

## **Fermentversuche an Zelluloseabbauprodukten.**

Von

**Hans Pringsheim und Adelheid Magnus-von Merkatz.**

(Der Redaktion zugegangen am 4. April 1919.)

Allgemein pflegt man die beim Abbau der Polysaccharide entstehenden Zwischenprodukte als Dextrine zu bezeichnen. Die wichtigsten Vertreter dieser Klasse sind die Stärkedextrine, von denen die Benennung „Dextrine“ auf andere übernommen worden ist. Da es sich bei allen Dextrinen um amorphe Substanzen handelt, die wohl in allen Fällen, auch da, wo man versucht hat, sie am besten zu reinigen, noch Gemische darstellen, so lassen sich naturgemäß für diese Körperklasse nur wenige charakteristische Eigenschaften angeben. Unter diesen Eigenschaften ragt, was die Stärkedextrine und die ihnen nahe verwandten Glykogendextrine angeht, vornehmlich eine hervor: nämlich die, daß sie durch die diastatischen Fermente aus dem ursprünglichen Polysaccharid gebildet und dann weiter bis zur Maltose abgebaut werden. Über den fermentativen Abbau anderer Dextrine ist bisher nichts bekannt. Es schien aus diesen Gründen von Interesse, der Beantwortung der Frage näher zu treten, wie sich ein anderer Vertreter dieser Körperklasse der Diastase gegenüber verhalte; am geeignetsten schien zu diesem Zwecke, sich an ein Zellousedextrin zu halten, einmal, weil die Dextrine der Zellulose, wenn auch ungenügend, so doch besser erforscht sind als die anderer Polysaccharide, vor allem aber, weil Hönig und Schubert<sup>1)</sup> angegeben haben, daß zwar die Enddextrine der Zellulose durch Diastase keine Veränderung erleiden, wohl aber die höheren; diese Ver-

<sup>1)</sup> Monatshefte für Chemie Bd. 7, S. 455 (1886).

änderung soll sich durch vergrößertes Reduktionsvermögen gegenüber Fehlingscher Lösung kennzeichnen, ohne daß es jedoch gelungen war, die Spaltungsprodukte zu identifizieren.

Zur experimentellen Beantwortung dieser Frage bedurften wir eines Zellulosedextrins, welches einerseits in Wasser löslich, andererseits jedoch frei von Osazon bildenden Zuckern sein mußte: denn es war von vornherein klar, daß es fürs erste wenigstens nur mit Hilfe der Osazonreaktion möglich sein würde, irgendwie in den Mechanismus des Abbaus des Zellulosedextrins durch das diastatische Ferment einzudringen. Zu diesem Behuf eignete sich die Darstellung von Dextrinen aus Zellulose nach der Methode von Willstätter und Zechmeister<sup>1)</sup> nicht. Bei der Einwirkung der hochprozentigen Salzsäure entstehen zuerst wasserunlösliche Dextrine, nachher aber Gemische von Dextrinen und Zuckern, die voneinander zu trennen mit großen Schwierigkeiten verbunden sein würde. Einige Versuche, dieses durch Dialyse zu erreichen, scheiterten an der langen hierzu erforderlichen Zeit, während welcher die Dextrine durch die Salzsäure nach und nach gespalten werden. Am geeignetsten zur Beschaffung des Zellulosedextrins schien uns die Methode über die Acetylierungsprodukte nach Schlie-  
mann<sup>2)</sup>, besonders in der in der Dissertation von Josef Madsen<sup>3)</sup> angegebenen Form. Nach dieser Vorschrift wird die Zellulose in Gestalt von Baumwolle oder Filtrierpapier in das gut gekühlte Acetylierungsgemisch von Essigsäureanhydrid und konzentrierter Schwefelsäure (50 g Watte, 200 g Essigsäureanhydrid und 50 g konzentrierte Schwefelsäure) unter Vermeidung des Hochschnellens der Temperatur nach und nach eingetragen. Madsen gibt an, daß er die Temperatur bis auf 45° steigen ließ, während es uns nicht gelungen ist, diesen Temperaturgrad festzuhalten; die Erwärmung ging häufig weiter, wobei unerwünschte Zersetzungen eintraten. Wir haben deshalb die Methode so modifiziert, daß wir zuerst mit einer Kältemischung kühlten, das Acetylierungsgemisch dann über

<sup>1)</sup> Berichte der Deutsch. Chem. Ges. Bd. 46, S. 2401 (1913).

<sup>2)</sup> Liebigs Annalen Bd. 378, S. 366 (1910).

<sup>3)</sup> Dissertation von Josef Madsen, Hannover 1917.

Nacht im Eiswasser stehen ließen, worauf am nächsten Tage eine Lösung der Zellulose ohne Schwarzfärbung zu einer hellgrauen sirupösen Masse eingetreten war. Nach sechstägigem Stehen kristallisierte aus ihr das Zellobioseoctoacetat so gut wie quantitativ aus; es wurde durch Absaugen entfernt und das als Filtrat gewonnene Dextrinacetat in Eiswasser gegossen und nach den Vorschriften von Madsen weiter verarbeitet. Die Entfernung der letzten Reste von Zellobioseoctoacetat erfolgte vermöge dessen großer Schwerlöslichkeit in 95% igem Alkohol. Die Verseifung des dann nach dem Abdampfen des Alkohols und nochmaligem Eingießen in Eiswasser gewonnenen Dextrins geschah mit Barythydrat. Auf diese Weise konnte in der Tat ein Zellosedextrin gewonnen werden, welches beim Erhitzen mit Phenylhydrazin keine Osazonbildung zeigte.

Als diastatisches Ferment verwandten wir zuerst einen wäßrigen Malzextrakt, welcher sowohl bezüglich seines Verflüssigungs- wie auch seines Verzuckerungsvermögens gegen Stärke außerordentlich aktiv war. Die Aktivierung dieses Malzextraktes erreichten wir durch die Zugabe ganz geringer Mengen von Salzsäure. Wir bestimmten sowohl die reduzierende Kraft des Dextrins gegenüber Fehlingscher Lösung, wie auch die unseres Malzextraktes: 100 mg Dextrin reduzierten 48,03 mg Kupfer. Angewandt wurden 0,293 g Dextrin mit einer Reduktionskraft von 140,7 mg Kupfer. Dazu setzten wir 2 ccm des Malzextraktes, die ihrerseits 18,7 mg Kupfer reduzierten. Vor dem Fermentspaltungsversuch war die gesamte Reduktionskraft der Lösung in 30 ccm Wasser also 159,4, nach 20stündigem Stehen bei 60° wurden 172 mg Kupfer reduziert. Nach diesem Versuche war also durch den Malzextrakt eine diastatische Spaltung des Zellosedextrins nicht erreicht worden. Auch eine gleichzeitig angestellte Probe des reinen Malzextraktes zeigte nach 20stündiger Einwirkung bei 60° keine Zunahme der reduzierenden Kraft. Bei dieser starken Verdünnung gab auch der Malzextrakt keine Osazonreaktion; ebensowenig ließ sich in unserem Fermentprodukt nach der Einwirkung ein Osazon nachweisen.

Trotzdem es sich in diesem Falle um einen sehr aktiven

Malzextrakt gehandelt hat, könnte unserer Versuchsanstellung gegenüber der Einwand erhoben werden, daß wir mit zu geringen Fermentmengen gearbeitet hätten. Um diesem Einwande zu begegnen, bedurften wir einer Fermentlösung, welche frei von Osazon bildenden Zuckern war. Dieser Forderung entsprach auch nicht die Diastase von Kahlbaum. Wurde sie jedoch in Wasser gelöst und nach der Filtration durch Eingießen in Alkohol wieder ausgefällt und diese Operation ein zweites Mal wiederholt, so war sie vollkommen frei von Osazon bildenden Zuckern, jedoch Stärkekleister gegenüber noch stark aktiv, sowohl bezüglich ihres Verflüssigungs- wie auch ihres Verzuckerungsvermögens. Wurden 0,2 g dieser gereinigten Diastase mit 0,3 g des Zellulosedextrins in der gleichen Weise, wie vorher beim Malzextrakt geschildert, behandelt, so ließ sich nach der Einwirkung ebenfalls keine Spaltung durch Osazonreaktion nachweisen.

Wir glauben auf diese Weise den definitiven Beweis erbracht zu haben, daß das nach der Methode von Madsen hergestellte Zellulosedextrin durch Diastase nicht gespalten wird. Allerdings gehörte es eher zu den Enddextrinen der Zellulose, da es eine stärkere reduzierende Kraft als die Anfangsdextrine von Hönig und Schubert besaß.

Bekanntlich wird die Zellobiose durch die im Emulsin vorhandene Zellobiase in Traubenzucker gespalten; es war deshalb mit der Möglichkeit zu rechnen, daß im Emulsin ein Ferment vorhanden sei, welches auch Zellulosedextrinen gegenüber eine gewisse Spaltungskraft zeigen würde. Die Prüfung ist jedoch negativ verlaufen; nach der Behandlung unseres Dextrins mit Emulsin konnten wir kein Osazon eines Zuckers gewinnen.

Wie schon Madsen angibt, eignet sich die Methode der Acetylierung in der Kälte ganz besonders zur Gewinnung von Zellobioseoctoacetat. Zur Darstellung kristallinischer Zellobiose genügt es, das vom Acetylierungsgemisch durch Abnutschen getrennte Acetat mit Alkohol aufzukochen, ohne daß es dabei völlig in Lösung gebracht werden muß, und es dann nach dem Abkühlen vom Alkohol getrennt mit alkoholischer Kalilauge

zu verseifen. Nach der weiteren Aufarbeitung kristallisiert dann die Zellobiose aus ihrem mit Alkohol gefälltem Sirup nach viertägigem Stehen, während allerdings aus einem nochmals aus Alkohol umkristallisierten Acetat schon nach 24 Stunden kristallisierte Zellobiose zu gewinnen war.

Da uns die Frage interessierte, ob in den Organen zelluloseverdauender Tiere Zellobiose spaltende Fermente vorkommen, haben wir Versuche mit dem Inhalte vom Pansen, vom Dünndarm und mit der Pankreasdrüse vom Rinde angestellt. Zu diesem Zwecke wurde die Pankreasdrüse fein zerhackt und in Gegenwart von Toluol mit wenig Wasser extrahiert. Ebenso wurde der Panseninhalte mit etwas Wasser vermischt. Von allen drei Präparaten gewannen wir dann einen wasserhellen und bakterienfreien Extrakt mit Hilfe der Filtration durch einen Zsigmondy-Filter (De Haens Membranfilter, Chemische Fabrik „List“ Seelze bei Hannover). Da alle Versuche negativ verliefen, filtrierten wir die drei Präparate direkt durch Filtrierpapier und wiederholten den Versuch mit den so gewonnenen Lösungen: auch hier war das Resultat negativ. Von der Wirkungskraft unserer Fermentlösungen überzeugten wir uns dadurch, daß wir mit Hilfe des Pankreassaftes und des Panseninhaltes Maltose und mit Hilfe des Darmsaftes Rohrzucker fermentativ spalteten. Wir verwandten hierzu die Filtrate durch Filtrierpapier. Ein Filtrat aus Pankreasdrüse durch Zsigmondy-Filter gab keine Spaltung der Maltose; das Ferment geht also nicht durch das Membranfilter, trotzdem eins von größerer Porenweite angewandt wurde. Wir machen hierauf ganz besonders aufmerksam, da durch die Verwendung solcher Filter zu Fermentversuchen sehr leicht Fehler entstehen könnten.

Wir glauben auf diese Weise den Beweis erbracht zu haben, daß im Organismus des Rindes Zellobiose spaltende Fermente nicht vorkommen und daß die Spaltung der Zellobiose den Zellulosebakterien überlassen bleibt, welche sich nachweislich im Besitze eines Zellobiose spaltenden Fermentes befinden<sup>1)</sup>.

<sup>1)</sup> H. Pringsheim, Zeitschr. für physiolog. Chemie, Bd. 78 S. 266 (1912).

Wir wollen bei dieser Gelegenheit noch erwähnen, daß wir den Versuch gemacht haben, die Zellobiose durch Kochen mit gelbem Quecksilberoxyd, welches Glukose zu Glukonsäure<sup>1)</sup> und Glukosamin zur Glukosaminsäure<sup>2)</sup> zu oxydieren imstande ist, in das Quecksilbersalz der Zellobionsäure umzuwandeln. Das Quecksilberoxyd blieb jedoch selbst beim längeren Kochen vollkommen unverändert. Auch die Oxydation des Milchzuckers und der Maltose ist uns durch gelbes Quecksilberoxyd nicht gelungen; die Disaccharide mit freier Aldehydgruppe lassen sich also durch Quecksilberoxyd nicht, wie die Monosaccharide, oxydieren.

<sup>1)</sup> Heffter, Berichte der Deutsch. Chem. Ges., Bd. 22, S. 1049 (1889).

<sup>2)</sup> H. Pringsheim und G. Ruschmann, Berichte der Deutsch. Chem. Ges., Bd. 48, S. 680 (1915).

# HOPPE-SEYLER'S ZEITSCHRIFT

für

## PHYSIOLOGISCHE CHEMIE

unter Mitwirkung von

E. ABDERHALDEN-Halle, SVANTE ARRHENIUS-Stockholm, G. v. BUNGE-Basel, A. ELLINGER-Frankfurt a. M., G. EMBDEN-Frankfurt a. M., H. EULER-Stockholm, EMIL FISCHER-Berlin, H. FISCHER-Wien, R. GOTTLIEB-Heidelberg, W. v. GULEWITSCH-Moskau, O. HAMMARSTEN-Upsala, S. G. HEDIN-Upsala, V. HENRIQUES-Kopenhagen, G. HOPPE-SEYLER, Kiel, O. KESTNER-Hamburg, F. KNOOP-Freiburg i. Br., L. KREHL-Heidelberg, Wm. KÜSTER-Stuttgart, CARL TH. MÖRNER-Upsala, F. v. MÜLLER München, J. P. PAWLOW-St. Petersburg, C. A. PEKELHARING-Utrecht, F. PREGL-Graz, W. E. RINGER-Utrecht, E. SALKOWSKI-Berlin, M. SIEGFRIED-Leipzig, S. P. L. SÖRENSEN-Kopenhagen, H. STEUDEL-Berlin, H. THIERFELDER-Tübingen, H. WIELAND-München, R. WILLSTÄTTER-München, A. WINDAUS-Göttingen, E. WINTERSTEIN-Zürich, R. v. ZEYNER-Prag

herausgegeben von

**A. KOSSEL,**

Professor der Physiologie in Heidelberg.

---

**Einhundertundfünfter Band:**

**Fünftes und sechstes Heft.**

(Schluß des Bandes.)

(Ausgegeben am 10. Juni 1919.)

---

Mit drei Figuren im Text.

---

**BERLIN und LEIPZIG 1919**

**VEREINIGUNG WISSENSCHAFTLICHER VERLEGER**

**WALTER DE GRUYTER & Co.**

vormals G. J. Göschen'sche Verlagsbuchhandlung — J. Guttentag, Verlagsbuchhandlung — Georg Reimer — Karl J. Trübner — Veit & Comp.

# EINHUNDERTUNDFÜNFTER BAND FÜNFTES UND SECHSTES HEFT.

Inhalt.	Seite
<b>Pringsheim, Hans und Hans Magnus.</b> Über den Acetylgehalt des Lignins . . . . .	179
<b>von Euler, Hans und O. Svanberg.</b> Enzymatische Studien über Zuckerspaltungen. Mit 3 Figuren im Text. . . . .	187
<b>Edlbacher, S.</b> Notiz über eine Farbreaktion der Eiweißkörper .	240
<b>Salkowski, E. und H.</b> Über den Anteil der Benzolderivate und des Benzolkohlenstoffs am Eiweißmolekül . . . . .	248
<b>Weinhagen, Albert B.</b> Beiträge zur Muscarin-Frage. (I. Mitteilung). Zur Kenntnis der Platindoppelsalze einiger Basen . . . . .	249
<b>Winterstein, E.</b> Über das Vicin. (I. Mitteilung) . . . . .	258
<b>Nelson-Gerhardt, Dr. Mathilde.</b> Untersuchungen über Salmin .	265

---

Für die nächsten Hefte sind Arbeiten eingegangen von:

S. P. L. Sørensen, E. Vahlen, E. Kerteß, H. Euler und O. Svanberg, H. Wieland, H. Wieland und E. Boersch, E. Eckstein und E. Grafe, E. Abderhalden (2), J. Lifschütz, E. Abderhalden und H. Spinner (3), R. Feulgen, C. Christiansen und J. Cristiansen.

---

Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie erscheint in Bänden von 6 Heften. Preis des Bandes 18 Mark.

Kurze Notizen oder Bemerkungen zu anderen Arbeiten werden in der Regel am Schluß des Heftes und außerhalb der Reihenfolge des Eingangsdatums mitgeteilt. — Bereits in anderen Zeitschriften veröffentlichte Arbeiten, sowie Referate über bereits publizierte Arbeiten werden nicht aufgenommen.

Das Honorar beträgt für den Druckbogen 40 Mark. Von jeder Arbeit werden dem Verfasser 75 Separat-Abdrücke gratis geliefert.

In bezug auf die Rechtschreibung der Fachausdrücke sind bis auf weiteres die Publikationen der Deutschen chemischen Gesellschaft maßgebend. In zweifelhaften Fällen wird der etymologische und internationale Standpunkt vor dem phonetischen bevorzugt.

---