

Über fermentative Fettspaltung.

Von

E. Hoyer.

(Aus dem wissenschaftlichen Laboratorium der Vereinigten Chemischen Werke, Aktiengesellschaft, Charlottenburg, im November 1906.)

(Der Redaktion zugegangen am 18. Dezember 1906.)

1. Untersuchungen über Säurewirkung.

Wenn man Ricinussamen mit Wasser zerreibt und die entstandene Samen-Ölemulsion (Samenmilch) mehrere Tage sich selbst überläßt, «beobachtet man nach einiger Zeit ein plötzliches, sprungweises, rapides Ansteigen der Säuremenge»,¹⁾ wobei das im Ricinussamen enthaltene neutrale Öl in Ricinusölsäure und Glycerin zerlegt wird. Diese vor etwa 4 Jahren gemachte erste Beobachtung war bekanntlich der Ausgangspunkt für die Erforschung der Fettspaltung mittels des in Pflanzensamen, speziell im Ricinussamen enthaltenen lipolytischen Fermentes, welches seitdem von mehreren Seiten²⁾ bearbeitet sich

¹⁾ Vergl. Connstein-Hoyer-Wartenberg, Ber. der Deutschen chem. Ges., Bd. XXXV, S. 3988 (1902).

²⁾ Vergl. Braun und Behrendt, Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXVI, S. 1142 und 1900 (1903); Braun, ebenda, Bd. XXXVI, S. 3003 (1903).

Fokin, Journ. russ. phys.-chem. Ges., Bd. XXXV, S. 831 u. 1197; Chem. Revue, Fett- und Harz-Ind., Bd. XI, S. 91 u. ff., Bd. XIII, S. 130 u. ff. Lami, Boll. Chim. Farm., Bd. XLIII, S. 385 u. 607.

Nicloux, Comptes-rendus de l'Acad. des sciences, Bd. CXXXVIII, S. 1112, 1175, 1288, 1352 (1903); CXXXIX, S. 143 (1904).

Urbain-Saugon, C. rend. de l'Acad. des sciences, Bd. CXXXVIII, S. 1291 (1904); Urbain, ebenda, Bd. CXXXIX, S. 606 (1904); Urbain-Perruchon-Lançon, ebenda, Bd. CXXXIX, S. 641 (1904); Urbain-Saugon-Feige, Bull. de la Soc. chim., Bd. XXXI, S. 1194 (1904).

zu einem brauchbaren technischen Fettspaltungsverfahren entwickelt hat.¹⁾

Unter den eingangs erwähnten Bedingungen setzt die fettspaltende Wirkung des Ricinussamenfermentes erst nach einiger Zeit ein, dann aber plötzlich sprungweise. «Die Ursache für das Auftreten des «Sprunges» erkannten wir darin, daß eine intensive Spaltung des Fettes in den Samen nur dann eintritt, wenn eine genügende Menge Säure zugegen ist.²⁾ Man kann nun die fettspaltende Eigenschaft des Ricinussamens sofort auslösen, wenn man dem Ansatz von vorneherein eine gewisse kleine Menge Säure oder sauren Salzes zusetzt. Diese Säuremenge ist je nach Säureart verschieden. In einer späteren Publikation von mir³⁾ sind diese Säuremengen genau festgesetzt worden, wobei es sich zeigte, daß unter den untersuchten Säuren⁴⁾ Buttersäure den weitesten Spielraum bezüglich der anzuwendenden Menge zuließ, während z. B. Schwefelsäure und Oxalsäure eine sehr genaue Einhaltung ihrer Mengenverhältnisse erforderten. Schon damals erwähnte ich, daß Untersuchungen darüber im Gange waren, eine noch geeignetere Säure als Buttersäure für Auslösung der Enzymwirkung zu finden.

Es war a priori anzunehmen, daß die geeignetste Säure sicherlich diejenige sein mußte, die von der Natur selbst zum Zwecke der Fettassimilation im Samen erzeugt wurde. Die oben erwähnte Sprungwirkung des Ricinussamenfermentes tritt, wenn man ohne künstlichen Säurezusatz arbeitet, erst nach einiger Zeit ein, d. h. erst dann, wenn eine ausreichende Menge natürlicher «Samensäure» gebildet worden ist. Es war also nur notwendig, diese «Samensäure» sich bilden zu lassen, sie

¹⁾ Deutsches Reichspatent 145 413 vom 22./IV. 02.

O. Heller, Der Seifenfabrikant, 1902, Nr. 47/48, 1903, Nr. 11; Connstein, Nr. 25, Hoyer, Nr. 45; Seifensiederzeitung 1903, Nr. 45/46; Steffen, Nr. 47, Betriebsresultate d. Seifenfabrikant, 1904, Nr. 26; Seifensiederzeitung, 1904, Nr. 26; Hoyer, Der Seifenfabrikant, 1905, Nr. 26; Seifensiederzeitung, 1905, Nr. 26—28.

²⁾ Vergl. Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXV, S. 3990 (1902).

³⁾ Vergl. Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXVII, S. 1436 (1904).

⁴⁾ Geprüft wurde die Wirkung der Schwefel-, Oxal-, Ameisen-, Essig- und Buttersäure.

zu isolieren und auf ihre Verwendbarkeit zu prüfen. Ich verfuhr hierbei wie folgt:

Versuch 1 (im März 1904).

200 g gemahlene Ricinuspreßlinge (d. i. hydraulische, kalt gepreßte, also zum größten Teil entölte Ricinussamen) werden mit 400 g einer 1^o/_oigen Chloralhydratlösung (demnach unter Ausschluß bakterieller Wirkung) im Trockenschrank bei 30—35° in verschlossener Glasstöpselflasche digeriert. Von Zeit zu Zeit werden Durchschnittsmuster gezogen, klar filtriert, je 10 ccm des Filtrates werden unter Anwendung von Phenolphthalein als Indikator mit $n/1$ -KOH titriert:

10 ccm Chloralhydratlösung verbrauchen	0	ccm $n/1$ -KOH
10 » Filtrat sofort nach dem Vermischen mit Preß-		
lingen verbrauchen	0,1	» »
10 » nach 1tägigem Digerieren verbrauchen	0,2	» »
10 » » 2 » »	0,45	» »
10 » » 3 » »	0,65	» »

Versuch 2 (am 15. 3. 04.).

200 g Ricinuspreßlinge wie oben werden mit 800 g 1^o/_oiger Chlorhydratlösung bei 35° digeriert. Von Zeit zu Zeit wird ein Teil der trüben Flüssigkeit abgegossen, filtriert, titriert; je 60 ccm Filtrat wurden mit je 200 g Leinöl und 6,6 g Ricinussamen geschält und gemahlen, zu einer Emulsion verrührt und der Spaltung überlassen:

Dauer des Digerierens der Preßlinge Tage	10 ccm Filtrat ab- neutralisiert durch Kubikzentimeter $n/1$ -KOH	Höhe der Leinölspaltung nach			
		1 Tag %	2 Tagen %	3 Tagen %	4 Tagen %
1	0,1	1,5	14	73	83
2	0,25	45	81	87	—
3	0,5	71	86	—	—

Obige Versuche beweisen, daß während des Digerierens der Ricinuspreßlinge mit Wasser sich nach und nach eine wasserlösliche Säure bildet, die, wenn sie in genügender Menge

vorhanden ist, die fettspaltende Wirkung des Ricinussamens auslöst.

Versuch 3 (am 12. 3. 04.).

300 g Ricinuspreßlinge werden wie vorher mit 700 ccm 1%iger Chloralhydratlösung während 2 Tagen bei 33° digeriert. Beim Öffnen der Flasche entweicht Kohlendioxyd, welches durch vorgelegtes Barytwasser als BaCO₃ nachgewiesen wird. Der ganze Flascheninhalt wird kolfiert, filtriert, das Filtrat¹⁾ in verschiedenen Mengen mit je 100 g Leinöl und 3,3 g Ricinussamen geschält und gemahlen verrührt und der Spaltung überlassen:

Filtrat ccm	Vermischt mit Wasser ccm	Ergaben eine Leinölsplaltung nach				
		1 Tag %	Zunahme	2 Tagen %	Zunahme	3 Tagen %
5	55	2	57	59	20	79
10	50	9	57	68	16	84
15	45	15	51	66	14	80
20	40	24	37	61	11	72
25	35	32	26	58	12	70
30	30	43	24	67	10	77
35	25	60	22	82	7	89
40	20	63	21	84	4	88
45	15	71	16	87	4	91
50	10	76	12	88	4	92
55	5	80	10	90	3	93

Das Ergebnis obiger Versuchsreihen ist nach mehreren Richtungen hin bemerkenswert: Die Spaltungsergebnisse nach 1 und 2 Tagen bilden untereinander zwei ziemlich gleichmäßig aufsteigende arithmetische Reihen, während die Spaltungszunahmen vom 1. zum 2. Tage und vom 2. zum 3. Tage zwei regelmäßig abnehmende arithmetische Reihen ergeben, mit anderen Worten: bei Anwesenheit von sehr wenig Säure verläuft

¹⁾ 10 ccm des Filtrates wurden durch 0,55 ccm n/1-KOH neutralisiert.

die Ölspaltung zunächst sehr langsam, erst am 2. Tage tritt der «Sprung» ein, wenn nämlich der Ricinussamen die ihm noch fehlende Menge Säure ergänzt hat. Damit ist gleichzeitig eine völlige Aufklärung des «Sprunges» selbst gegeben. Die Kurve der Spaltungshöhe nach 1 Tage ist bis zuletzt, d. h. bis zur höchsten angewandten Säuremenge hin ansteigend. In dem folgenden Versuche wird zur weiteren Aufklärung der Frage, ob höhere Säuremengen nicht einen noch höheren Spaltungseffekt ergeben würden, die Versuchsreihe weiter fortgeführt:

Versuch 4 (am 30. 3. 04.).

200 g Ricinussamenpreßlinge werden wie vorher mit 1000 g 1%iger Chloralhydratlösung bei 33° digeriert. Täglich vorgenommene Titrationen von Flüssigkeitsproben zeigen die übliche Säurezunahme.

10 ccm des Filtrates	am 2. Tage	abneutralisiert	durch	0,15 ccm	$n/1$ -KOH
10 » » » »	3.	»	»	0,2	» »
10 » » » »	4.	»	»	0,45	» »

Nun wurde die ganze Masse filtriert, vom Filtrat verschieden große Mengen mit je 100 g Leinöl und 3,3 g Ricinussamen geschält und gemahlen, verrührt und der Spaltung überlassen:

Filtrat ccm	Vermischt mit Wasser ccm	Leinölspaltung nach 22 Stunden %
40	40	61
45	35	71
50	30	79
55	25	81
60	20	82
65	15	84
70	10	84
75	5	84
80	—	84
120	—	84

(Nach 6 Tagen war die Leinölspaltung aller Ansätze auf 97% gestiegen.) Die Versuchsreihe lehrt, daß, wenn bei einer gewissen Säuremenge¹⁾ der optimale Spaltungseffekt erreicht ist, höhere Säuremengen einen begünstigenden Einfluß auf die Höhe der Spaltung nicht mehr haben; aber auch die höchste untersuchte Säuremenge schadet noch in keiner Weise. Mit anderen Worten die hier benutzte «Samensäure» ist in der Tat ganz besonders zur Auslösung der Spaltungen geeignet. Wodurch diese Samensäure entsteht, darüber gibt der folgende Versuch Auskunft:

Versuch 5 (am. 24. 7. 04.).

I. 200 g Ricinussamenpreßlinge wie vorher werden mit 500 g 1%iger Chloralhydratlösung bei 30—35° digeriert.

II. Ein zweiter gleich zusammengesetzter Ansatz wird zunächst 1/2 Stunde in siedendem Wasser erhitzt, sodann nach dem Abkühlen wie der obige bei 30—35° digeriert. Aus beiden werden von Zeit zu Zeit Proben gezogen, filtriert und titriert, je 10 ccm der Filtrate werden neutralisiert durch ccm $n_{/1}$ -KOH:

Sofort nach Fertigstellung des Ansatzes	ccm	Nach 1tägigem Digerieren	Nach 2tägigem Digerieren	Nach 3tägigem Digerieren	Nach 5tägigem Digerieren
		ccm	ccm	ccm	ccm
Bei Ansatz I	0,15	0,2	0,2	0,25	0,85
» » II	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15

Die «Samensäure» entsteht demnach gleichfalls durch Enzymwirkung; eine Säurezunahme in der Reihe des II. Ansatzes ist nicht erfolgt, da das säurebildende Enzym durch Siedehitze offenbar unwirksam geworden war. Der Einwand, daß die Samensäure durch Bakterienwirkung etwa entstanden sein könnte, ist durch Anwendung einer 1%igen Chloralhydratlösung eliminiert. Letztere hat sich bereits früher²⁾ als absolut keimtötend erwiesen.

¹⁾ Siehe die fettgedruckten Zahlen der Reihe 65—84.

²⁾ Vergl. Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXV, S. 3990 (1902).

Weiter schien es mir interessant, festzustellen, wie die «Samensäure» entsteht: Als unlöslich in allen bekannten Lösungsmitteln, also auch in Wasser, hat sich bereits unser fettspaltendes Enzym erwiesen.¹⁾ Im Gegensatz hierzu, entsprechend jedoch der Eigentümlichkeit der meisten anderen Fermentarten, ist das säurebildende Enzym des Ricinussamens wasserlöslich. Dies folgt aus dem nächsten Versuche.

Versuch 6 (am 25. 7. 05.).

Geschälter Ricinussamen wird in einer Excelsiormühle²⁾ mit Wasser durchgemahlen. Die durchgemahlene Samenmilch wird noch weitere dreimal in gleicher Weise durch die Mühle durchgehen gelassen, wobei jedesmal ein Quantum Samenmilch separat aufgefangen wird. Das von den einzelnen Portionen sofort sowie erst nach 24 Stunden klar abfiltrierte Wasser wird sofort sowie nach 24stündigem Stehen in Glasstöpselflaschen titriert: 100 ccm werden neutralisiert durch ccm $n/1$ -KOH:

Anzahl der Mahlungen	Nach dem Mahlen sofort filtriert und sofort titriert ccm	Nach dem Mahlen sofort filtriert, nach 24 Stunden titriert ccm	Nach dem Mahlen 24 Stunden stehen gelassen, filtriert und titriert ccm
1	0,5	2,3	3,2
2	0,5	2,6	3,2
3	0,5	2,6	3,8
4	0,7	2,8	4,0

Der Versuch beweist, daß die Feinheit der Mahlung des Ricinussamens,³⁾ also eine mehr oder weniger vollkommene Zerstörung der Samenzellen und dadurch bewirkte innige Berührung von Zellinhalt und Wasser für die Intensität der Säurebildung im Wasser von wesentlicher Bedeutung ist. Die Entstehung der «Samensäure» aus wasserlöslichen Samenbestandteilen durch Vermittelung eines wasserlöslichen Enzyms ist klar

¹⁾ Vergl. Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXVII, S. 1437 (1904).

²⁾ Von Friedr. Krupp, Grusonwerk, Magdeburg-Buckau.

³⁾ Vergl. auch Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXVII, S. 1440 (1904).

ersichtlich, wenn auch zugegeben werden muß, daß die Säurebildung bei längerer Berührung von Samenmilch und Wasser eine vollständigere ist. Die betreffenden die Säure erzeugenden Samenbestandteile gehen offenbar erst nach und nach in Lösung.

Um die Art der «Samensäure» festzustellen, bediente ich mich der von Buchner und Meisenheimer¹⁾ angegebenen Methode, welche diese Forscher benutzt haben, um die bei der alkoholischen Gärung entstehenden Säuren zu bestimmen: Ein größeres Quantum frisch hergestellter Samenmilch²⁾ wurde bei ca. 24° stehen gelassen, wobei bereits nach ca. 12 Stunden die gewünschte Säurebildung eingetreten war. Dabei wurde zunächst ziemlich starke Kohlendioxydentwicklung beobachtet. Von dem klar filtrierten säurehaltigen Wasser wurde ein Teil mit Wasserdampf destilliert; das schwach sauer reagierende Destillat wurde mit Natronlauge neutralisiert und auf dem Wasserbade bis zur Trockene eingeengt. Es hinterblieb ein geringer Salzurückstand, welcher mit Alkohol und Schwefelsäure die bekannte Essigsäureäthylesterreaktion gab. Nebenbei schien noch Ameisensäure in geringer Menge vorhanden zu sein, da neben dem Essigäthergeruch auch der Ameisensäureäthylester herauszuriechen war. Auch zeigte die Salzlösung eine Reduktionswirkung auf ammoniakalische Silbernitratlösung. Ferner wurde ein großes Quantum des oben gewonnenen klar filtrierten Säurewassers auf dem Wasserbade eingedampft, wobei alle flüchtigen Säuren fortgehen. Der sirupartige Rückstand wurde zur Reinigung mit absolutem Alkohol aufgenommen, filtriert, der Alkohol verjagt, aus dem zurückbleibenden starksauren Sirup mittels Zinkcarbonat das charakteristische schwerlösliche Zinklaktat isoliert. Aus Wasser zweimal umkrystallisiert und lufttrocken analysiert, wurden folgende Werte erhalten:

0,3703 g Substanz ergaben	0,1031 g ZnO
Gefunden Zn	= 22,37%
Berechnet für $(C_3H_5O_3)_2Zn$	= 22,00%

Genaue quantitative Bestimmungen über die Mengenver-

¹⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXVII, S. 417 (1904) und Bd. XXXVIII, S. 620 (1905).

²⁾ Siehe Versuch 6.

hältnisse der gebildeten einzelnen Säuren wurden nicht vorgenommen. Da jedoch die Menge der Essig- resp. Ameisensäure hinter derjenigen der Milchsäure stark zurücktritt, so haben wir es hier offenbar im wesentlichen mit einer Milchsäuregärung unter gleichzeitiger Bildung von Kohlendioxyd zu tun. Die besagte «Samensäure» ist sonach ein Säuregemisch und der Hauptsache nach Milchsäure.¹⁾

Hieraus läßt sich weiter schließen, daß auch in dem Keimungsprozeß des Ricinussamens diese Säurebildung eine große Rolle spielen muß. Die durch die Keimung bedingte Wasseraufnahme des Samens gibt dem säurebildenden Enzym die Möglichkeit, seine Wirksamkeit zu entfalten; die entstehende «Samensäure» aktiviert ihrerseits das lipolytische Enzym und vermittelt so durch Spaltung des Ricinusöles die Assimilation dieses Reservestoffes.²⁾

Zur Vervollständigung der Versuche über Säurewirkung wurde schließlich noch untersucht, inwieweit Essigsäure — in unzureichender Menge angewandt — der oben beschriebenen «Samensäure» (richtiger «Säuregemisch») sich ähnlich verhält. In der folgenden Versuchsreihe wurde in der Tat festgestellt,

¹⁾ Vergl. Buchner und Meisenheimer (Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXVIII, S. 622, 1905), Bildung kleiner Mengen Essigsäure bei der zellfreien Gärung.

²⁾ Diese Schlußfolgerung gewinnt an Wahrscheinlichkeit durch Untersuchungen von Stoklasa (Ber. d. Deutsch. botan. Ges., Bd. XXII, S. 460, 1904). Stoklasa gibt an, daß bei der anaëroben Atmung keimender Samen Milchsäure entsteht. Über Kohlendioxydbildung bei der Keimung liegen zahlreiche Literaturangaben vor (vergl. hierüber Czapek, Biochemie der Pflanzen, II. Band, S. 389, 1905).

In ihren bereits zitierten Abhandlungen (Comptes rendus de l'Académie des sciences, Bd. CXXXIX, S. 143 und 606, 1904) berichten Nicloux und Urbain über Untersuchungen, die sie über Ursprung und Wirkung der Kohlensäure im keimenden Ricinussamen angestellt haben. Die Kohlensäure entsteht nach ihrer Ansicht durch Hydrolyse albuminoider Substanzen des Samens. Es ist daher anzunehmen, daß im keimenden Samen die proteolytische Spaltung und Kohlensäurebildung der lipolytischen Spaltung des Ricinusöles vorangeht, da durch Kohlensäureeinwirkung die Verseifung des Ricinusöles durch die Lipase (Lipaseidin) des Ricinussamens bewirkt wird.

daß schon Spuren Essigsäure den Eintritt der Fettspaltung durch Ricinussamenferment beschleunigen; das Spaltungsoptimum wird jedoch erst viel später erreicht, als wenn von vornherein eine ausreichende Menge Essigsäure vorhanden ist.

Versuch 7 (am 16. 3. 04.).

Je 200 g Leinöl wurden mit je 6,6 g Ricinussamen geschält und gemahlen und mit verschiedenen Essigsäuremengen verrührt und der Spaltung überlassen:

0,06 %ige Essigsäure ccm	Essig- säure vom Öl %	Vermischt mit Wasser ccm	Ergaben eine Leinölspaltung nach			
			1 Tag %	2 Tagen %	3 Tagen %	5 Tagen %
40	0,012	80	—	1	3	65
50	0,015	70	—	2	40	80
60	0,018	60	—	2	66	86
70	0,021	50	—	3	63	86
80	0,024	40	1,5	33	75	87
90	0,027	30	4	35	72	86
100	0,030	20	19	62	79	87
110	0,033	10	48	74	81	89
120	0,036	—	54	78	85	91
60 ccm einer 0,1 %igen Essigsäure	0,06	—	81	91	92	—

2. Versuche zur Isolierung des Enzyms.

Während ich in der zitierten 2. Mitteilung¹⁾ über fermentative Fettspaltung nur von negativem Erfolge begleitete Versuche zur Isolierung des lipolytischen Enzyms aus dem Ricinussamen beschreiben konnte, seien jetzt einige Methoden erwähnt, nach denen sich eine beträchtliche Anreicherung des fettspaltenden Fermentes erreichen läßt.

Die bisherigen Untersuchungen waren nach zwei verschiedenen Richtungen hin in Angriff genommen worden: Eine Fer-

¹⁾ Vergl. Berichte d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXVII, S. 1436 (1904).

mentlösung zu erhalten, war bisher nicht möglich gewesen. Nach dem jetzt vorliegenden Material von diesbezüglichen Untersuchungen¹⁾ bei anderen lipolytischen Fermenten des Tier- und Pflanzenreiches zu schließen, ist es auch wenig wahrscheinlich, daß dies je gelingen wird. In keinem Falle ist bisher mit Sicherheit die Löslichkeit einer Lipase festgestellt worden. «Diese Tatsache ist übrigens sehr verständlich, wenn man berücksichtigt, daß diese Fermente ja dazu bestimmt sind, Fette anzugreifen, die ja ihrerseits weder in Wasser noch in Glycerin löslich sind.»²⁾

Weitere Versuche wurden unternommen, um das Ferment auf mechanischem Wege aus dem Ricinussamen zu isolieren. Zu diesem Zwecke muß man sich zunächst klar machen, an welcher Stelle des Samens man das Enzym zu suchen hat. Der Ricinussamen besteht der Hauptsache nach aus großen Zellen, die mit Aleuronkörnern, Ricinusölkügelchen und Protoplasma angefüllt sind.³⁾ Die Aleuronkörner und das Ricinusöl sind Reservestoffe, die die Pflanze für die Keimung ihres Samens aufgespeichert hat. Das Protoplasma ist Sitz aller latenten Energievorräte des ruhenden, aller Lebenstätigkeit des keimenden Samens. Die Reservestoffe sind dazu bestimmt, von «Enzymen, welche in dem Protoplasma der Zelle enthalten sind, gespalten und für den Embryo nutzbar gemacht zu werden.»⁴⁾ Die Reservestoffe konnten demnach auch in dem vorliegenden Falle im Ricinussamen nicht Sitz des lipolytischen Fermentes sein. Für das Ricinusöl als Reservestoff ist dies schon in der zitierten 1. Mitteilung über fermentative Fettspaltung⁵⁾ nachgewiesen worden, indem der entölte Ricinussamen noch die volle lipolytische Energie des ölhaltigen Samens besaß. Für

¹⁾ Vergl. Connstein, Über fermentative Fettspaltung, Ergebnisse d. Physiologie 3, I, S. 206 u. f. (1904).

²⁾ Ebenda.

³⁾ Vergl. E. Straßburger, Botanisches Praktikum, 2. Aufl., 1887, S. 43—45, und Green, Philosoph. Transactions 1890, S. 373.

⁴⁾ Vergl. Oppenheimer, Die Fermente, 2. Aufl., 1903, S. 72, und Green, l. c.

⁵⁾ Vergl. Berichte d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXV, S. 3994 (1902).

die Aleuronkörner als Reservestoff hat es zuerst Nicloux¹⁾ bewiesen. Nach obigen Ausführungen war es demnach vorauszusehen, daß im Ricinussamen das Protoplasma das fettspaltende Enzym enthalten würde. Es galt nun eine Methode zu finden, um auf mechanischem Wege das Protoplasma von den übrigen Reservestoffen des Ricinussamens zu trennen.

Das Naheliegendste war es nun, zu untersuchen, ob die einzelnen Samentteile sich nach ihrer verschiedenen Dichte trennen lassen. Der geschälte Samen war mit Öl oder einem Öllösungsmittel, z. B. Äther, angerieben worden und das verschieden große spezifische Gewicht der Samenpartikel benutzt worden, um durch fraktioniertes Dekantieren der sich teilweise absetzenden Samenteilchen Fraktionen zu gewinnen, die mehr oder weniger wirksame Substanz enthielten. Wie schon seinerzeit kurz erwähnt wurde, hat Nicloux²⁾ diese Methode zu einem technischen Verfahren auszuarbeiten versucht. Es gelang ihm in der Tat, mit Hilfe der Zentrifuge eine Trennung von Aleuronkörnern und Protoplasma in einem durch Zerreiben von geschälten Ricinussamen mit Öl erzeugten Samenbrei durchzuführen. In kleinem Laboratoriummaßstabe liefert dies Verfahren ganz gute Resultate, wenn auch die Trennung der einzelnen Samenbestandteile quantitativ recht schwer ausführbar ist. Im großen technischen Maßstabe versagt das Verfahren vollkommen.

Zu ungleich glatteren Trennungen der verschiedenen Samenbestandteile gelangt man bei Anwendung von Öllösungsmitteln, an Stelle der von Nicloux benutzten Öle, deren spezifisches Gewicht so gewählt wird, daß die lipolytisch unwirksamen schwereren Samenpartikel leicht zu Boden sinken, während die leichten aktiven Substanzen (also das Protoplasma) in Schwebelage bleiben. So beschaffene Öllösungsmittel gewinnt man durch ent-

¹⁾ Alle seine bisherigen Arbeiten über dieses Gebiet sowie diejenigen seiner Mitarbeiter (vergl. die Zitate S. 414) faßte Nicloux in einer ausführlichen Monographie zusammen: Contribution à l'étude de la saponification des corps gras p. M. Maurice Nicloux. Paris 1906.

²⁾ Französ. Patent 335, 902 vom 14. Okt. 1903.

sprechendes Mischen von Benzin, Petroläther, Benzol, Äther usw.¹⁾ einerseits, mit Chloroform oder Tetrachlorkohlenstoff andererseits, und wählt die Mischungsverhältnisse derart, daß das Gemisch ein spezifisches Gewicht von ca. 1,2 bis 1,4 hat. Man verfährt hierbei z. B. wie folgt:

Versuch 8 (am 8. 6. 04.).

500 g Ricinussamen geschält und fein gemahlen werden mit 1600 g Petroläther-Chloroformmischung (1 Vol. : 2 Vol.) vom spezifischen Gewicht 1,22 angerührt, durch ein grobes Sieb gegossen; der Siebrückstand wird mit frischer Mischung nachgewaschen und die trübe Flüssigkeit der Ruhe überlassen. Nach etwa 18 Stunden (über Nacht) haben sich alle unwirksamen Partikel (also Aleuronkörner, Zellwandstücke usw.) am Boden des Gefäßes fest zusammengeschlagen, so daß die darüberstehende trübe, das wirksame Protoplasma in Suspension haltende Flüssigkeit ohne irgend welche Vorsichtsmaßregel abgegossen werden kann. Der Bodensatz läßt sich durch zwei- bis dreimaliges Anschlämmen mit neuen Mengen Petroläther-Chloroformmischung von Protoplasma und Öl praktisch quantitativ befreien. Man hat nun aus der gewonnenen Aufschwemmung das Lösungsmittel nur abzudestillieren, um zu einem das ganze Protoplasma enthaltenden trüben Ricinusöl zu gelangen. Man gewinnt so:

A. Siebrückstand (lufttrocken)	47 g = 9,4 %
B. Aleuronkörner usw. (lufttrocken)	132 » = 26,4 %
C. Fermentöl (Protoplasma + Ricinusöl)	323 » = 64,6 %
	502 g 100,4 %

Dieses Fermentöl enthält in Form einer feinen grauen Trübung etwa 3 % Eiweißstoffe resp. feste Substanz. Mit obigen Samenfraktionen (A—C) wurden folgende Ansätze gemacht:

Je 100 g Cottonöl wurden mit 50 ccm Wasser, enthaltend 0,03 g Ameisensäure, und verschiedenen Mengen der obigen Samenfraktionen verrührt und der Spaltung überlassen:

¹⁾ Die Verwendung von Alkohol, Aceton, Schwefelkohlenstoff ist ausgeschlossen, da diese Lösungsmittel das Ferment unwirksam machen.

Samenfraktion	Angewandte Menge g	Enthaltend feste Masse g	Cottonölspaltung nach 22 Stunden %
A. Rückstand . . .	2	2	10
B. Aleuronkörner .	2	2	13
C. Fermentöl . . .	5	0,15	81

Wenn man dieses «Fermentöl» mit einem Lösungsmittel verdünnt und längere Zeit abstehen läßt oder zentrifugiert, so erhält man das Protoplasma nach Auswaschen des Öles als feines weißes Pulver.

Versuch 9 (am 20. 6. 04.).

Man kann auch das Ricinusöl des Samens schon vor dem Abschlämmen teilweise durch Auspressen des Öles oder durch Anreiben des Samens, z. B. mit Benzol, und Abnutschen der Benzolöllösung entfernen und kann dann erst den Samen wie vorher mit einer Mischung von z. B. Tetrachlorkohlenstoff-Petroläther vom spezifischen Gewicht 1,3 schlämmen. Der Erfolg ist der gleiche; man gewinnt hierbei nur ein wesentlich fermentreicheres, weil ölärmes, «Fermentöl», wovon z. B. 2,3 g enthaltend 0,27% fester Bestandteile mit 100 g Cottonöl und entsprechender Menge Säurewasser verrührt, eine Cottonölspaltung von ca. 88% in 24 Stunden ergeben.

Diese modifizierte Schlämmethode gibt also, wie ersichtlich, sehr wohl die Möglichkeit einer glatten Trennung von lipolytisch wirksamen und unwirksamen Samenbestandteilen; technisch unrationell ist sie infolge der Anwendung von teuren Solventien. Große Verluste an Lösungsmittel sind bei diesem Verfahren infolge der Unmöglichkeit, direkten Dampf zum Abtreiben derselben zu verwenden, unvermeidlich.

Bereits früher¹⁾ ist festgestellt worden, daß das frisch gepreßte trübe Ricinusöl beträchtliche Mengen an aktiver Substanz enthält, soviel mitunter, daß es sich nach Zusatz von Säurewasser von selbst auf 85—90% spaltet. Gelegentlich

¹⁾ Vergl. Berichte d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXVII, S. 1438 (1904).

einer neueren Untersuchung darüber, ob etwa im gekeimten Ricinussamen genügend «Samensäure» zur Einleitung sofortiger Ölsplaltung ohne künstlichen Säurezusatz gebildet wäre, machte ich den Versuch, gekeimten Samen hydraulisch zu pressen, um das hierbei resultierende «Preßöl» auf Enzymwirkung zu prüfen. Dabei zeigte sich nun, daß gekeimter Samen durch Quellung stark Wasser aufgenommen hatte. Dieses Wasser machte sich nun bei dem hydraulischen Pressen der gekeimten Samen äußerst unangenehm bemerkbar, indem die Preßtücher dauernd platzten. Das Wasser emulsioniert sich mit dem Ricinusöl und läßt sich in Form von Emulsion nicht oder kaum auspressen. Nichtsdestoweniger wurden kleine Mengen dieser «Preßemulsion» gewonnen und zeigten starke fettspaltende Eigenschaften. Die Vermutung lag nun hier sehr nahe, daß dies überraschende Resultat mit der Keimung an sich nichts zu tun hat. Lediglich die hiermit verbundene Wasseraufnahme trug zum Gelingen des Versuches bei. So wurde denn zunächst festgestellt, daß einfach durch Einlegen in Wasser gequollener Ricinussamen¹⁾ sich beim Pressen völlig analog dem gekeimten Samen verhielt. Es wurden wiederum nur ganz geringe Mengen einer äußerst aktiven «Preßemulsion» erhalten, welche ca. 4% fester Bestandteile enthielt und wovon 10% bei Säuregegenwart Cottonöl in ca. 20 Stunden auf 69% spalteten. Der Preßrückstand dagegen zeigte stark verringerte Spaltkraft gegenüber dem angewandten Ricinussamen. Wurde der gequollene Ricinussamen wieder lufttrocken gemacht, dann erst hydraulisch gepreßt, so nahm die Aktivität der «Preßemulsion» wieder ab, diejenige des «Preßrückstandes» wieder zu. Die wichtige Rolle des Wassers war nunmehr damit festgestellt und der nächste Schritt führte zum Pressen von gemahlenden Ricinussamen, denen etwas Wasser beigemischt war. Die sämtlichen vielfach variierten Preßversuche verliefen auch hier recht ungünstig, da aus oben angegebenen Gründen die Preßtücher jedesmal platzten; trotzdem zeigte die Untersuchung kleiner Mengen gewonnener «Preßemulsionen» die große lipolytische Wirksamkeit derselben:

¹⁾ Die Wasseraufnahme beträgt bis zu 20% vom Samen.

Versuch 10 (am 5. 8. 04.).

1 kg Ricinussamen, geschält, wird mit 200 g Wasser zusammen vermahlen, mit 350 g Ricinussamenschalen durchgeknetet, in feuchte Preßtücher eingeschlagen und bei ca. 200 Atmosphären hydraulisch gepreßt. Gewonnen werden: 280 g Preßemulsion und 1120 g Preßkuchen.

Verschiedene Mengen dieser Samenfraktionen werden mit je 100 g Cottonöl und je 50 ccm 0,6%iger Buttersäurelösung verrührt und der Fettspaltung überlassen,

	Menge g	Enthaltend feste Masse g	Cottonölspaltung nach 18 Stunden %
Preßemulsion . . .	2,5	0,08	46
» . . .	5	0,16	77
Preßkuchen . . .	5	4,5	49

d. h. die «Preßemulsion» ist im Verhältnis zu ihrem Gehalt an fester Masse sehr viel stärker wirksam als der Preßrückstand. Die Schwierigkeiten bei dem hydraulischen Pressen von Emulsionen machen auch hier die technische Nutzenanwendung der Methode unmöglich.

Nachdem ich aber einmal festgestellt hatte, daß sich die lipolytisch wirksame Substanz des Ricinussamens in Form von «Emulsion» isolieren läßt, daß also Wasser als solches die Wirksamkeit des Enzyms in keiner Weise beeinträchtigt, war der Weg für die jetzt vorzunehmenden Untersuchungen vorgezeichnet. Nach einigen wenigen orientierenden Versuchen bezüglich der Auswahl geeigneter Apparate und Maschinen wurde ein Verfahren zur Fabrikation einer lipolytisch wirksamen «Emulsion» herausgefunden, welches in dem folgenden Abschnitt näher besprochen wird. Hierbei wird die in dem Kapitel über Säurewirkung bereits ausführlich beschriebene Eigenschaft des Ricinussamens, die zur Fettspaltung ihm notwendige «Samensäure» sich selbst zu erzeugen, benutzt, um die gebildete enzymhaltige Ricinusöl-Wasser-Emulsion durch saure Gärung und die hiermit verbundene Kohlendioxydentwicklung in eine kompaktere,

wasserärmere Form zu bringen. Dabei behält das neuentstandene Ferment noch soviel «Samensäure» zurück, daß es auch ohne künstlichen Säurezusatz seine fettspaltende Wirkung zu entfalten imstande ist. Während also bisher die gewissermaßen latente Energie des Ricinussamens durch künstlichen Zusatz von Säure erst aktiviert wurde, wird nunmehr in dem neugebildeten Ferment ein mit bereits aktivierter Energie ausgestattetes Enzym zur Fettspaltung benutzt.

3. Herstellung des «Fermentes».

Der geschälte oder auch ungeschälte Ricinussamen wird in einer Excelsiormühle mit Wasser fein vermahlen. Die gebildete Samenmilch passiert eine Überlaufzentrifuge von hoher Umdrehungszahl, in der alle lipolytisch unwirksamen Bestandteile des Ricinussamens zurückgehalten werden, während das Enzym als zarte Emulsion («Fermentmilch») die Zentrifuge verläßt. Diese «Fermentmilch» enthält den größten Teil des Ricinusöles aus dem Samen emulsiert mit den unlöslichen Eiweißstoffen des Protoplasmas; darunter auch das fettspaltende Enzym. Das Emulsionswasser hat alle wasserlöslichen Bestandteile, worunter auch das säurebildende Enzym, aufgenommen. Diese zentrifugierte Fermentmilch wird nunmehr bei ca. 24° der Gärung überlassen. Hierbei setzt sich die fermenthaltige Emulsion als dicke «Sahne», die ich im folgenden kurz «Ferment» nennen will, an der Oberfläche des sauren Unterwassers ab und kann so leicht gewonnen werden. Das Ricinusöl ist hierbei selbst in Ricinusölsäure übergegangen, so daß das «Ferment» nunmehr der Hauptsache nach besteht aus etwa 38% Ricinusölsäure, 4% Eiweißkörpern resp. fester Masse, 58% Wasser.

4. Eigenschaften des Fermentes.

Die Eigenschaften des fettspaltenden Fermentes im Ricinussamen sind in unserer ersten Arbeit¹⁾ ausführlich beschrieben worden. Demgegenüber sind jedoch manche Eigenschaften des Fermentes in seiner neuen wasserhaltigen Form wesentlich ab-

¹⁾ Vergl. Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXV, S. 3993 u. ff. (1902).

geändert, so daß sie erneut der Besprechung unterzogen werden müssen.

Einen Hauptunterschied gegenüber dem Ricinussamen bildet das Verhalten des neuen Fermentes gegen Säurezusatz. Dasselbe ist gegen einen Säureüberschuß noch empfindlicher als der Ricinussamen selbst. Durch künstlichen Säurezusatz in einer für Ricinussamen entsprechenden Menge wird die fettspaltende Wirkung des Fermentes stark herabgesetzt und zwar bei den einzelnen Ölsorten verschieden. Es dürfte dies mit dem Gehalt vieler Öle an wasserlöslichen, niederen Fettsäuren zusammenhängen. Diese werden durch die Spaltung ihrer zugehörigen Glyceride in Freiheit gesetzt und wirken ihrerseits ungünstig auf das Ferment ein.

Versuch 11 (am 3. 11. 04.).

1,25 kg geschälten Ricinussamens werden mit Wasser gemahlen, zentrifugiert, und ergaben: 1,93 kg Zentrifugenrückstand und 13,9 kg zentrifugierte Fermentmilch.

Aus dieser entstehen durch Gärung 1,6 kg gesäuertes Ferment.

Mit aliquoten Teilen obiger Samenfraktionen, entsprechend 5 g Samen, werden nun je 100 g Öl und 30 ccm Buttersäurelösung (1%ig) zusammengerührt und der Fettspaltung überlassen:

	Mit 54 g ungesäuerter Fermentmilch %	Mit 6,4 g gesäuerten Fermentes %
Cottonöl	84	76
Leinöl	77	53
Palmkernöl . . .	65	17

Spaltung in ca. 20 Stunden.

Durch wiederholtes Waschen des gesäuerten Fermentes mit Wasser wird ihm die festgehaltene wasserlösliche «Samensäure» entzogen, so daß schließlich ein Säuremangel eintreten kann.

Versuch 12 (am 18. 4. 05.).

Ca. $\frac{1}{2}$ kg gesäuerten Fermentes wird mit je $\frac{1}{2}$ kg Wasser mittels Luftdurchblasen durchgerührt; nach längerem Abstehen wird das unter dem Ferment sich wieder abscheidende Wasser abgezogen, filtriert und titriert:

100 ccm des	1. Waschwassers	verbrauchen	0,5 ccm $\frac{n}{1}$ -KOH
100 » »	2. »	»	0,5 » »
100 » »	3. »	»	0,3 » »
100 » »	4. »	»	0,1 » »

Mit diesem vierfach gewaschenen Ferment werden folgende Versuche angesetzt: je 100 g Palmkernöl werden mit je 8 g Ferment und 40 ccm Wasser, enthaltend verschiedene Mengen Ameisensäure, durchgerührt und der Spaltung überlassen:

1%ige Ameisensäure ccm	Palmkernölspaltung nach	
	1 Tag %	2 Tagen %
—	47	56
0,5	52	61
1,0	56	64
1,5	56	63

Ein zu intensives Auswaschen des Fermentes mit Wasser schädigt das Ferment, indem sein Gehalt an «Samensäure» unter den zu voller Spaltungswirkung benötigten Säuregehalt heruntergeht. Gleichzeitig mit der Abnahme der Acidität des Fermentes beim Auswaschen geht Hand in Hand die Abnahme der sonstigen wasserlöslichen Substanzen des Ricinussamens. Diese werden ja zum größten Teil bereits durch sorgfältige Trennung des gegorenen, abgesetzten Fermentes von dem darunter befindlichen Säurewasser entfernt. Diese Entfernung des Unterwassers ist von größter Wichtigkeit für die Qualität des Fermentes. Bei der Fettspaltung mit Ferment gehen nämlich nach erfolgter Trennung des fertig gespaltenen Ansatzes alle wasserlöslichen Bestandteile des Fermentes in das Glycerinwasser über. Es leuchtet nun ohne weiteres ein, daß, je reiner das Ferment ist, desto reiner auch das bei der fermentativen Fett-

spaltung gewonnene Glycerinwasser ist. Dem Auswaschen des Fermentes ist jedoch durch das verschiedene Verhalten einzelner Ricinussamenarten eine Grenze gesetzt. In manchen Fällen ist das Auswaschen des Fermentes sehr wohl durchführbar. Meistens jedoch hat man hierbei große Verluste an aktiver Substanz, die mit in das Waschwasser übergeht und alsdann für Fermentgewinnung so gut wie verloren ist. Es empfiehlt sich danach bei der Fermentherstellung in großem Maßstabe von vornherein, bei dem Mahlen des Ricinussamens mit Wasser nicht zu sehr zu sparen, da hierdurch die im Ferment verbleibende Menge zu wasserlöslichen Substanzen verdünnt resp. verringert wird, und das Auswaschen des Fermentes ganz zu vermeiden.

Eine sehr bemerkenswerte Eigenschaft des Fermentes ist ferner seine Empfindlichkeit gegen gewisse Salzzusätze, über die noch an anderer Stelle in aller Ausführlichkeit berichtet werden soll.¹⁾ Aus dem großen hier vorliegenden Material sei nur ein Beispiel herausgegriffen und beschrieben:

Versuch 13 (am 27. 3. 05.).

Je 100 g Palmkernöl wurden mit 7 g Ferment und 40 g Wasser, enthaltend verschiedene Mengen Manganoxydulsulfat, verrührt und der Spaltung überlassen:

Menge Mangansulfat in % vom Öl	Palmkernölspaltung nach	
	1 Tag %	2 Tagen %
—	67	75
0,05	69	81
0,1	72	81
0,15	78	84
0,2	78	86
0,3	78	86
0,4	78	86
0,5	77	86

¹⁾ Die Einwirkung der verschiedenen Salze auf die Aktivität des Fermentes ist von den Herren F. Wiedermann und E. Wurl in unserem Laboratorium untersucht worden.

Die Menge von 0,15 bis 0,2 g Mangansulfat durch 100 g Öl erhöht, aktiviert demnach sehr wesentlich die Wirksamkeit des Enzyms. Unter den zahlreichen untersuchten, teils beschleunigend, teils verlangsamend wirkenden Substanzen ist Mangansulfat als entsprechendstes Mittel ausgewählt worden und wird wohl allgemein in der Technik bei Spaltungen mittels Ricinusferment angewandt.

Als letzten Punkt möchte ich nun noch die Frage der Haltbarkeit des neuen Fermentes besprechen: Als wasser- und eiweißhaltige Substanz ist das Ferment nicht unbegrenzt haltbar. Trotz aller Bemühungen zu einem absolut haltbaren Produkt zu gelangen, ist uns die Lösung dieses Problems bisher nicht gelungen. Immerhin ist das Ferment besonders in kühlerer Jahreszeit recht lange unverändert haltbar, vorausgesetzt, daß bei seiner Herstellung mit möglichster Sorgfalt gearbeitet worden ist. Ein häufiges Säubern, Ausdämpfen (also Sterilisieren) der für die Fermentfabrikation benutzten Gefäße, Maschinen, Leitungen usw. ist zur Vermeidung von Eiweißfäulnis und Zersetzung durchaus notwendig.

Versuch 14.

Ca. 200 g Ferment wurden in einer Glasstöpselflasche aufbewahrt. Von Zeit zu Zeit wurden damit wie folgt Ansätze gemacht:

Je 100 g Leinöl wurden mit 4 g Ferment und 40 ccm einer 0,5^o/_oigen Mangansulfatlösung zusammengerührt und der Spaltung überlassen:

Alter des Fermentes	Leinölspaltung nach je 20 Stunden
5 Tage	75 %
13 »	74 %
26 »	72 %
56 »	67 %
107 »	55 %
15 Monate	44 %

Im Zusammenhang mit der Haltbarkeitsfrage wurde auch die Frage der Entölung und Entwässerung des Fermentes bearbeitet. Es gelang, auch öl- und wasserarme Fermente z. B. mittels kalter Benzinextraktion herzustellen; auch bis zu trockenem Fermentpulver konnte man gelangen, jedoch niemals ohne große Verluste an aktiver Substanz und Spaltenergie.

Ein ölarmses wasserhaltiges Ferment ist dem Verderben ebenso sehr ausgesetzt als das normale. Auch verschiedene Zusätze von Salzen oder von Desinfektionsmitteln konnten die Abnahme der Aktivität nicht aufhalten. Die Frage der Entölung des Fermentes hat daher weit geringeres Interesse als diejenige der Entwässerung. Auch hier haben zahlreiche angestellte Versuche bisher kein praktisches Ergebnis gezeitigt. Auch ein Ferment, das aus frisch zentrifugierter Fermentmilch unter Umgehung der Gärung durch Separation der Milch auf einem Milchseparator hergestellt wurde, besaß zwar einen hervorragenden Reinheitsgrad; trotzdem wurde auch hier nach und nach eine Abnahme der Spaltenergie konstatiert.
