

Ueber die chemische Beschaffenheit der Diastase und über die Bestimmung ihrer Wirksamkeit unter Benutzung von löslicher Stärke, sowie über ein in den Diastasepräparaten vorhandenes Araban.

Von

A. Wróblewski.

(Der Redaction zugegangen am 18. September 1897.)

I. Mittheilung.

Einleitung.

Unter den mannigfaltigen chemischen Processen, die in jeder lebenden Zelle stattfinden, gebührt unzweifelhaft eine hervorragende Rolle den enzymotischen Vorgängen. Ueberall, wo sich das Leben äussert, begegnen wir den Enzymen. Bei Keimen der Pflanzen, bei Entwicklung der Blüthen und Reifwerden der Früchte äussern Enzyme ihre wunderbare und vielartige Wirkung. Beim Aufgange des thierischen Lebens im befruchteten Ei und im Foetus, im Blute, welches die Nahrung in alle Organismen theile bringt, in der Lymphe, in den Verdauungssäften, richtig gesagt in einer jeden lebenden Zelle, stossen wir auf die Thätigkeit dieser Stoffe. Eine Vorstellung über die enzymotischen Vorgänge ist direkt mit dem Lebensbegriffe verbunden.

Wegen dieser hervorragenden Wichtigkeit der Enzyme hat man von vielen Seiten diese Substanzen näher zu erforschen und verschiedene Theorien über ihr Wesen aufzustellen versucht. Es herrscht aber unter diesen Theorien heutzutage noch keine Uebereinstimmung, keine Klarheit. In der letzten Zeit ist sogar eine Ansicht aufgetaucht, die lautet, dass Enzyme keine Stoffe, sondern nur Eigenschaften der Stoffe sind.¹⁾

¹⁾ Maurice Arthus. Nature des enzymes. Paris 1896. «Le parallèle peut être fait de tous points entre les enzymes et les forces physiques: la solubilité dans l'eau, la précipitabilité par l'alcool, etc.

Es schien auch mir nicht ohne Interesse zu sein, die Eigenschaften dieser merkwürdigen Substanzen näher kennen zu lernen. Zu diesem Zwecke habe ich als Object der Untersuchung das am leichtesten zugängliche Enzym, die Diastase, gewählt. Von vielen Seiten wurden Angaben über die chemische Zusammensetzung der Diastase veröffentlicht. Wir kennen verschiedene Methoden, die zur Darstellung der Diastase führen sollen, wir kennen auch schon eine ganze Reihe von Zahlen, die die elementare Zusammensetzung der Diastase ausdrücken sollen. Und doch herrscht unter diesen Angaben keine Einheitlichkeit, keine Uebereinstimmung, so dass wir schliessen müssen, dass wenigstens die meisten von den bis jetzt erhaltenen Präparaten nichts Anderes als Gemische von verschiedenen Stoffen waren.

Um die Frage über die chemische Natur der Diastase richtig auffassen zu können, müssen wir vor Allem die allgemeinen Principien, auf welchen die bisherigen Studien über diese Substanz beruhen, kennen lernen.

Im Jahre 1785 bemerkte Irvine, dass das Mehl unter der Wirkung des Malzes theilweise verzuckert wurde.¹⁾

Kirchhof²⁾ hat im Jahre 1814 bemerkt, dass in der gekeimten Gerste eine eiweissartige Substanz enthalten ist, welche den Stärkekleister unter Bildung von Zucker verflüssigen kann. Diese Wirkung hat er den Kleberproteinstoffen zugeschrieben.

Den französischen Forschern Payen und Persoz¹⁾ verdanken wir die ersten Bemühungen, Diastase rein darzustellen (1833). Sie haben den wässrigen Malzauszug mit wenig Al-

ne prouvent pas la matérialité des enzymes, car on peut trouver pour les forces physiques des phénomènes analogues.» — «Nous proposons donc de considerer les enzymes non comme des substances matérielles, mais comme des propriétés de substances matérielles.» S. 56.

1) Payen und Persoz. Mémoire sur la diastase, les principaux produits de ses réactions, et leurs applications aux arts industriels. Ann. de ch. et de phys. 53 Vol. 73. 74.

2) Ueber die Zuckerbildung beim Malzen des Getreides. Schweigg. Journ. XIV. Jhrg. 1815. 389. Cit. nach Bourquelot. Les ferments solubles. Paris. 1896.

kohol versetzt, um Proteinstoffe niederzuschlagen, und aus dem Filtrate mit mehr Alkohol Diastase ausgeschieden. Das Rohprodukt wurde dreimal in Wasser gelöst und mit Alkohol gefällt und schliesslich wurden durch Erwärmen reiner Lösung bis ca. 70° die darin noch vorhandenen Eiweissstoffe coagulirt. Die Autoren betrachten Diastase als stickstofffreie Substanz.

Nach Dübrunfaut¹⁾ «genügt es, das Malzinfusum mit reinem, zwei- bis dreifachem Volumen Alkohol von 90 Volumprocenten zu behandeln, um die wirksame Substanz fast vollständig abzuscheiden». Er bezeichnet den «stickstoffhaltigen wirksamen Bestandtheil des Malzes, der folglich eiweissartiger Natur sein soll», mit dem Namen Maltin. Maltin soll in mehreren natürlichen Wässern vorkommen.

Cohnheim²⁾ hat die von Brücke für die Pepsindarstellung empfohlene Methode zur Reinigung der Diastase angewendet. Die mit dem entstehenden Niederschlage von Calciumphosphat mitgerissene Substanz, welche diastatisch wirkte, gab bei ihm keine Eiweissreactionen.

Zulkowsky³⁾ hat Malzauszüge mit Aether ausgeschüttelt. Dabei entstand eine gallertartige Masse, die er in Alkohol eingegossen hat, wobei ein weisser Niederschlag sich bildete. Er hat auch die von Wittich zur Darstellung der Enzyme empfohlene Methode angewendet. Das Malz wurde mit starkem Weingeist gewaschen und mit Glycerin ausgezogen. Der mit 2 Volumen Wasser versetzte Glycerinauszug wurde in ein Gemenge von Alkohol und Aether filtrirt. Der entstandene

¹⁾ Ueber die Umwandlung des Stärkemehls in Zucker vermittelt des Malzes und über die Eigenschaften und industrielle Darstellung einer stickstoffhaltigen Substanz des Malzes, welche wirksamer als Diastase ist. Dingl. polyt. Journ. 187 B. 491. — Mémoire sur une matière azotée du malt, plus active que la diastase, et sur la préparation économique applicable à l'industrie. Comp. rend. 66 Vol. 274.

²⁾ Virch. Arch. 1863. 28. 241. Cit. nach Hirschfeld. Ueber die chemische Natur der vegetabilischen Diastase. Pfl. Arch. 1886. 39 Vol. 499.

³⁾ K. Zulkowsky und E. König. Ueber den Charakter einiger ungeformten Fermente. Sitzb. d. Wien. Akad. 71 B. 453. — Karl Zulkowski. Ueber die chemische Zusammensetzung der Diastase und der Rübengallerte. ibid. 77 B. 647.

Niederschlag wurde im Wasser gelöst und mittelst Essigsäure und Magnesiumsulfat oder Natriumchlorid wieder gefällt, wiederholt mit Alkohol ausgefällt und getrocknet. Die wirksame Substanz gab bei Zulkowsky Eiweissreactionen nicht mehr und enthielt 5,08 % Stickstoff.

Lintner¹⁾ hat eine einfachere Methode zur Darstellung der Diastase ausgearbeitet. Das Malz wurde mit 20%igem Alkohol ausgezogen und der Auszug mit 2 Volumen absoluten Alkohols niedergeschlagen, der erhaltene Niederschlag wurde wieder gelöst, durch Dialyse von Asche möglichst befreit, mit Alkohol gefällt, gewaschen und getrocknet. Das Präparat wirkte stark diastatisch und enthielt 4—5 % Stickstoff. Lintner gibt in einer Polemik gegen Loew zu, dass Diastase ein stickstoffhaltiger Körper ist, sie sei aber von den Eiweisskörpern verschieden.

Loew²⁾ hielt Diastase für einen Eiweisskörper von peptonartiger Beschaffenheit. Zur Reinigung der Diastase benutzte er das Verfahren, welches Würtz zur Darstellung des Papayotins angewendet hatte. Mit basischem Bleiacetat schlug er aus dem Malzextracte Eiweissstoffe nieder, entfernte aus dem Filtrate Blei mit Schwefelwasserstoff und erhielt eine wirksame Flüssigkeit, die Eiweissreactionen gab.

Bei Hüfner³⁾ bezeugen wir folgender Ansicht: «Vergleicht man die Analysen von verschiedenen Enzymen (auch Diastase), so leuchtet es ein, dass alle bisher nach besseren Methoden isolirten analysirbaren Fermente von den Eiweisskörpern wesentlich verschiedene Substanzen sind, und es wird sogar bei ihrem höheren Gehalte an Sauerstoff wahrscheinlich, dass ihre Moleküle, mögen sie nun grösser oder kleiner als diejenigen des Eiweisses sein, hauptsächlich durch Oxydation aus letzterem entstanden sind.»

1) Studien über Diastase. J. pr. Ch. 34 B. 378. 36 B. 481.

2) Ueber die chemische Natur der ungeformten Fermente. Pfl. Arch. 27 B. 203.

3) Untersuchungen über «ungeformte Fermente» und ihre Wirkungen. J. pr. Ch. (2). 5 B. 372.

Bouchardat¹⁾ und Claud Bernard²⁾ hielten viele Substanzen, besonders Eiweissstoffe, für diastatisch wirksam. Seegen und Kratschmer³⁾ schrieben allen löslichen Eiweissstoffen saccharificirende Wirkung zu.

Brown und Héron,⁴⁾ auch Schwarzer⁵⁾ haben bemerkt, dass beim Erwärmen der Malzauszüge die Coagulation der Eiweissstoffe parallel mit der Verminderung der diastatischen Kraft geht. Sie bemerkten auch, dass beim Filtriren des Malzauszuges durch die Tonzelle Eiweisssubstanzen nicht durchgehen und das Filtrat unwirksam wird, woraus sie schliessen, dass Diastase ein Eiweissstoff ist.

Hirschfeld⁶⁾ hat durch Fällen mit basischem Bleiacetat Eiweissstoffe aus dem Malzauszuge entfernt und aus dem Filtrate ein Präparat mit den dextrinartigen Beschaffenheiten erhalten, welches diastatisch wirksam war und von ihm als Landwehr'sches Thiergummi erkannt wurde.

Julius Wortmann⁷⁾ ist der Meinung, dass «Stärkemehl meistens direkt vom Protoplasma ohne jede Beteiligung von Diastase in Lösung gebracht wird,» denn absolut nothwendig zur Umwandlung von Stärkemehl in Zucker ist das Enzym keineswegs. Er hält die Enzyme mit Ad. Meyer⁸⁾ für «Protoplasmasplitter» und erklärt die in den keimenden Samen besonders gesteigerte Diastaseproduktion auf die Weise, «dass in diesen Fällen das Protoplasma so stark enzymhaltig ist,

1) Sur la fermentation saccharine ou glucosique. Ann. chim. et phys. (3). 14 B. 61.

2) Leçons de physiologie experimentale. Paris.

3) Beitrag zur Kenntniss saccharificirender Fermente. Pfl. Arch. 1877. 14 B. 593.

4) Beiträge zur Geschichte der Stärke und der Verwandlungen derselben. Lieb. Ann. 199 B. 165.

5) Ueber die Umwandlung der Stärke durch Malzdiastase. J. pr. Ch. (2). 1 B. 212.

6) l. c.

7) Ueber den Nachweis, das Vorkommen und die Bedeutung des diastatischen Enzyms in den Pflanzen. Bot. Ztg. 1890 Jhrg. 582 u. ff.

8) Die Lehre von den chemischen Fermenten oder Enzymologie. 1882. Heidelberg.

dass eine Menge von solchen «Splittern» abfallen, aus dem Ver-
bände des lebenden Protoplasmas treten und nun, ihrer proto-
plasmatischen Natur zufolge, für sich allein und unabhängig
vom Protoplasma thätig sind».

Osborne¹⁾ hat die Lintner'sche Methode dadurch ver-
bessert, dass er Diastase mit Ammoniumsulfat ausgesalzen hat,
und hat dabei einen Proteinstoff mit ca. 17% Stickstoff und
von hoher Wirksamkeit erhalten. Die von Osborne erhaltene
Diastase soll ein Albumin und zwar identisch mit Leucosin
sein. Bei Erwärmung der Lösungen seiner Präparate bis 65°
bemerkte er eine Coagulation.

Wir sehen, dass die Meinungen getheilt sind. Diastase
wird von den Einen für einen Proteinstoff, von den Anderen
für ein Kohlenhydrat oder einen ganz besonderen stickstoff-
haltigen Körper gehalten.

Es war bei dieser Sachlage angezeigt, die Diastase noch
einmal einer Untersuchung zu unterwerfen, um etwas Be-
stimmtes über ihre chemische Natur erfahren zu können.

Darstellungsversuche.

Auf die Angaben von Payen und Persoz wie auch
von Lintner gestützt, aus welchen folgt, dass Diastase im
ca. 65%igen Alkohol unlöslich, im ca. 50%igen aber löslich
ist und dass sie nicht dialysirt, habe ich in folgender Weise
Diastase dargestellt. Als Ausgangsmaterial wurde Hellmalz
(von oberster Dörre) gewählt.

3 Kilo feingeschrotenes Malz wurden mit 6 Liter vom
68%igen Alkohol umgerührt und bei Zimmertemperatur bis
zum folgenden Tage stehen gelassen. Der stark ausgepresste
Rückstand wurde mit 6 Liter 45%igen Alkohols umgerührt,
nach 24 Stunden filtrirt und ausgepresst, wieder mit 6 Liter
vom 45%igen Alkohol versetzt, wieder filtrirt und ausgepresst.

Die zwei letzten gelb gefärbten Filtrate wurden vereinigt
und mit so viel 96%igem Alkohol versetzt, dass der Alkohol-

¹⁾ Thomas B. Osborne. The chemical nature of diastase.
Connectic. exper. stat. report. 1894. — Th. B. Osborne and George
F. Campbell. The chemical nature of diastase. Journ. of the Americ.
chem. soc. 18 Vol. 1896.

gehalt der Flüssigkeit gleich 70% war. Es entstand ein spärlicher feiner Niederschlag, der sich allmählich zu Boden setzte. Am folgenden Tage fand ich den zähen, gelblichen Niederschlag in Form von einer zusammenhängenden Schicht auf dem Boden ausgebreitet, die darüber stehende Flüssigkeit war ganz klar. Der abfiltrirte klebrige, gummiartige Niederschlag, der keine Biuretreaction, aber eine prachtvolle Millon'sche Reaction gab, wurde nach dem Auswaschen mit 70%igem Alkohol in 6 Liter 45%igen Alkohols unter Zerreiben gelöst, wobei ein kleiner Theil, augenscheinlich eiweissartiger Natur, ungelöst blieb, dann wurde er mit Alkohol wie vorher gefällt. Der ausgefällte Niederschlag stellte eine viel kleinere Quantität als die erste Fällung dar. Er wurde am folgenden Tage gesammelt und in einer möglichst kleinen Menge Wasser gelöst. Die erhaltene Lösung werden wir als Lösung B bezeichnen. Um die im Präparate möglicher Weise vorhandenen Dextrine wegzuschaffen, habe ich das Aussalzen der Diastase mit den Neutralsalzen angewendet. Diastase ist in einer gesättigten Kochsalzlösung löslich, sie lässt sich aber nicht mit solcher Lösung aus den Präparaten und aus dem Malze auslaugen. Das Sättigen einer kleinen Probe mit Natriumchlorid hat keinen Niederschlag, nur eine dickliche Flüssigkeit gegeben, die diastatisch wirkte.¹⁾ Beim Sättigen mit Natriumsulfat entstand ein Niederschlag, der auf Stärkekleister spaltend wirkte, das Filtrat von diesem Niederschlage gab mit Magnesiumsulfat einen kleinen Bodensatz, der ebenfalls wirksam war. Die Fällung mit Natriumsulfat war demnach nicht vollständig. Ein kleiner Theil von der oben erwähnten Lösung B wurde mit Magnesiumsulfat ausgesalzen, wobei ein voluminöser Niederschlag entstand, der stark diastatisch wirkte. Im Filtrate, welches unwirksam war, gab das Aussalzen mit Ammoniumsulfat keine Fällung. In der Flüssigkeit B entstand beim Versetzen mit Ammoniumsulfat in Substanz ein voluminöser Niederschlag. Diese Versuche haben ergeben, dass Magnesiumsulfat zur Fällung der Diastase vollständig aus-

¹⁾ Die Wirkungsfähigkeit der Präparate wurde nach der auf S. 199 beschriebenen Methode bestimmt.

reichend ist. Der auf diese Weise erhaltene Niederschlag, auf dem Filter gesammelt und mit concentrirter Magnesiumsulfatlösung ausgewaschen, wurde in einer möglichst kleinen Menge Wasser gelöst und im continuirlichen Wasserströme dialysirt.¹⁾ Als eine Probe der dialysirten Flüssigkeit nur eine kaum merkbare Trübung mit BaCl_2 und Salzsäure gab, wurde sie mit doppeltem Volumen Alkohol von 96 % versetzt; es entstand aber kein Niederschlag, dann wurden grosse Mengen vom Alkohol zugesetzt. Es bildete sich eine unbedeutende Trübung, das Versetzen mit gleichem Volumen Aether hat diese Trübung vergrössert, es entstand aber kein Niederschlag. Offenbar hat die Abwesenheit der Salze solchen Einfluss auf die Löslichkeitsverhältnisse gehabt. Einige Tropfen concentrirter Lösung von Kaliumacetat bewirkten so viel, dass der Niederschlag langsam zu Boden fiel. Man konnte ihn nur schwer mit absolutem Alkohol und Aether auswaschen, weil er so stark quoll, dass er sogar mit Aether in Form von einer scheinbaren, opalisirenden Lösung durch's Filter ging. Im Vacuum über Schwefelsäure getrocknet, stellte er ein weisses, stark wirksames Pulver in einer Quantität von 2,82 gr. vor, welches wir als Präparat I bezeichnen werden.

Auf eine ähnliche Weise wurde Präparat II aus 5 Kilo Malz erhalten. Dieses Malz stammte aus einer anderen Brauerei und gab eine kleinere Ausbeute. Hierbei wurde anstatt mit Magnesiumsulfat mit Ammoniumsulfat ausgesalzen, weil auf diese Weise eine leichter filtrirbare Flüssigkeit erhalten wurde.

Aus 25 gr. «wirksamer Diastase» von Merck, welche auf Fehling'sche Lösung reducirend wirkte und alle Eiweissreactionen gab, wurde in der beschriebenen Weise 0,29 gr. vom Präparate III erhalten. Während der Darstellung dieses Präparates habe ich mit der Lösung, welche mit Magnesiumsulfat versetzt werden sollte, Eiweissreactionen angestellt und constatirt, dass die Biuretreaction nur nach längerem Stehen zum Vorschein kam, wobei ein blauvioletter Ton zu erkennen war.

¹⁾ Die Dialyse wurde nach der auf S. 183 beschriebenen Methode ausgeführt.

Aus 100 gr. «Diastase absolut» von Merck wurden 6,31 gr. vom Präparat IV erhalten. Die Lösung wurde ähnlich wie in vorigem Falle vor dem Aussalzen geprüft. Sie gab keine Biuretreaction.

Ausserdem hat E. Merck in Darmstadt aus 100 Kilo Hellmalz nach folgender meiner Vorschrift 985 gr. vom Präparate, welches ich als Präparat A bezeichnen werde, dargestellt. Er hat das fein gemahlene Malz mit 70%igem Alkohol, nachher zweimal mit je 200 Liter vom 45%igen Alkohol ausgezogen, die zwei letzten Auszüge mit soviel starkem Alkohol versetzt, dass in der Flüssigkeit 70% Alkohol enthalten war. Der entstandene Niederschlag wurde mit absolutem Alkohol und Aether ausgewaschen und im Vacuum getrocknet.

Eigenschaften der erhaltenen Präparate. Alle so erhaltenen Präparate besaßen weisse oder grünliche Farbe. Ihre concentrirten Lösungen sahen gelblich aus. Die wässrigen Lösungen aller Präparate waren schwach opalisirend. Man kann aber Lösungen erhalten, die nicht opalisirend sind; so z. B. erhielt ich eine solche, die freilich sehr verdünnt war, bei einer Filtration durch die Tonzelle. Alle Präparate reducirten Fehling'sches Reagens erst nach dem Erwärmen mit verdünnter Salz- oder Schwefelsäure. Beim Kochen mit den Säuren entstand auch ein flockiger Niederschlag. Die Lösungen färbten sich mit Jod nicht, beim Kochen coagulirten sie nicht, auch beim Kochen mit Essigsäure konnte man kaum eine Aenderung wahrnehmen. Die Präparate I bis IV waren fast vollständig in Wasser löslich, das Präparat A liess beim Zerreiben auch mit grösseren Mengen Wasser einen unlöslichen Rückstand, während es grösstentheils in Lösung ging. Alle Präparate gaben eine deutliche Millon'sche Reaction, eine prachtvolle Xanthoproteinreaction, eine Grünfärbung bei der Liebermann'schen Reaction. Die Biuretreaction ist für Präparat A deutlich gewesen, Präparat III gab dieselbe erst nach längerem Stehen und undeutlich, Präparat IV gab sie sehr undeutlich. Mit den Präparaten I und II ist sie ganz misslungen. Die Gründe dafür, dass die letztgenannten Reactionen nicht deutlich oder in veränderter Weise auftraten, werden aus dem später Mitgetheilten

ersichtlich werden. Bei der Heller'schen Probe mit Salpetersäure entsteht eine Trübung, die im Ueberschusse der Säure löslich ist. Mit Bleizucker entsteht kein Niederschlag, mit Bleiessig eine Trübung, welche für Präparat A etwas stärker war als bei den anderen. Mit Sublimat entsteht eine Trübung, die in concentrirter Kochsalzlösung löslich ist. Mit Essigsäure und Ferrocyankalium entsteht auch eine Trübung, mit Pikrinsäure ein gelblicher flockiger Niederschlag, mit Gerbsäure ein voluminöser Niederschlag; mit Phosphorwolfram-, ebenso mit Phosphormolybdänsäure entsteht in nicht zu verdünnten Lösungen ein reichlicher, in den verdünnten aber nur ein sehr spärlicher Niederschlag. Alle Präparate lösten sich in einer gesättigten Kochsalzlösung nur sehr wenig. Daraus ergibt sich, dass die Diastase aus dem Malze mit dieser Lösung nicht ausgelaugt werden kann. Andererseits aber brachte der Kochsalzzusatz zu einer wässrigen Lösung keinen Niederschlag.

Auf einem Platinspatel verbrannt, verbreiten sie einen süsslichen karamelartigen Geruch, blähen sich dann auf und erzeugen nachher einen Geruch nach verbrennendem Horn.

Alle Präparate waren diastatisch stark wirksam. Es war aber merkwürdig, dass das von mir untersuchte Malzmehl nur wenig schwächer wie das daraus erhaltene Präparat II wirkte.

Die Thatsache, dass die Diastasepräparate nach dem Erhitzen mit Säuren stark reducirten, könnte die Vermuthung erwecken, dass Diastase ein Glykoprotein sei. Indessen zeigten die Elementaranalysen sofort, dass hier keine einheitliche Substanz, sondern ein Gemenge vorlag, denn ich erhielt bei der Analyse folgende Zahlen.

Präparat	C %	H %	N %	O+S %	Asche %
I	45,8	6,9	3,96	43,34	2,1
II	48,0	7,3	6,01	38,69	4,01
IV	50,1	7,2	8,13	33,57	1,2
A	46,2	7,6	4,54	41,66	4,2

Schon der erste Blick auf die vorstehende Tabelle beweist uns, dass wir mit Präparaten von einer nicht übereinstimmenden Zusammensetzung zu thun haben. Die Unterschiede in Bezug auf den Stickstoffgehalt sind besonders gross. Hält man die Resultate dieser Analysen zusammen mit den oben beschriebenen Eigenschaften dieser Präparate, so muss sich die Vermuthung aufdrängen, dass dieselben ein Gemisch von protein- und dextrinartigen Körpern bilden. Es war meine nächste Aufgabe diese Körper voneinander zu trennen und zu ermitteln, welcher von ihnen diastatisch wirkte. Wie ich dieses Ziel erreichte, werde ich weiter unten angeben (vergl. S. 201); zunächst mache ich einige Angaben über die Einrichtung des Apparates, in dem ich die Dialyse der Diastasepräparate ausführte, sowie über einige während der Dialyse beobachtete Erscheinungen.

Dialyse der Diastasepräparate.

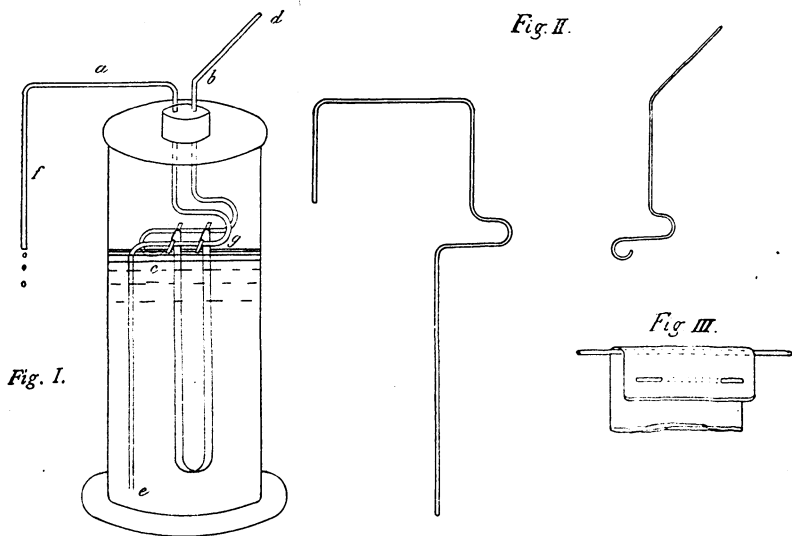
Bei den oben beschriebenen Darstellungsversuchen hat die Dialyse eine wesentliche Rolle gespielt. Es war die Aufgabe grössere Mengen salzreicher Flüssigkeiten zu dialysiren und dabei im Hochsommer der Gefahr einer Infection vorzubeugen. Um diesen Erfordernissen Genüge zu leisten, habe ich folgende Einrichtung angewendet, welche erlaubt hat in continuirlichem Wasserströme zu dialysiren.

Der Dialysator besteht aus einem Cylinder, der mit einer durchbohrten zugeschliffenen Glasplatte bedeckt ist. Durch die Bohrung gehen zwei in einem Gummistopfen befestigte gebogene Glasröhren *a* und *b* hindurch. Das frische Wasser fliesst ins Rohr *b* durch Oeffnung *d*, dann in den Cylinder durch *c* hinein. Das mit den Salzen beladene Wasser fliesst durch die Oeffnung *e* der Siphonröhre *a*, dann durch *f* hinaus. Man muss nur einmal den zufließenden Strom reguliren und der Apparat functionirt von selbst.

Wenn die Lichtweite von der Röhre *a* zu gross ist, so kann man in *f* einen Kautschukschlauch mit dem Quetschhahne aufsetzen, um die Ausflussöffnung beliebig klein machen zu können. In *g* auf zwei quergelegten Glasstäben hängt ein Pergament-

schlauch, der die zu dialysirende Flüssigkeit enthält. Der Verschluss des Pergamentschlauches ist auf der Fig. III dargestellt.

Das Wasserniveau im Cylinder steht auf der Höhe der Oeffnung *f*. Der ganze Apparat kann vor dem Gebrauche sterilisirt werden und die Dialyse kann in einem continuirlichen Strome von sterilem destillirten Wasser ausgeführt werden, wenn wir die Oeffnung *b* mit einem continuirlich wirkenden Destillationsapparate verbinden.



Während der Dialyse wollte ich mich überzeugen, ob die Diastase vollständig undialysirbar ist, weil ich in der Litteratur den Angaben begegnet bin, dass dieses Enzym theilweise durch das Pergamentpapier durchgeht. Zu diesem Zwecke wurde die Wassercirculation abgestellt und nach dem Verlaufe von 24 Stunden die Aussenflüssigkeit im Cylinder auf ihre Wirksamkeit geprüft. Sie vermag nicht Stärke zu spalten.

Da man vom Pepsin behauptet hat, dass es durch die Pergamentmembranen seine Wirkung ausüben kann, so wollte ich einen entsprechenden Versuch mit der Diastase anstellen. In den Dialysator wurde eine sehr verdünnte Lösung von löslicher Stärke eingegossen, die den Pergamentschlauch umspülte. Nach 24 Stunden hat sich ergeben, dass die Fehling'sche Lösung durch eine Probe der aus dem Dialysator genommenen Aussenflüssigkeit nicht im Mindesten reducirt wurde. Diese Flüssigkeit

färbte sich wie vorher mit Jod nur rein blau. Ich vermochte also keine Wirkung der Diastase durch das Pergamentpapier zu constatiren.

Nur einmal habe ich bemerkt, dass die Aussenflüssigkeit des Dialysators (nach 24stündiger Dialyse ohne Wassercirculation) Fehling'sche Lösung, wenn auch nicht stark, reducirte. Offenbar waren in den diesmal angewendeten Schläuchen unsichtbare Oeffnungen vorhanden, durch welche die Diastase durchgehen konnte. Um zu erfahren, ob viel Substanz auf diesem Wege verloren gegangen ist, habe ich die Millon'sche, die Xanthoprotein- und die Biuretreaction mit der fraglichen Flüssigkeit angestellt. Sie fielen negativ aus. Diese Flüssigkeit reducirte Fehling'sche Lösung nach dem Kochen mit Salzsäure auch nicht. Es schien, als ob in der Lösung keine Substanz ausser den kleinen Mengen von anorganischen Salzen vorhanden wäre. Es hat sich aber ergeben, dass nach dem Eindampfen auf dem Wasserbade von einem halben Liter dieser Flüssigkeit eine sehr kleine Menge organischer Substanz im Rückstande geblieben ist, die Millon'sche und Xanthoproteinreaction gegeben hat. Sie reducirte Fehling'sche Lösung nach dem Erwärmen mit Salzsäure. Die Biuretreaction fiel negativ aus, dies war aber auch der Fall mit der dialysirten Substanz. Diese Beobachtung liess vermuthen, dass die Zuckerbildung die empfindlichste Reaction der Diastase ist. Auf diese Beobachtung werde ich später noch einmal zurückkommen.

Bestimmung der diastatischen Wirksamkeit.

Bei den Studien über Diastase ist es nothwendig, ein Mittel zur quantitativen Bestimmung der diastatischen Wirksamkeit der Präparate zu besitzen. Für genaue Bestimmungen ist Stärkekleister nach meiner Erfahrung nicht brauchbar, weil ein solcher Kleister nie ganz gleichmässig von der Diastase angegriffen wird. Man konnte gute Dienste vom ersten Umwandlungsprodukte der Stärke, von der sogenannten «löslichen Stärke», erwarten. Ich erhielt indessen mit einem käuflichen Präparate keine sehr guten Resultate, obwohl

dieses Präparat von bester Qualität sein sollte.¹⁾ Aus diesem Präparate kann man nur 2%ige Lösungen darstellen. Diese Lösungen lassen nach der Einwirkung von Diastase einen leichten, flockigen Niederschlag, was wohl beweist, dass ein Theil des Präparates ursprünglich nur in einer scheinbaren Lösung vorhanden war. Ausser diesem Mangel besitzt das Handelspräparat eine schwach saure Reaction. Wenn man eine Lösung von diesem Präparate mit Jodlösung tropfenweise versetzt, so erscheint zuerst eine blaue, dann aber eine violette Färbung. Dieser violette Farbenton rührt, wie ich durch besondere Versuche constatiren konnte, von der Beimengung eines Dextrins her. Aus diesen Thatsachen ist ersichtlich, dass das Handelspräparat nicht vollkommen rein ist. Deshalb habe ich mich bemüht, eine bequeme Darstellungsmethode der reinen löslichen Stärke aufzufinden.

Die lösliche Stärke.

Wenn man mit der löslichen Stärke arbeiten will, so muss man vor Allem genau bestimmen, was man unter diesem Namen versteht, weil mit dem Namen «lösliche Stärke» und Amylodextrin mitunter ganz verschiedene, mitunter aber dieselben Substanzen bezeichnet werden, wie wir aus der einschlägigen Litteratur leicht ersehen können.

So z. B. lesen wir bei Beilstein,²⁾ dass man amorphe lösliche Stärke von der krystallisirten, die auch Amylodextrin genannt wird, unterscheidet. Nach Reichardt ist lösliche Stärke in 40 Theilen Wasser löslich, nach Zulkowsky³⁾ ist sie sehr leicht in warmem Wasser löslich.

Nach Musculus⁴⁾ unterscheidet sich amorphe lösliche Stärke vom Amylodextrin dadurch, dass die erste kein Reduktionsvermögen für Fehling'sche Lösung besitzt. Nach Brown und

1) Es stammt von Bender u. Hobein in München.

2) Handbuch der organischen Chemie, Bd. I, 1082.

3) Ueber die Einwirkung des Glycerins auf Stärke bei höheren Temperaturen. Sitzungsber. d. Wien. Akad. 72 B. 384.

4) Remarques sur la transformation de la matière amylacée en glucose et dextrine. Ann. chem. et phys. (3). 60 B. 203.

Morris ist Amylodextrin von der löslichen Stärke verschieden, es wird durch Jod braun gefärbt und reducirt Fehling'sche Lösung.

Wir lesen bei Tollens:¹⁾ «Nach der zuerst eintretenden Verflüssigung der Stärke hat man in der Lösung sogenannte lösliche Stärke, Amylodextrin, Amidulin, welche mit Jod noch intensive blaue Färbung gibt.» Lintner und Düll betrachten lösliche Stärke als Gemenge. Nach Lintner kann man mit Diastase eine 20 %ige Stärkelösung bereiten. Lösliche Stärke soll in kochendem Wasser ausserordentlich löslich sein. Aus 20 bis 30 %iger Lösung kann sie sich angeblich in Sphärokrystallen abscheiden.

F. W. Küster²⁾ sieht sich aus physikalischen Gründen zu der Ansicht geführt, dass die gelöste Stärke keine Lösung der Stärke im Wasser, sondern nur eine Emulsion der gequollenen Stärke darstellt. Zu derselben Ansicht gelangt A. Meyer. Wicke³⁾ spricht auch, dass es keine wahre Stärkelösung ist. Es soll nach ihm nur eine Suspension der Stärke im Wasser sein.

Es sind, wie wir aus den obigen Citaten ersehen, ganz verschiedene Substanzen mit denselben Namen bezeichnet. Wir werden, um allen Missverständnissen vorzubeugen, mit dem Namen «lösliche Stärke» das erste Umwandlungsprodukt der genuinen Stärke bezeichnen. Amylodextrin ist ein Umwandlungsprodukt der löslichen Stärke und demnach von derselben verschieden. Lösliche Stärke wird mit Jod rein blau gefärbt und reducirt Fehling'sche Lösung nicht, Amylodextrin wird von Jod rothbraun gefärbt und reducirt schwach Fehling'sche Lösung.

Darstellungsversuche. Was die Darstellung der löslichen Stärke anbetrifft, so sind dazu viele Methoden vorgeschlagen worden.

Nach Lintner und Düll stellt man lösliche Stärke, wie schon oben erwähnt ist, durch die Wirkung der Diastase auf

1) Handbuch der Kohlehydrate. I. u. II. Bd.

2) Lieb. Ann. 283 B. 360.

3) Pogg. Ann. 108 B. 359.

Stärkekleister dar. Man soll dabei 20% ige Lösungen erhalten können, was ich trotz aller Bemühung und bei der Beobachtung aller angegebenen Cautelen nicht zu Stande bringen konnte. Bei der Wirkung von Diastase bleibt immer ein Theil des Kleisters unangegriffen, während der andere Theil sich schon in Zucker umgewandelt hat. Aus einem solchen Gemische lässt sich lösliche Stärke nur in sehr spärlichen Quantitäten rein darstellen und von Erhaltung einer 20% igen Lösung ist überhaupt keine Rede, weil die lösliche Stärke nur wenig, wie wir weiter sehen werden, im Wasser löslich ist. Die Verschiedenheiten der Beobachtungen von Lintner und Düll von den meinigen lassen sich auf die Weise erklären, dass die genannten Autoren nicht die eigentliche lösliche Stärke, sondern ein Gemisch von Dextrinen, vor Allem das Amylodextrin, in den Händen hatten und dieses als lösliche Stärke bezeichneten.

Das Erwärmen der Stärke mit Säuren, eine Methode, die technisch angewendet wird, gibt Präparate, die nur mit grosser Mühe von den reducirenden Substanzen befreit werden können.

Nach den Angaben von Märcker wird Stärke, mit kleinen Mengen Wasser auf höhere Temperatur erhitzt, in lösliche Stärke übergeführt. Ich habe eine Reihe von Versuchen in dieser Richtung angestellt, um eine bequeme Darstellungsmethode der löslichen Stärke aufzufinden.

Aus bester Reisstärke wurde ein 20% iger gallertartiger Kleister bereitet. Er wurde nach dem Erkalten ganz steif und durchsichtig, aber schwach bläulich-grün opalisirend. Nach dem zweistündigen Erhitzen im Drucktopfe bei 134° hat er seine gallertartige Consistenz nicht geändert und nach dem Erkalten ist er ebenso steif geworden, wie er vorher gewesen, und hat nur eine gelbliche Farbe angenommen. Eine Probe wurde mit Wasser gekocht, wobei sich nur ein Theil löste, die Lösung färbte sich mit Jod blau, dann violett und reducirte schwach Fehling'sche Lösung. Die lösliche Stärke wurde aus diesem Präparate durch wiederholte Fällung mit Alkohol nur in sehr kleiner Ausbeute erhalten. Ein Theil von diesem gelblichen Präparate wurde noch einmal zwei Stunden lang bei 134° im Drucktopfe erwärmt, änderte aber seine Consistenz nicht, hat

sich nur mehr gelb gefärbt. Zu diesem Präparate wurden einige Tropfen Essigsäure zugesetzt und 1 Stunde im Drucktopfe bei 134° erwärmt. Die Gallerte wurde dann mit Wasser gekocht und die lösliche Stärke daraus in etwas grösserer Ausbeute erhalten.

10 gr. Reisstärke wurden mit 100 ccm. Wasser verrieben, mit ein paar Tropfen verdünnter Essigsäure versetzt und beim Drucke von 3 Atmosphären im Laufe von zwei Stunden erwärmt. Es hat sich dabei ein Kleister gebildet, der beim Erkalten steif wurde, beim Sieden mit Wasser löste sich fast alles auf. Die Lösung reducirte Fehling'sches Reagens nicht. Daraus habe ich lösliche Stärke in einer noch grösseren Ausbeute bekommen.

10 gr. Reisstärke wurden mit 100 ccm. 20% iger Kochsalzlösung verrieben, dazu ein Tropfen Essigsäure zugegeben und zwei Stunden lang unter dem Drucke von 4½ Atmosphären erhitzt. Es hat sich dabei alles bis auf einige Flocken gelöst; die Lösung reducirte aber stark.

Demnach hat das zweistündige Erhitzen unter dem Drucke von 3 Atmosphären und mit Zusatz von kleinen Mengen Essigsäure die besten Resultate gegeben. Da aber bei diesem Verfahren keine vollständige Umwandlung der Stärke erzielt wurde und da man dabei sehr vorsichtig verfahren muss, um die Umwandlung nicht zu weit zu treiben, so wollte ich noch eine Methode ausprobiren, die in der letzten Zeit von Bülow¹⁾ angegeben wurde.

« 20 gr. Aetzkali werden in einer Silberschale in Wasser gelöst. Nachdem die Lösung erkaltet ist, fügt man zu derselben unter stetigem Umrühren 20 gr. reine Kartoffelstärke, mit Wasser zerrieben, in 3—4 Portionen hinzu. Die Masse gesteht sofort zu einem gleichmässigen Kleister. Dieselbe wird nun zunächst auf dem Wasserbade erhitzt, bis sie dünnflüssig geworden ist, und darauf noch ca. 10 Minuten über freier Flamme im Sieden erhalten. Nach dem Verdünnen und Ab-

1) K. Bülow, Ueber die dextrinartigen Abbauprodukte der Stärke. Pfl. Arch. 62 B. 131.

kühlen wird die Lösung unter guter Kühlung mit verdünnter Essigsäure (21 gr. Eisessig mit der 6—7fachen Menge Wasser vermischt) schwach angesäuert und darauf unter Umschütteln mit soviel Alkohol versetzt, dass gerade Trübung eintritt.»

Diese Methode gibt nach Bülow sehr gute Resultate, da die Stärke bis auf einen ganz kleinen Rest in lösliche Stärke umgewandelt wird und die Umwandlung nicht zu weit geht, sie erfordert aber den Besitz grosser Silberschalen. Um in gläsernen Gefässen die Umwandlung durchführbar zu machen, habe ich verdünnte Kalilauge angewendet.

10 gr. Reisstärke wurden mit 100 ccm. 15%iger Kochsalzlösung verrieben, dazu 20 ccm. 30%iger Kalilauge zugesetzt, so dass die Flüssigkeit etwa 5 gr. KOH in 100 ccm. enthalten hat. Diese Mischung wurde in einem Kolben so lange gekocht, bis sie ganz dünn geworden war, dann wurde sie filtrirt, mit Essigsäure bis zur schwachsauren Reaction versetzt, mit Alkohol ausgefällt, im Wasser beim Kochen gelöst, wieder mit Alkohol ausgefällt und mehrmals ausgewaschen. Dieses Präparat stellte ein weisses Pulver dar, welches in der Quantität von 3 bis 4% im Wasser löslich war. Die Lösung wurde mit Jod blau gefärbt und reducirte Fehling'sche Lösung nicht. Es hat sich demnach ergeben, dass man silberne Schalen entbehren kann und dass verdünnte Kalilauge zur Lösung der Stärke genügt. Es ist dann die Frage entstanden, ob vielleicht verdünnte Kalilauge hier, katalytisch wirkend, eine hydrolytische Spaltung hervorruft. In solchem Falle müsste eine noch viel verdünntere Kalilauge denselben Effect hervorrufen. Zur Lösung dieser Frage habe ich entsprechende Versuche angestellt und folgende bequeme Darstellungsmethode der löslichen Stärke ausgearbeitet.

Man verreibt 100 gr. bester Reisstärke mit kleinen Quantitäten 2%iger Kalilauge und lässt 2—4 Stunden stehen. Die gleichmässig gequollene Masse wird mit kleinen Portionen von 2%iger Kalilauge unter gutem Umrühren versetzt, bis das Ganze ein Volumen von 600—800 ccm. einnimmt. Die erhaltene gallertartige Masse wird in einem Kolben so lange im Wasserbade unter beständigem Umrühren erhitzt, bis sie ganz dünn

geworden ist, dann auf der freien Flamme 20 bis 30 Minuten gekocht, filtrirt, mit Essigsäure bis zur schwach sauren Reaction neutralisirt und mit dem gleichen Volumen 95%igen Alkohols ausgefällt, wieder gelöst, wieder gefällt, in kleiner Menge Wasser gelöst, in dünnem Strahle unter sehr starkem Umrühren in eine sehr grosse Menge von absolutem Alkohol gegossen, mit absolutem Alkohol und Aether ausgewaschen und im Vacuum getrocknet. Das reine Präparat bekommt man in einer Ausbeute von 50—60% der angewandten Stärke.

Eigenschaften der löslichen Stärke. Das erhaltene Präparat war schneeweiss und im wasserfreien Zustande nicht hygroscopisch, solange es aber nicht vollständig getrocknet war, zog es stark Wasser an und zerfloss wie Dextrine in eine durchscheinende schmierige Masse. Es löste sich in kaltem Wasser in der Quantität von 3% auf. Man konnte auch stark opalisirende, beinahe 4%ige Lösungen erhalten. In grösserer Concentration bildete es mit Wasser kleisterartige Massen, wie aus Folgendem ersichtlich ist.

2 gr. löslicher Stärke wurden mit 20 ccm. Wasser verrieben und aufgekocht. Es entstand ein dicker Kleister, der beim Erkalten erstarrte. Wenn man auf 2 gr. Stärke 25 ccm. Wasser nimmt, so erhält man einen dünnen opalisirenden Kleister, der beim Erkalten nicht erstarrt. Wenn man dagegen 33 ccm. Wasser nimmt, so filtrirt die erhaltene Flüssigkeit nach dem Erkalten sehr langsam und nur theilweise und opalisirt stark. Eine kalte 4%ige Lösung filtrirt gut, sie opalisirt nur wenig. Eine 3%ige Lösung filtrirt leicht, sie opalisirt fast garnicht mehr.

Lösliche Stärke ist in 40%igem und stärkerem Alkohol fast unlöslich. Ihre Lösung färbt sich mit Jod, auch beim kleinen Ueberschusse von demselben, rein blau; sie reducirt Fehling'sche Lösung nicht. Wenn wir eine concentrirte Lösung mit wenig Kupfersulfat und dann mit Natronlauge versetzen, so bildet sich ein bläulicher Niederschlag, der beim Kochen nicht geschwärzt wird. Dieses Verhalten wurde von Landwehr als eine « charakteristische » Reaction für Thiergummi angegeben. Wenn man verdünnte Lösung nimmt, so bildet

sich kein Kupferniederschlag, sondern das Kupferoxyd wird, wie bei Anwesenheit von Zucker oder Glycerin, in Lösung gehalten. Lösliche Stärke dialysirt nicht, sie wird durch Ammonium-, Magnesium- und Natriumsulfat ausgesalzen. Bei Sättigung ihrer verdünnten Lösung mit Kochsalz fällt sie nicht aus. Sie wird mit Tannin gefällt, der mit Alkohol ausgewaschene Niederschlag ist aber im Wasser wieder löslich und der Waschalkohol enthält das gelöste Tannin. Mit Phosphorwolfram- und Phosphormolybdänsäure gibt lösliche Stärke in verdünnten Lösungen keinen Niederschlag, ebenfalls mit Jodquecksilberjodkalium. Bemerkenswerth ist es, dass lösliche Stärke eine schwache Gelbfärbung, ähnlich der Xanthoproteinreaction, zeigt; mit Bleizucker gibt sie keine Fällung, mit Bleiessig nur eine schwache Trübung, mit Sublimat und Quecksilbernitrat keinen Niederschlag.

Spaltung der Stärke unter der Wirkung von Alkalien. Es kann keinem Zweifel unterliegen, dass die lösliche Stärke schon ein Spaltungsprodukt der genuinen Stärke ist, demnach ist anzunehmen, dass Alkali auf Stärke eine spaltende Wirkung ausübt, und da diese Erscheinung der diastatischen Spaltung gewissermaassen analog ist, so glaube ich, dass eine nähere Betrachtung der Spaltungen unter Wirkung von Alkali an dieser Stelle nicht ohne Interesse sein wird.

Bei Ausführung des oben angegebenen Verfahrens zur Darstellung der löslichen Stärke wird die in der Flüssigkeit befindliche Kalilauge mit Essigsäure neutralisirt. Dies ist aber nicht nothwendig, weil wir auch durch das wiederholte Füllen und Auswaschen mit Alkohol die Kalilauge entfernen können, da sie nicht chemisch mit löslicher Stärke gebunden ist. Wir nehmen Essigsäure nur deshalb, weil Kaliumacetat weniger adsorbirt wird und sich leichter auswaschen lässt, als die Kalilauge.

Ich habe eine kleine Menge löslicher Stärke auf folgende Weise dargestellt: 10 gr. Stärke wurden mit 100 ccm. Wasser verrieben, dazu 2 Tropfen von 10% iger Kalilauge zugesetzt und während 30 Minuten gekocht, dann wiederholt mit Alkohol ausgefällt, mit absolutem Alkohol und Aether gewaschen und

getrocknet. Dieses Präparat enthielt nur 0,92 % Asche und besass alle Eigenschaften der löslichen Stärke. Es kann hier keine Rede von einer Alkaliverbindung der Stärke sein.

Alkaliverbindungen der Stärke wurden von Pfeiffer und Tollens¹⁾ dargestellt. Wir lesen bei diesen Autoren über diese Verbindungen Folgendes: «Wenn man Stärke mit kaltem Wasser umrührt und Natronlauge hinzufügt, erhält man eine kaum gelbliche, durchscheinende Gallerte. Alkohol scheidet aus der völlig homogenen Masse einen anfangs sehr zähen Körper ab.» «Die erhaltene Substanz reagirt stark alkalisch und unterscheidet sich durch die Löslichkeit in kaltem Wasser von der Stärke.» «Das Natrium ist sehr lose gebunden und trennt sich mit Wasser schon theilweise als Natriumhydroxyd, mit Säuren vollständig als Natriumsalz ab, so dass man das Natrium durch Titrirung mit verdünnter Schwefelsäure auch ohne Veraschung der Substanz bestimmen kann und es ungewiss ist, ob eine Zusammensetzung der Stärke mit NaOH oder ein Eintritt von Natrium in die Stärke wahrscheinlicher ist.» (S. 288.)

Die Autoren haben bei der Darstellung dieser Verbindungen Alkalien als Alkoholate zugesetzt, um grössere Quantitäten von Wasser zu vermeiden. Diese Alkaliverbindungen der Stärke sind so unbeständig, dass nicht nur das Wasser, sondern auch die Kohlensäure der Luft sie zu zerlegen vermag. «Kohlensäure der Luft zersetzt die Verbindung und es bleiben, wenn letztere dann wieder gelöst und gefällt wird, die geringen entstandenen Mengen Natriumcarbonat theilweise in Lösung, so dass der Natriumgehalt geringer wird.» Ein Präparat, welches längere Zeit im Trockenschrank verweilte, enthielt nur 1,89 % Natrium, während der durchschnittliche Gehalt der Präparate an Natrium — 3,4 % betrug. Wir lesen ausserdem in der citirten Abhandlung, dass ein Theil vom neugebildeten Natriumcarbonat mit dem Niederschlage niedergerissen wird, was aus dem ungemein grossen Gehalte an Kohlensäure er-

¹⁾ Th. Pfeiffer und B. Tollens, Ueber Verbindungen von Kohlenhydraten mit Alkalien. Lieb. Ann. 210 B. 285.

sichtlich ist. Daraus ersehen wir, dass an dem Niederschlage, welcher jetzt nur theilweise aus einer Alkaliverbindung, theilweise dagegen aus der löslichen Stärke bestehen muss, Natriumcarbonat der Adsorption wegen anhaftet, wir wissen aber, dass die ätzenden Alkalien in noch höherem Grade adsorbirbar sind.

Die Resultate der Arbeit von Pfeiffer und Tollens will ich hier nicht im Mindesten bezweifeln. Zweck der genannten Autoren war die Feststellung der Grösse des Stärkemoleküls, und wenn auch Alkaliverbindungen der Stärke sehr lose sind, so konnten doch die Vergleichsversuche, um welche es sich hier hauptsächlich handelte, zuverlässige Resultate geben. Wir lesen ja in der besprochenen Abhandlung, dass nur bei ganz übereinstimmenden Bedingungen die übereinstimmenden Zahlen (‰ von K) erhalten werden. «Bei unseren Darstellungen ist stets die Ungewissheit vorhanden, ob wir zwischen den genannten Klippen des Zuviel- oder Zuwenigerhaltens von Natrium resp. Kalium die richtige Mitte eingehalten haben.»

Für mich ist in dieser Frage nur das wichtig, dass die Alkaliverbindungen der Stärke nur bei ganz bestimmten Umständen entstehen können und bei meiner Darstellungsweise der löslichen Stärke gar nicht existenzfähig sind. Solche lose Verbindungen mit Alkalien bilden auch andere Polysaccharide, z. B. Cellulose. «Diese Verbindungen sind gegenüber dem Waschen mit Alkohol haltbar, aber Wasser zieht das Alkali wieder aus.»¹⁾

Das Verhalten der Stärke gegen die Alkalien ist ganz analog dem Verhalten gegen die Säuren. «Stärke gibt auch, mit den starken Säuren kalt verrieben, dicken Kleister, wobei Verbindungen, z. B. Stärkeschwefelsäuren, entstehen, die leicht zu Schwefelsäure und Stärke,» eigentlich lösliche Stärke, «zerfallen».²⁾

Wir sehen aus dem Obigen, dass es gelungen ist, Stärke durch die Wirkung von Alkali in löslichen Zustand zu bringen, d. h. zu spalten. Lösliche Stärke ist nichts anderes als ein

1) Tollens, l. c. I. 233.

2) Tollens, l. c. I. 178.

Produkt der Hydrolyse der Stärke, das erste Dextrin. Sie kann aus Stärke durch die Wirkung von Diastase, von Säuren, auch von Wasser (bei höheren Temperaturen) erhalten werden. Derselbe Zerfall, dieselbe Spaltung des Stärkemoleküls wird durch die Wirkung von Alkalien zu Stande gebracht, nur mit dem Unterschiede, dass die spaltende Wirkung der Säuren viel weiter geht, bei den Alkalien hört dagegen die Spaltung auf der ersten Stufe auf. Kalilauge kann jedoch, obgleich nur sehr langsam, auch die weitere Spaltung hervorrufen, wie der folgende Versuch zeigt.

10 gr. bester Reisstärke wurden mit 100 ccm. Wasser zerrieben, 10 Tropfen 10 proc. Kalilauge zugesetzt und unter Ersetzen des verdampfenden Wassers $4\frac{1}{2}$ Stunden gekocht. Die erhaltene Lösung reducirte schwach aber deutlich Fehling'sches Reagens, was beweist, dass sich weitere Spaltungsprodukte der Stärke gebildet hatten.

So viel es mir bekannt ist, ist dies die erste Beobachtung einer katalytisch-spaltenden Wirkung von verdünnten Alkalien auf Stärke. In dem von Bülow¹⁾ angegebenen Verfahren zur Darstellung der löslichen Stärke wurde starke, concentrirte Kalilauge angewendet. Die eingreifende chemische Wirkung der concentrirten Kalilauge ist sehr wahrscheinlich und diese Darstellungsmethode wurde von solchem Standpunkte aus aufgefasst. Wir haben in unserem Falle es offenbar mit der katalytisch-spaltenden Wirkung von sehr verdünnter Kalilauge zu thun.

Man hat schon früher bemerkt, dass verdünnte Alkalilauge bei lange dauerndem Erhitzen auf Saccharose zersetzend wirkt.²⁾ Diese Angabe wurde später widerlegt,³⁾ obgleich mit Unrecht, wie ich constatiren konnte. Verdünnte Kalilauge wirkt auch auf das Inulin, ähnlich den Säuren, spaltend. Inulin gibt bekanntlich mit der Fehling'schen Lösung keine Reduction, nach dem längeren Kochen mit Wasser gibt es aber wohl eine

1) l. c.

2) Michaelis, J. pr. Ch. 56 B. 430.

3) v. Lippmann, Zuckerarten, 129. Cit. nach Tollens. l. c.

Reduction und die verdünnten Säuren spalten es schon nach kurzem Kochen. Ich habe constatirt, dass auch die verdünnten Alkalien nach dem kurzen Kochen eine starke Inversion bewirken. Es ist von Interesse noch die Beobachtung, dass das reine Inulin, längere Zeit mit Fehling'scher Lösung gekocht, eine schwache Reduction gibt. Diese Reduction kann nur daher stammen, dass Inulin unter der Wirkung der Natronlauge der Fehling'schen Lösung gespalten wurde. Man begegnet oft den Angaben, dass dieses oder jenes Kohlehydrat Fehling'sche Lösung erst nach längerem Kochen reducirt; in allen diesen Fällen kommt wahrscheinlich eine Spaltung, wie in oben angeführtem Beispiele, zu Stande.

Es ist wahrscheinlich, dass auch die Ueberführung des Glykogens in Lösung, bei welcher man zerkleinerte Leber mit Kalilauge erwärmt, auf einer Spaltung beruht. Das Experiment soll diese Frage entscheiden.

Wir wissen, dass die hydrolytische Wirkung, welche das Wasser besonders bei den höheren Temperaturen ausübt, von der Anwesenheit der freien H-Ionen und OH-Ionen abhängig im Wasser ist. Die ausgezeichnete hydrolytische Wirkung der verdünnten Säuren hängt von der Anwesenheit grosser Mengen freier H-Ionen, diejenige der verdünnten Alkalien von freien OH-Ionen ab.

Hydrolytische Processe, welche unter der Wirkung von Fermenten verlaufen, kann man in zwei Hauptgruppen theilen. Zur ersten Gruppe gehören diejenigen, welche durch Zusatz von freien H-Ionen, zur zweiten, welche durch OH-Ionen beschleunigt werden. Die ersten sind die häufigsten, als Beispiel kann die Pepsinwirkung dienen. Als Beispiel der fermentativen Processe letzterer Art dient die Wirkung von Trypsin. Pepsin und Trypsin spalten die Eiweissstoffe, in einem Falle geht aber die Spaltung viel weiter als in dem anderen. Aehnliches Verhalten haben wir in dem vorliegenden Falle. Stärke wird durch Diastase und verdünnte Säuren viel weiter gespalten wie durch die verdünnten Alkalien.¹⁾

¹⁾ Vergl. Hoppe-Seyler, Physiologische Chemie, Berlin 1881, S. 116—126.

Es wäre interessant, wenn sich in den Pflanzen Fermente fänden, welche die Spaltung der Stärke in alkalischer Lösung nur bis zur löslichen Stärke zu bringen vermöchten. Man würde dann auch diesen Process zur zweiten Gruppe der hydrolytisch-fermentativen Spaltungen zu rechnen haben.

Ich führe einige von Anderen gemachten Beobachtungen an, die an dieser Stelle vielleicht nicht ohne Interesse sein können. Wir lesen bei Lintner:¹⁾ «Im Verhalten des Weizenfermentes und der Malzdiastase besteht ein bedeutender Unterschied insofern, als ersteres Ferment nicht im Stande ist, Stärkekleister zu verflüssigen.»

J. Dufour²⁾ hat in mehreren Pflanzen eine lösliche Verbindung gefunden, die mit Jod blau gefärbt wird und die er für lösliche Stärke erklärt. Er findet, dass lösliche Stärke von sehr beschränkter Verbreitung ist. «Unter 1300 untersuchten Pflanzen fand er sie nur bei etwa 20; sie soll sich fast ausschliesslich in der Epidermis finden und zwar bald in allen oberirdischen Theilen und in beträchtlicher Quantität (am meisten bei *Saponaria officinalis*), bald auf bestimmte Theile, besonders die Blüthe, oder gar nur auf einzelne Zellen beschränkt. Sie tritt in den jungen Blättern und den Keimpflanzen schon frühzeitig auf. In den Zellen findet sie sich in gelöstem Zustande. Sie verschwindet weder bei anhaltender Verdunkelung noch auch aus abgefallenen Blättern.»

Bei L. Brasse³⁾ lesen wir: «A l'époque de la germination les graines sont plutôt alcalines qu'acides. Aujourd'hui on est donc porté à admettre, que cette modification préliminaire est accomplie sous l'influence d'un ferment soluble distinct de l'amylase.»

1) Ueber das diastatische Ferment des ungekeimten Weizens. Zeitschr. Brauw, 11 B. 497, Ref. im Chem. Ctbl. 1889 I. 77.

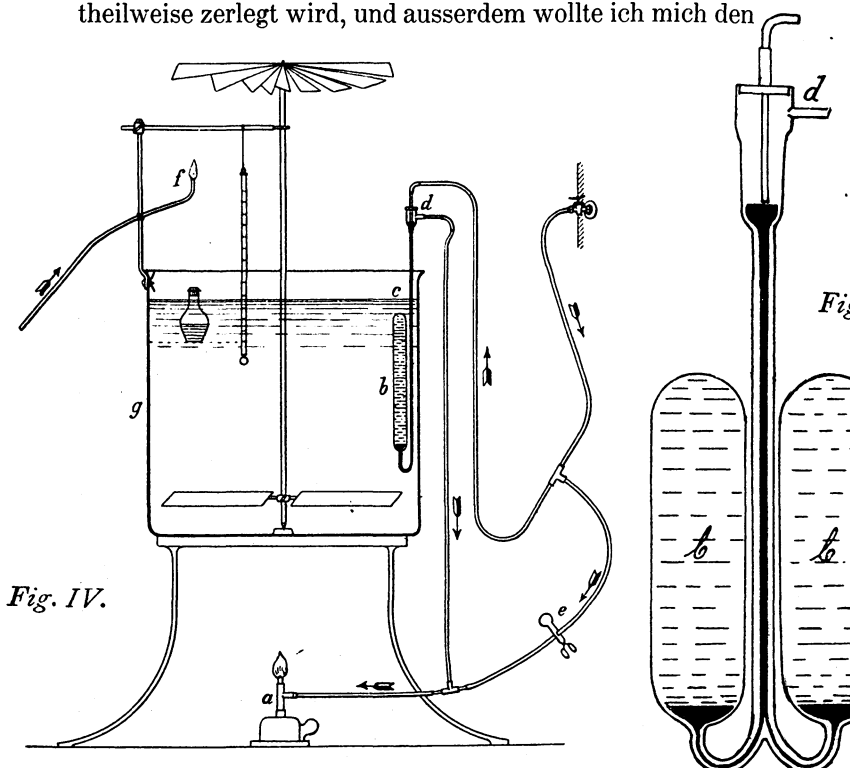
2) Recherches sur l'amidon soluble et son rôle physiologique chez les vegetaux. C. v. 66 Sess. Soc. Helvet Sc. nat. — Ibid 68 Session. — Ref. in Botan. Jahresb. 1885. 60 und 1886. 28. — J. Dufour, Notices microchimiques sur le tissu épidermique des vegetaux. Bull. Soc. vaudoise sc. nat. 22. — Ref. in Botan. Jahresb. 1886, 871.

3) Action de la diastase du malt sur l'amidon cru. C. rend. 100 Vol. 454.

Ostwald'sches Thermostat.

Nach der Besprechung der Darstellungsweise und der Eigenschaften der löslichen Stärke, welche ich bei der Prüfung der Wirksamkeit von Diastasepräparaten verwendete, kommen wir zur Beschreibung der Einrichtung, welche die Erhaltung einer constanten Temperatur während der Spaltung erlaubt.

Zur Bestimmung des Wirkungsgrades meiner Diastasepräparate habe ich nicht die optimale Temperatur von 50 bis 60°, sondern diejenige von 40° gewählt. Der Grund lag darin, dass nach vielen Angaben Diastase bei der optimalen Temperatur theilweise zerlegt wird, und ausserdem wollte ich mich den



natürlichen Verhältnissen näher halten. Das Thermostat habe ich nach den Angaben Ostwald's eingerichtet. In diesem Thermostate hält sich die Temperatur viel constanter wie in irgend einem anderen, z. B. bakteriologischen Brutofen u. dergl.¹⁾

¹⁾ Die Einrichtung dieses Thermostaten ist im «Hand- und Hilfsbuche zur Ausführung physiko-chemischer Messungen» von W. Ostwald

Der grosse eiserne emaillirte, mit Wasser gefüllte Kessel wird durch eine kleine Flamme (*a*) erwärmt. Das Wasser wird in constante Bewegung durch einen mit Windflügeln versehenen Mischer gebracht. Die Flamme (*a*) wird mit einem Ostwald'schen Flüssigkeitsregulator verbunden. Der Thermo-regulator ist mit Toluol (*b*) gefüllt; in der Kapillare (*c*) befindet sich Quecksilber, welches bei der Ausdehnung des Toluols die Oeffnung eines kleinen Gaszuleitungsröhrchens (*d*) schliesst. Die Einrichtung der Gaszuleitung ist aus der Fig. IV ersichtlich; *e* ist das Zuleitungsrohr für die Reserveflamme; *f* ist eine kleine Gasflamme, die die Windflügel in Bewegung setzt. Auf das Drahtnetz im Wasser werden die mit Blei beschwerten, mit den paraffinirten Korken versehenen und mit der zu untersuchenden Lösung gefüllten Kölbchen gestellt. Die Temperaturschwankungen betragen meistens nicht mehr als $0,1^{\circ}$. Um die Empfindlichkeit des Regulators zu erhöhen, gebrauche ich die auf Fig. V dargestellte Form.

Bestimmung der diastasischen Wirkung.

Um die invertirende Kraft meiner Diastasepräparate bestimmen zu können, nahm ich für jede Bestimmung 2 gr. lösliche Stärke, verrieb sie im Mörser mit 20 ccm. heissen Wasser und gab unter Verreiben kleine Quantitäten heisses Wassers zu, bis Alles eine gleichmässig dicke Masse geworden war, dann brachte ich es in ein Becherglas, spülte mit Wasser nach und kochte so lange, bis eine dünne Lösung erhalten war, dann kühlte ich es ab, goss in ein Messkölbchen à 100 ccm., spülte nach und füllte mit Wasser bis zur Marke. Ausserdem wurde von dem zu untersuchenden Präparate eine Menge von 0,01 gr. nach dem Trocknen bei 60° abgewogen, in 10 ccm. Wasser gelöst und, ohne zu filtriren, mit 50 ccm. der vorbereiteten Stärkelösung in einem verschlossenen Kölbchen vermischt. Das Kölbchen wurde in dem Ostwald'schen

beschrieben, 1893. J. S. 70. — Ich gebe hier auf Fig. IV eine Abbildung von der jetzt im Ostwald'schen Laboratorium gebräuchlichen Einrichtung, um den Lesern das Verständniss derselben zu erleichtern.

Thermostaten bei 40° C. 8 Stunden lang gelassen. Nach dem Verlaufe dieser Zeit wurde der Inhalt des Kölbchens aufgekocht, um die Wirkung der Diastase zu unterbrechen, filtrirt, 20 ccm. des Filtrates mit 40 ccm. Fehling'scher Lösung versetzt und die Menge des beim 5 Minuten dauernden Kochen abgeschiedenen Kupfers nach Allihn bestimmt. Diese Kupfermenge drückt die reducirende Wirkung der Spaltungsprodukte und mithin die spaltende Kraft des Diastasepräparates aus. Man kann auch aus der erhaltenen Kupfermenge die Quantität der gebildeten Maltose berechnen, vielleicht aber kann Maltose nicht das einzige reducirende Spaltungsprodukt bilden.¹⁾

Da nach Allihn 113 Theile Kupfer 100 Theilen Maltosé entsprechen, so müssen wir die erhaltene Kupfermenge mit $\frac{100}{113}$ multipliciren, um das Gewicht der Maltose zu bekommen. Ausserdem ist zu berechnen, wie viel Procente die gebildete Maltose vom Gewichte der angewendeten löslichen Stärke bildet.

Auf diesem Wege habe ich folgende Zahlen erhalten:

Präparat I bewirkt Bildung von 43,3 Th. Maltose aus 100 Th. lösl. Stärke.									
"	II	"	"	"	48,2	"	"	"	"
"	III	"	"	"	60,2	"	"	"	"
"	IV	"	"	"	{ 64,9	"	"	"	"
"	A	"	"	"	{ 65,0	"	"	"	"
"	A	"	"	"	48,9	"	"	"	"
Malz, aus welch. Präp. II dargestellt wurde	"	"	"	"	46,0	"	"	"	"
Präp. I bei 100°—110° 4 Stunden getrocknet	"	"	"	"	{ 0,0	"	"	"	"
"	"	"	"	"	{ 0,0	"	"	"	"

Zum Vergleiche führe ich hier die Resultate an, die ich bei anderen stärke-spaltenden Präparaten erhalten habe.

Diastase „Grübler“ bewirkt Bildung von 26,9 Th. Maltose aus 100 Th. lösl. Stärke.									
Pankreatin (sehr altes Präparat)	"	"	"	"	{ 0,0	"	"	"	"
Pankreatin (proteolyt. wirksam. altes Präp.)	"	"	"	"	{ 0,0	"	"	"	"
"	"	"	"	"	6,3	"	"	"	"

Bis jetzt habe ich noch nicht die Möglichkeit gehabt, mehr Bestimmungen zu machen und die Methode in verschiedenen Richtungen auszunutzen. Es ist aber beim ersten Blicke ersichtlich, dass diese Methode an der Genauigkeit alle

¹⁾ Es scheint, dass auch gewisse Dextrine schwach reduciren.

bis jetzt angewendeten übertreffen muss und dass sie bequem ausführbar ist und auch zur Bestimmung diastatischer Wirksamkeit einzelner Pflanzentheile mit Vortheil Anwendung finden kann.

Die Vortheile der Methode sind folgende: Das der Spaltung zu unterwerfende Präparat wird genau abgewogen und in vollständige Lösung gebracht. Während der Wirkung der Diastase auf die lösliche Stärke bleibt die Temperatur fast völlig constant; die Schwankungen betrugen weniger als 0,1°. Die Quantität der unter der Wirkung der Diastase entstandenen Spaltungsprodukte wird durch das Gewicht des reducirten Kupfers genau ausgedrückt.

Dieses Verfahren wird, wie ich glaube, bei den künftigen Untersuchungen über Diastase und über ähnliche Enzyme gute Dienste leisten.

Trennung des Proteinstoffes vom Kohlenhydrate.

Nach dieser Abschweifung gehe ich dazu über, die zur Zerlegung der Diastasepräparate in einen Proteinkörper und ein Kohlenhydrat von mir angestellten Versuche näher zu besprechen.

Um die Trennung der Körper, welche in den dargestellten Präparaten vorhanden waren, zu erreichen und auf diesem Wege Diastase rein darzustellen, habe ich zuerst das Verfahren zu benutzen versucht, welches von Brücke zur Darstellung von Pepsin angewendet wurde. Brücke stützte sein Verfahren auf die Beobachtung, dass Fermente mit gewissen Niederschlägen mitgerissen werden. Wenn z. B. in einer Pepsinlösung ein Cholesterin- oder ein Calciumphosphat-Niederschlag erzeugt wird, so reisst er das Pepsin mit nieder. Ich beobachtete jedoch noch im Jahre 1893, als ich im Drechsel'schen Laboratorium mich bemüht habe, Pepsin nach Brücke darzustellen, dass bei Erzeugung des Niederschlages von Calciumphosphat nur ein Theil des Pepsins mit niedergerissen wurde, weil die Mutterlaugen stark peptisch wirkten. Nach diesem Verfahren bekam ich schliesslich eine kleine Menge von nicht

sehr stark wirkender Pepsinlösung. Auch ein mit verdünnter Essigsäure erzeugter Caseinniederschlag riss nur einen Theil des Pepsins mit nieder. Die jetzt mit Diastase angestellten Versuche haben das gleiche Verhalten ergeben.

Eins von den wirksamen Präparaten wurde im Wasser gelöst, mit einer Lösung von phosphorsaurem Kalium und tropfenweise bis zur kaum merkbar alkalischen Reaction mit Kalkwasser unter Umrühren versetzt; der entstandene Niederschlag wurde mit Wasser gewaschen und in 0,028 proc. Salzsäure gelöst; die Lösung wirkte nicht sehr stark diastatisch und gab Millon'sche Reaction. Die Mutterlauge von der Fällung wirkte gleichfalls diastatisch, so dass es ersichtlich war, dass nur ein Theil des Fermentes mit dem Niederschlage mitgerissen worden war.

Dieses Anhaften der Diastase an den Niederschlägen, mit welchen sie doch nicht chemisch gebunden ist, muss auf dem Adsorptionsvorgange beruhen. Diese Adsorbirbarkeit der Diastase, wie auch der anderen Enzyme, gehört jedenfalls zu ihren charakteristischen Eigenschaften. Ich suchte die Mittel, um diese Adsorbirbarkeit zur Isolirung der Diastase anzuwenden. Die Filtration durch eine Tonzelle schien dazu geeignet zu sein. Man könnte erwarten, dass Diastase durch die Adsorption an den porösen Wandungen der Zelle bei der Filtration zurückgehalten wird. Eine schwach opalisirende Lösung eines Präparates wurde durch eine Chamberland-Kerze filtrirt. Es hat sich sofort gezeigt, dass die Filtration nur sehr langsam vor sich geht. Im Laufe von mehreren Stunden habe ich ca. 100 ccm. vom klaren, nicht opalisirenden, Filtrate gesammelt. Das Filtrat zeigte aber dieselben Eigenschaften wie eine sehr verdünnte Lösung des angewendeten Präparates. Der nichtfiltrirte Rest war stark opalisirend und enthielt auch das Gemenge des Kohlenhydrates mit dem Proteinstoffe. Auf diesem Wege konnte demnach die Trennung nicht bewirkt werden.

Dann habe ich Knochenkohle angewendet, welche auf viele Stoffe adsorbirend wirkt. Man könnte vermuthen, dass auch Diastase an der Knochenkohle haften wird. Ich habe eine Lösung vom Präparate A mit einer grossen Menge sehr

sorgfältig gereinigter Knochenkohle versetzt, gut geschüttelt und bis zum nächsten Tage stehen gelassen. Die von der Kohle abfiltrirte Lösung bestand aus demselben Gemische wie das ursprüngliche Präparat und wirkte diastatisch. Die Kohle adsorbirte thatsächlich einen Theil der Substanz, es wurden aber die beiden gemischten Körper adsorbirt. Mehrfache Wiederholungen des Versuches ergaben dieselben Resultate. Demnach hat es sich erwiesen, dass mit Hülfe der Adsorption die gewünschte Trennung nicht bewirkt werden kann.

Man konnte denken, dass das Bleiacetat, mit welchem Würtz so gute Resultate bei der Papayotindarstellung erzielte, auch in diesem Falle eine Trennung bewirken würde. Da aber in der Lösung meiner Präparate Bleizucker keinen Niederschlag und Bleiessig nur eine Trübung hervorbrachte, so konnte von der Trennung auf diesem Wege keine Rede sein.

Eine vollständige Trennung wurde dagegen durch die Anwendung des Brücke-Külz'schen Verfahrens erzielt, welches so gute Dienste bei der Trennung des Glykogens von den Proteinstoffen leistet. Eines von meinen Präparaten wurde im Wasser gelöst und tropfenweise mit verdünnter Salzsäure und einer Lösung von Jodquecksilberjodkalium versetzt, bis keine Fällung mehr entstand. Der voluminöse, stark gequollene, Niederschlag wurde abfiltrirt und mit schwach angesäuertem Wasser ausgewaschen, was sehr langwierig war. Man musste ferner bei der Fällung sehr vorsichtig verfahren, weil bei gewissem Ueberschusse vom Reagens ein Theil des Niederschlages sich wieder löste oder so stark quoll, dass er durch die Filterporen ging, und dieses Uebel war dann unverbesserlich. In dem erhaltenen Niederschlage befand sich ein Proteinstoff (S. 206) und im Filtrate ein dextrinartiges Kohlenhydrat, welches demnach mit Magnesiumsulfat mitausgefällt wurde.

Ich versuchte auch den Proteinstoff vom Kohlenhydrate mittelst Phosphorwolframsäure zu trennen. Dieser Process bietet aber noch viel grössere Schwierigkeiten und erfordert grosse Vorsicht, weil aus nicht sehr verdünnten Lösungen auch das Kohlenhydrat mitniedergeschlagen wird.

Das Kohlenhydrat.

Wie früher erwähnt wurde, ist ein Kohlenhydrat in dem Filtrate von dem mit Brücke's Reagens erhaltenen Niederschlage enthalten. Dasselbe wurde mit Alkohol ausgefällt, im Wasser gelöst, wieder gefällt und mit Alkohol und Aether ausgewaschen. Es stellte ein schneeweisses Pulver vor, welches im trockenen Zustande nicht hygroskopisch war, wenn es aber nicht vollständig getrocknet wurde, so zerfliesst es in eine durchsichtige, schmierige Masse, ganz ähnlich wie manche Dextrine. Es ist im Wasser und im 50%igen Alkohol löslich, im 60%igen wenig löslich. Wenn aber das Kohlenhydrat sehr salzarm ist, so kann man es aus den verdünnten Lösungen durch Zusatz von sogar grossen Mengen absoluten Alkohols nicht niederfallen. Es schmeckt nicht süss. Seine Lösung wird mit Jod nicht gefärbt und reducirt Fehling'sches Reagens erst nach dem Erhitzen mit einer Mineralsäure. Seine Lösung dreht die Polarisationsebene stark nach links. Eine annähernde Bestimmung, die ich mit einem nicht ganz reinen Präparate ausgeführt habe, hat ergeben $[\alpha]_D = -210^\circ$. Diese Zahl führe ich nur deswegen an, um zu zeigen, dass hier ein Körper von starkem Drehungsvermögen vorliegt.

Dieses Kohlenhydrat wird mit Bleizucker und Bleiessig nur aus sehr concentrirten Lösungen gefällt und der erhaltene Niederschlag löst sich im Ueberschusse des Reagenses. Mit Barythydrat wird es gefällt, ebenfalls mit Phosphorwolframsäure aus concentrirten Lösungen, und gibt mit Tannin einen voluminösen Niederschlag, der sich ähnlich verhält wie ein Niederschlag der löslichen Stärke (S. 192). Es wird aus seiner wässrigen Lösung durch Ammonium- und Magnesiumsulfat ausgesalzen und dialysirt nicht.

Um zu erfahren, aus welchen Glukosen das gefundene Polysaccharid besteht, habe ich Reactionen auf verschiedene Glukosen angestellt. Bei der Oxydation mit Salpetersäure hat sich keine Schleimsäure, auch keine Zuckersäure gebildet, was auf Abwesenheit der Galaktose und Dextrose hinweist. Bei der Reaction mit Salzsäure und Resorcin hat sich keine rothe

Färbung gebildet, woraus man über die Abwesenheit der Lävulose schliessen soll. Eine Probe der in der später beschriebenen Weise erhaltenen Spaltungsprodukte gab nach Erwärmen mit essigsaurem Phenylhydrazin keine Fällung, woraus die Abwesenheit des Mannans hervorginge.

Dagegen gab das Kohlenhydrat mit Phloroglucin und Salzsäure eine prachtvolle Pentosenreaction. Demnach lag ein Pentosan vor. Um zu entscheiden, welche Pentose dasselbe bei der Inversion liefert, habe ich 10 gr. des Kohlenhydrats mit verdünnter Schwefelsäure gekocht, dann die Lösung von der Schwefelsäure befreit, auf dem Wasserbade bis zum Syrup eingedampft, den Syrup mit Alkohol ausgezogen, die alkoholische Lösung eingedunstet, den Rückstand nochmal mit Alkohol ausgezogen. Diese alkoholische Lösung liess ich dann über Schwefelsäure abdunsten, sie lieferte Krystalle, welche aus absolutem Alkohol umkrystallisirt wurden. Die grossen farblosen, nadelförmigen Krystalle schmecken süss, schmelzen bei derselben Temperatur wie ein Arabinosepräparat.

Bei Bestimmung des specifischen Drehungsvermögens erhielt ich folgende Resultate: Eine wässrige Lösung, welche in 14 ccm. Wasser 0,4 gr. trockener Substanz enthielt, drehte in einem 20 cm. langen Rohr $+ 16,91^\circ$; daraus berechnet man $[\alpha]_D = + 102,4^\circ$. Das in bekannter Weise dargestellte Osazon schmolz bei ca. 155° , während für Arabinososazon ein Schmelzpunkt von 156° — 158° angegeben wird.¹⁾

Aus allen diesen Thatsachen müssen wir schliessen, dass der vorliegende Zucker Arabinose war. Da ich kein anderes Spaltungsprodukt nachzuweisen vermochte, so komme ich zum Schluss, dass das in den Diastasepräparaten vorkommende Kohlenhydrat ein Araban ist.

Soviel mir bekannt, ist dies das erste lösliche in den Pflanzen vorkommende Pentosan, welches untersucht wurde. Es wäre interessant, seine Bedeutung im Stoffwechsel der Gerste zu verfolgen und nach seiner Anwesenheit in anderen Pflanzen zu forschen.

¹⁾ Beilstein, l. c.

Der Proteinstoff.

Da das im Vorigen beschriebene Kohlenhydrat nicht diastatisch wirksam war, so musste die wirksame Substanz sich in dem durch das Brücke'sche Reagens bewirkten Niederschlage befinden, was sich auch experimentell nachweisen liess. Es erschien daher angezeigt, die im Niederschlage befindliche Substanz näher zu untersuchen.

Zu diesem Zwecke wurde der mit jenem Reagens erhaltene Niederschlag mit angesäuertem Wasser ausgewaschen. Das Auswaschen ging sehr schwer und langsam, weil der Niederschlag nicht grobflockig ist, sondern aus feinen, stark gequollenen Partikeln besteht, welche sich nicht zu Boden setzen, die Filterporen verkleben und das Auswaschen ungemein erschweren. Dieses Filtriren und Auswaschen dauert einige Tage und ist nie so vollständig, dass nicht Spuren vom Kohlenhydrat am Niederschlage haften bleiben. Um aus diesem Niederschlage Quecksilber und Jod zu entfernen und den Proteinstoff in die Lösung zu bringen, wurde er mit frisch dargestelltem Silbercarbonat und Wasser in einem geräumigen Mörser verrieben. Das Silbercarbonat wurde in kleinen Portionen solange zugesetzt, bis eine kleine Menge der abfiltrirten Flüssigkeit keine Jodreaction gab. Der freie Proteinstoff ging, wenn auch nur schwer und unvollständig, in Lösung und filtrirte sehr langsam. Das Filtrat enthielt kleine Mengen vom gelösten Silber. Um sie zu entfernen, leitete ich Schwefelwasserstoff ein, aber das Schwefelsilber konnte nicht durch Filtration weggeschafft werden, das Filtrat blieb immer schwärzlich. Um die Lösung zu reinigen, versetzte ich sie mit Alkohol und löste den mit Alkohol ausgewaschenen Niederschlag im Wasser. Das Schwefelsilber ist ungelöst geblieben, aber auch ein Theil des Proteinstoffes löste sich nicht wieder. Die Lösung filtrirte sehr schwer, sie opalisirte und war graulich gefärbt. Die in kleiner Menge erhaltene Flüssigkeit wirkte stark verzuckernd auf die lösliche Stärke und gab Proteinreactionen, und zwar Millon'sche und Xanthoproteinreaction, die Biuretreaction war undeutlich wegen der graulichen Farbe der Lösung. Die Darstellung dieses Protein-

stoffs ist, wie wir sehen, mit sehr grossen Schwierigkeiten verbunden, und es ist mir deshalb bis jetzt nicht gelungen, ein ganz reines wirksames Präparat zu erhalten.

Die Darstellung des Proteinstoffs aus dem Phosphorwolframsäure-Niederschlag ist noch schwieriger und liefert eine sehr unreine Lösung (S. 203). Der Phosphorwolframsäure-Niederschlag gab nach der Zerlegung eine kleine Menge Flüssigkeit, die, wenn auch nicht stark, diastatisch wirkte und Proteinreactionen gab. Wegen der grossen Schwierigkeiten wurde dieser Weg verworfen.

Zur Darstellung von grösseren Quantitäten dieses Proteinstoffes konnte die oben beschriebene Methode, welche im Uebrigen einen Beweis der proteinartigen Beschaffenheit von Diastase gebracht hat, dazu nicht verwendet werden, weil sie zu grosse Schwierigkeiten darbietet und doch kein vollständig reines Präparat liefert. Ich habe in Folge dessen eine Lösung des Präparates A mit verdünnter Schwefelsäure gekocht, wobei sich, wie früher schon erwähnt wurde, eine Proteinsubstanz ausschied, und den Niederschlag sorgfältig ausgewaschen. Der flockige Niederschlag liess sich mit Wasser ziemlich leicht auswaschen. Das Auswaschen dauerte so lange, bis sich im Filtrate kein Kohlenhydrat mehr nachweisen liess. Dieses Präparat wurde zu den weiter beschriebenen Spaltungen benutzt. Es löste sich in verdünnter Natronlauge und fiel bei Neutralisation mit Säure aus. Es war gelb gefärbt und gab deshalb die farbigen Eiweissreactionen nicht sehr deutlich.

Die von mir erhaltenen ursprünglichen Präparate, welche ein Gemisch vom Kohlenhydrate mit dem Proteinstoffe bildeten, waren fast vollständig, wenn auch schwer, im Wasser löslich. Das Präparat A war aber nicht ganz löslich. Der unlösliche Theil stellte nach dem Auswaschen mit Wasser einen Proteinstoff vor. Er quoll im Wasser sehr stark auf und äusserte in diesem Zustande eine diastatische Wirkung. Von diesem Präparate habe ich für Spaltungsversuche grosse Mengen gesammelt.

Die beiden Proteinstoffe, der lösliche und unlösliche, können eine und dieselbe Substanz sein. Ich habe nämlich constatirt,

dass der lösliche Proteinstoff durch die Wirkung von Alkohol an seiner Löslichkeit stark einbüsst. Während der Darstellung des ursprünglichen Präparates blieb nach jeder Behandlung mit Alkohol ein Theil des Niederschlages unlöslich. Da diese unlöslichen Reste aus einer Proteinsubstanz bestanden, so wurden die Niederschläge immer ärmer und ärmer an der Proteinsubstanz. Auch die von Anderen gemachten Beobachtungen weisen darauf hin, dass die diastatisch wirksame Substanz durch die Wirkung von Alkohol allmählich an der Löslichkeit einbüsst. Es ist sehr möglich, dass der unlösliche Proteinstoff im Präparate A ein nur in dieser Beziehung veränderter löslicher Proteinstoff ist, worauf auch die Darstellungsmethode hinweist. Beide wirken diastatisch, der unlösliche musste aber aus ersichtlichen Gründen weniger rein sein. Der Stickstoffgehalt des unlöslichen Proteinstoffes betrug 15,3% und der des löslichen 16,2%. Die vollständige Elementaranalyse schien zwecklos, weil die untersuchten Substanzen aschehaltig und demnach nicht vollständig rein waren. Dagegen habe ich die Produkte untersucht, welche bei der Spaltung derselben mit Salzsäure entstehen.

Spaltung der Proteinstoffe. Spaltungen der erhaltenen Proteinstoffe habe ich zu dem Zwecke vorgenommen, um zu erfahren, ob ihre Spaltungsprodukte qualitativ und quantitativ denjenigen gleich sind, welche man bei der Spaltung anderer Proteinstoffe bekommt. Die dabei erhaltenen Resultate theile ich im Folgenden mit, obwohl dieselben unvollständig sind, weil ich eine relativ geringe Materialmenge zur Verfügung hatte.

Ca. 30 gr. vom unlöslichen Proteinstoffe wurden nach dem Verfahren von Hlasivetz und Habermann mit 20%iger Salzsäure unter Zusatz von wenig Zinnchlorid drei Tage lang gekocht; nach dem Erkalten wurde die Flüssigkeit durch Einleitung von Schwefelwasserstoff von Zinn befreit und hierauf zur Entfernung des grössten Theils von Salzsäure bis zur Syrupconsistenz eingedunstet. Der Syrup wurde mit Wasser verdünnt und mit Phosphorwolframsäure versetzt. Es bildete sich ein nicht sehr starker Niederschlag, welcher Ammoniak und organische Basen enthielt. Die bei der Zerlegung des Niederschlages mittelst Barytwassers und reiner Kalkmilch er-

haltene Basenlösung behandelte ich, um daraus Arginin zu gewinnen, nach der von Hedin¹⁾ angegebenen Vorschrift. Es gelang mir aber nicht, ein schwer lösliches Silbersalz, welches im Verhalten dem von Hedin beschriebenen basischen Arginin-silbernitrat entsprach, zu erhalten; aus der Lösung krystallisirte nur ein im Wasser leicht lösliches Salz, über dessen Natur ich nähere Angaben vorläufig nicht machen kann.

Das Filtrat vom Phosphorwolframsäure-Niederschlag wurde zur Entfernung der überschüssigen Phosphorwolframsäure und eines Theils der Salzsäure mit Barytwasser und Bleizucker versetzt und schliesslich durch Behandeln mit Silberoxyd vom letzten Rest der Salzsäure befreit. Aus dem mit Hilfe von Schwefelwasserstoff vom gelösten Silber befreiten Filtrate krystallisirten nach dem Einengen Tyrosin und Leucin nacheinander aus. Sie wurden durch ihr Aussehen unter dem Mikroskop und durch ihre Reactionen charakterisirt. Die von den Leucinkrystallen abfiltrirte Mutterlauge wurde nicht näher untersucht.

Vom löslichen Proteinstoffe wurden 4 gr. mit 20%iger Salzsäure auf die gleiche Weise gespalten und in den Spaltungsprodukten kleine Mengen von Ammoniak und organischen Basen und relativ grosse Mengen Amidosäuren gefunden. Tyrosin und Leucin sind in Krystallen erhalten und in der gleichen Weise wie für den unlöslichen Proteinstoff identificirt worden.

Ich hoffe, dass es mir gelingen wird, grössere Mengen von den Proteinstoffen zu sammeln, um die Spaltungsprodukte näher qualitativ und quantitativ untersuchen zu können.

Verdauungsversuche mit Diastase.

Da man die proteinartige Natur der Diastase vermuthen konnte, so war es angezeigt, die Wirkung der verdauenden Agentien auf Diastase zu prüfen. Zu diesem Zwecke habe ich zuerst Versuche mit Natronlauge und Salzsäure angestellt, um zu bestimmen, in welcher Concentration diese Agentien für Diastase unschädlich sind.

1) Hoppe-Seyler's Zeitschrift 21 B. 296.

In drei Probirgläschen wurden gleiche Volumina von der Lösung des Präparates II gebracht, in eins von diesen Probirgläschen das gleiche Volumen von 1%iger, in das zweite von 0,1%iger und in das dritte das gleiche Volumen Wasser zugesetzt. Nach achtstündigem Erwärmen auf 40° wurde mit verdünnter Salzsäure genau neutralisirt, in jedem Gläschen ein paar Tropfen Stärkelösung zugefügt und über Nacht bei 40° stehen gelassen. Im ersten Probirgläschen fand keine Spaltung statt und im zweiten eine nur wenig schwächere, wie im dritten. Daraus folgt, dass 0,5%ige Natronlauge auf Diastase zerstörend wirkt, 0,05%ige aber nicht. Dann habe ich 0,05%ige Lauge mit dem gleichen Volumen Diastaselösung gemischt, dazu ein paar Tropfen einer wirksamen Trypsinlösung zugefügt und konnte nach 8 Stunden constatiren, dass das Trypsin in einer ca. 0,02%igen Natronlauge auf Diastase nicht gewirkt hat, weil diese Flüssigkeit nach der Neutralisation Stärkelösung stark spaltete. Um die Wirkung der Salzsäure auf Diastase zu prüfen, habe ich 0,28%ige, 0,028%ige und 0,014%ige Salzsäure in gleichen Volumen mit 1%iger Lösung des Präparates IV gemengt, nach 24stündigem Stehen bei 40° neutralisirt und mit Stärkelösung auf ihre Wirksamkeit geprüft. Alle Proben waren diastatisch wirksam, nur die erste wirkte schwach. Es hat sich demnach erwiesen, dass in den zwei letzten Proben die Diastase nicht angegriffen wurde. Dann habe ich in zwei Probirgläschen 0,028%ige und 0,014%ige Salzsäure mit gleichen Volumen 1%iger Lösung des Präparates IV gemengt, dazu je zwei Tropfen einer stark wirksamen 5%igen Pepsinlösung zugefügt, 48 Stunden bei 40° stehen gelassen, neutralisirt und mit Stärkelösung 8 Stunden bei 40° gehalten. Mit Fehling'scher Lösung entstand keine Reduction, was darauf hinweist, dass die Diastase zerstört wurde.

Aus diesen vorläufigen Versuchen, welche auch die Beobachtungen von anderen Autoren bestätigen, können wir den Schluss ziehen, dass Diastase in sehr schwach alkalischer Lösung durch Trypsin nicht zerstört, in sehr schwach saurer Lösung durch Pepsin aber wohl zerstört wurde.

Was ist Diastase?

Wie ich gezeigt habe, wird die wirksame Substanz meiner Diastasepräparate durch Brücke'sches Reagens gefällt. Aus dem Niederschlage vermochte ich nur eine Proteinsubstanz zu isoliren. Ich habe ferner gezeigt, dass die wirksame Substanz meiner Präparate nicht dialysirbar war und durch Magnesiumsulfat ausgesalzen wurde. Hält man alle diese Beobachtungen zusammen, so muss man zu der Ansicht kommen, dass Diastase ein Proteinstoff ist. Das Verhalten der Diastase gegen Pepsin spricht auch für ihre Proteinatur.

Man wird vielleicht noch einwenden, dass einem an und für sich unwirksamen Proteinstoffe äusserst kleine Mengen des wirklichen Enzyms anhafteten. Gesetzt aber, dass es so wäre, so würde doch dieses wirkliche Enzym durch Brücke'sches Reagens vollständig ausfällbar, durch Magnesiumsulfat ausalzzbar, nicht dialysirbar und von gleichem Verhalten gegen Weingeist wie der gefundene Proteinstoff sein, mit einem Worte, es würde, wenn nicht derselbe, so doch ein dem von mir nachgewiesenen Proteinstoffe sehr ähnlicher Körper sein. Sollten diese Gründe nicht überzeugend sein, so müssten wir mit Arthus¹⁾ zum Schlusse gelangen, dass Enzyme unfassbar sind, dass sie keine Stoffe, sondern nur Eigenschaften der Stoffe sind. Wenn dies aber von einem gewissen speculativen Standpunkte aus auch richtig sein könnte, so ist doch der beschriebene Proteinstoff ein Träger der enzymotischen Kräfte und wir können diesen Träger mit dem Namen «Diastase», «Enzym», bezeichnen.

Man hat oft gegen die Vermuthung, dass Enzyme Proteinstoffe sind, einige von Brücke mit dem Pepsin gemachten Erfahrungen als Beweis angeführt. Ich habe schon oben (S. 201) gezeigt, dass die von Brücke benutzte Adsorbirbarkeit, wenn sie auch für Enzyme charakteristisch ist, diesen Körpern doch nicht in so hohem Grade eigen ist, wie es Brücke vermuthet hat. Brücke hat Pepsinlösungen erhalten, die nur undeutliche Eiweissreactionen gaben. Er hat aber die Anwesenheit des

¹⁾ l. c.

Pepsins nur durch seine verdauende Wirkung constatirt und diese Wirkung auch nicht quantitativ gemessen. Wir werden gleich sehen, dass bei sehr grosser Verdünnung Enzyme nur ihre spaltenden Eigenschaften aufweisen, weil diese Reaction die empfindlichste ist, sodass, wenn bei der fortschreitenden Verdünnung alle anderen Reactionen versagen, diese Wirkung noch hervortritt. Es macht dann auf uns den Eindruck, als ob in der Lösung kein Proteinstoff mehr, sondern nur ein Enzym enthalten sei. Im Folgenden ist ein überzeugender Beweis dafür beschrieben. Ich habe bei der Darstellung der Diastase ein Präparat dialysirt und dabei bemerkt, dass die dialysirte Flüssigkeit diastatisch wirkte, wahrscheinlich nur deshalb, weil unsichtbare Oeffnungen im Pergamentpapiere vorhanden waren, und ich wollte mich überzeugen, ob viel Substanz auf diese Weise verloren gegangen war. Die äussere Flüssigkeit gab aber keine Proteinreactionen. Als ich jedoch ein halbes Liter dieser Flüssigkeit eindunstete, blieb ein kleiner Rückstand, der Millon'sche und Xanthoproteinreaction gab, die Biuretreaction war undeutlich; dies ist aber mit dem ursprünglichen Präparate auch der Fall gewesen. Also konnte die Proteinsubstanz in dieser diastatisch wirkenden Flüssigkeit durch ihre gewöhnlichen Reactionen nicht nachgewiesen werden.

Wir schliessen die Diskussion mit den eigenen Worten von Brücke.¹⁾ Die von ihm erhaltene Pepsinlösung gab keine Xanthoprotein-, Liebermann'sche und Pettenkofer'sche Reaction; «vom Platinchlorid wurde sie deutlich getrübt und stärker noch durch basisches und durch neutrales essigsaures Blei.» «Man kann gegen diese Versuche einwenden, dass man ja nicht wisse, in wie kleinen Quantitäten das Pepsin wirksam sei, und deshalb auch nicht wissen könne, ob es in der untersuchten Flüssigkeit trotz ihrer Wirksamkeit nicht in so geringer Menge vorhanden war, dass es sich durch chemische Reagentien nicht nachweisen liess. Ich muss die Berechtigung dieses Einwurfs um so mehr anerkennen, als ich direkt durch Auflösung des

¹⁾ Beiträge zur Lehre von der Verdauung. Sitzungsber. d. Wien. Akad. 43 B. 607.

Spitzbeutelinhalt in überschüssiger Phosphorsäure oder in Salzsäure, oder durch Zerlegen desselben mit Oxalsäure Flüssigkeiten gewonnen habe, von denen ein Tropfen in 5 cem. Wasser vertheilt, eine hineingeworfene Fibrinflocke binnen 10 Minuten löste».

Eigenschaften der Diastase.

Wenn ich jetzt die aus der ganzen Untersuchung erhaltenen Erfahrungen über die Eigenschaften der Diastase zusammenstelle, so komme ich zu dem Resultate, dass Diastase im Wasser schwer löslich ist, leicht quillt und opalisirende, schwer filtrirbare, durch die Tonzelle nur theilweise durchgehende und nicht dialysirbare Lösungen bildet. Die durch die Tonzelle filtrirte Lösung ist nicht opalisirend. Die meisten Niederschläge, welche mit der Diastaselösung durch verschiedene Agentien erhalten werden, sind gequollen und nur schwer filtrirbar. Diese Eigenschaft scheinen auch die anderen Enzyme zu besitzen. Im 45^o/oigen, meistens auch im 50^o/oigen Alkohol ist sie löslich und durch 60—70^o/oigen fällbar. Die Löslichkeit im Alkohol hängt vom Salzgehalte der Flüssigkeit ab. Je weniger Salze sie enthält, desto schwieriger wird die Diastase ausgefällt. Dieselbe Erscheinung bemerken wir auch bei den anderen Enzymen. Diastase gibt eine deutliche Millon'sche Reaction, gibt sehr leicht, schon in der Kälte, Xanthoproteinreaction, gibt Liebermann'sche Reaction, mit Essigsäure und Ferrocyanat eine Trübung, mit Salpetersäure eine solche, die im Ueberschusse der Säure löslich ist. Mit Sublimat gibt sie eine Trübung, die in der Kochsalzlösung löslich ist, mit Bleizucker keinen Niederschlag, mit Bleiessig nur eine geringe Trübung, mit Phosphorwolfram- und Phosphormolybdänsäure gibt sie flockige Niederschläge, ebenfalls mit Tannin. Mit Quecksilberkaliumjodid fällt sie in Form einer gequollenen Verbindung nieder. Diastase ist mit Magnesiumsulfat und Ammoniumsulfat aussalzbar. Sie koagulirt beim Kochen nicht, wird mit Essigsäure in der Kälte und in der Wärme nicht ausgefällt, durch verdünnte Salzsäure wird sie beim Kochen ausgefällt, kalt nur dann, wenn die Salzsäure nicht zu ver-

dünnt ist. Diastase wird durch sehr verdünnte Säuren und Alkalien nicht angegriffen, das Trypsin wirkt auf sie nicht, dagegen das Pepsin zerstört ihre Wirksamkeit.

Allen diesen Eigenschaften nach steht Diastase den Albumosen ziemlich nahe, was auch nach den Ergebnissen der zuverlässigeren Arbeiten für manche anderen Enzyme gilt.

Kritische Bemerkungen.

Bei Durchsicht der betreffenden Litteratur begegnen wir zahlreichen Mittheilungen über Diastase, wir finden viel Werthvolles darin, daneben treffen wir aber auch ganz irreführende Angaben, und in keiner Arbeit finden wir einen experimentellen Beweis für die proteinartige Natur der Diastase. Wir werden jetzt einen kurzen Ueberblick über diese Angaben im Lichte der vorliegenden Forschung geben, wobei sich zeigen wird, dass keiner von den Forschern, die mit Darstellung von Diastase beschäftigt waren, eine Trennung derselben von dem beigemengten Arabane durchgeführt hat. Man begegnet ja keiner Angabe über Existenz dieses Polysaccharids. Es folgt aus den Angaben, die ich in der Einleitung über die von den verschiedenen Forschern angewendeten Darstellungsmethoden angegeben habe, dass in allen ihren Präparaten ein Gemenge von mindestens zwei Körpern, der Diastase und des Arabans, vorhanden sein müsste. Da im Allgemeinen das Ausziehen und Fällen mit Alkohol, das Aussalzen, Dialysiren, Fällen mit dem Calciumphosphat und Behandeln mit Bleiessig bei der Darstellung angewendet wurden, so folgt aus meinen Versuchen über diese Methoden, dass alle bis jetzt erhaltenen Diastasepräparate kaum reiner als diejenigen, welche ich ursprünglich (S. 181) erhalten und analysirt habe, sein konnten.

Payen und Persoz¹⁾, von denen die Bezeichnung «Diastase» stammt, haben bei den wiederholten Fällungen mit

¹⁾ l. c.

²⁾ Payen et Pesoz. Mémoire sur l'amidone (substance intérieure de la fécule) et suite de recherches sur la diastase. Ann. de chim. et de pharm. (2). 56. 1834 J. 337. — «Les solutions du tannin en pro-

Alkohol einen Theil der Diastase in unlöslichen Zustand übergeführt. Das Araban löste sich mit Diastase im Wasser und wurde mit dem Alkohol wieder mitausgefällt, so dass diese Autoren schliesslich stickstoffarme Präparate erhielten, die ähnlich wie mein Präparat A zum grössten Theil aus dem Araban bestehen mussten. Deshalb haben sie den Schluss gezogen, dass Diastase stickstofffrei sei. Die von ihnen beschriebenen Eigenschaften der Diastase stimmen mit denjenigen meines Präparates A überein. Sie haben schon bemerkt, dass «Diastase mit Bleiessig nicht gefällt wird» (S. 75). Ihre Beobachtung, dass Diastase mit Tannin gefällt wird,¹⁾ wurde später von Jentys¹⁾ und jetzt von mir bestätigt. Auch ihre Beobachtung über Verhalten der Diastase gegen Thierkohle stimmt mit der meinigen ziemlich überein.²⁾

Das «Maltin» von Dubrunfaut³⁾ musste zweifellos auch ein durch Araban verunreinigtes Präparat der Diastase sein, was wir aus dem Befunde dieses Autors ersehen, dass mehrmals mit Alkohol umgefälltes Enzym immer weniger wirksam wurde und jedesmal einen ungelösten Theil zurückliess, welcher stark wirksam war. «Die löslichen Präparate enthielten 6—7 % Stickstoff.» «Ohne Zweifel war es diese Thatsache, durch welche die Entdecker des Diastas irre geführt worden waren, als sie die Beobachtung aufstellten, dass das vollkommen gereinigte Diastas stickstofffrei sei.» Das «Maltin» wirkte stärker als «Diastase» von Payen und Persoz, weil es mehr vom

portions suffisantes paralysent complètement la réaction de la diastase, aussi ne s'en trouve-t-il que très peu ou point dans les parties des végétaux ou s'accomplit la transformation de la fécule» (S. 340).

1) Stefan Jentys. O przeszkodach utrudniających wykrycie diastazy w liściach i Lodygach. Rozpr. Akad. Umiejtn. Krak. 1893.

2) «Les solutions brutes contenant de la diastase peuvent être épurées non seulement par une température de 75° centésimaux, qui coagule certaines matières organiques, mais encore par une filtration sur le charbons d'os, qui élimine les substances colorantes sans précipitée la diastase ni le sucre, ni la gomme, produits de sa réaction» (S. 368).

3) l. c.

wirklichen Enzyme wegen der kürzeren Behandlung mit Alkohol enthielt.

Was die Erfahrungen Cohnheim's¹⁾ anbetrifft, welcher nach Brücke'scher Methode gearbeitet hat, so sehen wir jetzt klar, dass er sehr verdünnte Diastaselösung unter den Händen hatte und nur deshalb «keine Eiweissreactionen» bekam. Nach dieser Methode hat Sundberg²⁾ ein anderes Enzym, nämlich Pepsin, darstellen wollen und bekam eine Lösung, welche zwar verdauend wirkte, aber «keine Reactionen gab». Er schliesst daraus, dass Pepsin kein Eiweissstoff sei, nachdem aber diese Lösung mit 5—6 Volumen Alkohol gefällt wurde, bekam er einen kleinen Niederschlag, welcher, auf dem Platinspatel verbrannt, einen Geruch nach verbrennendem Horne verbreitete.

Bei Zulkowsky³⁾ löste das Glycerin wahrscheinlich neben der Diastase das Araban aus dem Malze auf. Die wiederholten Fällungen mit Alkohol haben einen Theil der Diastase unlöslich gemacht, so dass Zulkowsky zu immer stickstoffärmeren Präparaten gelangte, welche «weder Eiweiss- noch Peptonreactionen zeigten». Es ist interessant, dass auch Zulkowsky bemerkt hat, dass nach jeder Fällung mit Alkohol ein Theil des Niederschlages unlöslich blieb. Was für Eiweissreactionen Zulkowsky machte, ersehen wir aus seiner Abhandlung nicht. Wenn es Biuretreaction war, so ist es ersichtlich, dass dieselbe durch das ohne Zweifel in grosser Menge in den Zulkowsky'schen Präparaten vorkommende Araban verdeckt wurde, wie es auch bei meinen Präparaten der Fall war. Die von Zulkowsky bei der Ausschüttlung des Malzauszuges mit Aether erhaltene gallertartige Masse bestand zweifellos auch aus einem Gemische. Ich habe eine Lösung meines Präparates I mit Aether ausgeschüttelt und bekam dabei in der Grenzschicht der beiden Flüssigkeiten eine gallertartige Emulsion, die jedoch aus einer Mischung der Diastase mit dem Arabane bestand. Diese Emulsion entsteht nur in ziemlich concentrirten Lösungen

1) l. c.

2) Ein Beitrag zur Kenntniss des Pepsins. Hoppe-Seyl. Zeitschr. 9 B. 319.

3) l. c.

und ihre Entstehung hängt augenscheinlich davon ab, dass in solchen Lösungen weder Araban noch Diastase vollständig gelöst, sondern theilweise im Zustande einer sehr starken Quellung sich befinden, und dieser Theil wird dann durch die Aetheremulsion abgetrennt. Eine ähnliche Erscheinung beobachtete ich beim Schütteln einer ziemlich concentrirten Caseinlösung mit Aether.

Lintner'sche¹⁾ Präparate waren auf ähnliche Weise wie mein Präparat A dargestellt und ihre Zusammensetzung musste demnach eine ähnliche sein. Sie enthielten wenig Stickstoff und Lintner hat deshalb Diastase für verschieden von den Eiweisskörpern gehalten, ohne zu wissen, dass der grösste Theil seiner Präparate aus einem Kohlenhydrate bestand.

Loew²⁾ hat ganz richtig behauptet, dass Diastase ein Proteinkörper ist, einen Beweis dafür hat er aber nicht gebracht. Er hat nämlich die Würz'sche Methode angewendet, die für das Papayotin gute Dienste geleistet hat, für die Diastase aber keinen Nutzen bringen konnte. Würz hat mittelst Bleiacetat Papayotin von den anderen Proteinstoffen getrennt. Die Proteinstoffe sind meistens, wie bekannt, mit dem Bleiacetat fällbar, Papayotin dagegen nicht. Die Diastase ist auch mit diesem Reagens nicht fällbar, es ist aber auch der Fall mit dem sie verunreinigenden Kohlenhydrate. Es ist demnach folgender Satz, welchen Loew in einer Polemik gegen Lintner gebraucht, nicht ganz zutreffend. Er sagt: «Meine Erfahrung hat mir ebenfalls gezeigt, dass bei Anwendung der nöthigen Cautelen diese Methode (Bleiessig) ein vorzügliches Resultat liefert, und Lintner's Misserfolg muss auf einem nicht genügend beachteten schädlichen Nebenumstand beruhen.»³⁾ Loew hat ohne Zweifel ähnliche Gemenge unter den Händen gehabt, wie es mein Präparat A darstellt, welches auch die Eiweissreactionen gibt.

Befunde von Kirchhof,⁴⁾ Bouchardat, Claud Ber-

¹⁾ Ueber die chemische Natur der vegetabilischen Diastase. Pfl. Arch. 40 B. 311.

²⁾ l. c.

³⁾ O. Loew, Berichtigung. Berichte d. deutsch. chem. Ges. 20 B. 58.

⁴⁾ l. c.

nard,¹⁾ Seegen und Kratschmer, dass verschiedene eiweissartige Körper diastatisch wirken, sind nicht beweisend, weil man den Einwurf machen kann, dass an der verzuckernden Wirkung ihrer Lösungen Infection durch Bacterien schuld war.

Die Beobachtungen von Brown und Heron²⁾ über die Coagulation der Diastase beziehen sich offenbar auf die die Diastase verunreinigenden Eiweissstoffe, weil, wie wir wissen, Diastase selbst durch Kochen ihrer Lösung nicht coagulirt wird.

Hirschfeld³⁾ hat dieselbe Darstellungsmethode wie Loew angewendet und daher muss er ein Gemisch von Araban mit der Diastase unter den Händen gehabt haben. Er ist aber zum entgegengesetzten Resultate wie Loew gelangt. Er erklärt die Diastase für ein Kohlenhydrat. Bei dem Vergleiche der beiden Abhandlungen von Hirschfeld und Loew ersehen wir auf's Deutlichste, dass beiden ein Gemisch eines Kohlenhydrats mit einem Proteinkörper vorliegen musste. Hirschfeld hat seine Diastasepräparate als aus Landwehr's Thiergummi bestehend betrachtet. Wir wissen jetzt, dass der Haupttheil seiner Präparate aus dem von mir entdeckten Araban bestehen musste. Dies ist aber keine Diastase, und ob es mit Landwehr'schem Thiergummi übereinstimmend ist, können wir nicht sagen, weil es überhaupt ganz unklar ist, was das Landwehr'sche Thiergummi sein soll. Landwehr hat nur wenige Eigenschaften seiner Präparate beschrieben und keine Spaltungen derselben gemacht. Die einzige von ihm angegebene «charakteristische» Reaction mit Kupfersalzen wird thatsächlich auch vom Araban gegeben, sie gelingt aber auch mit manchen anderen Polysacchariden. Wenn wir eine Lösung dieses Pentosans mit einer kleinen Menge von Kupfersalzlösung und dann mit Natronlauge versetzen, so bildet sich ein hellblauer Niederschlag, der sich im Ueberschusse von Natronlauge nicht löst und sich beim Kochen nicht schwärzt.⁴⁾

¹⁾ l. c.

²⁾ l. c.

³⁾ l. c.

⁴⁾ Man vergleiche auch in Bezug auf Thiergummi die Abhandlung von Folin. Diese Zeitschrift Bd. 23 S. 347.

Die Anschauung von Wortmann, dass Enzyme die vom lebenden Protoplasma abgefallenen «Splitter» sind,¹⁾ die auch für sich allein fähig sein können, Stärke zu spalten, indem die Enzymwirkung hauptsächlich dem Protoplasma zugeschrieben wird, kann vielleicht in gewisser Deutung berechtigt sein. Es ist sehr möglich, dass Enzyme, als chemische Stoffe, einen von den Bestandtheilen des Protoplasmas bilden, wo sie mit den anderen Stoffen lose gebunden sind; vom Protoplasma abgetrennt lösen sie sich in den Cellularsäften. Diese Anschauung erweitert aber unsere Kenntnisse über Enzyme nicht viel und besonders deshalb, weil wir nicht wissen, was vom Protoplasma im chemischen Sinne zu denken ist. Jedenfalls kann der Satz, dass «Stärkemehl meistens direkt vom Protoplasma ohne jede Betheiligung von Diastase in Lösung gebracht wird», nicht berechtigt sein.

Es ist auffallend, dass bei Osborne das Araban mit Ammoniumsulfat nicht ausgefällt wurde, während es bei mir mit Ammoniumsulfat und auch schon mit Magnesiumsulfat niederfällt. Jedenfalls konnte Osborne nach seiner Darstellungsmethode reine Diastase nicht in den Händen haben, was schon daraus ersichtlich ist, dass seine «Diastase» bei 58° coagulierte, während dieses Enzym auch beim Sieden seiner Lösungen nicht coaguliert wird. Auf diese Coagulirbarkeit seiner Präparate und Löslichkeit der Diastase im verdünnten Alkohol gestützt, hält er Diastase für identisch mit Leucosin, einem pflanzlichen Albumin.²⁾

1) «Splitter» vom Protoplasma können nicht in einer Flüssigkeit vorhanden sein, welche durch eine Tonzelle filtrirt wurde, wie z. B. eine von meinen Diastaselösungen. — Vergl. Buchner. Ber. d. deutsch. chem. Ges. 30 B. 1110.

2) «Leucosin is intimately associated with diastase. Heated to 50°, solutions of this proteid become turbid, and at 58° a flocculent coagulum occurs. Coagulation, however, is incomplete unless the solution is heated for some time and the temperature raised to about 70°. Saturation with sodium chlorid partly precipitates leucosin.» T. B. Osborne and George F. Campbell. The proteids of malt. Rep. of connect. Agric. exper. Stat. 1895 (S. 252). — «Although in general the diastatic power of my preparations was greater the larger the amount of coagulabel

Aus diesem kurzen Ueberblicke ersehen wir, dass die Proteinnatur der Diastase von einigen Forschern vermuthet, aber experimentell bis jetzt nicht nachgewiesen wurde.

Schluss.

Am Schlusse dieser Mittheilung fasse ich die Ergebnisse meiner Forschung kurz zusammen.

Es wurde bewiesen, dass ein Begleiter der Diastase im Malze, der in allen bis jetzt dargestellten Diastasepräparaten vorhanden gewesen sein, ja den grössten Theil derselben gebildet haben muss, ein diastatisch unwirksames Polysaccharid — Araban — ist.

Es wurde bewiesen, dass Diastase ein Proteinstoff ist und dass sie unter den bekannten Proteinstoffen am nächsten den Albumosen steht.

Es wurde eine genaue und bequeme Methode zur Bestimmung der diastatischen Wirksamkeit gefunden, die bei chemischen und pflanzenphysiologischen Arbeiten Nutzen bringen kann.

Es wurde eine einfache Darstellungsmethode der löslichen Stärke, des für die Bestimmung der diastatischen Wirksamkeit von mir benutzten Materials, ausgearbeitet.

Es wurde bewiesen, dass verdünnte Kalilauge ähnlich der Diastase, wenn auch viel langsamer, auf mehrere Kohlehydrate hydrolytisch spaltend wirken kann.

Die hier beschriebene Untersuchung wurde auf Kosten der in Warschau befindlichen «Mianowski'schen Unterstützungskasse für wissenschaftliche Forscher» ausgeführt.

Zürich. Agrikulturchemisches Laboratorium des Polytechnikums.

albumine they contained» (S. 205). «It is to be concluded that the diastatic enzyme is most closely related to the albumin, named leucosin» (S. 207). Report of the Connect. Agric. exper. Stat. 1895. — «It was always possible to roughly judge of the diastatic power of a preparation, by heating a portion of its solution to 65° C. and observing the amount of coagulum formed» (S. 238). B. Osborne. The chemical nature of diastase. Rep. of the Connectic. Agric exper. Stat. 1894.

Im Folgenden gebe ich noch die Titel einiger Abhandlungen an, welche bei den Studien über Diastase in Betracht kommen können; die meisten derselben sind von mir berücksichtigt, aber in dieser Mittheilung nicht citirt worden.

- Baraniecki, J. Die stärkeumbildenden Fermente in der Pflanze. 1878. Leipzig.
- Barth, M. Zur Kenntniss des Invertins. Ber. d. deutsch. ch. Ges. 11 B. 474.
- Baswitz, M. Zur Kenntniss der Diastase. Ber. d. deutsch. ch. Ges. 11 B. 1443.
- Bourquelot. Sur l'identité de la diastase. C. r. de la Soc. biolog. 1885.
- — Sur quelques points relatifs à l'action de la salive sur le grain d'amidon. C. rend. 104 Vol. 71.
- — Sur la composition du grain d'amidon. C. r. 104 Vol. 177.
- — Sur les caractères de l'affaiblissement éprouvé par la diastase sous l'action de la chaleur. C. r. 104 Vol. 576.
- Brasse, L. Sur la présance de l'amylase dans les feuilles. 99 Vol. 878.
- Chapoteaux, P. Sur le suc gastrique. C. r. 94 Vol. 1722. — C. r. 95 Vol. 148.
- Cripps. Bestimmung der diastatischen Kraft von Malzextract. Ref. in chem. Ctbl. 1890 I. 324.
- Cuisinier, L. Die Glykose und die Verzuckerung des Stärkemehls. Ref. in chem. Ctbl. 1886. 614.
- Defresne, Th. Etudes comparatives sur la ptyaline et la diastase. C. r. 89 Vol. 1070.
- Detmer, W. Ueber den Einfluss verschiedener Substanzen auf Pflanzenzellen. Landw. Jhrb. 10.
- Donath, Eduard. Ueber den invertirenden Bestandtheil der Hefe. Ber. d. deutsch. chem. Ges. 8 B. 795.
- Dumas. Sur les ferments appartenants au groupe de la diastase. C. r. 75 Vol. 295.
- Epstein, Wilhelm und Müller, Julius. Ueber den Einfluss der Säuren und Alkalien auf das Labferment. Ber. d. deutsch. chem. Ges. 8 B. 679.
- Erlenmeyer. Sitzungsber. Münchn. Akad. 1874.
- Fluhrer, W. Die Diastase. 1870. München.
- Géduld, R. Ein neues Enzym, die Glykose. Wochenschr. f. Braüwes. 8.
- Green. On vegetable Ferment. Ann. of botany. 7.
- Gorup Besanez. Ueber das Vorkommen eines diastatischen und peptonisirenden Fermentes in den Wickensamen. Ber. d. deutsch. chem. Ges. 7 und 8.
- Haberlandt, G. Die Kleberschicht des Gras-Endosperms als diastaseausscheidendes Drüsengewebe. Ber. d. deutsch. botan. Ges. 8.
- Hansen, A. Ueber Fermente und Enzyme. Arb. d. bot. Inst. Würzb. 3.
- Hüfner, G. Zur Lehre von den «katalytischen Wirkungen». J. pr. ch. (2) 10 B. 148. 387.

- Jacobsohn, John. Untersuchungen über lösliche Fermente. Diese Zeitschr. 16 B. 340.
- Kjeldahl. Recherches sur les ferments producteurs du sucre. C. r. laborat. de Carlsberg. 1879.
- Kossmann. Recherches chimiques sur les fermentes contenus dans les végétaux. Bull. de la soc. chim. de Paris. 27.
- Krabbe, G. Untersuchungen über das Diastaseferment unter specieller Berücksichtigung seiner Wirkung auf Stärkekörner innerhalb der Pflanze. Prngsh. Jhrb. 21.
- Krauch, C. Beiträge zur Kenntniss der ungeformten Fermente im Pflanzenreiche. Landw. Versuchsst. 23.
- Lindet, L. Observations sur la saccharification par la diastase. C. rend. 108 B. 453.
- Lintner und Eckhardt. Studien über Diastase. Zeit. Brauwes. 12 B. 389. Journ. pr. ch. 41 B. 91.
- Lintner, C. J. Entstehung von Dextrose aus Stärke. Zeitschr. f. ges. Brauwes. 15.
- Loew, O. Einige Bemerkungen über Enzyme. J. pr. ch. 37 B. 101.
- — Notiz über die Natur der ungeformten Fermente. Pfl. Arch. 36 B. 170.
- Marckwort, E. und G. Hüfner. Ueber ungeformte Fermente und ihre Wirkungen. J. pr. Ch. (2). 11.
- Märker. Standpunkt unserer Kenntniss über die diastatischen Vorgänge. Ref. in Chem. Ctbl. 1878. 559.
- Nasse, Otto. Bemerkungen zur Physiologie der Kohlehydrate. Pfl. Arch. 14 B. 473.
- — Untersuchungen über die ungeformten Fermente. Pfl. Arch. 11 B. 136.
- Payen. Réaction de la diastase sur la substance amylacée dans différentes conditions. Ann. ch. et phys. (4) 4 Vol. 286.
- — Extraction et propriétés de la diastase. C. r. 66 Vol. 460.
- — Ueber die Einwirkung der Diastase auf das Stärkemehl unter verschiedenen Umständen. Dingl. polyt. Journ. 178 B. 69.
- — Note sur le dernier mémoire de M. Guérin-Varry. Ann. chim. et phys. (2) 60.
- — Amidon, dextrine et tissus ligneux. Ann. ch. et phys. (4). 7 Vol. 382.
- Reychler, A. Ueber künstliche Diastase. Ber. d. deutsch. chem. Ges. 22 B. 414.
- Schärtler, L. Diastase. Časop. česk. lékár. 6. 95. Ref. in Chem. Ctbl. 18 B. 534.
- Schulze, E. Ueber Maltose. Ber. d. deutsch. chem. Ges. 7.
- Schulz, C. Beiträge zur Geschichte des Glykogens. Diss. Berlin 1877.
- Schützenberger. Les fermentations 1896. Paris.
- Schwarzer, A. Ueber die Umwandlung der Stärke durch Malzdiastase. Dingl. polyt. Journ. 198 B. 321.

Wittich, v. Ueber eine neue Methode zur Darstellung künstlicher Verdauungsflüssigkeiten. Pfl. Arch. 2 B. 193.

— — Weitere Mittheilungen über Verdauungsfermente. *ibid.* 3 B. 339.

— — " *ibid.* 5 B. 435.

Wurtz, Ad. Sur la papaïne. Contribution à l'histoire des ferments solubles. C. r. 90 Vol. 1379.

— — Sur la papaïne. Nouvelle contribution à l'histoire des ferments solubles. C. r. 91 Vol. 787.

Wurtz, Ad. et Bouchat, E. Sur le ferment digestif du carica papaya. C. r. 89 Vol. 425.