac{1}{2}$ Stunde unter zeitweiligem Umrühren stehen ge-

lassen. Darauf wird durch Filtrirpapier abfiltrirt und das Fermentpulver an der Luft getrocknet und pulverisirt. Erhalten 50 gr. Diese werden mit 1000 ccm 1% Stärkekleysters unter Zufügung von 20 ccm 10% Thymollösung 3 Tage im Brütöfen digerirt.

Der N-Gehalt des Osazons, bestimmt aus 0,1104 gr, beträgt
11,3% N.

Versuch X.

600 ccm defibrinirten Bluts vom Hund wurden mit 6000 ccm Alkohol gefällt und die Mischung $\frac{1}{2}$ Stunde stehen gelasseu. Darauf wird durch Filtrirpapier filtrirt und das Fermentpulver an der Luft getrocknet und pulverisirt. Erhalten 40 gr.

Diese wurden mit 600 ccm 1% Maltoselösung unter Zufügung von 12 ccm 10% Thymollösung 3 Tage im Brütöfen digerirt.

Der N-Gehalt des Osazons, bestimmt aus 0,2357 gr, beträgt	
berechnet für Maltosazon:	gefunden:
10,77% N	10,80% N.

Versuch XI.

200 ccm Serum vom Rinde werden mit 3000 ccm 94% Alkohols gefällt und die Mischung 5 Minuten lang stehen gelassen. Darauf wird durch Filtrirpapier filtrirt und das Fermentpulver an der Luft getrocknet und pulverisirt. Erhalten 15 gr.

Diese werden mit 1000 ccm 1% Stärkekleysters unter Zufügung von 20 ccm 10% Thymollösung 3 Tage lang im Brütöfen digerirt.

Der N-Gehalt des Osazons, bestimmt aus 0,1788 gr, beträgt
15,01% N.

So hatten sich denn bei dem Behandeln des Blutfermentes mit Alkohol bemerkenswerthe Resultate ergeben, je nach der Dauer der Zeit, in welcher dieser Stoff einwirken konnte. Als eine bei den verschiedenen Experimenten gemeinsame Folge der Alkoholeinwirkung zeigte sich eine Schwächung der Fermentationskraft. Die Fermentniederschläge wirkten erheblich schwächer als Blutserum, selbst wenn man zu ihrer Herstellung das mehrfache Volumen derjenigen Menge Blutes nahm, welches man direkt auf Stärke einwirken liess. Während von jenem 100 ccm genügen, um 1000 ccm 1% Stärkekleysters in 24 Stunden nahezu vollständig in Traubenzucker überzuführen und dementsprechend die Mengen erhaltenen Osazons 5—6 gr betragen, ist bei kurzer Alkohol-Einwirkung die Quantität des in solch veränderter Fermentation gebildeten

Zuckers schon geringer, so dass Osazonmengen von 2—3 gr in maximo resultiren; bei langdauernder Alkoholeinwirkung ist die Menge des durch Fermentation erhaltenen Zuckers entsprechend noch kleiner, so dass die erhaltenen Osazonmengen sich nur nach wenigen Decigrammen beziffern, und man eben noch die für eine Stickstoffbestimmung erforderlichen Mengen Substanz erhielt. Je länger also der Alkohol auf das Blut zur Wirkung kam, desto mehr hatte er die zuckerbildende Kraft desselben herabgesetzt. Gleichzeitig mit der Abnahme in der Menge der Osazone zeigte sich auch eine Veränderung ihres N-Gehaltes, indem derselbe je nach der Dauer der Alkoholeinwirkung immer mehr herunterging, d. h. sich immer mehr von dem N-Gehalt des Glycosazons entfernte und unter günstigen Verhältnissen den des Maltosazons erreichte.