

**STUDIEN  
ÜBER ENZYMATISCHE  
OXYNITRILBILDUNG**

**VON**

***EINAR NORDEFELDT***

**SPRINGER-VERLAG BERLIN HEIDELBERG GMBH**

**1 9 2 5**

---

**Sonderdrucke aus „Biochemische Zeitschrift“  
Bde. 118, 131, 137 und 159.**

---

# AKADEMISCHE ABHANDLUNG

ZUR

ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE

DER

MATHEMATISCH-NATURWISSENSCHAFTLICHEN

FAKULTÄT DER HOCHSCHULE ZU STOCKHOLM

AM

26. MAI 1925 UM 10 UHR VORM.

VORGELEGT

VON

*EINAR NORDEFELDT*

FIL. LIC.

ISBN 978-3-662-28212-0

ISBN 978-3-662-29726-1 (eBook)

DOI 10.1007/978-3-662-29726-1

# Die Bedeutung der Acidität für die Oxynitrilsynthese und die Nichtexistenz des Rosenthalerschen syn-Emulsins.

Von

E. Nordefeldt.

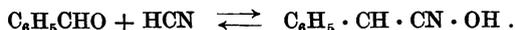
(Aus dem biochemischen Laboratorium der Universität Stockholm.)

(Eingegangen am 1. März 1921.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

## Einleitung.

Eine Amygdalinlösung wird, wie bekannt, von Emulsin in die Endprodukte Glucose, Benzaldehyd und Cyanwasserstoff gespalten, wobei als Zwischenprodukt Benzoxynitril auftritt. Bekanntlich kann das Oxynitril auch, in und ohne Gegenwart von Emulsin, aus Benzaldehyd und Cyanwasserstoff synthetisiert werden, nach der reversiblen Reaktion:



Über die angebliche und die wirkliche Rolle des Emulsins bei dieser Reaktion soll die vorliegende Arbeit berichten.

## Kapitel I.

### Historisches über katalytische Einwirkungen bei der Einstellung des Oxynitrilgleichgewichtes.

#### I. Wirkungen der Acidität.

Ultée<sup>1)</sup> fand, auf ältere Arbeiten gestützt, daß viele Oxynitrile in fast reiner Form aus Benzaldehyd und Cyanwasserstoff synthetisiert werden konnten, falls Spuren von Substanzen anwesend waren, welche in Lösung Hydroxylionen bildeten, z. B. KOH, KCN, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Wurden diese Substanzen nach beendeter Synthese durch einen Überschuß von Schwefelsäure wieder zerstört, verblieb das Oxynitril stabil, so daß es z. B. von Wasser nicht merklich zerlegt wurde. Falls der basische Katalysator

<sup>1)</sup> Rec. d. Trav. d. Pays-Bas 28, 1 und 248. 1909.

durch Säure nicht zerstört wurde, zerfiel das Oxynitril mit Wasser oder bei Erhitzen wieder in Aldehyd und Cyanwasserstoff. Wirth<sup>1)</sup> studierte das Gleichgewicht im System Benzaldehyd — Cyanwasserstoff — Oxynitril in wässriger Lösung. Er fand, daß schon kleine Mengen von Alkalien oder Säuren großen Einfluß auf die Gleichgewichtsreaktion in der Weise ausüben, daß Hydroxylionen die Geschwindigkeit, mit der das Gleichgewicht erreicht wird, von beiden Seiten vergrößern, Wasserstoffionen dagegen die beiden Reaktionen sehr stark verzögern. Übrigens fand er, daß die Dissoziation des Oxynitrils bei Verdünnung und bei Erwärmung zunimmt, um bei Konzentrierung und bei Abkühlung wieder zurückzugehen. Er stimmt mit Lapworth<sup>2)</sup> darin überein, daß man sich die Oxynitrilbildung so vorstellen muß, daß zuerst das CN-Ion sich verhältnismäßig langsam zum Aldehyd addiert, wonach das H-Ion, dank seiner Leichtbeweglichkeit, sich unmeßbar schnell mit dem neuen Komplex verbindet. Dadurch soll erklärt werden, warum Zusatz von Säure die Oxynitrilbildung verzögert, denn dadurch wird die Dissoziation des Cyanwasserstoffes zurückgedrängt und folglich die Menge der CN-Ionen vermindert.

## II. Wirkungen des Emulsins.

### 1. Rosenthalers Arbeiten. syn-Emulsin und dia-Emulsin.

**syn-Emulsin.** Rosenthaler<sup>3)</sup> studierte (1908—1913) den Effekt des Emulsins (aus Mandeln) auf die Oxynitrilbildung. Er entdeckte dabei, daß Emulsin unerwartete Wirkungen ausübte, teils **asymmetrische**, wodurch das entstandene Oxynitril optisch aktiv wurde (was bei gewöhnlicher Synthese nicht eintritt), teils **symmetrische**, so daß die Geschwindigkeit der totalen Synthese vermehrt und die Ausbeute von Oxynitril größer wurde. Er fand auch, daß der asymmetrische Effekt sein Optimum bei einer bestimmten Temperatur (25—30°) und nach einer bestimmten Zeit (2—3 Stunden) erlangte, und daß einstündiges Erhitzen auf 75—80° das Emulsin in asymmetrischer Hinsicht wirkungslos machte. Daraus zog er den Schluß, daß die Wirkung des Emulsins von enzymatischer Natur war. Das neue asymmetrisch synthetisierende Enzym wurde von ihm **syn-Emulsin** (*σνν*-Emulsin, *σ*-Emulsin) genannt. Dieses konnte nach seinen Angaben in mehr oder weniger reiner Form dadurch isoliert werden, daß eine Emulsinlösung während längerer Zeit (1—2 Wochen) auf 40—45° erwärmt wurde, oder durch Behandeln von Emulsin zuerst mit Schwefelsäure und dann mit einer zur Säure äquivalenten Menge von Alkalihydroxyd, wodurch in beiden Fällen die übrigen enzymatischen Bestandteile beinahe vollständig zerstört wurden. Die enzymatische Wirkung des syn-Emulsins wurde vom Überschuß von Benzaldehyd, nicht aber von Cyanwasserstoff, geschwächt. Die Eigenschaft des syn-Emulsins,

<sup>1)</sup> Arch. d. Pharmazie **249**, 332. 1911.

<sup>2)</sup> Journ. Chem. Soc. **83**, 995. 1903.

<sup>3)</sup> Diese Zeitschr. **14**, 238. 1908; **17**, 257. 1909; **19**, 186. 1909; **26**, 1 und 7. 1909; **28**, 408. 1910; **50**, 486. 1913. — Arch. d. Pharmazie **246**, 365. 1908; **248**, 105 und 534. 1910; **249**, 510. 1911; **251**, 56 und 85. 1913.

zur Bildung von optisch aktiven Oxynitrilen zu führen, zeigte sich nicht nur beim Benzaldehyd, sondern es gelang Rosenthaler, von verschiedenen Aldehyden ausgehend, eine ganze Reihe von asymmetrischen Oxynitrilen darzustellen, von welchen die meisten rechtsdrehend waren. Demnach konnte man annehmen, daß Rosenthaler eine neue Methode zur asymmetrischen Synthese gefunden und die Existenz eines spezifisch synthetisierenden Enzymes bewiesen hatte. Das syn-Emulsin wurde später, nach dem Nomenklaturvorschlag Eulers<sup>1)</sup>, Oxynitrilese oder, weil es rechtsdrehendes Benzoxynitril bildete, d-Oxynitrilese genannt.

Als Krieble<sup>2)</sup> fand, daß Präparate aus Blättern von wilder Kirsche (*Prunus serotina*) und aus Pfirsichblättern linksdrehendes Oxynitril gaben, wurde darin eine neue Oxynitrilese, l-Oxynitrilese, angenommen.

**dia-Emulsin.** Zum Unterschied vom syn-Emulsin wurde von Rosenthaler der enzymatische Bestandteil des Emulsins, welcher Amygdalin wie übrige  $\beta$ -Glucoside spaltet, dia-Emulsin ( $\delta\delta$ -Emulsin,  $\delta$ -Emulsin) genannt.

Dieses Enzym soll nach Rosenthaler isoliert werden können, wenn eine Emulsinlösung mit einer gesättigten Lösung von Magnesiumsulfat oder mit Kupfersulfat gefällt wird, wobei es im Filtrat verbleibt. Er findet jedoch, daß die Methode mit Kupfersulfat bisweilen versagen kann. Durch Erwärmung während längerer Zeit auf 40–45° wurde das dia-Emulsin größtenteils zerstört, eine Lösung von syn-Emulsin ertrug aber eine kurze Erhitzung bis 70–80°. Weil das dia-Emulsin aus Amygdalin Benzaldehyd und Cyanwasserstoff abspaltete, sollte es auch das Zwischenprodukt Benzoxynitril zerlegen können. Die synthetisierende Wirkung des syn-Emulsins wurde folglich bei Anwesenheit von dia-Emulsin mehr oder wenig geschwächt, wodurch der sehr variierende Effekt verschiedener Emulsinpräparate des Handels erklärt wäre.

Als die englischen Forscher H. E. und E. F. Armstrong und Horton<sup>3)</sup> das gewöhnliche Emulsin in mehrere spezifisch spaltende Enzyme einteilten — Amygdalase, Prunase und Benzcyanase —, identifizierte Rosenthaler sein dia-Emulsin als ein Gemisch der beiden erstgenannten. Die Benzcyanase, welche nach Armstrong und Horton das spezifisch oxynitrilspaltende Enzym wäre, wurde von Rosenthaler Oxynitrilase genannt.

## 2. Weitere Arbeiten über die asymmetrische Wirkung.

Die interessante Entdeckung Rosenthalers, daß bei Gegenwart von emulsinartigen Substanzen optisch aktive Oxynitrile gebildet werden, ist eine sichergestellte Tatsache, die von mehreren Forschern bestätigt worden ist. Das aus Benzaldehyd und Cyanwasserstoff mit gewöhnlichem Emulsin (aus Mandeln) erhaltene Oxynitril erweist sich immer rechtsdrehend.

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiol. Chemie **74**, 13. 1911.

<sup>2)</sup> Journ. Americ. Chem. Soc. **35**, 1643. 1913.

<sup>3)</sup> Proc. Roy. Soc. B. **80**, 321. 1908; **85**, 359. 1912.

Feist<sup>1)</sup> fand, daß linksdrehendes Benzoxynitril erhalten werden konnte, wenn eine Lösung von inaktivem Oxynitril mit Emulsin behandelt und dabei ein Luftstrom durch das Gemisch geleitet wurde. Mittels dieser Methode zur Wegführung der Spaltprodukte gelang es ihm, auch aus anderen Oxynitrilen die l-Form im Überschuß zu erhalten. Die Drehungsrichtung der durch Spaltung gewonnenen Oxynitrile war also der der durch Synthese dargestellten entgegengesetzt, und mit Hilfe von Emulsin konnten jetzt beide optischen Isomeren erhalten werden. Im Gegensatz zu Rosenthaler nimmt er an, daß das d-Oxynitril, welches bei Amygdalinspaltung mit Emulsin gefunden wird, schon als solches im Amygdalin vorhanden ist, um bei der Spaltung frei zu werden, und folglich in diesem Falle nicht synthetisiert wird, wie es bei dessen Bildung aus Benzaldehyd und Cyanwasserstoff der Fall ist.

Venth<sup>2)</sup>, ein Schüler Rosenthalers, findet, daß die asymmetrische Oxynitrilsynthese sich bei Verwendung einer ganzen Reihe von enzymartigen Präparaten vollzieht, die aus den verschiedensten Pflanzen gewonnen werden können, wobei in der Regel d-Oxynitril erhalten wird. In einem Falle aber (mit einem Präparat aus den Blättern von *Tarakto-genos Blumei*) erhielt er die l-Form, wodurch er die Existenz des Enzymes l-Oxynitrilase bestätigt findet.

Nachdem schon Fischer 1898 die Hypothese ausgesprochen hatte, daß die Spezifität der Enzyme optischen Antipoden gegenüber auf den asymmetrischen Bau ihrer als optisch aktive Katalysatoren wirksamen Moleküle zurückzuführen sei, gelang es Marckwald<sup>3)</sup> und McKenzie<sup>4)</sup>, von symmetrischen Substanzen ausgehend, durch Verwendung asymmetrischer Hilfsstoffe und durch rechtzeitiges Unterbrechen der Synthesen optisch aktive Gemische zu erhalten. Durch Anwendung dieser Methode auf die Hydrolyse der inaktiven Mandelsäureester mittels des Enzymes Lipase konnte Dakin<sup>5)</sup> rechtsdrehende Mandelsäure erhalten, während die noch zurückgebliebenen Ester sich linksdrehend erwiesen, und es gelang ihm auch eine Theorie für diese Befunde zu liefern.

Auf diese Arbeiten gestützt, haben dann Bredig, Fajans<sup>6)</sup> und Fiske<sup>7)</sup> mit großem Erfolg die asymmetrische Wirkung der Enzyme nachzubilden gesucht. Durch geeignete Wahl von asymmetrischen Substanzen bekannter Zusammensetzung als Katalysatoren konnten sie nämlich mehrere Reaktionen derart leiten, daß optisch aktive Produkte erhalten wurden, wobei nach Belieben die Wirkung eines l-Enzymes oder eines

<sup>1)</sup> Arch. d. Pharmazie **247**, 226 und 542. 1909; **248**, 101. 1910.

<sup>2)</sup> E. Venth, Über emulsinartige Enzyme. Inaug.-Diss. Straßburg 1912.

<sup>3)</sup> Berichte **37**, 349 und 1368. 1904.

<sup>4)</sup> Journ. Chem. Soc. **85**, 1249. 1904; **87**, 1373. 1905; **89**, 365 und 688. 1906; **91**, 1215. 1907.

<sup>5)</sup> Journ. of physiol. **30**, 253. 1904; **32**, 199. 1905.

<sup>6)</sup> B **41**, 752. 1908. Zeitschr. f. physikal. Chemie **73**, 25. 1910.

<sup>7)</sup> Diese Zeitschr. **46**, 7. 1912.

d-Enzymes nachgeahmt werden konnte. Wenn sie z. B. zu einer Mischung von Benzaldehyd und Cyanwasserstoff (in Chloroform oder Toluol gelöst) die linksdrehende Base Chinin fügten, wurde ein Überschuß von d-Oxynitril erhalten, während bei Verwendung des rechtsdrehenden Isomeren Chinidin l-Oxynitril in Überschuß gefunden wurde. Es gelang ihnen auch, eine experimentelle Stütze für die Annahme zu finden, daß der Grund der asymmetrischen Wirkung in einer intermediären Bindung zwischen dem Substrat (Oxynitril) und den genannten Basen liegt. Weil diese Substanzen nach beendeter Reaktion nicht verbraucht waren, sondern aus dem Gemisch wieder ausgelöst werden konnten, und weil ihre Wirkung viel größer war, als ihrer Menge stöchiometrisch entsprach, wurde ihr Effekt als ein katalytischer bewiesen. In diesen Versuchen findet Fajans starke Stützen für die Erklärung des Rosenthalerschen optischen Effektes als eine Wirkung eines asymmetrischen Katalysators in Emulsin, welcher nicht enzymatisch zu sein braucht und welcher die Dissoziation des l-Oxynitrils stärker beschleunigt als die des d-Oxynitrils, wodurch während des Verlaufes der Reaktion das letztere in Überschuß gefunden wird.

Die asymmetrische Oxynitrilsynthese von Fajans wurde von Bayliss<sup>1)</sup> experimentell bestätigt, welcher gleichfalls zeigte, daß auch bei Dissoziation des inaktiven Oxynitrils der verwendete Katalysator die Reaktionsgeschwindigkeit desselben Isomeren beschleunigt wie bei Synthese. —

Wir wissen aber noch nichts von der Zusammensetzung, der Stabilität und den übrigen Eigenschaften dieses asymmetrischen Katalysators. Vielleicht wird er aber wärmerestabiler erscheinen, falls er von den koagulierbaren Eiweißstoffen des Emulsinpräparates befreit werden kann, und damit wäre seine einzige noch „enzymatische“ Eigenschaft aufgeklärt.

### 3. Weitere Arbeiten über die symmetrische Wirkung.

Die Behauptung Rosenthalers, daß in Emulsin zwei übrigen gleichartige Enzyme existieren, von welchen aber das eine synthetisierend, das andere spaltend auf dasselbe Substrat wirkt, erregte großes Aufsehen. Die Anhänger der synthetisierenden Enzyme glaubten hier eine gute Stütze für ihr sonst sehr schwaches Beweismaterial zu finden, während diejenigen, welche annahmen, daß die Enzyme nur als ideale Katalysatoren wirken, durch kontrollierende Untersuchungen die Resultate Rosenthalers zu widerlegen suchten.

Auld<sup>2)</sup> ist mit Rosenthaler darin einverstanden, daß die synthetische Wirkung des Emulsins von einem speziellen Enzym veranlaßt ist. Er bestätigt, daß bei Spaltung des Amygdalins mit Emulsin Benzaldehyd einen stärker verzögernden Effekt zeigt als die übrigen Spaltprodukte (Glucose und Cyanwasserstoff), was er so erklärt, daß der Aldehyd, wie im allgemeinen die Atomgruppe — CHO, ein Gift für das Enzym sei. Bei

<sup>1)</sup> Journ. of physiol. **46**, 236. 1913.

<sup>2)</sup> Journ. Chem. Soc. Trans. **95**, 927. 1909.

Gegenwart von Säuren oder Basen nimmt nach Auld die Geschwindigkeit der Hydrolyse stark ab, weil das Emulsin sich mit diesen zu Salzen vereinigt, und es könnte folglich selbst sowohl Base wie Säure sein, d. h. es besitze amphotere Eigenschaften.

Bayliss<sup>1)</sup> zeigte, daß bei Synthese, wie bei Hydrolyse, von Glycerin-glucosid sowohl mit syn-Emulsin als mit dia-Emulsin dasselbe Gleichgewicht, obschon mit verschiedener Geschwindigkeit, erhalten wurde. Er hält sie darum für ein und dasselbe Enzym, und er bezweifelt überhaupt die Existenz spezifisch synthetisierender Enzyme.

Krieble<sup>2)</sup> verhinderte die partielle Oxydation des Benzaldehyds während des Verlaufs der Versuche dadurch, daß er den Luftsauerstoff durch Stickstoff verdrängte. Er fand dann bei Verwendung von Enzympräparaten aus verschiedenen Prunus-Arten keine Differenz im Gleichgewicht und stellte fest, daß ihre Wirkung durch vorhergehende Behandlung mit reinem Benzaldehyd oder mit Cyanwasserstoff nicht geschwächt wurde. Es gelang ihm nicht mit den Methoden von Rosenthaler das synthetisierende und das spaltende Enzym zu trennen.

## Kapitel II.

### Eigene Untersuchungen.

Auf Prof. v. Eulers Anregung habe ich eine Untersuchung über die Wirkungen des Emulsins begonnen, und dabei habe ich auch den Grund der Variation des kinetischen (symmetrischen) Effektes verschiedener Emulsinpräparate zu finden versucht, wodurch möglicherweise der Zusammenhang zwischen syn-Emulsin und dia-Emulsin aufgeklärt werden konnte.

Dabei habe ich näher studiert, in welchem Grade die Acidität ( $p_H$ ) auf die Geschwindigkeit der Oxynitrilsynthese, mit und ohne Emulsin, einwirkt.

### I. Material.

Nachdem ich einige Zeit versucht hatte, mit wässrigen Lösungen zu arbeiten, welche Methode wegen der Schwerlöslichkeit des Benzaldehyds im Wasser bei konzentrierten Lösungen nicht gut verwendbar war, habe ich hier Alkohol als Lösungsmittel verwendet, wodurch ich immer ein homogenes System beibehalten konnte. Der stets benutzte Alkohol war eine Mischung von Äthylalkohol und Wasser zum spez. Gew. 0,924 (bei 18°), 47 Gewichtsprozenten reinen Äthylalkohols entsprechend.

<sup>1)</sup> l. c.

<sup>2)</sup> Journ. Americ. Chem. Soc. **37**, 2205. 1915.

Zu den Synthesen wurde vom Benzaldehyd, dessen Gehalt an Benzoesäure mit Phenolphthalein zu 1% bestimmt wurde, eine solche Menge genommen, daß sie das angegebene Gewicht reinen Aldehyds enthielt.

Der Cyanwasserstoff wurde aus Cyankalium und verdünnter Schwefelsäure bereitet und, nach Durchstreichen einer mit Baumwolle gefüllte Waschflasche, in Alkohol gelöst. Die Lösung verblieb ungefärbt, und ihr Gehalt an HCN wurde nach Volhards<sup>1)</sup> Methode bestimmt und bisweilen kontrolliert.

Das Emulsin wurde aus bitteren Mandeln nach der Methode Hérisseys<sup>2)</sup> dargestellt, so fein als möglich gepulvert und in dieser Form zum Reaktionsgemisch gefügt, in welchem es anscheinend ungelöst verblieb, obschon es dabei gute asymmetrische und kinetische Wirkung gab.

Mein Präparat wirkte außerdem kräftig spaltend auf Amygdalin; die Analyse nach Bertrand<sup>3)</sup> zeigte nur Spuren von löslichen Kohlenhydraten an; bei Mikroanalyse nach Kjeldahl<sup>4)</sup> wurde als Mittel 12,5% Stickstoff gefunden, und die Asche betrug ca. 10%.

## II. Versuchsanordnung.

**Die Synthesen.** In einem Fläschchen mit Stopfen wurde ein abgemessenes Volumen Cyanwasserstofflösung, eventuell auch die kleine Menge  $p_{\text{H}}$ -variierender Substanz, eingefüllt. Nach Umschwenken wurde dann die dem Cyanwasserstoff äquimolekulare Menge Benzaldehyd zugefügt und das Gemisch kräftig geschüttelt, wonach das Titrieren auf freiem HCN beginnen konnte. Dabei wurde mit Pipette ein bestimmtes Volumen des Reaktionsgemisches in überschüssiger Silbernitratlösung (0,1 N), welche mit etwas Salpetersäure versetzt war, gegossen und weiter nach Volhards Methode verfahren.

Die Bestimmung von  $p_{\text{H}}$  wurde gewöhnlich gegen das Ende jeden Versuches gemacht.

<sup>1)</sup> Annalen d. Chemie u. Pharmazie **190**, 47. 1878.

<sup>2)</sup> Recherches sur l'Emulsine. Thèse Paris 1899, S. 44.

<sup>3)</sup> Bull. de la Soc. chim. **35**, 1285. 1906.

<sup>4)</sup> I. Bang, Methoden zur Mikrobestimmung einiger Blutbestandteile. Wiesbaden 1916.

Alle Versuche wurden bei Zimmertemperatur (17–18° C) ausgeführt.

**Die Aciditätsbestimmungen.** Bei den Reaktionsgemischen konnte, der Anwesenheit des Cyanwasserstoffs zufolge, die sonst verwendete elektrometrische Methode<sup>1)</sup> (wie auch beim Kupfersulfat) nicht gebraucht werden, weshalb dort die kolorimetrische Methode Sörensens<sup>2)</sup> gewählt wurde. Als Vergleichsmaterial wurden Acetatgemische in Alkohol (eventuell mit Spuren von Schwefelsäure versetzt) verwendet, in welchen  $p_H$  elektrometrisch bestimmt wurde.

Durch Zusatz von Acetatpuffer oder Spuren von Schwefelsäure bzw. Natriumhydroxyd zu den Reaktionsgemischen wurde darin  $p_H$  innerhalb des Intervalls 2,9–8,0 variiert.

Die  $p_H$ -Werte einzelner Lösungen sind im Versuch 17 zusammengestellt.

### III. Versuche.

#### Versuch 1.

Der Zusammenhang zwischen Acidität und Reaktionsgeschwindigkeit der Synthese (Vers. 1–8).

Reaktionsgemisch: 5 ccm (= 5,141 g)  $C_6H_5CHO$  + 36,71 ccm HCN (1,32 N) + 0,06 ccm verdünnte Schwefelsäure.

Titriertes Volumen: 2 ccm. Der Geschwindigkeitskoeffizient  $k$  ist aus der Formel einer bimolekulären Reaktion  $k = \frac{1}{at} \cdot \frac{x}{a-x}$  berechnet.

Zeit in Stunden	AgNO <sub>3</sub> ccm verbraucht	HCN Proz. gebunden	$k \cdot 10^3$ berechnet
2,5	22,7	2,2	0,09
4,75	22,6	2,5	0,05
24	20,8	10,3	0,03
72	17,5	24,6	0,04
198	12,2	47,7	0,04
240	10,5	54,7	0,09

Mittel:  $k \cdot 10^3 = 0,06$ ,  $p_H = 2,9$ .

<sup>1)</sup> L. Michaelis, Die Wasserstoffionenkonzentration. Berlin 1914.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschr. 21, 131. 1909; wie auch in der oben genannten Monographie von Michaelis.

## Versuch 2.

Wie im Versuch 1, aber 0,03 ccm verd. Schwefelsäure.

Zeit in Stunden	AgNO <sub>3</sub> ccm verbraucht	HCN Proz. gebunden	$k \cdot 10^3$ berechnet
1,5	18,0	22,5	1,9
4	14,1	39,3	1,4
6,5	11,8	49,2	1,3
8	10,6	54,5	1,5
21	6,0	74,0	1,3
29	4,9	78,9	1,4
100	1,7	92,7	1,3

Mittel:  $k \cdot 10^3 = 1,4$ ,  $p_H = 3,3$ .

## Versuch 3.

Wie im Versuch 1, aber 2 ccm Natriumacetatpuffer (0,2 N,  $p_H = 3,4$ ) anstatt verd. Schwefelsäure.

Zeit in Stunden	AgNO <sub>3</sub> ccm verbraucht	HCN Proz. gebunden	$k \cdot 10^3$ berechnet
1,1	17,1	22,9	2,7
2	14,5	34,6	2,3
3	12,7	42,7	2,2
5	10,3	53,5	2,1
6	9,3	58,0	2,8
7	8,45	61,9	2,4
21	4,6	79,3	1,6
47	2,4	89,2	1,7
70	1,85	91,7	1,6
120	1,6	94,3	

Mittel:  $k \cdot 10^3 = 2,2$ ,  $p_H = 3,4$ .

## Versuch 4.

Wie im Versuch 1, aber ohne Zusatz.

Zeit in Stunden	AgNO <sub>3</sub> ccm verbraucht	HCN Proz. gebunden	$k \cdot 10^3$ berechnet
0,5	18,7	19,5	4,8
2,5	11,5	50,5	3,9
4,75	8,6	63,0	3,0
24	3,2	86,2	2,6
72	1,5	93,5	

Mittel:  $k \cdot 10^3 = 3,6$ ,  $p_H = 3,5$ .

## Versuch 5.

Wie im Versuch 1, aber 2 ccm Acetattuffer (0,2 N,  $p_H = 4,1$ )  
anstatt verd. Schwefelsäure.

Zeit in Stunden	AgNO <sub>3</sub> ccm verbraucht	HCN Proz. gebunden	$k \cdot 10^3$ berechnet
1	9,0	59,4	14
2	6,0	73,0	12
3	4,5	79,7	12
5	3,2	85,6	10
6	2,75	87,6	11
7	2,5	88,7	11
21	1,55	93,0	
47	1,3	94,1	
70	1,25	94,4	
120	1,2	94,6	

Mittel:  $k \cdot 10^3 = 12$ ,  $p_H = 4,1$ .

## Versuch 6.

Wie im Versuch 1, aber 0,03 ccm Natriumhydroxyldlösung  
anstatt verd. Schwefelsäure.

Zeit in Stunden	AgNO <sub>3</sub> ccm verbraucht	HCN Proz. gebunden	$k \cdot 10^3$ berechnet
0,15	13,3	42,7	50
0,4	7,4	68,1	56
0,75	4,5	80,6	56
0,92	3,8	83,6	56
1,6	2,7	88,4	37
2	2,3	90,1	37
4,75	1,7	92,7	
24	1,3	94,2	
72	1,2	94,8	

Mittel:  $k \cdot 10^3 = 50$ ,  $p_H = 5,3$ .

## Versuch 7.

Wie im Versuch 1, aber 0,06 ccm Natriumhydroxyldlösung  
anstatt verd. Schwefelsäure.

Zeit in Stunden	AgNO <sub>3</sub> ccm verbraucht	HCN Proz. gebunden	$k \cdot 10^3$ berechnet
0,2	3,15	86,7	326
0,32	2,3	90,1	273
0,5	1,7	92,7	268
0,92	1,5	93,5	
1,5	1,4	94,0	
2	1,4	94,0	
24	1,3	94,4	
72	1,3	94,4	

Mittel:  $k \cdot 10^3 = 290$ ,  $p_H = 6,1$ .

## Versuch 8.

Wie im Versuch 1, aber 0,1 ccm Natriumhydroxydlösung anstatt verd. Schwefelsäure.

Zeit in Stunden	AgNO <sub>3</sub> ccm verbraucht	HCN Proz. gebunden	$k \cdot 10^3$ berechnet
0,03	1,6	93,2	4110
0,07	1,6	93,2	2055
0,10	1,5	93,6	1470
0,17	1,5	93,6	
0,5	1,45	93,8	
1,0	1,4	94,0	
1,5	1,3	94,5	
2,0	1,3	94,5	

Mittel:  $k \cdot 10^3 = \text{ca. } 2000$ ,  $p_H = 8,0$ .

## Versuch 9.

Die Wirkung des Emulsins bei der Synthese. (Vers. 9—13).

Wie im Versuch 1, aber 0,2 g Emulsin anstatt verd. Schwefelsäure.

Eine nach Verlauf von 22 Stunden filtrierte Probe vom Reaktionsgemisch gab eine Drehung von  $+1,0^\circ$ , nach Verlauf von 100 Stunden gab eine neue Probe die Drehung von  $+0,6^\circ$  (1 dm-Rohr).

Zeit in Stunden	AgNO <sub>3</sub> ccm verbraucht	HCN Proz. gebunden	$k \cdot 10^3$ berechnet
0,15	16,5	29,0	16
0,75	9,2	60,4	22
1,5	6,0	74,2	18
3	3,5	84,7	18
4	2,7	88,4	21
7	1,8	92,3	15
22	1,2	94,8	
30	1,15	95,0	
100	1,15	95,0	

Mittel:  $k \cdot 10^3 = 18$ ,  $p_H = 4,4$ .

## Versuch 10.

Wie im Versuch 1, aber 0,1 g Emulsin und 0,14 ccm verd. Schwefelsäure.

Drehung nach 2 Stunden  $+0,1^\circ$ , nach 50 Stunden noch unverändert.

Zeit in Stunden	AgNO <sub>3</sub> ccm verbraucht	HCN Proz. gebunden	$k \cdot 10^3$ berechnet
18	21,5	10,2	0,06
23	21,5	10,2	0,05
43	20,6	13,9	0,04
67	17,5	26,9	0,05
91	16,4	31,5	0,05
117	15,3	36,1	0,05

Mittel:  $k \cdot 10^3 = 0,05$ ,  $p_H = 2,9$ .

### Versuch 11.

Wie im Versuch 1, aber 0,1 g Emulsin und 0,1 ccm. verd. Schwefelsäure.

Drehung + 0,1° (nach 20 Stunden).

Zeit in Stunden	AgNO <sub>3</sub> ccm verbraucht	HCN Proz. gebunden	$k \cdot 10^3$ berechnet
4	22,3	7,0	0,18
19	19,4	19,0	0,12
24	18,9	21,1	0,15
41	17,3	27,8	0,07
67	14,9	37,8	0,09
90	13,0	45,8	0,10
115	11,55	51,8	0,09
138	10,8	54,9	0,09
162	9,6	59,9	0,11

Mittel:  $k \cdot 10^3 = 0,11$ ,  $p_H = 3,0$ .

### Versuch 12.

Wie im Versuch 1, aber 0,1 g Emulsin und 0,06 ccm verd. Schwefelsäure.

Drehung + 0,15° (nach 20 Stunden).

Zeit in Stunden	AgNO <sub>3</sub> ccm verbraucht	HCN Proz. gebunden	$k \cdot 10^3$ berechnet
3	20,9	12,9	0,3
17	16,4	31,6	0,2
19	15,9	33,7	0,2
24	14,3	40,4	0,3
41	11,45	52,3	0,2
67	8,35	65,2	0,3
90	6,7	72,1	0,3
115	5,5	77,1	0,3
138	4,6	80,8	0,4
162	4,1	82,9	0,3

Mittel:  $k \cdot 10^3 = 0,3$ ,  $p_H = 3,1$ .

## Versuch 13.

Wie im Versuch 1, aber 0,1 g Emulsin und 0,03 ccm verd. Schwefelsäure.

Drehung  $+0,2^\circ$  (nach 20 Stunden).

Zeit in Stunden	AgNO <sub>3</sub> ccm verbraucht	HCN Proz. gebunden	$k \cdot 10^3$ berechnet
2	16,5	31,2	2,3
3	14,9	37,9	2,2
17	5,4	77,5	2,0
19	4,8	80,0	2,1
22	4,6	80,8	2,2
41	2,35	90,2	2,2
67	1,55	93,5	2,2
90	1,2	95,0	2,1
115	1,15	95,2	
138	1,15	95,2	

Mittel:  $k \cdot 10^3 = 2,2$ ,  $p_H = 3,4$ .

## Versuch 14.

Dasselbe Gleichgewicht wird bei Dissoziation und bei Assoziation erhalten.

Dissoziation.

Reaktionsgemisch: 20 ccm (= 20,67 g) C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CHO + 141,8 ccm HCN (1,37 N) + 0,1 ccm Natriumhydroxydlösung.

Nach 24 Stunden durch Titrierung (2 ccm; 1,2 ccm AgNO<sub>3</sub>) 95,1% gebundenes HCN gefunden.

Vom Gemisch wurden 20 ccm mit Alkohol zum Volumen 200 ccm versetzt.

Titrl. Volumen: 10 ccm.

Zeit in Stunden	AgNO <sub>3</sub> ccm verbraucht	HCN Proz. gebunden
3	1,5	87,8
21	1,55	87,4
29	1,55	87,4
46	1,55	87,4

Das Gleichgewicht bei Dissoziation wurde folglich bei 87,4% gebundenes HCN erreicht.

Assoziation.

Reaktionsgemisch:  $\frac{20 \cdot 20,67}{161,9}$  g C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CHO +  $\frac{20 \cdot 141,8}{161,9}$  ccm

HCN (1,37 N) + Alkohol zum Volumen 200 ccm.

Titrl. Volumen: 10 ccm.

Zeit in Stunden	AgNO <sub>3</sub> ccm verbraucht	HCN Proz. gebunden
3,5	2,5	79,2
29	1,5	87,5
46	1,5	87,5

Es wurde folglich auch bei Assoziation dasselbe Gleichgewicht wie bei Dissoziation erhalten.

#### Versuch 15.

Der Zusammenhang zwischen Acidität und Dissoziationsgeschwindigkeit.

Von dem Reaktionsgemisch im Versuch 14, mit 95,1% gebundenem HCN, wurden zwei Proben von je 10 ccm in Alkohol zu 100 ccm gelöst.

Die Lösungen wurden mit einem Tropfen von Natriumhydroxyd (I), bezw. Schwefelsäure (II), versetzt. Titr. Volumen: 10 ccm.

#### Lösung I.

Zeit in Stunden	AgNO <sub>3</sub> ccm verbr.	HCN Proz. geb.
0,02	1,55	87,4
6	1,55	87,4
22	1,55	87,4

$p_H = 7,5$ .

#### Lösung II.

Zeit in Stunden	AgNO <sub>3</sub> ccm verbr.	HCN Proz. geb.
0,02	0,5	95,1
6	0,5	95,1
22	0,9	92,7

$p_H = 2,9$ .

In einer beinahe neutralen Lösung ( $p_H = 7,5$ ) wird folglich bei Dissoziation das Gleichgewicht unmeßbar schnell, in einer sauren Lösung ( $p_H = 2,9$ ) dagegen sehr langsam erreicht.

#### Versuch 16.

##### Bestimmung der Kontraktion.

5 ccm C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CHO und 36,7 ccm HCN (1,32 N) wurden in einem in Kubikzentimetern gradiertem Rohre vermischt und 0,1 ccm Natriumhydroxydlösung zugefügt, um die Synthese zu beschleunigen. Nach Verlauf von 20 Stunden wurde das Volumen abgelesen, wobei gefunden wurde, daß eine Kontraktion von 1,0 ccm stattgefunden hatte, 2,4% vom anfänglichen Volumen entsprechend. Das Volumen verblieb dann unverändert.

Diese Kontraktion vermehrt die Prozentziffern des gebundenen Cyanwasserstoffs nur mit höchstens einer Einheit in der ersten Dezimalstelle, weshalb sie hier nicht berücksichtigt worden ist.

Versuch 17.

$p_H$ -Bestimmungen.

Substanz	Lösungs- mittel	$p_H$	Bestimmungs- methode
Alkohol . . . . .	Alkohol	7,9	Elektrometrisch
Benzaldehyd (2 ccm B. + 20 ccm Alk.)	Alkohol	4,7	Elektrometrisch
Cyanwasserstoff (1,32 N) . . . . .	Alkohol	6,0	Kolorimetrisch
Emulsin	Alkohol	7,0	Elektrometrisch
Magnesiumsulfat (gesättigte Lösung)	Wasser	7,0	Elektrometrisch
Kupfersulfat (verd. Lösung) . . . . .	Wasser	ca. 6	Kolorimetrisch

Nachdem die Acidität der Benzaldehydlösung zu  $p_H = 4,7$  bestimmt war, wurde diese langsam (während einer Stunde) durch einmalige Entleerung einer Bürette in ein untergestelltes Fläschchen getropft, wonach gefunden wurde, daß  $p_H$  sich zu 3,0 vermindert hatte.

Sodann wurde ca. 0,1 g Emulsin zugefügt und das Gemisch geschüttelt. Nach einer Viertelstunde wurde  $p_H$  zu 4,9 bestimmt, auf welchem Werte es dann fortwährend verblieb.

IV. Resultate.

Aus dem aus den Versuchen 1—13 gezeichneten Diagramm (Abb. 1) wird sogleich ersichtlich, daß (bei unveränderter Temperatur und Konzentration) die Geschwindigkeit der Synthese von der Acidität der Lösung bestimmt wird. Beim Ansteigen von

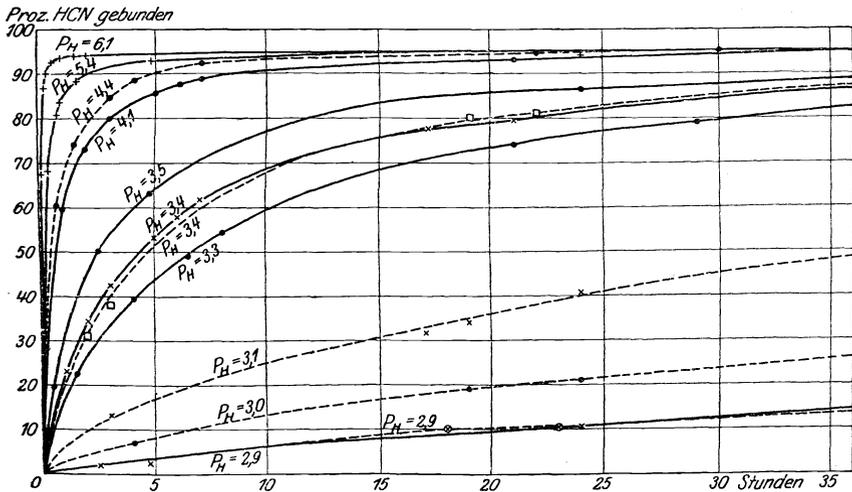


Abb. 1. Die Geschwindigkeit der Oxynitrilsynthese bei verschiedenen Aciditäten. Die Kurven der Versuche bei Gegenwart von Emulsin sind gestrichelt.

$p_{\text{H}}$  von ca. 3 bis ca. 6 vermindert sich die Reaktionszeit von etwa zwei Monaten bis zu einer Stunde, d. h. die Geschwindigkeit wird dadurch außerordentlich vergrößert, um bei Neutralität der Lösung unmeßbar groß zu werden.

Der genannte Zusammenhang zwischen Acidität und Geschwindigkeit geht auch aus folgender Zusammenstellung hervor:

$p_{\text{H}}$	2,9	3,0	3,1	3,3	3,4	3,5	4,1	4,4	5,3	6,1	8,0
$k \cdot 10^3$	0,6	0,11	0,3	1,4	2,2	3,6	12	18	50	290	2000

Mit diesen Zahlen ist die Kurve in Abb. 2 gezeichnet.

Auch bei der Dissoziation findet man einen derartigen Zusammenhang zwischen Geschwindigkeit und Acidität (Versuch 15).

In einer genügend sauren Lösung ( $p_{\text{H}} = \text{ca. } 3$ ) verläuft sowohl die Bildung wie die Spaltung des Oxynitrils äußerst langsam.

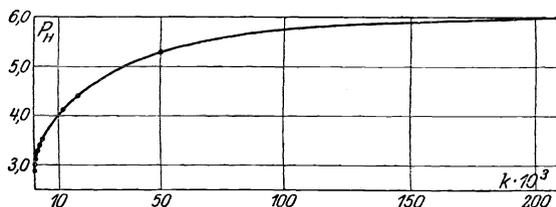


Abb. 2. Der Zusammenhang zwischen Acidität und Reaktionsgeschwindigkeit bei der Oxynitrilsynthese.

Das früher oder später erreichte Gleichgewicht wird bei allen Synthesen praktisch dasselbe, falls Temperatur und Konzentration unverändert sind. Es verbleibt auch dasselbe, ob von dem Oxynitril, das sich beim Verdünnen teilweise dissoziiert, oder von Benzaldehyd und Cyanwasserstoff, ausgegangen wird (Versuch 14).

Der Zusatz von Emulsin hat keine Veränderung im Gleichgewicht zur Folge. Dagegen wird von Emulsin, wie von anderen Substanzen, die  $p_{\text{H}}$  vermehren, die Geschwindigkeit der Synthese entsprechend vergrößert. In einer Mischung mit Geschwindigkeitskonstante  $k \cdot 10^3 = 3,6$  wird z. B. durch Zusatz von 0,2 g Emulsin diese auf dem Werte 18 erhöht (Versuche 4 und 9). Der Grund ist, daß das Emulsinpräparat, wie andere Eiweißstoffe, die Säure (Benzoessäure) zu binden vermag, die bei der Oxydation des Aldehyds gebildet wird; diese Bildung geschieht bei reichlicher Luftzufuhr sehr schnell (Versuch 17).

Außerdem wirkt Emulsin dahin, daß die Produkte optisch aktiv (asymmetrisch) gefunden werden (Versuche 9—13).

#### V. Besprechung der Theorie von Rosenthaler und anderen.

Wenn die von mir gefundenen Resultate mit den Befunden und Annahmen von Rosenthaler verglichen werden, scheint es mir, als wären seine Ansichten und Erklärungen über die „enzymatische“ Wirkung des Emulsins im Falle des Oxynitrilgleichgewichts nicht haltbar. Es können jetzt einfachere Erläuterungen gegeben werden, wobei die genannten Wirkungen des Emulsins nicht als enzymatische aufgefaßt zu werden brauchen.

1. Die Zunahme der Geschwindigkeit der Synthese wird jetzt ungezwungen darauf zurückgeführt, das das Emulsinpräparat mehr oder weniger von der freien Benzoesäure des Reaktionsgemisches bindet, wodurch  $p_H$ , und damit die Reaktionsgeschwindigkeit, vergrößert wird.

2. Die Zunahme der Menge des Oxynitrils bei Anwesenheit von Emulsin hat ihren Grund darin, daß das Gleichgewicht in diesem Falle, wo ja die Benzoesäure vom Emulsin gebunden wird, früher erreicht wird als in einem Gemisch, wo die anwesende Säure die Reaktion verzögert.

Weder die erstere Zunahme noch die letztere braucht also als ein enzymatischer Effekt angesehen zu werden.

3. Das „syn-Emulsin“, welches erhalten wird, wenn Emulsin zuerst mit Säuren und dann mit Alkali bis zur Neutralisation behandelt wird, beschleunigt die Synthese schlechthin, weil dann der Neutralitätspunkt ( $p_H = \text{ca. } 7$ ) erreicht ist und folglich der Säuregrad so unmerklich, daß die Synthese außerordentlich schnell verläuft. Die Wirkung dieses Präparates ist mithin keine enzymatische.

4. Rosenthalers „dia-Emulsin“, welches er dadurch erhalten hat, daß Emulsin mit Lösungen von Kupfersulfat oder Magnesiumsulfat behandelt wird, und welches das Oxynitril schnell zerlegt, verliert auch ihre enzymatische Mystik. Denn durch die geringe Acidität ( $p_H = 6-7$ ) in diesen Lösungen — von welchen, sehr bezeichnend, Rosenthaler das fragliche Enzym niemals trennen konnte — wird das zugeführte Oxynitril (z. B. aus gespaltenem Amygdalin) schnell dissoziiert und ein neues Gleichgewicht erhalten, wobei natürlicherweise etwas Cyanwasserstoff

entbunden wird. Daß das Kupfersulfat nicht immer geeignet war, wird daraus erklärt, daß es etwas mehr sauer ist als das Magnesiumsulfat (Versuch 17).

Die Annahme Aulds<sup>1)</sup>, daß die auffallend stark verzögernde Wirkung des Aldehyds bei der Spaltung des Substrates eine Giftwirkung der Atomgruppe —CHO sei, wird jetzt ganz einfach auf die durch Oxydation des Aldehyds vergrößerte Acidität zurückgeführt.

5. Im Zusammenhang mit dem dia-Emulsin wurde erwähnt, daß Armstrong und Horton<sup>2)</sup> in Emulsin u. a. auch ein Oxynitril spaltendes Enzym, Benzcyanase, von Rosenthaler Oxynitrilase genannt, angenommen hatten. Ihr Grund hierfür war, daß Schwefelsäure, nach Walker und Krieble<sup>3)</sup>, aus Amygdalin, Benzoxynitril lostrennt, ohne daß diese Substanz dann weiter zerlegt wird, und daß, nach Ultée<sup>4)</sup> das Oxynitril viel beständiger ist als vorher angenommen war. Weil also das (in saurer Lösung) sehr stabile Oxynitril in Gegenwart von Emulsin zerlegt wird, soll, nach Armstrong und Horton, darin ein Oxynitril spaltendes Enzym stecken. Ultée hat aber gezeigt, daß die Stabilität des Oxynitrils nur bei Überschuß von Säure vorhanden ist, welches mit dem Befunde von Walker und Krieble übereinstimmt, während in neutraler Lösung, nach Wirth<sup>5)</sup> und nach meinem Versuche 15, Spaltung schnell von selbst eintritt. Man braucht also nicht die Annahme eines speziellen Enzymes, um zu erklären, warum Benzoxynitril in Lösung gespalten wird.

6. Der einzige spezifische Effekt, den Emulsin auf eine Mischung von Benzaldehyd und Cyanwasserstoff ausübt, ist die Asymmetrie des entstandenen Oxynitrils. Prinzipiell würde dieses Verhalten zur Annahme eines Enzymes nicht nötigen, wie Fajans<sup>6)</sup> ausführlich dargelegt hat. Es ergibt sich jetzt die Aufgabe, quantitativ zu erforschen, in welcher Weise sich eine solche nichtenzymatische, asymmetrische Wirkung über die symmetrische Synthese superponiert.

---

<sup>1)</sup> l. c.

<sup>2)</sup> l. c.

<sup>3)</sup> Journ. Chem. Soc. Trans. **95**, 1437. 1909.

<sup>4)</sup> l. c.

<sup>5)</sup> l. c.

<sup>6)</sup> l. c.

### Zusammenfassung

I. Sämtliche symmetrisch-kinetischen Wirkungen, welche bei der Oxynitrilbildung einem synthetischen Enzyme zugeschrieben worden sind, lassen sich einfach, ohne Einführung besonderer Hypothesen, als Aciditätswirkungen erklären.

Für diese Wirkungen wird die Annahme eines synthetischen Enzymes „syn-Emulsin“ oder „Oxynitrilase“ folglich überflüssig und hinfällig, und die betr. „Enzyme“ können aus der Reihe der enzymatischen Katalysatoren gestrichen werden.

II. Gegen die Existenz einer Oxynitrilase (Benzocyanase) dürften meine Versuche 14 und 15 sprechen. Der Beweis von Armstrong und Horton kann nicht als entscheidend angesehen werden.

In welchem Grad die Oxynitrilsynthese, bzw. die Oxynitrilspaltung, wenn sie unter Einwirkung eines Emulsinpräparates verläuft, auf einen asymmetrischen, nicht enzymatischen Katalysator im Sinne Fajans' zurückgeführt werden kann, und ob man ohne Annahme eines Oxynitril spaltenden (asymmetrischen) Enzyms auskommt, hoffe ich in meiner nächsten Mitteilung erläutern zu können.

### Nachtrag.

Nach Erledigung der 1. Korrektur ist im Januarheft 1921 des Journal Americ. Chem. Society eine Untersuchung von Kriebler und Wieland: „The properties of oxynitrilase“ zu meiner Kenntnis gekommen. Die genannten Autoren sind zwar auf Grund einiger Versuche ebenfalls zur Ansicht gelangt, daß die Acidität für die Oxynitrilsynthese eine wesentliche Rolle spielt, haben aber trotzdem die Wirkung des Rosenthalerschen Enzympräparates nicht auf die Acidität zurückführen können.

# Über die asymmetrische Wirkung des Emulsins bei der Benzoxynitril-synthese.

Von

**E. Nordefeldt.**

(Aus dem Biochemischen Laboratorium der Universität Stockholm.)

(Eingegangen am 24. April 1922.)

Mit 6 Abbildungen im Text.

## Einleitung.

In einer früheren Arbeit habe ich gezeigt<sup>1)</sup>, daß nicht unbedingt ein Enzym als die Ursache der *symmetrisch*-synthetischen Wirkung des Emulsins bei der Benzoxynitrilsynthese angesehen werden muß, wie es *Rosenthaler*<sup>2)</sup> angenommen hat, sondern daß diese als einfache Aciditätswirkung betrachtet werden kann. Die einzige übrigbleibende spezifische Wirkung, die das Emulsin auf eine Mischung von Benzaldehyd und Cyanwasserstoff ausübt, ist deshalb die Hervorrufung der *Asymmetrie* des entstehenden Oxynitrils.

In der hier vorliegenden Arbeit studierte ich hauptsächlich die Bedingungen für das Bildungsoptimum des aktiven d-Oxynitrils und einige Eigenschaften des Emulsins.

## I. Über das d-Benzoxynitril.

### 1. Allgemeine Methodik.

Die Ausbildung der optischen Aktivität verfolgte ich durch zwei etwas verschiedene Methoden:

*Methode I. Polarimetrische Untersuchung nach Ausschütteln mit Chloroform.* In einer Reihe Fläschchen mit Stöpseln wurde aus einer Bürette ein bestimmtes Volumen einer Wasserlösung von Cyanwasserstoff bekannter Normalität mit einer abgewogenen Menge feingepulverten Emulsins (siehe S. 400) zusammengebracht. Nach eventueller Ver-

<sup>1)</sup> Diese Zeitschr. **118**, 15. 1921.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschr. **14**, 238. 1908; **17**, 257. 1909; **19**, 186. 1909; **26**, 1 u. 7. 1909; **28**, 408. 1910; **50**, 486. 1913. — Arch. der Pharm. **246**, 365. 1908; **248**, 105 u. 534. 1910; **249**, 510. 1911; **251**, 56 u. 85. 1913.

dünnung mit Wasser wird einige Minuten geschüttelt und gewartet, wobei das Pulver quoll und in eine schleimige Fällung überging, die sich in der Flüssigkeit verteilte; dann wurde eine mit dem Cyanwasserstoff äquimolekulare Menge Benzaldehyd bekannten Volumens eingeführt. Die Mischung wurde sogleich geschüttelt, was mit kurzen Pausen gleichförmig für alle Proben der Versuchsreihe wiederholt wurde. Durch den reichlichen Emulsinschlamm hielt sich das Benzaldehyd einigermaßen gleichförmig in der Flüssigkeit verteilt, und das Ganze wurde bei höheren Wärmegraden mittels Thermostat bei konstanter Temperatur gehalten. Nach bestimmter Zeit wurde jede Flasche mit einem gewissen Volumen Chloroform ausgeschüttelt, welches dann mittels eines Scheidetrichters abgetrennt, durch Schütteln mit ein wenig wasserfreiem Natriumsulfat von Feuchtigkeit befreit und mit Na-Licht in einem 5 cm-Rohr polarisiert wurde. Durch polarimetrische Prüfung der zurückbleibenden Wasserlösung wurde kontrolliert, daß fast alle optisch aktive Substanz beim Ausschütteln ins Chloroform überging.

Bei einigen Reihen wurde zur gleichen Zeit der Gang der totalen Synthese beobachtet, indem vor dem Chloroformzusatz eine Probe (z. B. 3 ccm) mit Pipette herausgeholt und auf freien Cyanwasserstoff mit salpetersäurehaltigem Silbernitrat nach *Volhards* Methode titriert wurde.

*Methode II. Direkte polarimetrische Untersuchung der homogenen Substratlösung.* Eine bessere Methode wurde in der Weise gewonnen, daß als Lösungsmittel eine Mischung von Wasser und so viel Alkohol benutzt wurde, daß das Benzaldehyd und das Oxynitril die ganze Zeit hindurch gelöst erhalten blieben, wodurch die Ausbildung der optischen Aktivität in ein und derselben Lösung direkt verfolgt werden konnte. Zu diesem Zweck wurde der Cyanwasserstoff in konzentriertem Alkohol (96%) gelöst und mit einem zweckmäßigen Volumen filtrierter Wasserlösung von Emulsin (in einigen Fällen mit in Wasser aufgeschlämmtem Emulsinpulver) versetzt; hierauf wurde eventuell Acetatpuffer, in 47% Alkohol gelöst (spez. Gew. 0,924), und Benzaldehyd zugesetzt und die Mischung geschüttelt, wobei das Benzaldehyd in Lösung ging. Nachdem die immer unmittelbar entstehende Proteinfällung abfiltriert worden war, konnte die Lösung mit bestimmten Zeitintervallen direkt polarisiert werden. Bei Verwendung von Röhren von 1 oder 2 dm Länge war die Genauigkeit der Ablesung 0,05°.

Falls die eben erwähnte Fällung dann in eine neue Substratmischung eingeführt wurde, entstand darin keine merkbare optische Aktivität, weshalb sie nichts mehr vom Katalysator enthielt. Auch zeigte sich, daß die zum Abfiltrieren benötigte Zeit in der Ausbildung der optischen Aktivität keine Veränderung hervorrief. Deshalb wurde sie gewöhnlich unmittelbar vor der ersten polarimetrischen Ablesung abfiltriert.

Als Maß des Abnehmens der Drehung mit der Zeit (die *Inaktivierungsgeschwindigkeit*) wurde die Formel der Reaktionsgeschwindigkeit bei einer monomolekularen Reaktion verwendet:  $k' = \frac{1}{t} \log \frac{\alpha_0}{\alpha_t}$ , wo  $t$  die Zeit in Stunden zwischen zwei polarimetrischen Ablesungen und  $\alpha_0$  und  $\alpha_t$  die am Anfang und Ende des Intervalls beobachteten Drehungswinkel sind.

Als Maß der *Bildungsgeschwindigkeit des totalen Oxynitrils* verwendete ich die Konstante der Reaktionsgeschwindigkeit einer bimolekularen Reaktion:

$$k = \frac{x}{at(a-x)}$$

( $a$  die Anfangskonzentration des freien Cyanwasserstoffes und  $x$  die Konzentrationsänderung im Zeitintervall  $t$  Stunden).

**2. Die optische Aktivität nimmt mit der Zeit ab, während die totale Menge des Oxynitrils konstant bleibt.**

Um die Bildungsgeschwindigkeit des optisch aktiven und des totalen Oxynitrils zu vergleichen, wurde folgender orientierender Versuch gemacht.

*Versuch 1:* 0,1 g Emulsin + 10 ccm Wasser + 9 ccm HCN (1,1 N) + 1,05 g  $C_6H_5CHO$ . Methode I. Titriertes Volumen 5 ccm.  $AgNO_3$  0,05 N.

a) Temperatur 17°.

Stunden	Drehung in Graden	$AgNO_3$ ccm verbr.	HCN % geb.	$k \cdot 10^3$ berechnet
1	0,98	25,4	51,2	4,2
3	1,35	18,0	65,4	
70	1,00	15,6	70,1	

b) Temperatur 36°.

Stunden	Drehung in Graden	$AgNO_3$	HCN	$k \cdot 10^3$
$\frac{1}{4}$	1,05	18,6	64,3	7,1
$\frac{1}{2}$	1,17			
1	1,13	16,5	68,3	
$1\frac{1}{2}$	1,05	16,0	69,3	
$6\frac{1}{2}$	0,80	15,9	69,5	

Die Bildungsgeschwindigkeit sowohl asymmetrischen wie totalen Oxynitrils steigt also mit der Temperatur. Ehe die totale Synthese ihr Maximum noch erreicht hat, fängt indessen die Asymmetrie an abzunehmen, und dies geschieht schneller bei höherer Temperatur, wodurch sich erklärt, daß dieselbe dann nicht so starke Entwicklung erreicht. Dies

deutet darauf hin, daß ein „inaktivierender“ (d. h. ein die Asymmetrie aufhebender) Faktor in die Reaktion eingreift, und der Einfluß dieses Faktors scheint mit der steigenden Temperatur gesteigert zu werden.

### 3. Die optische Aktivität nimmt schnell mit steigender Temperatur ab.

Um den Zusammenhang zwischen Inaktivierungsgeschwindigkeit und Temperatur näher zu untersuchen, wurde folgender Versuch gemacht.

*Versuch 2:* 0,1 g Emulsin + 14,4 g Wasser + 5,4 ccm HCN (1,83 N) + 1,05 g  $C_6H_5CHO$ . Methode I. Titriertes Volumen 3 ccm.  $AgNO_3$  0,05 N.

#### a) Temperatur 0°.

Stunden	Drehung in Graden	$k' \cdot 10^3$	$AgNO_3$	HCN	$k \cdot 10^3$
1/4	0,10		25,5	15,0	
3	0,67		16,4	45,2	2,3
7	0,87		13,4	55,3	1,3

Mittel  $k \cdot 10^3 = 1,8$ .

#### b) Temperatur 10°.

Stunden	Drehung in Graden	$k' \cdot 10^3$	$AgNO_3$	HCN	$k \cdot 10^3$
1/4	0,21		22,7	24,2	
3	1,03		13,0	56,6	3,5
7	1,14		10,2	65,9	1,6

Mittel  $k \cdot 10^3 = 2,5$ .

#### c) Temperatur 20°.

Stunden	Drehung in Graden	$k' \cdot 10^3$	$AgNO_3$	HCN	$k \cdot 10^3$
1/4	0,33		20,5	31,6	
1	0,78		15,0	49,9	7,1
2 1/2	1,04		11,7	60,9	3,7
4	1,11		10,6	64,6	
6	1,12		9,8	67,3	
8	1,15		9,4	68,8	1,8
15	1,08	3,9	8,9	70,3	
22	0,98	6,0	9,0	70,0	

Mittel  $k' \cdot 10^3 = 5$ ,  $k \cdot 10^3 = 4,2$ .

## d) Temperatur 30°.

Stunden	Drehung in Graden	$k' \cdot 10^3$	AgNO <sub>3</sub>	HCN	$k \cdot 10^3$
1/4	0,51		16,7	44,2	[21,7]
1/2	0,78		14,4	51,9	
3/4	0,90		12,9	56,9	9,7
1 1/4	0,98		11,2	62,5	6,9
1 3/4	1,05		10,2	65,9	5,3
2 1/4	1,09		9,8	67,3	
3	1,10		9,6	67,9	

Mittel  $k \cdot 10^3 = 7,3$ .

## e) Temperatur 40°.

Stunden	Drehung in Graden	$k' \cdot 10^3$	AgNO <sub>3</sub>	HCN	$k \cdot 10^3$
1/4	0,86		13,1	56,3	10,0
1/2	0,88		11,8	60,6	
1	0,86		10,5	64,9	6,2
2	0,75	59,4	9,4	68,8	
4	0,60	48,4	8,8	70,6	

Mittel  $k' \cdot 10^3 = 54$ ,  $k \cdot 10^3 = 8$ .

## f) Temperatur 50°.

Stunden	Drehung in Graden	$k' \cdot 10^3$	AgNO <sub>3</sub>	HCN	$k \cdot 10^3$
1/4	0,69		13,1	56,3	13,5
1/2	0,64	130,4	11,4	61,9	
3/4	0,55	265,6	10,4	65,2	10,0
1 3/4	0,38	160,6	9,6	67,9	

Mittel  $k' \cdot 10^3 = 185$ ,  $k \cdot 10^3 = 12$ .

## g) Temperatur 60°.

Stunden	Drehung in Graden	$k' \cdot 10^3$	AgNO <sub>3</sub>	HCN	$k \cdot 10^3$
1/12	0,47		13,8	54,1	19,6
1/6	0,55		12,8	57,3	
1/4	0,43	1283	11,8	60,6	23,5
1/2	0,21	1245	10,2	65,9	15,8
1	0,07	954	9,6	67,9	

Mittel  $k' \cdot 10^3 = 1100$ ,  $k \cdot 10^3 = 20$ .

Für das *totale* Oxynitril sinkt also innerhalb jedes einzelnen Versuches die Synthesegeschwindigkeit, gemessen durch  $k$ , ziemlich schnell mit der Zeit, was sich daraus erklärt, daß das zurückbleibende Benzaldehyd von der Luft oxydiert wird und dadurch die Acidität der Lösung immer mehr steigert, wodurch die Synthese langsamer geht. Mit steigender Temperatur wird die Synthesegeschwindigkeit gesteigert, obschon die gewonnenen Zahlenwerte aus der eben erwähnten Ursache ziemlich approximativ sind. Von der Temperatur unabhängig steigt in allen Fällen die Menge des totalen Oxynitrils zu ungefähr ein und demselben Endwert, und dieses Maximum erleidet dann keine Veränderung mit der Zeit (Abb. 1).

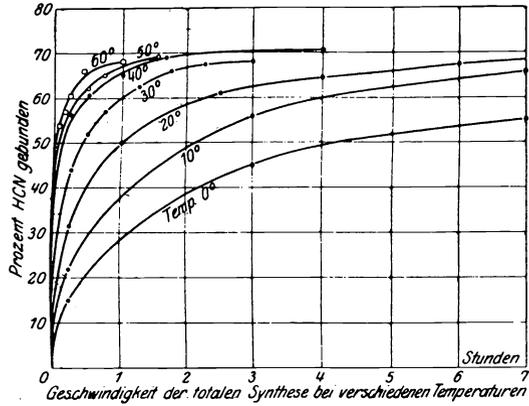


Abb. 1.

Ganz anders verhält sich die *optische Aktivität*. Bei niedriger Temperatur bildet sie sich zwar langsam aus, wie das totale Oxynitril, und bei höherer Temperatur schneller, aber das erreichte Maximum bleibt nicht stehen, sondern beginnt asymptotisch gegen Null zu sinken. Mit steigender Temperatur wird dieses Maximum immer niedriger und sein Hinabsinken immer schneller (Abb. 2). Augenscheinlich steigt die Stärke des inaktivierenden Faktors stark mit der Temperatur, so daß er immer vollständiger und schneller die optisch aktiven Oxynitrilmoleküle umwandelt, die während der Einwirkung des Emulsinkatalysators entstehen.

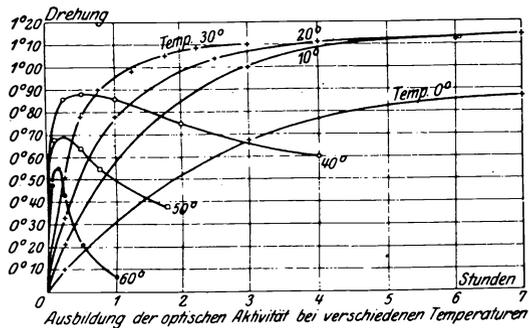


Abb. 2.

#### 4. Die optische Aktivität nimmt rasch mit steigender Neutralität ab.

*Versuch 3:* Eine Reihe Mischungen wurden angestellt, jede 10 ccm Emulsinlösung + 5 ccm Acetatpuffer (1 N, in 47proz. Alkohol gelöst) + 10,2 ccm HCN (1,93 N in 96proz. Alkohol gelöst) + 2,09 g  $C_6H_5CHO$  enthaltend. Temp. 17°.

Nach 1 Stunde wurde die Proteinfällung abfiltriert, worauf die Lösungen mit bestimmten Zeitintervallen in einem 2 dm-Rohr polarimetrisch untersucht wurden.

a)  $p_H = 3,3$ .

Stunden	1½	3½	7	19	46
Drehung in Graden	2,10	2,20	2,45	2,50	2,50
$k' \cdot 10^3$ . . . . .	—	—	—	—	—

Mittel  $k' \cdot 10^3 = 0$ .

b)  $p_H = 4,5$ .

Stunden	1	1½	18½	19½
Drehung in Graden	4,40	4,60	4,40	4,30
$k' \cdot 10^3$ . . . . .	—	—	1,6	1,5

Mittel  $k' \cdot 10^3 = 1,6$ .

c)  $p_H = 4,7$ .

Stunden	1½	5	7	20	46
Drehung in Graden	4,55	4,65	4,60	4,30	3,85
$k' \cdot 10^3$ . . . . .	—	—	2,4	2,5	2,0

Mittel  $k' \cdot 10^3 = 2,3$ .

d)  $p_H = 5,2$ .

Stunde..	1½	3½	6½	19	46
Drehung in Graden	4,40	4,25	3,95	3,20	2,10
$k' \cdot 10^3$ . . . . .	—	7,5	10,6	7,7	6,8

Mittel  $k' \cdot 10^3 = 8,1$ .

e)  $p_H = 5,4$ .

Stunden	1½	3½	6½	19
Drehung in Graden	4,25	4,00	3,70	2,70
$k' \cdot 10^3$ . . . . .	—	13,1	11,3	10,9

Mittel  $k' \cdot 10^3 = 11,8$ .

f)  $p_H = 5,7$ .

Stunden	1½	3½	6½	19
Drehung in Graden	3,40	3,00	2,60	1,25
$k' \cdot 10^3$ . . . . .	—	27,7	17,4	25,4

Mittel  $k' \cdot 10^3 = 23,5$ .

g)  $p_H = 6,1$ .

Stunden	½	¾	1½	3½	6½	19
Drehung in Graden	2,65	2,55	2,30	1,70	1,20	1,10
$k' \cdot 10^3$ . . . . .	—	66,8	60,0	66,6	63,0	60,0

Mittel  $k' \cdot 10^3 = 63,3$ .

Aus den hieraus angefertigten Kurven (Abb. 3) ergibt sich, wie in einigermaßen saurer Lösung die optische Aktivität sich ziemlich langsam ausbildet und ebenfalls äußerst langsam abnimmt. Je neutraler die Lösung wird, desto rascher bildet sich diese Aktivität aus und fängt

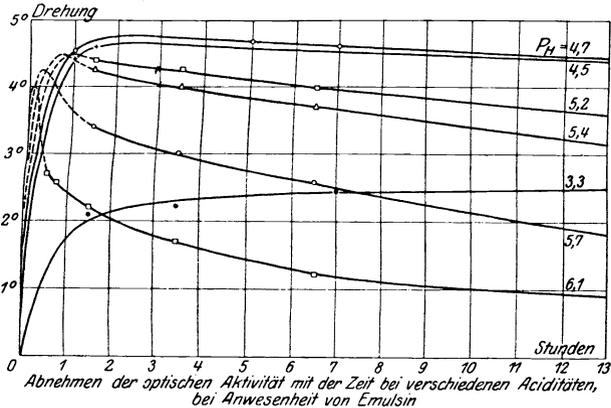


Abb. 3.

dann bald an, immer rascher abzunehmen. In einer fast neutralen Lösung findet sie augenscheinlich kaum die Zeit, sich auszubilden, bevor sie wieder verschwunden ist.

Der Einfluß des inaktivierenden Faktors nimmt also mit steigendem  $p_H$  zu, um bei voller Neutralität augenblickliche und vollständige Sym-

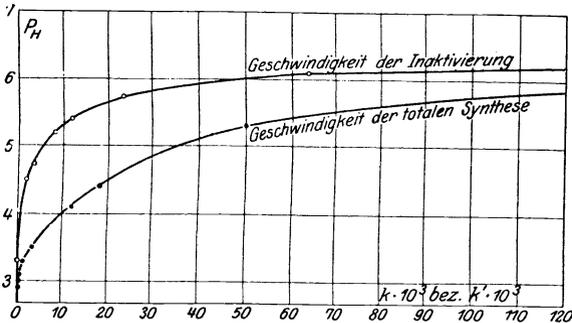


Abb. 4.

metrie hervorzurufen. Da bei verminderter Acidität, wo die Konzentration der H-Ionen abnimmt, die saure Dissoziation des Oxynitrils und also die Konzentration der Oxynitrilionen gesteigert wird, erscheint die Abnahme der optischen Aktivität gerade von dieser Dissoziation und den damit zusammenhängenden Umlagerungen verursacht.

Der Zusammenhang zwischen der *Inaktivierungsgeschwindigkeit* und der Acidität wird durch die obere Kurve in Abb. 4 veranschaulicht. Die

untere Kurve zeigt die Abhängigkeit der *totalen Synthesegeschwindigkeit* von der Acidität und ist meiner zitierten Arbeit entnommen. Obschon die Konzentrationen der reagierenden Stoffe bei beiden Kurven nicht völlig dieselben sind, kann durch einen Vergleich der Kurven eine gute Übereinstimmung mit den beobachteten Erscheinungen gewonnen werden.

*Versuch 4:* Um die Störungen in der Inaktivierungsgeschwindigkeit auszuschalten, die etwa durch die Anwesenheit des Emulsinpräparates hervorgerufen worden sind, wurde der Versuch 3 mit emulsinfreiem, optisch aktivem Oxynitril wiederholt.

1. *Herstellung des Oxynitrils.* 100 ccm Emulsinlösung + 88 ccm HCN (2,3 N, in 96 proz. Alkohol gelöst) + 21,47 g  $C_6H_5CHO$  wurde bei Zimmertemperatur gemischt und nach  $\frac{1}{4}$  Stunde filtriert, wobei die Drehung (2 dm-Rohr)  $3,40^\circ$  war, um nach noch  $1\frac{1}{4}$  Stunden zu  $3,90^\circ$  zu steigen. Nachdem die optische Aktivität nach weiteren  $1\frac{1}{2}$  Stunden, wie angenommen werden konnte, ihr angenähertes Maximum erreicht hatte, wurde die Mischung mit 60 ccm Chloroform ausgeschüttelt, wobei Wasser zugesetzt wurde, um die Löslichkeit des Oxynitrils in dem verdünnten Alkohol zu vermindern, wodurch fast alle optisch aktive Substanz vom Chloroform aufgenommen wurde. Das abgeschiedene oxynitrilhaltige Chloroform wurde mit ein wenig wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und auf dem Wasserbad bis  $100^\circ$  erwärmt, bis fast alles Chloroform verschwunden war, wonach das zurückbleibende ölähnliche Oxynitril in 47 proz. Alkohol zum Volumen 100 ccm gelöst wurde. Die Drehung der Lösung (2 dm-Rohr) war  $3,25^\circ$ .

2. *Inaktivierung des Oxynitrils.* Zu je 20 ccm der letzterwähnten Lösung wurden 2 ccm Citratpuffer (2 N, in 47 proz. Alkohol gelöst) gesetzt, wonach die Abnahme der optischen Aktivität bei verschiedenen  $p_H$  im 2 dm-Rohr verfolgt wurde.

a)  $p_H = 3,6$ .

Stunden	$\frac{1}{4}$	2	5	$6\frac{1}{2}$	21	46	120
Drehung in Graden	2,95	2,95	2,90	2,85	2,80	2,70	2,50
$k' \cdot 10^3$ . . . . .	—	—	—	—	0,5	0,6	0,5

Mittel  $k' \cdot 10^3 = 0,5$ .b)  $p_H = 4,8$ .

Stunden	$\frac{1}{4}$	2	5	$7\frac{1}{2}$	21	46	120
Drehung in Graden	2,90	2,90	2,85	2,80	2,60	2,20	1,55
$k' \cdot 10^3$ . . . . .	—	—	2,5	3,0	2,4	2,9	2,0

Mittel  $k' \cdot 10^3 = 2,6$ .c)  $p_H = 6,8$ .

Stunden	$\frac{1}{12}$	$\frac{1}{4}$	$1\frac{1}{4}$	$4\frac{1}{2}$	6	20
Drehung in Graden	2,60	2,30	1,20	0,25	0,10	0
$k' \cdot 10^3$ . . . . .	—	320	283	210	265	—

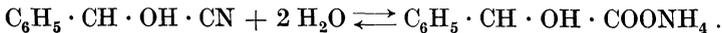
Mittel  $k' \cdot 10^3 = 270$ .d)  $p_H = 7-8$ .

Die optische Aktivität verschwindet unmeßbar schnell.  $k' \cdot 10^3 =$  eine sehr große Zahl.

Auch diese Werte von  $k' \cdot 10^3$  stimmen mit den in Versuch 3 gefundenen wohl überein. Die Anwesenheit des Emulsins scheint also auf die Geschwindigkeit, womit das Oxynitril inaktiviert wird, nicht merkbar störend einzuwirken, vorausgesetzt, daß die Acidität dabei keine Veränderung erleidet.

##### 5. Die Ursache des Verschwindens der optischen Aktivität.

Aus den *Versuchen 1—4* hat sich ergeben, daß die Inaktivierung beschleunigt wird, teils durch das Erhitzen der saueren Lösung, teils durch Vermindern ihrer Acidität. Da die Temperatursteigerung die Geschwindigkeit der Hydrolyse steigert, könnte vermutet werden, ob eine Hydrolyse des Oxynitrils bei höherer Temperatur merkbar wird, wobei das Ammoniumsalz der Mandelsäure entstehen würde:



Hierbei würde die Rechtsdrehung der Flüssigkeit immer mehr abnehmen, weil aus rechtsdrehendem Oxynitril, wie bekannt, linksdrehende Mandelsäure gebildet wird. Da aber der Zahlenwert der spezifischen Drehung bei dieser Mandelsäure [etwa  $-156^\circ$ , *Leukowitsch*<sup>1)</sup>] um ein Vielfaches größer ist als beim Oxynitril [etwa  $+14^\circ$ , *Feist*<sup>2)</sup>], sollte zwar die Mischung nach einiger Zeit inaktiv, aber später immer stärker linksdrehend werden. Wie lange und wie rasch die Inaktivierung auch hat fortfahren können, so habe ich doch *niemals* gefunden, daß eine Linksdrehung eingetreten ist. Falls sich nicht zeigen sollte, daß auch die Mandelsäure in neutraler Lösung schnell racemisiert wird, spricht dieses gegen die Wahrscheinlichkeit einer Hydrolyse.

*Versuch 5:* Um, wenn möglich, vorläufig zu entscheiden, ob Mandelsäure gebildet wird, habe ich die Inaktivierung (bei Zimmertemperatur) in einer Lösung erfolgen lassen, die in einen Kolben eingeschlossen war und mit einer geringen Menge Kaliumcarbonat alkalisch gemacht war. Während 12 Stunden wurde durch diese Lösung ammoniakfreie Luft gesaugt, die dann eine Waschflasche mit 0,1 N. Schwefelsäure passierte. Hätte sich Ammoniummandelat gebildet, so hätte daraus vom Kaliumcarbonat Ammoniak frei gemacht werden sollen, das dann mit dem Luftstrom in die Schwefelsäure eingeführt worden wäre und also deren Titer vermindert hätte. Dieser wurde aber am Ende des Versuches unverändert gefunden. Hydrolyse konnte folglich nicht nachgewiesen werden.

*Versuch 6:* Endlich habe ich die Inaktivierung auch in einem Widerstandsgefäß mit zugehöriger Brücke und Mikrophon vor sich gehen lassen, damit eine bei dem Übergang des Oxynitrils in Mandelat entstehende Veränderung in dem Leitungsvermögen beobachtet werden konnte. Dieses blieb indessen die ganze Zeit unverändert.

Aus den *Versuchen 5—6* ergibt sich, daß die Inaktivierung wahrscheinlich nicht mit etwaigem Entstehen von Mandelsäure zusammenhängt. Obgleich die Möglichkeit anderer Umlagerungen nicht ganz ausgeschlossen ist, scheint mir doch vorläufig wahrscheinlich, daß hier

<sup>1)</sup> B. 16, 1567. 1883.

<sup>2)</sup> Arch. d. Pharm. 247, 226. 1909.

hauptsächlich nur eine *intramolekulare Umlagerung* vorliegt, nämlich Racemisierung in inaktives Oxynitril. Die Frage bedarf aber weiterer Bearbeitung.

## II. Zur Kenntnis des Emulsins.

### 1. Die Herstellung des Emulsins.

In ihren Hauptzügen schloss sich meine Herstellung des hier verwendeten Emulsins an *Herisseys*<sup>1)</sup> Methode an<sup>2)</sup>, wobei aber das Alkohol gegen *Aceton* vertauscht wurde, weil hierdurch teils die Fällung sich schneller absetzte, teils das Präparat dem Oxynitril kräftigere optische Aktivität zu erteilen schien. Die ganz neuerdings von *Willstätter* (l. c.) empfohlene Extraktion mit schwach ammoniakalischer Lösung entspricht durchaus meinen Erfahrungen.

*Versuch 7:* 0,1 g mit verschiedenen Fällungsmitteln hergestellter Mandel-emulsinpräparate wirkten während 19 Stunden auf Mischungen von 4,4 ccm HCN (2,1 N, in Wasser gelöst) + 0,98 g C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CHO ein, wonach die optische Aktivität nach Methode I bestimmt wurde. *Resultat:* Mit Aceton gefälltem Emulsin 1,95°, alkoholgefälltem (neues) 1,45°, alkoholgefälltem (1/2 Jahr alt) 1,45°, acetonegefälltem aber alkoholgewaschenem 1,57°.

*Aceton scheint also ein zweckmäßigeres Fällungsmittel als Alkohol zu sein.*

Auch aus Kernen von anderen *Prunus*-Arten, wie Kirschen und Pflaumen, habe ich kräftige Präparate erhalten, während dagegen die aus den Blättern der erwähnten Pflanzen gewonnenen Substanzen nur geringe Wirkung gezeigt haben. Ebenfalls hat ein Präparat aus Blättern von *Prunus serotina*, deren sich *Krieble*<sup>3)</sup> bedient hat, nur schwache optische Aktivität ergeben.

*Versuch 8:* 0,05 g Emulsinpräparat + 4,4 ccm HCN (2,1 N, in Wasser gelöst) + 0,98 g C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CHO. Temp. 30°. Methode I. Titriertes Volumen 2 ccm AgNO<sub>3</sub> 0,1 N.

Emulsinpräparat	Stdn.	Drehung in Graden	AgNO <sub>3</sub>	HCN
Aus bitteren Mandeln (mit Aceton gefällt)	1/4	0,32	14,7	65,0
	1	0,75	10,9	74,0
	3	0,75	9,7	76,9
	5	0,50	8,8	79,0
	5	0,22	—	—
Aus bitteren Mandeln (mit Alkohol gefällt)	1/4	0,33	—	—
	1	0,38	10,9	74,0
	2	0,31	—	—
	5	0,30	8,0	80,9
	5 1/2	0,06	14,2	66,2
Aus <i>Prunus serotina</i> - Blättern (mit Aceton gefällt)	1 1/4	0,09	8,6	79,5
	4	0,08	8,4	80,0
	19	0,06	8,1	80,7
	24	0,06	8,1	80,7

<sup>1)</sup> Recherches sur l'Emulsine. Thèse Paris, 1899, S. 44.

<sup>2)</sup> Diese Untersuchung war schon abgeschlossen, als die Arbeiten von *Helferich* (Zeitschr. f. physiol. Chem. **117**, 159. 1921) sowie von *Willstätter* und *Csányi* (Zeitschr. f. physiol. Chem. **117**, 172. 1921) erschienen, welche wertvolle Beiträge zur Darstellungsmethode des Emulsins bringen. Die genannten Arbeiten behandeln aber fast ausschließlich *Glucosidasen*.

<sup>3)</sup> Journ. of the Americ. chem. soc. **35**, 1643. 1913.

Aus dem Versuch ergibt sich, daß das aus Mandeln mit Aceton gefällte Emulsin eine etwa zweimal größere Menge optisch aktiven Oxynitrils gibt als das mit Alkohol gefällte, und beide ergeben eine bedeutend kräftigere Wirkung als das aus Blättern von *Prunus serotina* gewonnene Präparat. Dagegen scheint ihre verschiedene Herkunft und Herstellung auf die Geschwindigkeit der *totalen* Synthese nicht einzuwirken, welche, wie früher erwähnt, durch die Acidität der Lösung bestimmt wird.

## 2. Die Eigenschaften meiner Emulsinpräparate.

1. *Ihre optische Aktivität.* Eine neubereitete Wasserlösung von Mandelemulsin läßt sich bis zur Klarheit filtrieren und kann polarimetrisch untersucht werden, wobei dieselbe linksdrehend erscheint, einer spezifischen Drehung des Präparats von  $-47,7^\circ$  entsprechend. Nach etwa 24 Stunden beginnt diese Lösung sich zu trüben und allmählich entsteht Fällung, durch das Entstehen freier Säure verursacht, die einen Teil der gelösten Eiweißstoffe ausfällt. In einer Lösung sank z. B. während 3 Tagen  $p_H$  von 6,51 auf 6,04. Beim Erhitzen der Lösung entsteht allmählich ein reichliches Koagulum und die Drehung verschwindet immer mehr.

*Versuch 9:* Eine Emulsinlösung von 4,09% Trockensubstanz (0,32% Asche) ergab im 2 dm-Rohr die Drehung  $-3,90^\circ$ . Eine andere Lösung von 3,46% Trockensubstanz ergab die Drehung  $-3,30^\circ$ , beide  $[\alpha]^D = -47,7^\circ$  entsprechend.

2. *Temperaturstabilität.* Um eine Auffassung von der Stabilität des im Präparat befindlichen Katalysators der Oxynitrilspaltung bei höherer Temperatur zu gewinnen, wurde folgender Versuch gemacht.

*Versuch 10:* Einige Fläschchen wurden mit je 10 ccm einer Emulsinlösung (4,09% Trockensubstanz,  $p_H = 5,9$ ) beschickt und blieben während einer Stunde bei konstanter Temperatur, wonach sie rasch bis Zimmertemperatur abgekühlt wurden. Jetzt wurde zu den mehr oder weniger koagulierten Lösungen als Puffer 10 ccm Acetat (1 N, in 47 proz. Alkohol gelöst) von  $p_H = 5,0$  und unmittelbar danach 15 ccm HCN (1,34 N, in 96 proz. Alkohol gelöst) und 2,13 g  $C_6H_5CHO$  zugesetzt. Nach einer Stunde bei  $18^\circ$  wurden die Fällungen abfiltriert, und dann wurden die Lösungen im 2 dm-Rohr untersucht. Resultat:

Temperatur	40°		50°		60°			70°		73°		76°		78°		80°	
	2	6	2	25	2	3	25	2	6	2	6	2	6	2	6	2	25
Drehung in Graden	3,00	3,00	2,95	2,35	2,65	2,85	2,00	2,30	2,40	1,75	1,75	0,45	0,45	0,25	0,25	0	0

Zwischen  $70^\circ$  und  $80^\circ$  wird also die hier wirksame Substanz schnell inaktiviert, um nach einer Stunde Erhitzen bis  $80^\circ$  mit Bezug auf ihr Vermögen optisch aktives Oxynitril zu bilden, ganz inaktiv zu werden. Dies gilt wenigstens für  $p_H = \text{ca. } 5,9$ , obgleich es möglich ist, daß in noch neutraler, salzhaltiger oder schwach alkalischer Lösung, wo die Koagulierung nicht so leicht stattfindet, die Aktivität auch nach stärkerem Erhitzen weiter bestehen kann.

3. *Dialyse*. In bezug auf die bei einigen Enzymen nachgewiesene Existenz spezifischer, durch Dialyse abtrennbarer *Aktivatoren* (Koenzyme) schien es von Interesse zu sein, das Verhalten einer Emulsinlösung hierbei zu untersuchen. Im Zusammenhang hiermit wurde eine *Aschenanalyse* gemacht.

*Versuch 11*: Die Dialysen gingen bei Anwesenheit von Toluol in einer Anzahl Collodiumschläuchen vor sich, je etwa 15 ccm fassend, 3 Tage lang, mit oft wiederholtem Umtausch von Außenflüssigkeit, deren totales Volumen 1500 ccm betrug, und die dann bei 30—35° zum Volumen 50 ccm im Vakuum eingeengt wurde.

*Dialyse I.* Emulsinlösung 300 ccm.

<i>Nichtdialysierte Lösung</i>	<i>Dialysierte Lösung (Innenflüssigkeit)</i>	<i>Außenflüssigkeit</i>
$p_H = 6,08$	$p_H = 6,04$	$p_H = 5,73$
Trockensubstanz = 12,1 mg/ccm	Trockensubstanz = 9,2 mg/ccm.	Trockensubstanz = 14,3 mg/ccm = 2,4 mg/ccm von der ursprünglichen Lösung. Davon Kohlenhydrate (als Glucose berechnet) 3,0 mg/ccm = 21% der Trockensubstanz.
Asche = 0,84 mg/ccm = 6,94% d. Trockensubstanz	Asche nicht nachweisbar	Asche = 4,5 mg/ccm = 35% der Trockensubstanz.

*Dialyse II.*

<i>Nichtdialysierte Lösung</i>	<i>Dialysierte Lösung</i>	<i>Außenflüssigkeit</i>
$p_H = 6,39$	$p_H = 5,88$	$p_H = 5,88$
Trockensubstanz = 12,2 mg/ccm	Trockensubstanz = 9,7 mg/ccm	Trockensubstanz = 5,7 mg/ccm. Davon Kohlenhydrate (als Glucose berechnet) 1,3 mg/ccm = 23% der Trockensubstanz.
Asche = 0,9 mg/ccm = 7,37% d. Trockensubstanz	Asche nicht nachweisbar	Asche = 1,9 mg/ccm = 33% der Trockensubstanz.

*Aschenanalyse*<sup>1)</sup>:

PO <sub>4</sub> . . . . .	75,79%
K <sub>2</sub> O . . . . .	14,55 „
CaO . . . . .	7,45 „
MgO . . . . .	1,48 „
SiO <sub>2</sub> . . . . .	0,32 „
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> . . . . .	Spuren
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> . . . . .	„
Na <sub>2</sub> O . . . . .	„
	99,34%

Daraus ergibt sich, daß die ursprünglichen beiden Lösungen (bei verschiedenen Gelegenheiten bereitet), mit einem Emulsingehalt von

<sup>1)</sup> Diese Analyse wurde von Herrn stud. phil. V. *Andersson* gemacht.

bzw. 1,21% und 1,22%, durch die Dialyse einen Teil der Substanz verloren hatten, so daß ihr Gehalt bis bzw. 0,92% und 0,97% gesunken war.

Die in die Außenflüssigkeit audialysierte Substanz enthielt, außer einer geringen Menge stickstoffhaltiger Stoffe (die bei dem Erhitzen der Lösung koagulierte), einen Teil löslicher *Kohlenhydrate*, die nach Hydrolyse mit verdünnter Schwefelsäure und Bestimmung nach *Bertrands*<sup>1)</sup> Methode, als Glucose berechnet, bzw. 21% und 23% von dem Trockengewicht der Substanz ausmachten. Außerdem enthielt dieselbe *anorganische* Stoffe (hauptsächlich Kalium- und Calciumphosphat) bis zu einem Gehalt von bzw. 35% und 33,3%.

Diese bei der Dialyse entfernte Substanzmischung, die *Außenflüssigkeit*, zeigte an sich keine merkbare optisch aktivierende Wirkung bei der Oxynitrilsynthese und enthielt also keine nachweisbare Menge des betr. Katalysators.

Die dialysierte Emulsinlösung, die *Innenflüssigkeit*, zeigte auch nur geringe oder keine katalytische Wirkung. Wenn aber die beiden Flüssigkeiten *gemischt* wurden, zu einem Volumen, wie vor der Dialyse, wurde wieder deutliche optische Aktivität erhalten, obgleich nicht eine so starke wie aus der ursprünglichen undialysierten Lösung.

Indessen trat beim Verwenden nur *dialysierter* Lösung eine *neue Erscheinung* auf, die ein genaues Beobachten der optischen Aktivität unmöglich machte. Wenn gewöhnliche Emulsinlösung mit dem Substrat vermischt wird, entsteht, wie früher erwähnt wurde, augenblicklich eine starke Proteinfällung, nach deren Abfiltrierung der Gang der Aktivität in der klaren Lösung leicht verfolgt werden kann. Diese Fällung enthält keine nachweisbare Menge des Katalysators, weshalb es scheint, als ob dieser aus dem Emulsin freigemacht würde und seine Wirksamkeit anfinde, wenn das Protein ausgefällt wird. Eine dialysierte Lösung ergibt aber *keine Fällung*, wenn sie dem Substrat zugesetzt wird, sondern höchstens eine starke Opaleszenz. Diese verschwindet aber nicht und kann auch nicht durch Filtrieren entfernt werden, weshalb die Polarisierung in einem längeren Rohr dann unmöglich und auch in  $\frac{1}{2}$  dm-Rohr so erschwert ist, daß zuverlässige Resultate nicht haben gewonnen werden können, obgleich es den Eindruck gemacht hat, daß optische Aktivität dabei *nicht* entstanden ist.

Falls aber eine solche dialysierte Emulsinlösung wieder mit Außenflüssigkeit versetzt wird, erhält man mit dem Substrat wieder die Proteinfällung, und deutliche optische Aktivität wird ausgebildet. Diese aktivierende Wirkung hängt augenscheinlich nicht von der Zuführung der organischen Bestandteile der Außenflüssigkeit (z. B. Kohlenhydrate) ab, sondern wird von den *anorganischen* Stoffen verursacht, denn allein eine Zuführung von Emulsinasche genügt, um dieselbe hervorzurufen.

<sup>1)</sup> Bull. de la Soc. chim. **35**, 1285. 1906.

Auch nachdem die Außenflüssigkeit eine Stunde bis 80° erhitzt worden ist, behält sie ihr Vermögen dialysierte Emulsinlösung zu aktivieren.

Hierdurch wird man etwa veranlaßt zu glauben, dies sei ein Fall von direkter Aktivierung durch einen anorganischen Aktivator, etwa Alkaliphosphat, besonders da sich zeigt, daß Zusatz von Spuren desselben so gleich reichliche Proteinfällung und gleichzeitig optische Aktivität des Substrats hervorruft. Indessen zeigten weitere Versuche, daß eine *andere Deutung* möglich ist (siehe Kap. III). Es ergab sich nämlich, daß zwar ein kleiner Zusatz von NaCl, MgCl<sub>2</sub> oder Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> keine Fällung hervorrief, wohl aber eine entsprechende Menge MgSO<sub>4</sub> oder CaSO<sub>4</sub>, und noch bessere Fällung wurde, wie erwähnt, mit Phosphat erhalten. Augenscheinlich wurde die Lösung nicht merkbar durch einwertige Anionen gefällt, wohl aber durch zweiwertige und noch stärker durch dreiwertige, analog den Tatsachen, die sich bei Aussalzung elektrolytfreier Albuminlösungen [*F. Hofmeister*<sup>1)</sup>] ergeben haben. Auch Zusatz von Acetat als Pufferlösung rief eine Fällung hervor, mit begleitender optischer Aktivität des Oxynitriils.

#### 4. Nitrilsynthese durch nichterhitztes und durch erhitztes Emulsin.

*Versuch 12:* Emulsinlösung = 1 g Emulsin + 100 ccm Wasser, filtriert. Hiervon ein Teil inaktiviert durch 1 Stunde Erhitzung bis zu 100° und Filtrierung. Reaktionsgemisch: 4,53 ccm HCN (2,06 N) + 1,0 g C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CHO + 4,53 ccm von bzw. aktiver oder inaktiver Emulsinlösung oder Wasser. Temp. 17°. Methode I. Titriertes Volumen 2 ccm. AgNO<sub>3</sub> 0,1 N.

##### a) Nichterhitztes Emulsin.

Stunden	Drehung in Graden	AgNO <sub>3</sub>	HCN	k · 10 <sup>4</sup>
2	0,70	11,1	46,1	1,8
4	0,82	9,3	54,9	0,8
6	0,80	8,7	57,8	0,5
19	0,76	6,7	67,5	

##### b) Erhitztes Emulsin.

Stunden	Drehung in Graden	AgNO <sub>3</sub>	HCN	k · 10 <sup>4</sup>
2	0	12,3	40,3	0,9
4	0	11,1	46,1	0,5
6	0	10,5	49,0	0,2
19	0	9,2	55,3	

<sup>1)</sup> Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. **28**, 210. 1891.

## c) Ohne Emulsin.

Stunden	Drehung in Graden	AgNO <sub>3</sub>	HCN	$k \cdot 10^3$
2	0	14,0	32,0	0,6
4	0	12,0	37,4	
6	0	12,6	38,8	0,2
19	0	11,9	42,2	0,1
30	0	10,3	50,0	0,2

d) Die Reaktionsmischung verblieb ohne Emulsin während 6 Stunden. Dann wurde nichterhitztes Emulsin zugesetzt. Nach noch  $1\frac{1}{4}$  Stunden ergab sich: Drehung  $0,25^\circ$ , AgNO<sub>3</sub> 11,7, HCN 43,2.

Hieraus ergibt sich, daß eine auf  $100^\circ$  erhitzte (und filtrierte) Emulsinlösung, die *nicht länger optische Aktivität verursacht*, noch eine *Steigerung der totalen Synthesegeschwindigkeit* hervorruft. Diese Wirkung ist folglich *nicht enzymatisch*, sondern hängt von dem Gehalt säurebindender Proteinsubstanz, die in der Lösung noch zurückbleibt, ab. Als Säure kommt hier Benzoesäure (aus dem Benzaldehyd stammend) in Betracht. Bei Verwendung auf  $100^\circ$  erhitzter und *unfiltrierter* Emulsinlösung wurde bei einem Parallelversuch noch größere Synthesegeschwindigkeit erreicht, weil dabei kein Proteinstoff entfernt worden war, und folglich mehr Säure gebunden werden konnte.

Wird der Katalysator zugeführt, nachdem ein Teil der Synthese schon vorsichgegangen ist, so wird eine schwächere optische Aktivität erhalten, darauf deutend, daß der Katalysator nur auf den noch nicht synthetisierten Teil des Substrats einwirkt.

5. Für kleine Emulsinmengen ist die optische Aktivität des Substrats der Emulsinmenge proportional. Um zu prüfen, ob bei kleinen Emulsinmengen die optische Aktivität des Oxynitrils der Menge des Katalysators proportional ist, wurde folgender Versuch gemacht.

Versuch 13: Substrat = 14,1 ccm HCN (1,4 N, in 96 proz. Alkohol gelöst) + 2,09 g C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CHO + 10 ccm Acetatpuffer (1 N, in 47 proz. Alkohol gelöst,  $p_H = 4,4$ ). Methode II.

a) Substrat + 10 ccm Wasser + 5 ccm Emulsinlösung.

Stunden	$\frac{1}{2}$	1	8	24	98
Drehung in Graden	0,20	0,25	0,30	0,35	0,30
	$k' \cdot 10^3 = 1,0$ .				

b) Substrat + 8 ccm Wasser + 7 ccm Emulsinlösung.

Stunden	$\frac{1}{2}$	1	8	24	98
Drehung in Graden	0,40	0,40	0,50	0,50	0,40
	$k' \cdot 10^3 = 1,3$ .				

c) Substrat + 5 ccm Wasser + 10 ccm Emulsinlösung.

Stunden	1/2	1	8	24	98
Drehung in Graden	0,60	0,60	0,75	0,75	0,60
$k' \cdot 10^3 = 1,3.$					

d) Substrat + 3 ccm Wasser + 12 ccm Emulsinlösung.

Stunden	1/2	1	8	24	98
Drehung in Graden	0,80	0,80	0,90	0,85	0,65
$k' \cdot 10^3 = 1,5.$					

e) Substrat + 0 ccm Wasser + 15 ccm Emulsinlösung.

Stunden	1/2	1	8	24	98
Drehung in Graden	1,00	1,00	1,15	1,10	0,85
$k' \cdot 10^3 = 1,5.$					

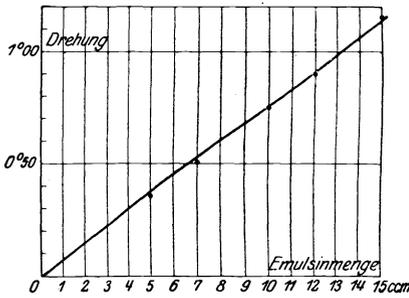


Abb. 5.

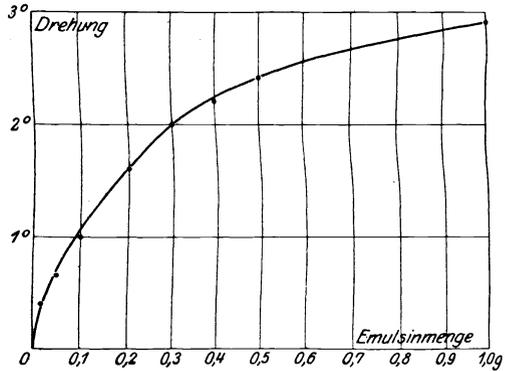


Abb. 6.

Bei kleinen Mengen des Katalysators ist also seine Wirkung seiner Menge proportional (Abb. 5).

Je nachdem die optische Aktivität ihr Maximum erreicht, bringt indessen eine weitere Vermehrung der Katalysatormenge immer geringere Wirkung mit sich, wie sich aus folgendem Versuche ergibt (Abb. 6).

Versuch 14: Das Emulsinpulver wurde mit 10 ccm Wasser während einer Stunde digeriert, wonach 10 ccm Acetatpuffer (1 N, in 47 proz. Alkohol gelöst,  $p_H = 5,4$ ) und Substrat wie im vorigen Falle zugesetzt wurden.

a) 0,03 g Emulsin.

Stunden	1	17	44	124
Drehung in Graden	0,40	0,35	0,15	0,00
$k' \cdot 10^3$ . . . . .	—	—	13,6	—

b) 0,05 g Emulsin.

Stunden	1	17	44	124
Drehung in Graden	0,65	0,55	0,20	0
$k' \cdot 10^3$ . . . . .	—	—	16,3	—

## c) 0,1 g Emulsin.

Stunden	1	17	44	124
Drehung in Graden	1,00	0,65	0,35	0,05
$k' \cdot 10^3$ . . . . .	—	11,7	10,0	10,5

## d) 0,2 g Emulsin.

Stunden	1	17	44	124
Drehung in Graden	1,60	1,00	0,50	0,10
$k' \cdot 10^3$ . . . . .	—	12,8	11,2	10,0

## e) 0,3 g Emulsin.

Stunden	1	17	44	124
Drehung in Graden	2,00	1,30	0,65	0,10
$k' \cdot 10^3$ . . . . .	—	11,7	11,2	10,2

## f) 0,4 g Emulsin.

Stunden	1	17	44	124
Drehung in Graden	2,20	1,35	0,65	0,10
$k' \cdot 10^3$ . . . . .	—	12,6	11,8	10,2

## g) 0,5 g Emulsin.

Stunden	1	17	44	124
Drehung in Graden	2,40	1,40	0,70	0,10
$k' \cdot 10^3$ . . . . .	—	14,6	14,2	10,6

## h) 1,0 g Emulsin.

Stunden	1	17	44	124
Drehung in Graden	2,90	1,70	0,70	0,10
$k' \cdot 10^3$ . . . . .	—	14,5	14,2	10,6

Daß die optische Aktivität in dieser Versuchsreihe mit der Zeit schneller abnimmt ( $k' \cdot 10^3 = \text{ca. } 12$ ) als in der vorhergehenden (Versuch 13) ( $k' \cdot 10^3 = \text{ca. } 1,3$ ) hängt augenscheinlich von dem höheren  $p_{\text{H}}$ -Wert (5,4 bzw. 4,4) des Puffers ab.

## III. Theoretisches.

Eine im Pflanzenreich gewöhnliche Gruppe von Eiweißstoffen ist, wie bekannt, die der *Globuline*. Sie sind in verdünnten Neutralsalzlösungen löslich, nicht aber in konzentrierten, auch nicht in reinem Wasser. Sie fallen deshalb aus, wenn der Salzgehalt der verdünnten Lösung durch weiteren Salzzusatz gesteigert wird, wie auch, wenn er durch Dialyse in zu hohem Grade vermindert wird. Da sie amphotere Elektrolyten sind, aber in überwiegender Grad die Eigenschaften einer schwachen Säure zeigen, werden sie von Alkalien gelöst und von gewöhnlichen Säuren ausgefällt.

Ein Hauptbestandteil in Mandeln und in den Steinen anderer *Prunus*-Arten ist, wie bekannt, das Globulin *Amandin*, das folglich auch ein Hauptbestandteil im Emulsin sein dürfte und das sich mit Bezug auf Herstellungsweise und Eigenschaften diesem anschließt. Außerdem ist in meinem Emulsinpräparat ein reduzierender Bestandteil<sup>1)</sup> enthalten, wahrscheinlich ein *Kohlenhydrat* (*Versuch 11*), von dem möglicherweise die hier besprochene katalytische Tätigkeit herrührt. *Ohta*<sup>2)</sup> hat nachgewiesen, daß Emulsin, das seines ganzen Eiweißgehalts beraubt worden ist, noch immer Pentosereaktion gibt. Wie *Willstätter* und *Csányi* (l. c.) angeben, sind aber *Ohtas* Präparate sehr schwach, so daß Schlüsse aus seinen Angaben kaum gezogen werden können. Seine Wirkung bei der Oxynitrilsynthese hat *Ohta* leider nicht untersucht. Durch die Anwesenheit von (rechtsdrehendem) *Kohlenhydrat* kann in meinem Präparat der Stickstoffgehalt, für den ich 12,5% fand, gegenüber dem *Amandin* (19%) herabgesetzt sein; auch wird durch das rechtsdrehende *Kohlenhydrat* die Drehung meines Präparates (gefunden  $-47,7^\circ$ ) gegenüber der Drehung des *Amandins* herabgesetzt ( $-56^\circ$ ). Diese Verschiedenheit der Drehung kann indessen auch dadurch erklärt werden, daß, wie bekannt, die Anwesenheit von Neutralsalzen die Drehung der Eiweißstoffe herabsetzt.

Da ein Hauptbestandteil meines Präparates ein Globulin ist, lassen sich die bei der *Dialyse* beobachteten Erscheinungen (*Versuch 11*) folgendermaßen deuten: Da der Salzgehalt durch die Diffusion allzu gering wurde, fiel ein großer Teil des Präparates in unlöslicher Form aus, was sich auch dadurch zeigte, daß gegen Ende der *Dialyse* auf dem Boden der Kollodiumschläuche stets eine Fällung entstand. Wenn dann die zurückbleibende verdünnte Emulsinlösung dem salzfreien Substrat zugeführt wurde, blieb das *Amandin* in gelöstem oder wenigstens opaleszierendem Zustande und rief keine optische Aktivität beim Oxynitril hervor, weil der Katalysator noch am *Amandin* gebunden (adsorbiert) blieb. Wenn dagegen ein geeignetes Salz, z. B. Alkaliphosphat, in genügender Menge zugeführt wurde, wurde eine Ausfällung des *Amandins* in grobflockiger Form erhalten, wobei die adsorbierende Fläche eine gewaltsame Verminderung erlitt, so daß der Katalysator freigemacht und optische Aktivität des Substrats erhalten wurde. Da die Emulsinlösung durch die *Dialyse* geschwächt worden war, konnte jedoch die optische Aktivität nicht so hohen Wert erreichen wie mit der ursprünglichen Emulsinlösung. Daß besonders Alkaliphosphat dem Emulsin größere Wirkung zu geben schien als z. B. Sulfate, kann auch auf seine Pufferwirkung zurückgeführt werden, wodurch ein größerer  $p_{\text{H}}$ -Wert

<sup>1)</sup> In Handelspräparaten von Emulsin fanden auch *Neuberg* und *Marx* (diese Zeitschr. 3, 535. 1907) Reduktion von *Fehlingscher* Lösung. *Willstätters* und *Csányis* Emulsinpräparat zeigte diese reduzierende Wirkung nicht.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschr. 58, 329. 1914.

erreicht wurde und optische Aktivität folglich schneller ausgebildet werden konnte (*Versuch 3a* und *b*).

Der anscheinend vorliegende Fall von Katalysatoraktivierung kann somit auf eine *verhinderte Ausflockung* von Globulin zurückgeführt werden.

Die *Schnelligkeit*, womit die optische Aktivität ausgebildet wird, wird augenscheinlich von der totalen Synthesegeschwindigkeit bestimmt, welche ihrerseits durch die Acidität reguliert wird. Indessen wirkt, nach meinen Versuchen (siehe S. 399), noch ein Faktor auf die optische Aktivität ein, nämlich die intramolekulare Umlagerungsgeschwindigkeit, wodurch schließlich eine Mischung gleich vieler rechts- und linksdrehender Moleküle ausgebildet wird. Die Geschwindigkeit dieser racemisierenden Umlagerung, die in dem ganzen untersuchten Aciditätsgebiet die Synthesegeschwindigkeit nicht erreicht, scheint mit steigendem  $p_H$  und mit steigender Temperatur zu steigen, wodurch die optische Aktivität schnell abnimmt. In völlig neutraler Lösung scheint die Geschwindigkeit der Inaktivierung dieselbe Höhe zu erreichen wie die Synthesegeschwindigkeit, d. h. beide werden unmeßbar groß.

#### Besprechungen einiger Befunde von Rosenthaler.

Durch die hier vorliegende Arbeit können mehrere der von *Rosenthaler*<sup>1)</sup> beobachteten Erscheinungen ihre einheitliche Erklärung finden. *Rosenthaler* findet die stärkste Drehung, wenn man einen *Überschuß* von Benzaldehyd langsam in eine Mischung von Emulsin und Cyanwasserstoff eintropfen läßt. Diese anscheinend eigentümliche Tatsache wird indessen von mir darauf zurückgeführt, daß die durch die Oxydation des Aldehyds gebildete Säure die Acidität der Mischung steigert, wodurch mit der Zeit starke optische Aktivität erreicht wird, weil dann die Inaktivierungsgeschwindigkeit immer mehr herabgesetzt wird. Bleibt dagegen die Acidität konstant erhalten, so erzeugt, wie ich gefunden habe (diese Versuche sind nicht mitgeteilt), sowohl *Überschuß* als unzureichende Menge von Benzaldehyd *Verminderung* im Gewinn des optisch aktiven Oxynitrils, wie auch zu erwarten ist. Dieselbe Ursache ist wohl auch der Grund der Beobachtung *Rosenthalers*, daß eine größere Drehung erhalten wird, wenn man die Mischung schüttelt. Möglicherweise kann auch seine Beobachtung, daß Anwesenheit von Äthylacetat Steigerung in der optischen Aktivität bewirkt, auf die bei ihrer teilweisen Hydrolyse freigemachte Essigsäure zurückgeführt werden. *Rosenthaler* findet weiter, daß einmal verwendetes Emulsin nicht mehr bei einem neuen Substrate optische Aktivität hervorruft, und er erklärt dies damit, daß das Emulsin von Oxynitril „beschädigt“ worden ist. Meiner Ansicht nach hat das Oxynitril den Katalysator aus dem Emulsinpräparat *abgenommen*, wodurch dieses seine Wirkung verloren hat. Dies wird noch

<sup>1)</sup> l. c.

wahrscheinlicher durch *Bredig* und *Fiskes* <sup>1)</sup> Beobachtung, daß der von ihnen verwendete ähnliche Katalysator Chinin (Chinidin) vom Oxynitril aufgenommen und hartnäckig daran gebunden wurde. Endlich findet *Rosenthaler*, daß, wenn eine Lösung von optisch aktivem Oxynitril mit Emulsin versetzt wird, die optische Aktivität schneller abnimmt als in einer emulsinfreien Lösung, worin er für seine Auffassung einen Beweis sieht, daß es in Emulsin ein Oxynitril spaltendes Enzym gibt. Ohne auf die Frage, ob es sich hier um die Wirkung eines Enzyms handelt, näher einzugehen, mag bemerkt werden, daß sich *Rosenthalers* Befund darauf zurückführen läßt, daß das Emulsinpräparat aus der Lösung Säure aufnimmt, wodurch die Acidität vermindert und folglich die Inaktivierungsgeschwindigkeit gesteigert wird.

### Zusammenfassung.

1. In meiner früheren Mitteilung (l. c.) ist gezeigt worden, daß, wenn Benzaldehyd und Cyanwasserstoff in Lösung in äquimolekularen Mengen vermischt werden, sie sich zu Benzoxynitril verbinden, wobei die Geschwindigkeit dieser Reaktion als Funktion der H-Ionenkonzentration dargestellt wird. Das dabei erhaltene Oxynitril ist optisch inaktiv.

2. Wenn bei dieser Reaktion *Emulsin* anwesend ist, wird die Synthese asymmetrisch geleitet, wobei sich d-Oxynitril bildet. Der in Emulsin befindliche Proteinbestandteil (Globulin) fällt hierbei in unlöslicher Form aus und ist selbst katalytisch unwirksam. Wird dieses Ausfallen (dadurch verursacht, daß das Globulin Benzoesäure aus dem Substrat bindet) verhindert, indem durch Dialyse der Salzgehalt des Emulsins weggenommen wird, oder indem die Reaktionsmischung schwach alkalisch gemacht wird, so gewinnt man kein optisch aktives Oxynitril. Die Menge des entstandenen Oxynitrils ist von der Menge anwesenden Emulsins abhängig. Bei kleinen Emulsinmengen zeigt sich vollständige Proportionalität zwischen der erreichten Drehung und der Emulsinmenge. Bei großen Mengen steigt die Drehung langsamer als die Menge Emulsinpräparat.

3. Das gewonnene d-Oxynitril ist labil, und die Drehung der Lösung nimmt von selbst ab, ohne Mitwirkung eines Enzyms oder eines anderen Katalysators. Die Geschwindigkeit, mit der die Drehung abnimmt, steigt 1. mit einem Temperaturkoeffizienten  $k_{t+10} : k_t = \text{ca. } 3,2$ , nimmt 2. mit steigender Acidität innerhalb des Gebietes  $p_H = 3$  bis  $6,5$  ab (Abb. 4) und erreicht 3. die Höhe der totalen Synthesegeschwindigkeit erst im Neutralpunkt, wo beide sehr groß werden und wo die optische Aktivität ebenso rasch verschwindet, wie sie entsteht.

4. Einige von *Rosenthaler* (l. c.) beobachtete spezielle Erscheinungen stimmen mit meinen Resultaten gut überein, finden aber hier eine von der seinigen abweichende Deutung.

<sup>1)</sup> Diese Zeitschr. **46**, 7. 1912.

# Über die Wirkung des Emulsins auf das System Blausäure—Benzaldehyd—Benzoxynitril.

Von  
E. Nordefeldt.

(Aus dem Biochemischen Laboratorium der Universität Stockholm.)

(Eingegangen am 27. Februar 1923.)

Hinsichtlich der Enzymwirkung auf das im Titel erwähnte System sind zwei Fragen besonders wesentlich:

1. Welche Einflüsse üben nichtenzymatische, und welche Einflüsse üben enzymatische Katalysatoren auf die synthetischen und auf die Spaltungsvorgänge aus?

2. Existiert — soweit überhaupt enzymatische Katalysatoren in Frage kommen — ein besonderes, spezifisches, synthetisierendes Enzym, eine Oxynitrilase und daneben ein besonderes spaltendes Enzym?

Die zweite Frage wird besonders nahegelegt durch die sehr bemerkenswerten Arbeiten von *Rosenthaler*<sup>1)</sup> und durch seine daraus gezogenen Schlüsse über die Existenz eines *syn-* und eines *dia-Emulsins*.

In zwei vorhergehenden Mitteilungen (I und II)<sup>2)</sup> habe ich experimentelle Beiträge zur Beantwortung der erwähnten Fragen erbracht und habe einstweilen die Untersuchung fortgesetzt, um so mehr, als die hier behandelten Probleme für die Enzymchemie im allgemeinen eine gewisse Bedeutung besitzen.

Bei der theoretischen Behandlung der in meinen beiden ersten Mitteilungen angegebenen Resultate hat mich in erster Linie die Frage beschäftigt, wie die Spaltung des razemischen Oxynitrils in Gegenwart und in Abwesenheit von Emulsin, und zwar eines in angegebener Weise dargestellten Präparats (l. c. II, S. 400) verläuft.

Diese Spaltung ist von *Feist*<sup>3)</sup> untersucht, welcher fand, daß linksdrehendes Benzoxynitril erhalten werden konnte, wenn eine Lösung von inaktivem Oxynitril mit Emulsin behandelt und dabei ein Luftstrom durch das Gemisch geleitet wurde. Ohne diesen Kunstgriff zur Wegführung der Spaltprodukte (Benzaldehyd und Blausäure) gelang es ihm aber nicht, ein optisch aktives Oxynitril zu erhalten.

<sup>1)</sup> Diese Zeitschr. 14, 238, 1908; 17, 257, 1909; 19, 186, 1909; 26, 1 u. 7, 1909; 28, 408, 1910; 50, 486, 1913; Arch. d. Pharm. 246, 365, 1908; 248, 105 u. 534, 1910; 249, 510, 1911; 251, 56 u. 85, 1913.

<sup>2)</sup> Ebendasselbst 118, 15, 1921 (I. Mitt.); 181, 390, 1922 (II. Mitt.).

<sup>3)</sup> Arch. d. Pharm. 247, 226 u. 542, 1909; 248, 101, 1910.

**Experimentelles.**

Ich berichte kurz über einige Versuche, das Oxynitril mit und ohne Anwesenheit von Emulsin zu spalten.

Die Substratmischung wurde nach einigen Minuten von der entstandenen Proteinfällung filtriert und dann der Verlauf der Spaltung dadurch verfolgt, daß die entbundene Blausäure mittels *Volhards* Methode mit  $\text{AgNO}_3$  (n/10) bestimmt wurde. Die Aziditäten wurden bei diesen Versuchen nur mit Indikatoren bestimmt und sind darum bis auf eine halbe Einheit unsicher.

*Versuch 1.* a) 40 ccm Alkohol (95 proz.) + 22 ccm Emulsinlösung (1 : 50) + 6 ccm Acetatpuffer (n/1, in 47 proz. Alkohol gelöst) + 2 ccm (= 2,2114 g) inaktives Benzoxynitril. Temperatur =  $16^\circ$ ,  $p_{\text{H}} = c : a \ 5$ , Titrationsprobe = 5 ccm.

b) Wie in a), aber anstatt Emulsinlösung 22 ccm Wasser. Dasselbe  $p_{\text{H}}$  wie in a).

a)			b)		
Zeit in Stunden	$\text{AgNO}_3$ verbraucht ccm	HCN frei %	Zeit in Stunden	$\text{AgNO}_3$ verbraucht ccm	HCN frei %
$1/4$	0,1	0,8	$1/10$	0,1	0,8
$1\frac{1}{4}$	0,6	5,0	1	0,6	5,0
2	0,7	5,8	2	0,7	5,8
12	0,8	6,7	12	0,8	6,7
24	0,8	6,7	24	0,8	6,7
68	0,8	6,7	68	0,8	6,7

Danach wurde ein wenig NaOH bis zur stark alkalischen Reaktion zugefügt, wodurch das Endgleichgewicht fast augenblicklich erreicht wird (*Wirth*<sup>1)</sup>), dann mit  $\text{HNO}_3$  wieder sauer gemacht und titriert:  $\text{AgNO}_3 = 0,9$  ccm, 7,6% HCN entsprechend, in a) sowohl als in b).

*Versuch 2.* Dieselbe Mischung wie in Versuch 1, aber eine andere Azidität des Puffers.  $p_{\text{H}} = c : a \ 6$ . Übrigens wie in Versuch 1.

a)			b)		
Zeit in Stunden	$\text{AgNO}_3$ verbraucht ccm	HCN frei %	Zeit in Stunden	$\text{AgNO}_3$ verbraucht ccm	HCN frei %
$1/20$	0,2	1,7	$1/20$	0,2	1,7
$1\frac{1}{6}$	0,8	6,7	$1\frac{1}{6}$	0,8	6,7
$2\frac{1}{4}$	0,8	6,7	$2\frac{1}{4}$	0,8	6,7
$6\frac{1}{2}$	0,8	6,7	$6\frac{1}{2}$	0,8	6,7
18	0,8	6,7	18	0,8	6,7

<sup>1)</sup> Arch. d. Pharm. 249, 382, 1911.

Danach das Endgleichgewicht wie in Versuch 1 bestimmt:  $\text{AgNO}_3 = 0,9$  in a) sowohl als in b), 7,5% HCN entsprechend.

*Versuch 3.* a) 125 ccm Alkohol (47proz.) + 20 ccm Alkohol (95proz.) + 20 ccm Emulsinlösung (1 : 50) + 15 ccm Acetatpuffer + 2 ccm Oxynitril. Temperatur =  $17^\circ$ ,  $p_H = c : a 6$ , Titrationsprobe = 10 ccm.

b) Wie in a), aber anstatt Emulsinlösung 20 ccm Wasser. Dasselbe  $p_H$  wie in a).

a)			b)		
Zeit in Stunden	$\text{AgNO}_3$ verbraucht ccm	HCN frei %	Zeit in Stunden	$\text{AgNO}_3$ verbraucht ccm	HCN frei %
$1/20$	0,2	2,2	$1/20$	0,2	2,2
1	1,0	10,8	1	1,0	10,8
2	1,1	11,9	2	1,1	11,9
4	1,1	11,9	4	1,1	11,9
10	1,1	11,9	10	1,1	11,9

Danach das Endgleichgewicht wie in Versuch 1 bestimmt:

a)  $\text{AgNO}_3 = 2,3$ , 24,9% HCN, b)  $\text{AgNO}_3 = 2,4$ , 25,9% HCN entsprechend.

*Versuch 4.* 2 g Emulsinpulver + 50 ccm Wasser + 50 ccm Alkohol (95proz.) + 10 ccm Acetatpuffer + 2 ccm Oxynitril. Temperatur =  $18^\circ$ ,  $p_H = c : a 5$ , Titrationsprobe = 10 ccm, Polarisationsrohr = 200 mm.

Zeit in Stunden	$\text{AgNO}_3$ verbraucht ccm	HCN frei %	Drehung °
$1/20$	0,8	5,2	— 0,2
$1/2$	1,2	7,8	— 0,4
1	1,3	8,5	— 0,4
$3 1/2$	1,3	8,5	— 0,5
7	—	—	— 0,4
26	—	—	— 0,0

Danach wurde das Endgleichgewicht wie in Versuch 1 bestimmt:  $\text{AgNO}_3 = 3,2$  ccm, 20,8% HCN entsprechend.

Nach 4 Stunden vom Beginn des Versuches wurden 30 ccm der Substratmischung mit 30 ccm Wasser gemischt und sogleich zweimal mit Äther ausgeschüttelt (jedesmal 15 ccm). Der Äther wurde mit wasserfreiem  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet, zum halben Volumen eingengt und davon 12,5 ccm (gleich das Volumen des Polarisationsrohres) polarimetrisch untersucht:  $\alpha - 0,3^\circ$ . Dieser Teil wurde dann mit HCl auf dem Wasserbade verseift und die entstandene Kristallmasse in 15 ccm Wasser gelöst, wovon wieder 12,5 ccm polarimetrisch untersucht wurden:  $\alpha + 1,8^\circ$ .

*Versuch 5.* a) 2 g Emulsinpulver + 60 ccm Wasser + 60 ccm Alkohol (95proz.) + 10 ccm Acetatpuffer + 2 ccm Oxynitril. Temperatur = 18°,  $p_H = c : a$  4, Titrationsprobe = 10 ccm.

b) Wie in a), aber eine andere Azidität des Puffers.  $p_H = c : a$  6,5.

a)				b)			
Zeit in Stunden	AgNO <sub>3</sub> verbraucht ccm	H <sub>2</sub> CN frei %	Drehung °	Zeit in Stunden	AgNO <sub>3</sub> verbraucht ccm	H <sub>2</sub> CN frei %	Drehung °
1	0,3	2,8	— 0,2	1	0,3	2,8	— 0,2
14	0,3	2,8	— 0,3	14	0,4	3,8	— 0,3
25	0,3	2,8	— 0,4	25	0,5	4,7	— 0,2
45	0,3	2,8	— 0,2	45	0,5	4,7	0,0
70	0,3	2,8	— 0,1	70	—	—	0,0
100	0,3	2,8	0,0				

### Resultate.

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß die Geschwindigkeit der *Spaltung* von der Anwesenheit des Emulsins unabhängig ist und nur von der Azidität der Lösung bestimmt wird, wie es sich auch bei der *Synthese* nach meinen früheren Untersuchungen (l. c. I, S. 30) ergeben hat. Bei größerer Verdünnung wird eine größere Spaltung erhalten.

Das optische Isomere, das d-Oxynitril, welches bei Anwesenheit von Emulsin mit der größeren Geschwindigkeit synthetisiert wurde, wird jetzt auch am schnellsten gespalten, wodurch das l-Oxynitril während des Verlaufs der Spaltung in Überschuß erhalten wird. Das aktive Oxynitril wird aber mit der Zeit *razemisiert*, und zwar um so schneller, je mehr sich die saure Lösung dem Neutralitätspunkt nähert. Daß die Linksdrehung der Lösung nicht von der Emulsinsubstanz selbst verursacht wird, wurde dadurch gezeigt, daß bei der Verseifung des l-Oxynitrils Rechtsdrehung erhalten wurde.

Das Wegführen der Spaltprodukte nach *Feist* ist unnötig, denn wenn nur die Azidität innerhalb geeigneter Grenzen gehalten wird, kann deutliche optische Aktivität erhalten werden. Daß indessen Durchleiten von Luft während der Spaltung sich als günstig gezeigt hat, scheint mir dadurch erklärt werden zu können, daß dann der entstehende Benzaldehyd schneller zur Benzoesäure oxydiert wird, wodurch größere Azidität erhalten und die Schnelligkeit der Raze-misierung dadurch vermindert wird.

Indem ich eine zusammenfassende Diskussion über die Rolle enzymatischer Katalysatoren im System Blausäure—Benzaldehyd—Benzoxynitril auf meine nächste ausführlichere Mitteilung verschiebe, möchte ich hier zur Ergänzung und Verdeutlichung, und in einem

Punkte auch zur Verbesserung meiner früheren Darstellung folgendes anführen.

Daß die (symmetrische) Bildung von Benzoxynitril durch Hydroxylionen *ohne Mitwirkung von Emulsin* synthetisiert wird, hat, wie ich in meiner ersten Mitteilung einleitend angab, *Ultee*<sup>1)</sup> 1909 gezeigt. An der gleichen Stelle habe ich bereits auf die Ergebnisse von *Lapworth*<sup>2)</sup> 1903 und auf die gründliche Studie von *Wirth*<sup>3)</sup> hingewiesen, welcher fand, „daß Hydroxylionen die Geschwindigkeit, mit der das Gleichgewicht erreicht wird, von beiden Seiten vergrößern, Wasserstoffionen dagegen die beiden Reaktionen sehr stark verzögern“.

In einer kleinen Bemerkung zu dem hier behandelten Thema hebt Herr *L. Rosenithaler*<sup>4)</sup> hervor, er „habe selbst schon vor langer Zeit (vgl. diese Zeitschr. 19, 186, 1909) bewiesen, daß diejenigen Bestandteile des Emulsins, welche die Blausäureaddition beschleunigen, in der Hauptsache nichtenzymatischer Natur sind und also auch nicht identisch mit dem syn-Emulsin-Oxynitrilese“. Ich führe die betreffende Stelle hier an:

„Da der Zusatz von Säure, welche die Dissoziation der Blausäure zurückdrängt, die Reaktion verzögert, so erfolgt die Addition der Blausäure nicht in Form ihrer undissoziierten Verbindungen, sondern als Ionen, ein Schluß, den schon früher *Lapworth* (l. c.) aus seinen in anderer Weise angestellten Versuchen gezogen hat. Es werden also alle Körper die Addition der Blausäure beschleunigen, welche eine Vermehrung der CN-Ionenkonzentration herbeiführen, ohne die Konzentration der zur Reaktion unbedingt notwendigen H-Ionen allzusehr herabzudrücken. Dazu sind Verbindungen der Alkalien und Erdalkalien mit schwachen Säuren und kaustische Alkalien in geringer Konzentration geeignet. Während der Reaktion werden dann die infolge der Addition verschwundenen CN-Ionen durch die noch vorhandene nichtdissoziierte Blausäure nachgeliefert. Aus all dem darf für die durch Emulsin erfolgende Beschleunigung der Blausäureaddition folgendes geschlossen werden: *Sie erfolgt zum überwiegenden Teil durch Verbindungen des Magnesiums, Calciums und Kaliums, die als ‚Cyanionenbildner‘ zu wirken imstande sind.*“

Diesem Zitat stelle ich das Ergebnis meiner eigenen Versuche gegenüber (l. c. I, S. 30, Zeile 1 bis 4). Unter Hinweis auf die Versuche 1 bis 13 der ersten Mitteilung und der Abb. 1 und 2 l. c. kann ich meine Versuche in eine vollständig ausgearbeitete Kurve der mit und ohne Beteiligung des Emulsins gültigen Aziditätsfunktion zusammenfassen:

$p_H$ . . . .	2,9	3,0	3,1	3,3	3,4	3,5	4,1	4,4	5,3	6,1	8,0
$k \cdot 10^3$ . . .	0,06	0,11	0,3	1,4	2,2	3,6	12	18	50	290	2000

1) Rec. d. Trav. d. Pays-Bas 28, 1 u. 248, 1909.

2) Journ. Chem. Soc. 83, 995, 1903.

3) l. c.

4) Diese Zeitschr. 128, 606, 1922.

Durch diese Messungen ist die Aziditätsfunktion zum ersten Male quantitativ festgestellt worden.

Über Herrn *Rosenthalers* und meinen relativen Anteil an der Aufklärung der nicht enzymatischen Benzoxynitrilsynthese dürfte sich hiernach eine Diskussion erübrigen.

Was dann die Richtigkeit der *Rosenthalerschen* Annahme eines syn- und eines dia-Emulsins betrifft, so ist vielleicht zunächst die allgemeine Bemerkung gestattet, daß die Enzymchemie in den letzten 10 Jahren keinen Fall gezeigt hat, in welchem die Annahme eines *besonderen* synthetisierenden Enzyms auch nur wahrscheinlich gemacht würde. Der Fall Oxynitrilase — Oxynitrilase würde also ganz vereinzelt dastehen.

Aber auch wenn man die in diesem speziellen Falle vorhandenen Tatsachen, auf welche *Rosenthaler* die gesonderte Existenz seiner Oxynitrilase und Oxynitrilase zu stützen versucht, näher betrachtet, wenn man insbesondere in Erwägung zieht, was sich aus der Darstellungsweise der beiden Enzympräparate für tatsächliche Unterschiede ergeben, so wird man die Existenz einer besonderen Oxynitrilase als *unbewiesen* bezeichnen müssen.

Bis jetzt besteht keine Tatsache, welche nicht mit der theoretischen Forderung in Einklang wäre, daß das Benzoxynitrilgleichgewicht — soweit es überhaupt von einem Enzym abhängt — von beiden Seiten her durch den gleichen enzymatischen Katalysator eingestellt wird.

Was dann eine von Herrn *Rosenthaler* beanstandete „völlig falsche Auffassung“ über den Emulsinbestandteil betrifft, welchen er als syn-Emulsin bezeichnet hat, so darf ich zunächst aus der Einführung zu meiner ersten Mitteilung wörtlich zitieren: „Das neue asymmetrisch synthetisierende Enzym wurde von ihm (*Rosenthaler*) *syn-Emulsin* (*σνν-Emulsin*, *σ-Emulsin*) genannt.“

Dagegen könnte die Formulierung meiner Zusammenfassung Anlaß zu Mißverständnis geben. Dasselbst steht: „Sämtliche symmetrisch-kinetischen Wirkungen . . . erklären“. Dieser Satz ist durch folgenden zu ersetzen: *Sämtliche symmetrisch-kinetischen Wirkungen lassen sich einfach, ohne Einführung besonderer Hypothesen, als Aziditätswirkungen erklären.* Der folgende Satz: „Für diese Wirkungen wird die Annahme eines synthetischen Enzyms . . . folglich überflüssig und hinfällig“ soll wegfallen.

Hinsichtlich einiger kritischer Bemerkungen Herrn *Rosenthalers* in *Fermentforschung* (5, 334, 1922) kann ich mich noch kürzer fassen:

Die Bemerkung, ich hätte den Silberverbrauch des Emulsins nicht in Abzug gebracht, ist nicht richtig; derselbe ist in Abzug gebracht worden, soweit er nicht vollkommen in den Bereich der Versuchsfehler fiel; er war stets so klein, daß mir seine besondere Angabe überflüssig erschien.

Die Reaktionssysteme sind in solchen Temperaturgrenzen konstant gehalten worden, daß die durch die Temperaturschwankungen (etwa  $\pm 0,2^\circ$ ) verursachten Fehler wohl innerhalb der Grenzen der sonstigen Versuchsfehler lagen; damit erledigt sich die Bemerkung bezüglich des Thermostaten.

Wenn schließlich Herr *Rosenthaler* sagt, daß ich die Alkalinität des Glases nicht berücksichtigt habe, so beruht auch dieser Einwand vielleicht auf einer nicht vollständigen Vertrautheit mit den modernen physikalischen Methoden der Aziditätsmessung. Eine kurze Überlegung wird Herrn *Rosenthaler* davon überzeugen, daß durch die elektrometrische Bestimmung der stets genau angegebenen  $p_{\text{H}}$ -Werte die *gesamte* Azidität (bzw. Alkalinität) der Lösungen gemessen wird, so daß damit die vom Glase eventuell in Lösung gegangenen Alkalimengen berücksichtigt sind.

Ferner kann ich es vielleicht unterlassen, mit Herrn *Rosenthaler* die Richtigkeit der Berechnung meiner nach der Formel für bimolekulare Reaktionen berechneten Koeffizienten näher zu diskutieren, sondern kann mich auf den Hinweis beschränken, daß meine S. 340 seiner Arbeit erwähnten „Konstanten“ oder besser „Koeffizienten“ richtig berechnet, andererseits nicht weiter quantitativ verwertet und auch zu keinen Schlüssen verwendet worden sind.

# Versuche zur Reinigung der Oxynitrilese und einige Eigenschaften derselben.

Von

E. Nordefeldt.

(Aus dem biochemischen Laboratorium der Universität Stockholm.)

(Eingegangen am 25. März 1925.)

Mit 5 Abbildungen im Text.

Zu meinen früher in drei Aufsätzen<sup>1)</sup> veröffentlichten Versuchen über die Bedeutung des „Emulsins“ bei der asymmetrischen Synthese des Benzoxynitrils aus Benzaldehyd und Cyanwasserstoff wird hier eine neue Untersuchung über die Oxynitrilese gefügt. Ich bezeichne hier die unbekannt (vermutlich enzymatische) Substanz, welche die Bildung von asymmetrischem Oxynitril bewirkt, als *Oxynitrilese*. Damit soll nur ausgedrückt werden, daß das Enzym durch die asymmetrisch synthetische Wirkung charakterisiert wird. Die Frage, ob an dieser Wirkung eine asymmetrische *Spaltung* beteiligt ist, soll durch diese Bezeichnung, welche den Vorzug der Einfachheit hat, nicht berührt werden.

Ich werde im folgenden über mehrere Methoden berichten, wodurch eine Reinigung der Oxynitrilese in den Präparaten erzielt wird. Mit den reinsten, so gewonnenen Präparaten habe ich einige Eigenschaften dieses Katalysators studiert. Speziell habe ich Versuche über die Kinetik der Oxynitrilbildung angestellt und auch versucht, das Molekulargewicht des Enzyms angenähert zu bestimmen.

Am Ende des Aufsatzes findet man eine kurze Zusammenfassung der in dieser und meinen drei früheren Arbeiten gewonnenen Resultate.

## I. Herstellung des Rohpräparats.

Als Rohpräparat bezeichne ich ein durch Acetonfällung von Mandelextrakt erhaltenes Pulver.

### 1. Die Acidität bei der Extraktion.

Ich hatte gefunden, daß Wasser, mit ein wenig Alkali versetzt, viel mehr Substanz aus den Bittermandeln auslöst als angesäuertes Wasser. Selbstverständlich ist damit nicht gesagt, daß auch *mehr Enzym*

<sup>1)</sup> Diese Zeitschr. 118, 15, 1921; 131, 390, 1922; 137, 489, 1923.

durch Alkali herausgelöst wird. Es war indessen notwendig, eine Acidität ausfindig zu machen, wo die Extraktion eine Flüssigkeit ergab, die nach Acetonfällung das bestmögliche Enzympräparat lieferte.

Bittermandeln wurden während drei Minuten in 70gradigem Wasser gehalten, dann schnell gekühlt, geschält und in der Mühle gerieben. Das Pulver wurde durch Pressen zwischen Filtrierpapier von einem Teile des Fettes befreit, danach einige Male mit Äther gewaschen und schließlich an der Luft getrocknet.

Proben von 20 g wurden jetzt während einiger Stunden mit gleichen Mengen (200 ccm) Wasser geschüttelt. Verschiedene Aciditäten wurden durch Zusatz von Ammoniak oder Essigsäure eingestellt. Nach Filtration wurden von jedem Extrakt 80 ccm genommen und mit je 200 ccm Aceton gefällt. Die Niederschläge wurden getrocknet und gewogen. Die Gewichte findet man in der Tabelle I (A). Die übriggebliebenen Teile der Extrakte wurden mit Essigsäure bzw. Ammoniak zu derselben Acidität gebracht:  $p_H$  war nach der kolorimetrischen Bestimmung 4,5. Die dabei entstandenen Niederschläge zeigten sich enzymatisch unwirksam und wurden verworfen. Von den Filtraten wurden 80 ccm genommen und wie oben mit Aceton gefällt. Die Niederschläge wurden getrocknet und gewogen (B in der Tabelle I).

Es wurde nun die Wirksamkeit der Pulver bestimmt. Von den A-Präparaten nahm ich 0,35 g, von den B-Präparaten 0,165 g, und setzte dazu 5 ccm Wasser. Nach 24 Stunden wurde die Reaktionsmischung hinzugesetzt. Diese bestand aus 1 ccm Benzaldehyd + 22,2 ccm (äquivalente Menge) HCN-Lösung (Alkohol: 60 Volumprozent) + 5 ccm Acetatpuffer (molare Lösung). In dieser Mischung war  $p_H$  5,2. Das Aldehyd war mittels  $\text{NaHCO}_3$  und Destillation von Benzoesäure befreit. Nach einer Stunde wurde der Eiweißniederschlag, der enzymatisch inaktiv war, abfiltriert und danach der Zuwachs der Rechtsdrehung beobachtet (2 dm Rohr, Na-Licht). Nach etwa 3 Stunden hatte die Drehung ihr Maximum erreicht und nahm danach langsam ab, um nach etwa 100 Stunden Null zu werden. Die Drehungsmaxima findet man in der folgenden Tabelle I.

Tabelle I.

Nr.	Extraktionsflüssigkeit	A		B	
		Gewicht des Niederschlags g	Drehung	Gewicht des Niederschlags g	Drehung
1	180	2,5	0,45°	1,2	0,50°
2	185	2,3	0,50	1,0	0,50
3	190	2,3	0,50	1,0	0,50
4	195	2,0	0,50	1,1	0,45
5	200	0,6	0,60	0,7	0,60
6	195	0,4	0,90	0,2	1,00

Den relativen Reinheitsgrad der Präparate können wir vorläufig folgendermaßen ausdrücken (siehe unten Abt. II, 1 und V, A):

$$\text{Rel. Reinheitsgrad} = \frac{\text{Drehung}}{\text{g Enzympräparat in der Reaktion}}$$

Die Ausbeute wird dann durch den Ausdruck:

$$\text{Ausbeute} = \text{g Niederschlag} \cdot \frac{\text{Drehung}}{\text{g Enzympräparat in der Reaktion}}$$

ausgedrückt. Stelle ich diese Zahlen für die verschiedenen Niederschläge zusammen, ergibt sich folgende Tabelle II:

Tabelle II.

Nr.	A		B	
	Reinheitsgrad	Ausbeute	Reinheitsgrad	Ausbeute
1	1,3	3,3	3,0	3,6
2	1,4	3,2	3,0	3,0
3	1,4	3,2	3,0	3,0
4	1,4	2,8	2,8	3,1
5	1,7	1,0	3,6	2,5
6	2,6	1,0	6,1	1,2

Es ist aus dieser Tabelle leicht zu sehen, daß das günstigste Resultat in den Versuchen B 1, 2 und 3 erreicht wurde. Das beste Verfahren ist also, das Enzym (mit viel Eiweiß und dergleichen) mit Alkali zu extrahieren und danach mit Säure das damit fällbare Eiweiß zu entfernen. Da bei der Extraktion saure Substanzen (unter anderen Benzoesäure) gebildet werden, muß ab und zu ein wenig Alkali zugefügt werden. Die Extraktion wurde gewöhnlich über einen Tag und eine Nacht ausgedehnt.

#### 2. Einfluß des Fettgehaltes der Mandeln.

Da es möglich erschien, daß aus schon vorher von Fett befreiten Mandeln ein besseres Enzympräparat dargestellt werden könnte, wurden einige Versuche über die Fettextraktion ausgeführt.

A. Aus 300 g Mandeln wurde durch alkalische Extraktion und Acetonfällung ein Roh-Enzym gewonnen. Beim Trocknen wurde viel Öl ausgeschieden, das durch mehrmaliges Waschen mit Aceton entfernt wurde. Das trockene Pulver wog 40 g.

B. 300 g Mandeln wurden im Soxhletapparat mit Äther extrahiert. Sie wogen dann 160 g. Daraus wurde wie früher ein Rohpräparat mit einem Gewicht von 43 g gewonnen.

C. Die Extraktion wurde jetzt mit Aceton vorgenommen, wonach 170 g Substanz zurückblieben. Das daraus dargestellte Enzympräparat wog 42 g.

Da diese drei Präparate die gleiche enzymatische Wirkung zeigten, ist die Ausbeute und die Reinheit also etwa dieselbe. Die Fettextraktion

führt also keinen Verlust oder Gewinn mit. Da indessen viel Aceton oder Äther zum Wegwaschen des Öles nötig ist, wurden alle im folgenden beschriebenen Präparate aus einem beinahe fettfreien, feingemahlten Pulver hergestellt, das unter dem Namen „Placent Amygdalar. amar.“ im Handel vorkommt.

### 3. Die Acetonfällung.

Eine Lösung von Roh-Enzym wurde mit 1 Volumen Aceton versetzt, der Niederschlag abfiltriert und getrocknet und das Filtrat mit 9 Volumen Aceton versetzt. Dabei wurde nochmals ein Niederschlag erzeugt, der abfiltriert und getrocknet wurde. Von den zwei Niederschlägen wurde 0,1 g auf enzymatische Wirksamkeit geprüft. Der letzte Niederschlag war mehr als dreimal kräftiger. Bei Fällung mit geringen Acetommengen fallen also hauptsächlich inaktive Beimengungen aus.

Ich stellte jetzt 200 ccm einer 3,68proz. Lösung von Roh-Enzym her, wozu steigende Mengen Aceton gefügt wurden. Wenn 150 ccm Aceton zugesetzt waren, wurde die Flüssigkeit trübe. Mit noch 200 ccm Aceton wurde nun ein großer Niederschlag erzeugt, der abfiltriert und getrocknet wurde. Von dem Filtrat, das durch mehr Aceton keinen weiteren Niederschlag gab, wurden 270 ccm bei vermindertem Druck und bei 30° auf 65 ccm eingengt. Von der konzentrierten Lösung erregten 10 ccm in der Substratmischung von 27,2 ccm keine wahrnehmbare Drehung und enthielten folglich kein Enzym. Durch Zusatz von 1,5 bis 2 Volumen Aceton wird also alles Enzym gefällt, und überschüssiges Aceton hat nur die Wirkung, daß sich der Niederschlag schneller bildet und leichter filtriert.

In diesem Zusammenhang will ich bemerken, daß ein kräftiger Niederschlag immer entsteht, wenn *rohe* Enzymlösung mit dem Substrat vermischt wird. Es ist indessen für die Ausbildung der Rechtsdrehung belanglos, ob dieser Niederschlag abfiltriert wird oder während der Reaktion in der Flüssigkeit verbleiben darf. So konnte auch eine Rohemulsinlösung vollständig durch cyanwasserstoffhaltigen Alkohol gefällt werden, ohne daß das Enzym ausgefällt wurde.

## II. Reinigung des Roh-Emulsins.

### 1. Dialyse.

Roh-Emulsin wurde mit Wasser geschüttelt, wobei ein kleiner unwirksamer Rest abfiltriert und verworfen wurde. Das Filtrat wurde mit Toluol versetzt und in großen Kollodiumschläuchen während einer Woche gegen fließendes Wasser dialysiert. Dabei setzte sich auf dem Boden der Schläuche ein weißer Niederschlag ab, der indessen enzymatisch unwirksam war.

Das Trockengewicht der ursprünglichen Lösung betrug 2,18 Proz. und ihr Aschengehalt 0,13 Proz. Die dialysierte Lösung war 1,26proz. und hatte den Aschengehalt 0,02 Proz. Durch mehrere Versuche mit

beiden Lösungen wurde gefunden, daß die Dialyse keine Abnahme der Wirksamkeit mitgeführt hatte. Dies wurde so untersucht, daß in zwei Reaktionsmischungen von je 1 ccm Aldehyd, der äquivalenten Mengen Cyanwasserstoff, Acetatpuffer zur optimalen Acidität und 2,5 ccm von jeder Enzymlösung zum Totalvolumen 18 ccm, die Maximaldrehungen ( $0^{\circ}$ , 80 und  $0^{\circ}$ , 80 bzw.) und die totale Synthese (etwa 95 Proz.) beobachtet wurden. Hieraus berechnen sich die spezifischen Drehungen der beiden Oxynitrillösungen zu je  $5,1^{\circ}$ . Um einen zahlenmäßigen Ausdruck für den Reinheitsgrad zu bekommen, verfahren wir folgendermaßen: Die in den Substratgemischen beobachtete Rechtsdrehung ist der Enzymmenge proportional (siehe weiter unten V, A) und kann also als Maß der Enzymmenge dienen. Nun ist indessen in den verschiedenen Versuchen aus äußeren Gründen die Verdünnung der Substrate nicht ganz dieselbe, aber da die Total-synthese in sämtlichen Fällen beinahe die gleiche ist, können wir als Maß der Enzymmenge die *spezifische Drehung* des Oxynitrils wählen. Wir finden dann:  $\text{Reinheitsgrad} = \frac{\text{sp. Drehung}}{\text{g Enzympräparat}}$ . Der Reinheitsgrad berechnet sich dann für das Rohpräparat zu 100 und für das durch Dialyse gereinigte zu 165. Durch einfache Dialyse kann also eine beträchtliche Erhöhung des Reinheitsgrades erzielt werden. (Daß die lange Dialysezeit an sich keine Zerstörung bewirken kann, wird dadurch bewiesen, daß dialysierte Enzymlösungen, mit Toluol versetzt, bei Zimmertemperatur während Monaten ohne nennenswerte Abnahme der Wirksamkeit aufbewahrt werden können.)

Versuche, die dialysierte Lösung mit Alkohol oder Äther zu fällen, scheiterten aus dem Grunde, daß der kleine Niederschlag nicht in filtrierbarer Form ausfiel. Erst beim Zusatz eines geeigneten Elektrolyten wurde das Enzym wirklich gefällt. Die Reinigung durch Dialyse und Fällung ist also ohne Zusatz von z. B.  $\text{MgSO}_4$  unmöglich, und der Zweck der ersten Dialyse wird ja dadurch verfehlt. Übrigens zeigte ein auf diese Weise gewonnenes Präparat einen Reinheitsgrad, der nicht größer war als derjenige der nur einmal dialysierten Lösung.

## 2. Fraktionierte Fällung mit Säure.

Von der großen Menge inaktiver Substanz, die bei der alkalischen Extraktion nebst dem Enzym in Lösung geht, kann ein wesentlicher Teil mit Säure beseitigt und dann das Enzym mit Aceton ausgefällt werden. So wurden z. B. 400 g Placent mit 2 Liter Wasser angerührt und danach in kleinen Portionen 60 ccm 2 n Natronlauge zugesetzt. Die Mischung wurde während 24 Stunden gerührt, dann mit 120 ccm n Essigsäure gemischt und schließlich filtriert. Vom Filtrat wurden 1,5 Liter mit 4,5 Liter Aceton gefällt. Der Niederschlag wog trocken

30 g. Dies Präparat war wirksamer und in der Farbe weißer als das mit Wasser extrahierte, das seinerseits weißer war als das aus dem alkalischen Extrakt direkt ausgefällte hellbraune und wenig wirksame Präparat.

Auch in einer Lösung des Roh-Emulsins ruft Säure einen Niederschlag hervor, der sich in Überschuß der Säure löst. Um die für die Fällung optimale Acidität kennenzulernen, wurde eine Roh-Enzymlösung bereitete und in Mengen von 100 ccm mit wechselnden Mengen Essigsäure versetzt, wonach die Niederschläge abfiltriert wurden. In den Filtraten wurde die Acidität elektrometrisch gemessen und das Trockengewicht bestimmt. Dann wurde in je 5 ccm die enzymatische Wirkung gemessen, durch Beobachtung der maximalen Rechtsdrehung in einer Reaktionsmischung von 2 ccm Aldehyd + Cyanwasserstoff<sup>1)</sup> + Puffer + Enzym = 30,6 ccm. Aus den spezifischen Drehungen wurden die Reinheitsgrade der verschiedenen Enzymlösungen berechnet (Tabelle III und Abb. 1).

Tabelle III.

Acidität $p_H$	Trockengewicht Proz.	Maximale Drehung	Spezifische Drehung	Reinheitsgrad
8,5 (keine Säure)	2,61	1,30 <sup>0</sup>	8,0 <sup>0</sup>	61
7,4	2,53	1,30	8,0	63
5,4	2,20	1,30	8,0	73
5,1	0,98	1,25	7,7	157
5,0	0,70	1,30	8,0	228
4,8	0,63	1,30	7,7	253
4,6	0,65	1,25	8,0	236
4,2	1,45	0,90	5,5	76
3,9	2,60	0,60	3,7	28

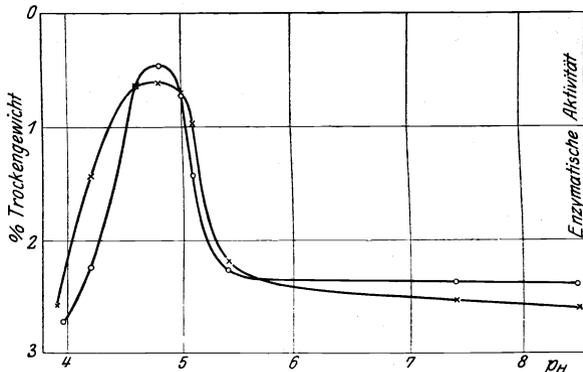


Abb. 1. Trockengewicht (x) und enzymatische Aktivität (o) bei verschiedenen Aciditäten. Die Aktivität ist als Reinheitsgrad willkürlich aufwärts abgesetzt.

<sup>1)</sup> Bei allen Versuchen war, wenn nicht anders gesagt wird, die Cyanwasserstoffmenge dem Aldehyd äquivalent.

Bei steigender Acidität wird also immer mehr Eiweiß gefällt, bis bei  $p_{\text{H}} = 4,8$  das Maximum erreicht wird. Setzt man mehr Säure hinzu, löst sich der Niederschlag wieder, (als Acidalbumin) bei  $p_{\text{H}} = 3,9$  vollständig. Obgleich das Trockengewicht von 2,6 bis 0,6 Proz. abnimmt, wird kein Enzym gefällt. Durch eine Fällung mit Säure bis  $p_{\text{H}} = 4,8$  kann also die enzymatische Kraft des Präparats vervierfacht werden.

### 3. Adsorption durch Tonerde.

Das Aluminiumhydroxyd wurde folgendermaßen hergestellt. Ein Kilogramm  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 + 18 \text{H}_2\text{O}$  wurde in 3 Litern kochenden Wassers gelöst und die Lösung in 3 Liter heißer 20proz.  $\text{NH}_3$  eingegossen. Die Mischung wurde 10 Stunden gekocht und der Niederschlag dann so lange durch Dekantation mit Wasser gewaschen, bis das Waschwasser mit *Nesslers* Reagens keine Färbung gab. Das Tonerdehydrat wurde in 5proz. Suspension aufbewahrt. Die schleimige Mischung hatte eine Acidität  $p_{\text{H}} = 6,8$  (elektrometrisch gemessen).

A. Tonerdehydrat sorbiert. Phosphat und Arsenat eluieren.

Von einer dialysierten Enzymlösung (Trockengewicht 0,60 Proz., Aschengehalt 0,01 Proz.,  $p_{\text{H}} =$  etwa 6) wurden 250 ccm mit 50 ccm Al-Suspension verrührt. Nach 30 Minuten wurde das Tonerdehydrat abfiltriert, mit ein wenig destilliertem Wasser gewaschen und dann mit einer 1proz. Lösung von  $\text{KH}_2\text{AsO}_4$ , die mit  $\text{NH}_3$  gegen Phenolphthalein neutral gemacht war, geschüttelt. Nach Filtration wurde die Elution dialysiert. Das Trockengewicht war dann 0,13 Proz. und der Aschengehalt 0,03 Proz. In 15 ccm dieser Lösung und in 2,5 ccm der ursprünglichen Lösung + 12,5 ccm Wasser wurde die enzymatische Wirkung gemessen (2 ccm Aldehyd in Totalvolumen 37 ccm). Die Mengen der Lösungen waren so gewählt, daß sie gleichen Mengen fester Substanz entsprachen. Im ersten Falle wurde die Drehung  $1,35^\circ$ , im zweiten Falle  $0,22^\circ$  beobachtet (die Acidität war in beiden Fällen  $p_{\text{H}} = 5$ ). Die spezifischen Drehungen berechnen sich hieraus zu 1,6 bzw.  $10,0^\circ$ , wobei man findet, daß der Reinheitsgrad der ursprünglichen Lösung 109 und der der gereinigten Lösung 667 ist. Der Reinheitsgrad der dialysierten Elution ist also sechsmal größer als die der Ausgangslösung (die Drehungen sind so klein, daß sie den Enzymmengen proportional sind).

Das Arsenat kann durch *Phosphat* ersetzt werden.

### B. Menge sorbierter Substanz.

Von einer dialysierten, neutralen 1,64proz. Roh-Emulsinlösung wurden drei Proben von 100 ccm mit verschiedenen Mengen Al-Suspen-

sion versetzt. Nach einer Stunde wurde filtriert und in den Filtraten das Trockengewicht und die enzymatische Kraft bestimmt (2 ccm Aldehyd in Totalvolumen 25 ccm). In den zwei letzten Proben (siehe Tabelle IV) war das Enzym vollständig sorbiert worden. Die Sorbate wurden mit je 50 ccm 1proz. Arsenatlösung eluiert ( $p_H = 6,2$ ). Nach dreitägiger Dialyse wurden in 10 ccm die enzymatische Wirkung und das Trockengewicht bestimmt.

Tabelle IV.

Al-Hydroxyd g	Nicht sorbierte Substanz g	Trockengewicht der dialys. Elution Proz.	Drehung durch 10 ccm Elution
0	1,64	—	—
0,5	0,86	0,04	0,22°
1,5	0,23	0,03	0,20
2,5	0,05	0,05	0,10

Von 0,5 g Al-Hydroxyd ist also etwa die Hälfte der Trockensubstanz sorbiert worden, von 1,5 g beinahe alles. Dabei ist die Sorption des Enzyms vollständig. Da hier wie gewöhnlich der Reinheitsgrad beträchtlich erhöht worden ist (mit 1,5 g bis 330), müssen wir schließen, daß die *Elution*, nicht aber die Sorption, recht selektiv sein muß.

(Besondere Versuche zeigten, daß eine Menge der Roh-Enzymlösung, die in Trockengewicht 10 ccm der Elution entsprach, keine merkbare Drehung hervorrufen konnte, und daß also eine große Verbesserung des Reinheitsgrades erzielt worden war.)

#### C. Abhängigkeit der Sorption von der Acidität.

Eine Roh-Emulsinlösung mit dem Trockengewicht 2,27 Proz. wurde mit Essigsäure gefällt. Vom Filtrat (Trockengewicht 0,55 Proz.) wurden Proben genommen, die mit Salzsäure, Essigsäure oder Natronlauge zu verschiedenen Aciditäten gebracht wurden (elektrometrische Messung). Nun wurden 50 ccm von jeder Probe mit je 5 ccm Al-Suspension versetzt und 30 Minuten geschüttelt, wonach  $p_H$  noch einmal bestimmt wurde. Die Elution wurde mit 10 ccm molarer  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  + 15 ccm Wasser während einer halben Stunde vorgenommen. Nachdem die Filtrate 15 Stunden dialysiert waren, wurde die Acidität wieder bestimmt und die Maximaldrehung im Substratgemisch (10 ccm Enzymlösung + 2 ccm Aldehyd + 16,3 ccm 1,19 n HCN-Lösung + 5 ccm Acetatpuffer,  $p_H = 5,2$ ) beobachtet. Das Trockengewicht der dialysierten Elutionen war im Durchschnitt 0,04 Proz.

Tabelle V.

$p_H$			Maxi- male Drehung	$p_H$			Maxi- male Drehung
vor der Sorption	nach der Sorption	nach der Dialyse		vor der Sorption	nach der Sorption	nach der Dialyse	
0,35	0,66	6,10	0,00°	5,16	5,47	6,88	1,70°
1,91	2,81	6,30	0,85	5,79	6,20	6,95	1,75
3,39	3,63	6,28	1,30	9,06	7,00	6,98	1,75
3,51	3,71	6,27	1,35	11,31	8,25	7,02	1,45
4,19	4,30	6,30	1,55	12,70	12,60	7,12	0,15
4,69	4,95	6,77	1,65	13,17	13,15	7,59	0,00

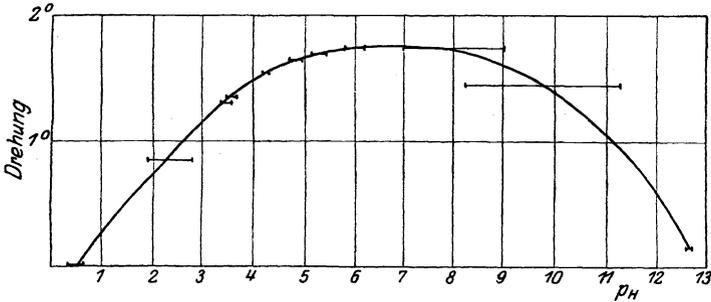


Abb. 2. Sorptions- $p_H$ -Kurve.

Obleich ohne Schädigung des Enzyms die Sorption zwischen  $p_H = 3$  und 10 vorgenommen werden kann, ist es aus Tabelle V und aus Abb. 2 ersichtlich, daß man die größte Sorption bei  $p_H = 6$  bis 7 erzielt.

Wenn man wie hier zuerst das mit Säure fällbare Eiweiß beseitigt und danach die Lösung durch Sorption reinigt, wird sie so eiweißfrei, daß kein Niederschlag bei Zufügung des Substrats entsteht. Bei Verwendung eines so gereinigten Enzyms kann also die Ausbildung der Rechtsdrehung stetig beobachtet werden.

#### D. Elution bei verschiedener Acidität.

Nachdem durch Vorproben gefunden worden war, daß alkalisches Arsenat weit mehr Enzym eluiert als saures, wurde die Acidität der maximalen Elution herausgesucht. Die Elutionsflüssigkeit war  $\frac{2}{3}$  molares Phosphat, das durch NaOH auf verschiedene Aciditäten gebracht wurde, die elektrometrisch bestimmt wurden.

Eine Roh-Emulsinlösung wurde dialysiert, wonach das Trockengewicht 2,27 Proz. gefunden wurde. Von dieser Lösung wurden 600 ccm mit 130 ccm Tonerde-Aufschlammung versetzt, und nach 24 Stunden wurde das Sorbat abfiltriert, wonach das Trockengewicht des Filtrats 0,40 Proz. und der Aschengehalt 0,01 Proz. war. Das Sorbat wurde in 100 ccm Wasser aufgeschlämmt. Davon wurden je 15 ccm mit 2 ccm

Phosphatlösung bestimmter Acidität gemischt. Nach 17 Stunden wurden die Elutionen filtriert, 5 ccm der Filtrate mit dem Substrat gemischt und die Maximaldrehung beobachtet (2 ccm Aldehyd, 5 ccm Acetatpuffer mit  $p_H = 5,2$  in der Mischung) Totalvolumen 25 ccm.

Tabelle VI.

Acidität bei der Elution . .	5,0	5,8	6,4	6,8	7,2	7,7	8,6	11,3
Maximaldrehung . . . . .	0,30	0,50	1,05	1,60	1,85	2,00	2,10	2,10°

Wie aus der Tabelle VI hervorgeht, wird also durch alkalische Elution weit mehr Enzym freigemacht als durch saure.

Mit einer anderen Roh-Emulsinlösung wurde ein ähnlicher Versuch angestellt, wobei die Acidität der Phosphatmischung in noch weiteren Grenzen variiert wurde. Die Elutionen wurden vor der Prüfung dialysiert. Es ergab sich, daß bei  $p_H = 0,88$  kein Enzym eluiert wurde, daß bei  $p_H = 4,8$  ein wenig Enzym frei gemacht war und daß die ausgelöste Enzymmenge danach mit fallender Acidität stetig zunahm, um bei kräftiger Alkalinität ( $p_H = 13$ ) wieder klein zu werden, was allerdings auf Enzymzerstörung beruhen kann.

Auch durch *Elution mit Alkali ohne Phosphat* ( $p_H = 10,3$ ) wurde eine wirksame Lösung erhalten, die indessen nach Dialyse eine nur halb so große Drehung gab als die mit Phosphat von derselben Acidität gewonnene Lösung. Wasser ohne Alkali löste kein Enzym aus. Anscheinend ist also die Acidität ausschlaggebend und das Phosphat scheint dadurch beizutragen, daß es unlösliches Al-Phosphat liefert, wobei das Enzym verdrängt wird. In den folgenden Versuchen wurde mit 0,5 molarer Phosphatlösung eluiert ( $p_H = 9 - 10$ )<sup>1</sup>).

#### E. Sorption durch Ferrihydroxyd.

Das Ferrihydroxyd wurde in derselben Weise wie das Tonerdehydrat hergestellt, indem Ferrisulfat heiß mit starkem  $NH_3$  gefällt wurde. Die Aufschlammung des ausgewaschenen Hydroxyds hatte ein Trockengewicht von 5,5 Proz.

200 ccm einer säuregereinigten 0,82proz. Enzymlösung wurden mit 50 ccm der  $Fe(OH)_3$ -Aufschlammung geschüttelt. Nach einer Stunde wurde filtriert und mit 25 ccm Phosphatlösung + 25 ccm Wasser eluiert ( $p_H = 8,5$ ). Das Filtrat von der Sorption mit dem etwa nicht sorbierten Enzym hatte das Trockengewicht 0,47 Proz. und  $p_H = 6,3$ . Es wurde gefunden, daß die Lösung keine enzymatische Wirkung zeigte. Die Elution wurde dialysiert, wobei etwas Ferrihydroxyd aus-

---

<sup>1</sup>) Wie aus den neueren Untersuchungen (besonders von *Willstätter*) hervorgeht, können aus Sorptionsversuchen an unvollständig gereinigten Enzymen keine Schlüsse über ihre elektrochemische Natur gezogen werden.

flockte. Nach Filtrieren zeigte die dialysierte Lösung das Trockengewicht 0,29 Proz. und  $p_H = 6,8$ . Die enzymatische Wirkung wurde nun in je 5 ccm der ursprünglichen Lösung und der Elution bestimmt. Die Drehungen  $0,95$  und  $0,60^\circ$  wurden beobachtet (2 ccm Aldehyd in 25 ccm). Die Elution gibt eine ziemlich schlechte Ausbeute, aber trotzdem ist die eluierte Lösung bedeutend reiner als die Ausgangslösung (in diesem Falle sind die Reinheitsgrade 120 bzw. 214). Eine Reinigung kann also sowohl mit Fe als mit Al ausgeführt werden.

Es wurden nun zwei vergleichende Sorptionsversuche mit gleichen Mengen  $\text{Al}(\text{OH})_3$  und  $\text{Fe}(\text{OH})_3$ -Aufschlammung ausgeführt. Von den Elutionen wurden in Trockengewicht gleiche Mengen auf Enzym geprüft, wobei es sich herausstellte, daß die Drehungen sich wie 1:0,85 verhielten. Es scheint also, als wäre das Tonerdehydrat ein wenig überlegen.

Bei einem Versuch, mit einer zweiten Sorption die Elution weiter zu reinigen, wurde keine deutliche Verbesserung wahrgenommen.

#### F. Versuche zur Sorption mit Kaolin.

Es wurde von einer schon mit Al gereinigten Enzymlösung ausgegangen, und Sorptionsversuche sowohl in saurer als in alkalischer Lösung wurden gemacht. In den Phosphatelutionen fand ich indessen kein Enzym. In einem anderen Versuch wurden die Sorbate direkt geprüft, enthielten aber kein Enzym.

#### G. Reinigung mit Bleiacetat und Schwefelwasserstoff.

Eine säuregereinigte Emulsinlösung (Trockengewicht 0,97 Proz., Asche 0,11 Proz.,  $p_H = 6,53$ ) wurde mit einer kleinen Menge gesättigter Lösung von basischem Bleiacetat versetzt. Ein reichlicher Niederschlag, der sich bei weiterem Zusatz von Bleisalz nicht vermehrte, wurde abfiltriert, mit ein wenig Wasser gewaschen, dann mit Wasser verrieben und mit einem kräftigen Strom von  $\text{H}_2\text{S}$  behandelt. Wenn alles Blei als Sulfid gefällt war, wurde filtriert. (Wenn das Schwefelblei sich in kolloider Form löste, wurde es leicht mit ein wenig Natriumacetat ausgeflockt). Das Filtrat war farblos und klar, Trockengewicht 0,75 Proz., Asche 0,27 Proz. Von der organischen Substanz war also etwa die Hälfte gefällt worden. In je 1 ccm der ursprünglichen und der gereinigten Lösung wurde die enzymatische Wirkung festgestellt (2 ccm Aldehyd in 25,7 ccm). Die Drehungen waren  $1,10$  und  $1,35^\circ$ , die Reinheitsgrade 660 und 1450 entsprechend. Der Reinheitsgrad ist also mehr als verdoppelt.

In einem zweiten Versuch mit derselben Ausgangslösung enthielt das  $\text{H}_2\text{S}$ -Filtrat 1,16 Proz. feste Stoffe und 0,51 Proz. Asche, d. h. 0,65 Proz. organische Substanz. Ein Teil wurde dialysiert, wodurch

das Trockengewicht zu 0,18 Proz. und der Aschengehalt zu 0,01 Proz. sank. Diese Lösung gab die Drehung  $1,20^\circ$ , einer Aktivität von 3640 entsprechend. Durch die Reinigung wurde also der Reinheitsgrad 5,5mal größer als der der ursprünglichen Lösung.

*Wiederholte Reinigung.* Ein Teil von einer schon durch diese Methode gereinigten Enzymlösung mit Trockengehalt 0,30 Proz. und Asche 0,02 Proz. wurde wieder mit Pb gefällt, mit  $H_2S$  eluiert und dann dialysiert, wonach ein Gehalt von 0,08 Proz. Trockensubstanz und 0,00 Proz. Asche gefunden wurde. Die Aktivität der ersten und der zweiten Lösung wurde geprüft, wobei gefunden wurde, daß 1 ccm der beiden Lösungen in den Reaktionsmischungen (2 ccm Aldehyd in 25,7 ccm) die Drehungen 2,00 und  $1,55^\circ$  hervorrief. Dies gibt einen Reinheitsgrad von 3680 bzw. **10 000**. Durch einmal wiederholte Behandlung mit Pb und  $H_2S$ , in Verbindung mit Dialyse, läßt sich also die Roh-Enzymlösung weitgehend reinigen. Von den hier geprüften Methoden scheint diese die beste zu sein, und ein rund *hundertfacher Reinheitsgrad* im Vergleich mit dem Rohpräparaté kann leicht erreicht werden.

Setzt man direkt zu dem Substrat den enzymhaltigen Bleiniederschlag, wird eine kräftige Rechtsdrehung beobachtet. Das Bleisulfid und das Dialysat sind dagegen vollkommen inaktiv.

Statt des basischen Bleiacetats kann auch *neutrales* mit etwa demselben Erfolg angewendet werden. Die Elution des Enzyms mit  $H_2S$  wird in beiden Fällen erleichtert, wenn etwas NaOH zugefügt wird, um die von  $H_2S$  entbundene Essigsäure abzustumpfen.

### III. Direkte Reinigung des Mandelextrakts.

Um zu erfahren, ob die Ausfällung des Roh-Emulsins durch Aceton etwa entbehrt werden konnte, wodurch die Reinigung weit einfacher werden sollte, wurden auch Reinigungsversuche mit *Placentextrakt* ausgeführt.

#### A. Dialyse.

Placent wurde mit schwach alkalischem Wasser extrahiert und das Filtrat mit ein wenig Essigsäure gefällt. Das Filtrat hatte das Trockengewicht 2,72 Proz. und den Aschengehalt 0,28 Proz. Ein Teil wurde dialysiert und dann das Trockengewicht zu 0,07 Proz. bestimmt. Beide Lösungen wurden auf Enzymgehalt geprüft (5 ccm Enzym, 2 ccm Aldehyd in Totalvolumen 25,7 ccm). Die Drehungen waren  $1,45$  und  $1,80^\circ$ , wovon sich die Reinheitsgrade 61 und 2660 berechnen. Die dialysierte Lösung war also etwa 40mal aktiver als die undialysierte. Die Außenflüssigkeit bei der Dialyse wurde bei vermindertem Druck und  $30^\circ$  eingengt, gab aber keinen enzymatischen Effekt. Durch Dialyse kann also der Mandelextrakt weitgehend gereinigt werden.

*B. Sorption.*

Ein Extrakt, der mit Säure von dem größten Teile des Eiweißes befreit war und das Trockengewicht 1,74 Proz. hatte, wurde sowohl in saurer ( $p_{\text{H}} = 4$  bis 5) als in alkalischer Lösung mit Al behandelt. Zu 300 ccm Extrakt wurden in beiden Fällen 20 ccm Al(OH)<sub>3</sub>-Aufschlammung gesetzt. Beide Adsorbate wurden mit 100 ccm Dinatriumphosphatlösung ( $\frac{2}{3}$  molar) eluiert und die Elutionsflüssigkeiten dann dialysiert. In beiden Fällen wurden hellbräunliche, ein wenig opaleszente Lösungen erhalten. Die aus der sauren Flüssigkeit erhaltene Lösung hatte das Trockengewicht 0,78 Proz., die durch alkalische Sorption gewonnene 0,30 Proz. (beide gaben merkbare Niederschläge beim Vermischen mit dem Substrat und waren also ziemlich unrein). In 1 ccm wurden die Enzymmengen bestimmt (2 ccm Aldehyd in 25,7 ccm). Aus den Drehungen 0,20 bzw. 0,65° berechnen sich die Reinheitsgrade 130 bzw. 1120. Die aus dem basischen Extrakt erhaltene Lösung ist also etwa 9mal aktiver als die aus dem sauren gewonnene.

Um zu untersuchen, ob ein durch *Dialyse* gereinigter Extrakt durch Al-Sorption weiter verbessert werden kann, wurde ein solcher Extrakt von Trockengewicht 0,62 Proz. mit Al sorbiert und mit Phosphat eluiert. Nach Dialyse hatte die Lösung das Trockengewicht 0,50 Proz. Je 5 ccm des Extrakts und der Elution gaben die Drehungen 0,80 und 1,75° (2 ccm Aldehyd in 25,7 ccm), entsprechend den Reinheitsgraden 133 und 361. Durch die Sorption ist also der Reinheitsgrad etwa dreifach worden.

Schließlich wurde ein mit *Säure und Dialyse* gereinigter Extrakt sorbiert. Eine Lösung mit dem Trockengewicht 4,06 Proz. wurde mit Essigsäure gefällt und das Filtrat dialysiert. Das Trockengewicht wurde dadurch 0,52 Proz. Durch Sorption, Elution und Dialyse erhielt ich eine Lösung mit dem Trockengewicht 0,66 Proz. Je 5 ccm der Lösungen wurden auf Enzymgehalt geprüft (2 ccm Aldehyd in 25,7 ccm). Die ursprüngliche Lösung gab 2,95°, die säuregereinigte 1,45° und die Elution 2,90°, wovon sich die Reinheitsgrade 75, 287 und 457 berechnen. Nach der Säurebehandlung war also der Reinheitsgrad viermal und nach der Sorption sechsmal größer als im Rohextrakt.

*C. Reinigung mit Bleiacetat.*

Nachdem Vorversuche gezeigt hatten, daß auch bei der Fällung mit PbAc<sub>2</sub> ein neutraler oder schwach basischer Extrakt eine bessere Ausbeute lieferte als ein saurer Extrakt, wurde ein alkalischer Extrakt aus Mandelpulver bereitet und dialysiert. Das Trockengewicht war dann 2,07 Proz. und der Aschengehalt 0,02 Proz. Ein Teil dieser Lösung wurde mit neutralem Bleiacetat vollständig gefällt. Nach Behandlung mit H<sub>2</sub>S, Filtration und Dialyse wurde aus dem Bleiniederschlag eine

Lösung erhalten, die nach Einengen das Trockengewicht 1,34 Proz. und den Aschengehalt 0,02 Proz. aufwies. Von beiden Lösungen wurde 1 ccm auf Enzym geprüft (2 ccm Aldehyd in 23,1 ccm). Aus den beobachteten Drehungen 0,80 und 3,70° berechnen sich die Reinheitsgrade 180 und 1300. Der Reinheitsgrad ist im letzten Falle etwa 7 mal größer. Die Methode ist also auch bei Mandelextrakt gut.

*D. Reinigungsversuche mit Tannin.*

In einer Lösung von Roh-Emulsin ruft Tannin einen Niederschlag hervor, der enzymatisch sehr aktiv ist. Ein Extrakt aus Placentpulver wurde mit Säure gereinigt, eingeengt und mit Tannin fraktioniert gefällt. Die erste Fraktion, welche die Hauptmenge ausmachte, war weniger wirksam als die letzte. Durch Behandlung mit Bleioxyd und Wasser oder mit Baryt konnte ein stark wirksames Filtrat erhalten werden. Da indessen meine Enzymlösungen, an sich linksdrehend, durch die Anwesenheit des Tannins stark rechtsdrehend wurden und dadurch die Berechnung der Drehung des gebildeten Oxynitrils erschwerten, habe ich keine weiteren Versuche mit dieser Methode ausgeführt.

*Vergleich der  $\beta$ -Glucosidase- und der Oxynitrilesewirkung verschiedener Präparate.*

Im Zusammenhang mit den Versuchen zur Reinigung der Oxynitrilese wurde auch in aller Kürze untersucht, wie sich ein anderes Enzym der Mandeln, die  $\beta$ -Glucosidase, bei den Reinigungsoperationen verhält.

Roh-Emulsin wurde in Wasser gelöst = Lösung  $E_1$ , mit Trockengewicht 3,25 Proz. und Asche 0,11 Proz. Ein Teil dieser Lösung wurde mit Säure gereinigt und dann mit Aceton gefällt. Von dem getrockneten Pulver wurde eine 3,95proz. Lösung bereitet, Asche 0,30 Proz., = Lösung  $E_2$ . Ein Teil davon wurde mit Bleiacetat behandelt und dialysiert und gab die Lösung  $E_3$ , mit Trockengewicht 0,59 Proz. und Asche 0,01 Proz. Von den drei Lösungen wurden 0,3 ccm auf Oxynitrilese untersucht (2 ccm Aldehyd in 23,1 ccm,  $p_H = 5,2$ ). Aus den beobachteten Drehungen  $E_1$  0,35°,  $E_2$  1,30° und  $E_3$  1,65° berechnen sich die Reinheitsgrade der Lösungen: 166, 550 und 4390. Die relativen Aktivitäten sind also 1, 3,3, und 26,4.

Nun wurde die *Salicin*spaltung der drei Lösungen bestimmt<sup>1)</sup>. Die 2proz., mit Puffer versetzte Salicinlösung zeigte die Drehung - 2,30°. Die vollständige Spaltung entspricht der Drehung + 1,19°. Zu 15 ccm dieser Lösung setzte ich 1,0 ccm  $E_1$  oder 0,9 ccm  $E_2$  oder 1,0 ccm  $E_3$ . Im ersten Falle wurde nach 2 $\frac{1}{4}$  Stunden die Drehung

<sup>1)</sup> Helferich, Zeitschr. physiol. Chem. 117, 160, 1921.

— 0,85° gefunden (nach Zusatz von Pottasche — 0,70°). Im zweiten Falle nach derselben Zeit 0,35° bzw. 0,50, im dritten Versuch nach  $\frac{1}{4}$  Stunden — 1,80°, nach  $1\frac{1}{2}$  Stunden — 0,85° und nach  $2\frac{1}{4}$  Stunden — 0,35° (nach Zusatz von Pottasche — 0,20°). Aus diesen Zahlen berechnen wir die Reaktionskoeffizienten zu 197, 521 und 282 · 10<sup>-5</sup>. Da diese Koeffizienten den Enzymmengen proportional sind, finden wir die relativen Reinheitsgrade bezüglich der  $\beta$ -Glucosidase zu 1, 2,6 und 8,3. Wir finden also, daß die zwei Enzyme in sehr verschiedenem Grade angereichert werden. So sind z. B. durch die Bleimethode die Oxynitrilese dreimal reiner als die Glucosidase.

#### IV. Eigenschaften der Oxynitrilesepräparate.

##### A. Spezifische Drehung des Enzympräparats.

Eine undialysierte Roh-Emulsinlösung (6 Proz.) gab die Drehung — 4,80° (2-dm-Rohr), eine andere, 3,94proz. Lösung die Drehung — 3,20°. Die spezifischen Drehungen sind also — 40,0 bzw. — 40,6°. Nach Dialyse, wodurch das Trockengewicht auf 2,9 Proz. sank, gab die erste Lösung die spezifische Drehung — 44,8°, die zweite Lösung mit Trockengewicht 3,47 Proz. gab — 45,1°. Einige andere Roh-Emulsinlösungen (dialysiert), deren Trockengewicht zwischen 1,2 und 2,8 Proz. schwankten, zeigten die spezifischen Drehungen — 44,7, — 44,6, — 44,4, — 44,4, — 44,0, — 45,1 und — 45,8°. Das Mittel scheint — 45° zu sein.

Die Präparate, die nach den verschiedenen oben geschilderten Methoden gereinigt waren (Trockengewicht unter 1 Proz.), zeigten spezifische Drehungen zwischen — 30 und — 40°, mit einem Mittel von etwa — 35°.

In diesem Zusammenhang sei auf die wichtige Tatsache hingewiesen, daß die spezifische Drehung des Enzympräparats sich durch Hitzeinaktivierung des Enzyms nicht änderte. Nun hängt ja mit aller Wahrscheinlichkeit die Wirkung der Oxynitrilese mit ihrer optischen Aktivität zusammen, und es ist möglich, daß die Hitzeinaktivierung mit einer Racemisierung zusammenhängt. Da nun aktive und hitzeinaktivierte Enzymlösungen dieselben spezifischen Drehungen zeigten, würde folgen, daß das Enzym zu der Drehung der Lösung nur wenig beiträgt, sei es wegen einer sehr kleinen spezifischen Drehung oder wegen einer sehr geringen Konzentration im Präparat.

##### B. Stabilität bei Zimmertemperatur.

Eine toluolhaltige Enzymlösung, die durch Sorption mit Al gereinigt war (0,13 Proz.) und mit Reinheitsgrad 667, gab im Substrat-

gemisch die Drehung  $1,35^{\circ}$ . Nach einem Monat gab dieselbe Menge der Enzymlösung die Drehung  $1,30^{\circ}$ . Das Enzym wird also beim Aufbewahren unter Toluol bei Zimmertemperatur während dieser Zeit nicht merkbar inaktiviert.

Um die Stabilität gegen Säure zu prüfen, versetzte ich eine dialysierte Roh-Emulsinlösung vom Reinheitsgrad 65 mit wachsenden Mengen Essigsäure. Jedesmal wurde der Eiweißniederschlag abfiltriert und im Filtrat die Acidität, das Trockengewicht und, nach Neutralisieren, die enzymatische Wirkung bestimmt. Durch die Säurefällung nahm das Trockengewicht von 1,45 bis 0,15 Proz. ab (Reinheitsgrad 663), ohne daß die Drehung des Reaktionsgemisches ( $1,90^{\circ}$ ) im meßbaren Grade vermindert wurde. Auch in den Lösungen, die mit Essigsäure noch saurer gemacht waren ( $p_{\text{H}} = 3$ ), wurde nach Neutralisieren eine ebenso gute Wirkung beobachtet. Die Einwirkungsdauer der Säure war 1 Stunde. Diese Acidität zerstört also das Enzym nicht.

Auch in alkalischer Lösung ist es sehr haltbar. So gab z. B. eine Enzymlösung, die nach Sorption mit Al bei  $p_{\text{H}} = 11,3$  eluiert wurde (1 Stunde), eine ebenso große Drehung wie eine durch Elution bei  $p_{\text{H}} = 7$  bis 8 erhaltene Lösung. Bei einem anderen Versuch wurden die zwei Elutionen bei  $p_{\text{H}} = 8,5$  und  $12,5$  während 12 Stunden vorgenommen. Nach Dialyse waren die Trockengewichte 0,21 und 0,20 Proz. und die Aciditäten  $p_{\text{H}} = 8,1$  und  $8,9$ . Im Substratgemisch (2 ccm Aldehyd in 30,6 ccm) wurden die Drehungen  $0,85$  bzw.  $0,30^{\circ}$ , den Reinheitsgraden 495 und 180 entsprechend, erhalten. Während 12 Stunden verliert also das Enzym bei  $p_{\text{H}} = 12,5$  etwa zwei Drittel ihrer Wirksamkeit. (Hier ist allerdings zu bemerken, daß die Acidität  $p_{\text{H}} = 12,5$  wahrscheinlich mit der Zeit ein wenig zunahm. Die Base wird nämlich allmählich teilweise an das feste Al-Hydroxyd gebunden.)

#### *C. Termostabilität. Inaktivierungstemperatur (1 Stunde).*

Es wurde zuerst das  $p_{\text{H}}$ -Stabilitätsoptimum des Enzyms bestimmt. Eine säuregereinigte Enzymlösung (Reinheitsgrad 503, Trockengewicht 4,06 Proz., Asche 0,46 Proz., spezifische Drehung  $-41,7^{\circ}$ ,  $p_{\text{H}} = 6,3$ ) wurde in mehrere Proben geteilt, die mit ihrem doppelten Volumen verschiedener Acetatpuffer versetzt und dann im Termostaten während einer Stunde zu  $60$ ,  $70$  oder  $80^{\circ}$  erhitzt wurden. Nach Abfiltrieren des etwa gebildeten Niederschlags wurden die Drehungen bestimmt und die Lösungen dann 24 Stunden dialysiert. Von der Lösung wurden je 10 ccm mit dem Substrat (2 ccm Aldehyd + 13,6 ccm HCN, 1,45 n, + 5 ccm Acetatpuffer,  $p_{\text{H}} = 5,3$  in der Reaktionsmischung) vermischt und die Maximaldrehungen beobachtet.

Tabelle VII.

Temperatur	Puffer (m/Liter)		Eigendrehung	Drehung im Substrat
60°	1 ccm	Essigsäure + 9 ccm Acetat	— 0,75°	2,40°
	0,5 "	" " + 9,5 " "	— 0,85	2,30
	0 "	" " + 10 " "	— 0,85	(2,00)
	0,2 "	NaOH + 9,8 " "	— 0,85	2,30
70°	4 "	Essigsäure + 6 " "	— 0,50	0,25
	2 "	" " + 8 " "	— 0,70	0,55
	0,5 "	" " + 9,5 " "	— 0,85	1,75
	1 "	NaOH + 9 " "	— 0,50	0,00
80°	1 "	Essigsäure + 9 " "	— 0,75	0,00
	0,5 "	" " + 9,5 " "	— 0,80	0,00
	0 "	" " + 10 " "	— 0,85	(0,05)
	0,2 "	NaOH + 9,8 " "	— 0,80	0,00

Das Stabilitätsmaximum liegt also bei der Acidität einer Natriumacetatlösung, die mit 2 bis 3 Proz. Essigsäure versetzt ist. Bei den folgenden Versuchen wurde der Puffer: 9,7 ccm Acetat + 0,3 ccm Essigsäure gebraucht ( $p_H = 5,7$ ). Zu dieser Puffermenge wurden 20 ccm der Enzymlösung gesetzt und Proben davon während verschiedener Zeiten zu 70 oder 75° erhitzt. Die Proben wurden dann schnell gekühlt, filtriert und 5 ccm davon zu dem Substratgemische (2 ccm Aldehyd + 13,6 ccm HCN + 5 ccm Puffer mit  $p_H = 5,3$  im Gemisch) gesetzt. Alle Proben zeigten dieselbe Eigendrehung ( $-1,60^0$ ), obgleich ihre enzymatische Wirkung sehr verschieden war.

Tabelle VIII.

Temperatur	Erhitzungszeit Stunden	Drehung im Substrat	$k_c$	Temperatur	Erhitzungszeit Stunden	Drehung im Substrat	$k_c$
70°	0	3,10°	—	75°	0	3,00°	—
	1	3,00	—		1	1,65	0,26
	2	2,80	0,023		2	1,05	0,23
	3	2,60	0,026		3	0,65	0,22
	4	2,35	0,030		4	0,35	0,23
	5	2,10	0,037		5	0,20	0,24
	6	1,35	0,033	6	0,10	0,24	

Die Inaktivierungstemperatur, d. h. die Temperatur, wo das Enzym in Lösung nach einstündiger Erhitzung seine halbe Aktivität verliert, liegt also ein wenig höher als 75°.

Durch Berechnung der Reaktionskoeffizienten aus den obigen Zahlen habe ich untersucht, inwieweit sich die Hitzeinaktivierung der

monomolekularen Formel:  $k_c = \frac{1}{t} \log \frac{k_0}{k_t}$ , in diesem Falle

$$k_c = \frac{1}{t} \log \frac{\text{Drehung nach der Erhitzungszeit } 0}{\text{Drehung nach der Erhitzungszeit } t}$$

anschließt. Die nach dieser Formel gefundenen  $k_c$ -Werte findet man im letzten Stabe der Tabelle VIII. Die Koeffizienten zeigen eine gute Konstanz.

#### D. Stickstoffgehalt.

In einer Enzymlösung, die zweimal mit Bleiacetat und Schwefelwasserstoff gereinigt war und dadurch einen Reinheitsgrad von 10000 (46mal größer als der der ursprünglichen Lösung) erreicht hatte, wurde der Stickstoffgehalt zu 12,3 Proz. bestimmt (Mikro-Kjeldahl, 5,60 mg Substrat:0,690 mg N). Da ich früher<sup>1)</sup> in einem nicht besonders gereinigten Präparat den Stickstoffgehalt 12,5 Proz. gefunden habe, scheint es, als sollte durch diese weitgehende Reinigung der Stickstoffgehalt nicht erheblich geändert werden.

Das *gereinigte* Präparat gab indessen keine Ninhydrinreaktion und hatte also keinen nennenswerten Eiweißgehalt. Auch koagulierte seine 0,4proz. Lösung beim Kochen nicht. Mit dem sehr empfindlichen *Molischschen* Reagenz wurde nur eine sehr unbedeutende Kohlenhydratfärbung erhalten. Phosphorwolframsäure erzeugte einen starken Niederschlag, was möglicherweise auf die Anwesenheit alkaloidähnlicher Stoffe deuten kann. Eine Lösung von Roh-Emulsin gibt dagegen beim Kochen starken Eiweißniederschlag und auch eine sehr starke Molischreaktion.

Eine mit Tonerde-Hydrat und Elution hergestellte Lösung (0,24 Proz., Reinheitsgrad 5290 = 14mal kräftiger als die ursprüngliche) wurde mit Aceton gefällt und der Niederschlag in Wasser gelöst. Es zeigte sich indessen, daß noch viel Eiweiß beigemischt war. Auch in dieser Hinsicht ist also die Bleiacetatmethode überlegen.

Daß das Enzym mit dem Eiweiß der Lösung nichts zu tun hat, folgt übrigens sowohl aus dem Molekulargewicht (s. unten) als aus dem Umstande, daß beim Vermischen mit dem Substrat, das Eiweiß von dem Alkohol und Benzaldehyd gefällt wird, das Enzym aber in Lösung bleibt. Der Eiweißniederschlag, der immer bei Verwendung unreiner Enzymlösungen entsteht, kann beim Beginn der Reaktion abfiltriert werden, ohne daß die Rechtsdrehung vermindert oder die Reaktion in irgend anderer Weise geändert wird.

#### E. Molekulargewicht nach Diffusionsversuchen.

Da es aus vielen Versuchen deutlich war, daß das Enzym kein genuiner Eiweißstoff sei, sondern wahrscheinlich ein kleineres Molekulargewicht besaß, wurden Molekulargewichtsbestimmungen mit der

---

<sup>1)</sup> Diese Zeitschr. 118, 21, 1921.

Diffusionsmethode von *Euler*<sup>1)</sup> ausgeführt<sup>2)</sup>). Angewandt wurden *Öholms* Apparate. Sperrflüssigkeit war in sämtlichen Versuchen Chloroform,  $h/2 = 0,509$  cm.

1. Eine Lösung, die durch zweimalige Reinigung mit Bleiacetat und Dialyse den Reinheitsgrad 6200 (28mal die ursprüngliche) erreicht hatte, diffundierte während 143 Stunden bei 14°. Von jeder Schicht wurden dann 2 ccm genommen. Die Maximaldrehungen (2 ccm Aldehyd + 13,7 ccm HCN + 4 ccm Wasser + 5 ccm Puffer von  $p_H = 5,3$  in Mischung) durch die verschiedenen Schichten wurden 2,50, 1,17, 0,24 und 0,02°. Daraus berechne ich das Molekulargewicht zu 5100.

2. Eine Lösung von Emulsin, Reinheitsgrad 166, Zeit 117 Stunden bei 15°. Die Drehungen waren 1,9, 5,0, 90,0, 20,0, 0,00°. Molekulargewicht 3700. In einem zweiten Versuch wurden die Reaktionsgemische bei 0° (anstatt 18°) gehalten. Die Drehungen 2,4, 0,1, 20,0, 25,0, 0,00°. Molekulargewicht 3100.

3. Von der soeben benutzten Emulsinlösung wurde ein Teil mit Essigsäure, Bleiacetat und Dialyse gereinigt, wodurch ihr Reinheitsgrad 4390, d. h. etwa 26mal vergrößert wurde. Diffusionszeit 42 Stunden bei 15°. Drehungen 1,60, 0,80, 0,20, 0,05. Molekulargewicht 4300.

4. Säuregereinigte Emulsinlösung. Reinheitsgrad 550. 144 Stunden bei 15°. Drehungen 2,50, 1,10, 0,20, 0,00°. Molekulargewicht 7100. In einem zweiten Versuch war die Diffusionszeit 142 Stunden bei 15°. Drehungen 2,60, 1,15, 0,22, 0,05. Molekulargewicht 6900.

5. Dialysierte Emulsinlösung, Reinheitsgrad 1350. Zeit 72 Stunden, 15°. Drehungen 1,25, 0,45, 0,03, 0,00°. Molekulargewicht 4700.

Aus 1. bis 5. berechnen sich die Diffusionskoeffizienten  $D_{20} = 0,098, 0,114, 0,127, 0,107, 0,083, 0,084$  und  $0,102$  bez.

Als Mittel geben meine Molekulargewichtsbestimmungen den Wert  $M = 5000$ . Da das diffundierende Enzym von gewissen Verunreinigungen gebunden sein kann, dürfte der gefundene Wert ein oberer Grenzwert sein. Es scheint indessen aus diesen vorläufigen Bestimmungen hervorzugehen, daß das Enzym einen bedeutend höheren Dispersitätsgrad (geringere Teilchengröße) besitzt als die nativen Eiweißstoffe.

#### F. Enzympräparat und Silbernitrat.

Unreine Enzympräparate, wovon sehr große Mengen nötig sind, damit man eine nennenswerte Rechtsdrehung bekommt, verbrauchen meßbare Mengen  $AgNO_3$ . Dies muß bei der Titration des

<sup>1)</sup> *Euler*, Wied. Ann. **63**, 273, 1897.

<sup>2)</sup> Betreffend die Methodik siehe *Euler, Hedelius* und *Svanberg*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **110**, 190, 1920.

freien Cyanwasserstoffs berücksichtigt werden. Auch mit gereinigten Enzympräparaten habe ich darüber Versuche angestellt: Zwei gleich große Mengen Cyanwasserstofflösung (18,7 ccm) wurden mit Wasser bzw. einer Enzymlösung, die mit Bleiacetat gereinigt war (dialysiert, Reinheitsgrad 725), verdünnt. Es wurden 2 ccm der Enzymlösung (Trockengewicht 3,05 Proz.) bzw. Wasser zugesetzt. Die ziemlich eiweißfreie Lösung reduzierte *Fehlings* Lösung nicht. Von den zwei HCN-Lösungen wurde die gleiche Menge  $\text{AgNO}_3$  verbraucht (von 0,9 ccm, 7,5 ccm n/10  $\text{AgNO}_3$ , 100 Proz. HCN entsprechend). Es ist deshalb bei Verwendung reinerer Enzymlösungen eine diesbezügliche *Korrektion unnötig*.

*G. Dialyse durch Kollodiummembranen.*

Durch mehrere Versuche ist gezeigt worden, daß eine Dialyse durch Kollodiumschläuche ohne wesentlichen Verlust von Enzym durchgeführt werden kann. Ich habe indessen in einem besonderen Versuch festzustellen versucht, ob in der Außenflüssigkeit irgend eine Wirkung zu finden ist. Durch Fällung mit Essigsäure und Bleiacetat wurde eine Enzymlösung mit Reinheitsgrad 2310 hergestellt und bei vermindertem Druck stark eingengt. Sie wurde dann dialysiert, die Außenflüssigkeit neutralisiert und eingengt, wonach sie in 1-dm-Rohr die Drehung  $2,25^\circ$  zeigt. Von dieser Lösung wurden 3 ccm mit dem Substrat gemischt. Die Maximaldrehung (2-dm-Rohr) war dann  $0,65^\circ$ . Da indessen das Dialysat selbst in dieser Verdünnung  $0,60^\circ$  dreht, ist die Aktivität äußerst klein und die Kollodiumhäute für Oxynitrilese ganz undurchdringlich.

**V. Kinetische Versuche.**

*A. Die Maximaldrehung ist anfangs der Enzymmenge proportional.*

Zu gleichen Substratgemischen (2 ccm Aldehyd + 20 ccm Cyanwasserstofflösung + 5 ccm Puffer,  $p_{\text{H}} = 5,2$  im Gemisch) wurden verschiedene Mengen einer Roh-Emulsinlösung (3,94 Proz., Reinheitsgrad 110) gesetzt. Die Maximaldrehungen wurden beobachtet.

*Tabelle IX.*

Enzymmenge	Maximaldrehung	Enzymmenge	Maximaldrehung
1 ccm + 7 ccm Wasser	$0,60^\circ$	4 ccm + 1 ccm Wasser	$2,40^\circ$
2 " + 3 " "	1,20	5 " + 0 " "	2,85
3 " + 2 " "	1,80		

Erst wenn die Drehung über  $2,40^\circ$  stieg (spezifische Drehung  $15,4^\circ$ ), wurde keine gute Proportionalität mehr beobachtet. (Bei der Berechnung der spezifischen Drehung ist nach anderen Versuchen eine Totalsynthese von 95 Proz. angenommen worden.)

B. Aktivitäts- $p_H$ -Kurve.

Die Größe der Rechtsdrehung und die Geschwindigkeit, womit sie erreicht wird, hängen in höchstem Grade von der Acidität ab. Die  $p_H$ -Kurve wurde deswegen bestimmt, wobei als Puffer molare Acetat-Essigsäuregemische benutzt wurden. Die Enzymlösung mit Reinheitsgrad 503 hatte Trockengewicht 4,06 Proz., Asche 0,46 Proz. und die Acidität  $p_H = 6,3$ . Zu dem Gemisch von Puffer und Enzym wurde so viel Alkohol gesetzt, als der gewöhnlichen Reaktionsmischung entspricht. Die Eiweißniederschläge wurden abfiltriert und die Acidität der Filtrate elektrometrisch bestimmt. Da die Pufferkonzentration so groß gewählt wurde, daß der Einfluß von Aldehyd und HCN, die neutrale Reaktion aufwiesen, auf die Acidität sehr klein war, konnte dadurch die Acidität der Versuchslösungen festgelegt werden.

Zu 2ccm Aldehyd + 13,6 ccm HCN + 10 ccm Puffer wurden 5ccm Enzym oder 2,5 ccm Enzym + 2,5 ccm Wasser zugesetzt und die Maximaldrehungen beobachtet.

Tabelle X.

5 ccm Enzym		2,5 ccm Enzym			
$p_H$	Drehung	$p_H$	Drehung	$p_H$	Drehung
4,4	0,60°	3,9	0,05°	5,3	2,25°
4,7	1,00	4,4	0,40	5,4	2,20
4,9	2,10	4,7	0,75	5,5	2,10
5,0	2,65	4,8	1,00	5,7	1,80
5,1	2,90	4,9	1,35	5,9	1,25
5,3	3,00	5,0	1,75	6,1	0,75
5,5	2,80	5,1	2,20		
5,8	2,25	5,2	2,25		

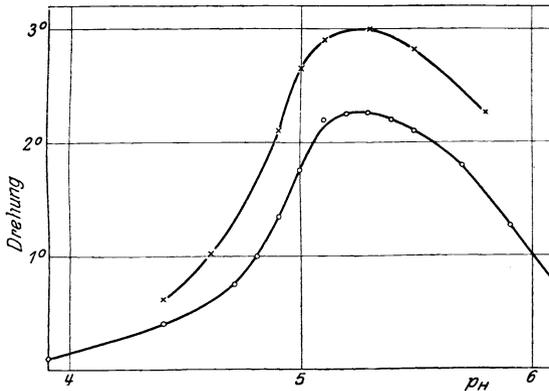


Abb. 3. Aktivitäts- $p_H$ -Kurve.

Nach der Tabelle X und Abb. 3 liegt das  $p_H$ -Optimum bei  $p_H = 5,2$  bis 5,4. (Die Pufferlösung, welche in dieser alkoholischen Lösung die Acidität  $p_H = 5,2$  gibt, gibt im gleichen Volumen Wasser  $p_H = 4,8$ .)

Bei diesem Punkte wird, wie früher berichtet ist, das Eiweiß der Rohpräparate am vollständigsten gefällt.)

Bei der Deutung dieser  $p_H$ -Kurve der Oxynitrilese muß eine große Reihe von Tatsachen beachtet werden. Bei den gewöhnlichen spaltenden Enzymen werden die  $p_H$ -Kurven durch die elektrochemischen Eigenschaften des Enzyms oder der Enzym-Substratverbindung erklärt. Bei der Oxynitrilese entbehren wir sogar jede klare Vorstellung von der Enzym-Substratverbindung, und bestimmend für die  $p_H$ -Kurve sind außerdem andere, parallel mit der enzymatischen Synthese verlaufende Reaktionen, wie die symmetrische Synthese und die Racemisierung des d-Oxynitrils.

Um über eine eventuelle Bindung des Katalysators an die Substrate etwas zu erfahren, wurden Versuche mit wechselnden Substratkonzentrationen ausgeführt.

*C. Die Substratkonzentration.*

1. Zu 5 ccm Enzymlösung + 5 ccm Puffer ( $p_H = 5,2$  im Gemisch) + 5 ccm Alkohol + 16,3 ccm HCN (entsprechend 2 ccm Aldehyd) wurden verschiedene Mengen Aldehyd gesetzt und die Mischungen mit Alkohol auf das Volumen 35,3 ccm gebracht. Die Maximaldrehungen wurden beobachtet.

Aldehyd ccm	Drehung	Aldehyd ccm	Drehung
1	0,80°	3	1,00°
2	1,25	4	0,80

2. Zu 10 ccm Enzymlösung (anderes Präparat) + 10 ccm Puffer + 1 ccm Aldehyd wurden verschiedene Mengen HCN und Alkohol gegeben. Volumen 51 ccm.

Cyanwasserstoff ccm	Entspricht Aldehyd ccm	Drehung	Cyanwasserstoff ccm	Entspricht Aldehyd ccm	Drehung
10	1,22	0,50°	20	2,44	0,90°
16,3	2,00	0,80	30	3,66	0,95

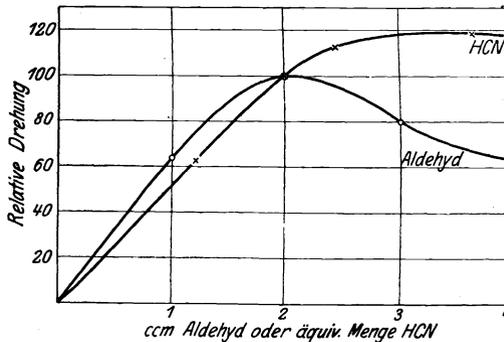


Abb. 4. Die Drehung als Funktion der Substratkonzentration.

In Abb. 4 habe ich die Drehung als Funktion der Substratkonzentration veranschaulicht. Die Drehung ist in einem willkürlichen Maßstab angegeben (die Drehungen bei äquivalenten Substratmengen sind gleich 100 gesetzt). Die eine Kurve („Aldehyd“) betrifft den Versuch mit Variation der Aldehydmenge, die andere („HCN“) den Versuch mit variierender HCN-Konzentration.

Wir sehen aus der Abbildung, daß mit steigender HCN-Konzentration die Drehung immer größer wird. Dies könnte in Analogie mit den Annahmen bei anderen enzymatischen Reaktionen so gedeutet werden, daß die Oxynitrilese mit HCN eine Verbindung eingehe, welche den rechtsdrehenden Oxynitril liefert. Durch Steigerung der HCN-Konzentration muß diese Verbindung in größerer Menge gebildet werden, und daraus folgt die Mehrbildung der rechtsdrehenden Form<sup>1)</sup>.

Daß die Drehung bei Vergrößerung der *Aldehyd*konzentration wieder abnimmt, dürfte darauf beruhen, daß HCN schneller zu symmetrischem Nitril gebunden wird und dessen Konzentration dadurch so schnell abnimmt, daß die *enzymatische* Reaktion bald zum Stehen kommt.

Unter der Annahme von einer Verbindung Enzym—HCN kann das Maximum der  $p_H$ -Kurve als das Maximum der Bildung oder der Reaktionsfähigkeit dieser Verbindung angesehen werden. Indessen dürfte, wie schon oben gesagt ist, dieses Maximum wenigstens teilweise von anderen Reaktionen bestimmt werden. So ist es z. B. klar, daß die Geschwindigkeit der Racemisierung des d-Nitrils, die in alkalischer Lösung schnell zunimmt, den alkalischen Ast der Kurve erklären kann (s. zweite Abhandlung, S. 397).

#### D. Hemmung durch das Reaktionsprodukt.

In Analogie mit den Verhältnissen bei anderen Enzymen war zu vermuten, daß die Geschwindigkeit der asymmetrischen Synthese durch die Anwesenheit von Oxynitril beim Versuchsbeginn herabgesetzt werden sollte, und zwar durch die Rechtsform mehr als durch die Linksform.

Mit Benzol wurde ein stark rechtsdrehendes Oxynitril isoliert und das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Ein Teil des Oxynitrils wurde durch Erhitzung vollständig racemisiert. Der Gehalt an Oxynitril war in beiden Fällen 95 Proz. Zu gewöhnlichen Reaktionsmischungen (2 ccm Aldehyd + 13,7 ccm HCN + 5 ccm Puffer + 1 ccm Enzym-

---

<sup>1)</sup> Es ist bei anderen Enzymen in gewissen Fällen möglich, eine Affinitätskonstante Enzym-Substrat zu berechnen. Es soll nur mit Vorbehalt erwähnt werden, daß, wenn man hier in gewöhnlicher Weise die Affinitätskonstante Oxynitrilese—HCN berechnet, sich der Wert etwa 4 ergibt. (Dissoziationskonstante = Molare Substratkonzentration bei halber maximaler Reaktionsgeschwindigkeit: etwa 0,23.)

lösung, das Enzym nach dem Oxynitril zugesetzt) wurde von den zwei Oxynitrilen 1,5 ccm + 1,5 ccm Alkohol zugesetzt. In einem dritten Versuch wurden nur 3 ccm Alkohol zugegeben (es wurde kontrolliert, daß die Acidität in allen drei Versuchen optimal war). Die Maximaldrehungen wurden beobachtet (die Drehung  $0,10^{\circ}$  ist wegen der Eigendrehung des d-Oxynitrils korrigiert):

Mit d-Oxynitril . . . . .	0,10 <sup>o</sup>
Mit racemischem Oxynitril . . . . .	0,35 <sup>o</sup>
Mit Alkohol . . . . .	0,50 <sup>o</sup>

Wie zu erwarten war, finden wir, daß das Enzym von dem Oxynitril gebunden wird, und zwar von der Rechtsform am kräftigsten.

*E. Spezifische Drehung des d-Benzoxynitrils.*

Bei kleinen Enzymmengen ist die Rechtsdrehung der Enzymmenge proportional. Vergrößert man dann die Enzymmenge, nimmt die Drehung langsamer zu, um schließlich nicht weiter mit der Enzymmenge merkbar zu steigen. Mit einer sehr großen Enzymmenge könnte man hoffen, bei optimaler Acidität einen ziemlich reinen d-Oxynitril zu erhalten. (Dies wird natürlich erst dadurch ermöglicht, daß unter jenen Umständen die enzymatische Synthese viel schneller verläuft als die symmetrische. Nach meinen oben gemachten Annahmen über die Bindung des Enzyms an HCN sollte dies bedeuten, daß das „HCN-Enzym“ schneller Benzaldehyd addiert als die freie Cyanwasserstoffsäure).

1. Zu der gewöhnlichen Substratmischung wurden verschiedene Mengen einer säuregereinigten Enzymlösung zugesetzt (organische Substanz 7,20 Proz.). Die Drehungen (1-dm-Rohr) waren: mit 5 ccm Enzymlösung  $2,35^{\circ}$ , mit 7 ccm  $2,50^{\circ}$  und mit 9 ccm  $2,50^{\circ}$ . Die Totalsynthese wurde durch Bestimmung des freien HCN gemessen. Es wurde gefunden, daß in den zwei letzten Versuchen bzw. 92,3 Proz. und 92,6 Proz. des HCN gebunden war. Im letzten Falle berechne ich die spezifische Drehung  $26,1^{\circ}$ . Die Oxynitrillösungen wurden gemischt und mit dem gleichen Volumen Benzol ausgeschüttelt. Die alkoholisch-wässrige Lösung drehte dann in 2-dm-Rohr  $0,15^{\circ}$ , die benzolische Lösung  $5,25^{\circ}$ , woraus folgt, daß beinahe alles Oxynitril ausgeschüttelt war. Auch nach einer Woche war die Drehung der Benzollösung unverändert, und nach Verdunsten des Benzols bei Zimmertemperatur wurde ein stark rechtsdrehendes Oxynitril erhalten (etwa  $15^{\circ}$  in 1-dm-Rohr).

2. In einem Versuch mit derselben Substratmischung und 7 ccm einer 0,26 proz., zweimal mit Bleiacetat gereinigten Enzymlösung (Reinheitsgrad 6630) wurde die Drehung  $2,70^{\circ}$  bei 92,5 Proz. Totalsynthese beobachtet. Spezifische Drehung  $28,2^{\circ}$ .

3. Von einer gereinigten Enzymlösung (Reinheitsgrad 4000) wurden steigende Mengen zum Substratgemisch zugesetzt, wobei das Totalvolumen immer konstant gehalten wurde. Folgende Drehungen wurden abgelesen: mit 1 ccm Enzymlösung 2,75°, 2 ccm 3,10°, 3 ccm 3,10°, 4 ccm 3,15°, 5 ccm 3,20°, 6 ccm 3,15°. Die Totalsynthese wurde in sämtlichen Versuchen zu  $92,0 \pm 0,5$  Proz. bestimmt. In den zwei letzten Fällen finden wir die spezifischen Drehungen 30,8 und 30,2°.

4. Ein mit Benzol ausgeschütteltes, stark rechtsdrehendes Oxynitril wurde auf totalen HCN-Gehalt nach *Volhard-Feldhaus* untersucht. Dabei wurde von 0,25 ccm Oxynitrillösung 9,5 ccm n/10 AgNO<sub>3</sub> verbraucht. In 1 ccm der Lösung finde ich also 0,506 g Oxynitril. In einem besonderen Versuch wurde festgestellt, daß eine Spaltung des Oxynitrils in Aldehyd und HCN in der Benzollösung nicht in Frage kommt, denn 0,8 ccm davon verbrauchten mit Alkohol gemischt nur 0,3 ccm AgNO<sub>3</sub>. Das benzolhaltige Oxynitril zeigte im 1-dm-Rohr die Drehung 13,5°. Spezifische Drehung 27,3°.

5. Da die Rechtsdrehung bei Synthese bei niedriger Temperatur stärker wird, wurde schließlich die spezifische Drehung auch nach Synthese bei 0° bestimmt. (Die Wasserkonzentration mußte hier vermindert werden, da die Mischung sonst nicht homogen blieb.) Zu 2 ccm Aldehyd + 13,1 ccm HCN + 2 ccm Puffer wurden 3 ccm Enzymlösung gesetzt, und dabei wurde die Drehung 3,20° in 1-dm-Rohr, bei 95,3 Proz. Totalsynthese, beobachtet. Spezifische Drehung 25,6°. Mit 4 ccm Enzymlösung + 1 ccm Puffer wurde die Drehung 3,50° erhalten (spezifische Drehung 29,7°), und mit 5 ccm Enzymlösung + 1 ccm Puffer fand ich bei 93,8 Proz. Totalsynthese die Drehung 3,50°, was einer spezifischen Drehung von 30,0° entspricht.

Der höchste von mir erhaltene Wert, etwa 30°, ist wahrscheinlich die spezifische Drehung des reinen d-Benzoxynitrils. Dafür spricht auch, daß *Krieble* und *Wieland*<sup>1)</sup> gefunden haben, daß bei 0° die ganze Oxynitrilmenge in optisch aktiver Form erhalten werden kann.

#### *F. Die Drehung des Oxynitrils in alkoholischer Lösung.*

Ein mit Chloroform ausgeschütteltes d-Oxynitril zeigte nach Verdunsten des Chloroforms die Drehung 31,5° in 2-dm-Rohr, aber nach 5 Monaten nur 23°. Das Oxynitril wurde nun in Alkohol gelöst, bis die Drehung der Lösung 3,40° und also von derselben Größenordnung wie in den Enzymversuchen wurde. Wenn jetzt die Lösung mit Alkohol weiter verdünnt wurde, zeigte sich eine genaue Proportionalität zwischen Drehung und Oxynitrilgehalt. Die in meinen Versuchen

<sup>1)</sup> Journ. Americ. Chem. Soc. **43**, 164, 1921.

beobachteten Drehungen sind also ein direktes Maß der d-Oxynitrilmenge.

Bei sehr hohen Oxynitrilkonzentrationen nimmt indessen die Drehung beim Verdünnen schneller ab, als aus der Proportionalitätsregel zu erwarten ist. Ein mit Benzol isoliertes d-Oxynitril mit der Drehung 13,25° (1-dm-Rohr, Na-Licht) wurde so mit Alkohol verdünnt, daß zu 9 ccm Oxynitril 1 ccm Alkohol gesetzt wurde, die Drehung beobachtet, noch 1 ccm Alkohol zugesetzt usw. Die Drehungen wurden sowohl mit Na-Licht als mit Hg-Licht abgelesen [Tabelle XI und Abb. 5 (Hg-Licht)]. Mit Silbernitrat wurde gefunden, daß sogar bei der größten Verdünnung (9 ccm Oxynitril + 37 ccm Alkohol) nur 0,2 Proz. des (sauren) Oxynitrils gespalten wurden.

Tabelle XI.

Verdünnung	Drehung		Verdünnung	Drehung	
	Hg-Licht	Na-Licht		Hg-Licht	Na-Licht
9 ccm Oxynitril + 0	15,20°	13,25°	9 ccm Oxynitril + 9	5,70°	5,05°
+ 1	12,55	—	+ 11	5,10	4,40
+ 2	10,80	9,50	+ 13	4,50	4,00
+ 3	9,55	8,40	+ 17	3,50	3,20
+ 4	8,55	7,55	+ 21	3,10	2,75
+ 5	7,70	6,85	+ 27	2,40	2,75
+ 7	6,50	5,80	+ 37	1,90	1,70

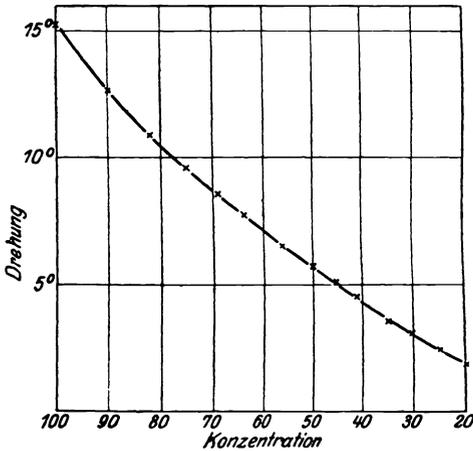


Abb. 5.  
Die Drehungsabnahme bei Verdünnung des Oxynitrils.

Die früher bestimmte spezifische Drehung 30° wurde mit Na-Licht beobachtet und dürfte also im Hg-Licht etwa 32° betragen.

G. Racemisierung des d-Oxynitrils.

Schon früher habe ich in meiner Arbeit gefunden, daß erhöhte Temperatur einer geringeren Drehung entspricht, was auf die vergrößerte Racemisierungsgeschwindigkeit zurückzuführen ist. Ich habe nun einige weitere Versuche angestellt, indem ich bei verschiedenen Temperaturen sowohl die Drehung

als die Totalsynthese bestimmte. Zu 4 ccm Aldehyd + 26,2 ccm HCN-Lösung + 10 ccm Puffer ( $p_H$  in der Mischung = 5,2) wurden 5 ccm einer Enzym-lösung (aus Mandelextrakt mit Säure, Bleiacetat und Dialyse hergestellt, Reinheitsgrad 4320) zugesetzt. Proben von 3 ccm zur Silbertitration (Tabelle XII).

Aus der Tabelle XII sehen wir, daß bei höherer Temperatur die Maximaldrehung kleiner ist und schneller abnimmt. Bei 60° wird keine Rechtsdrehung beobachtet. Bei dieser Temperatur bleibt auch die Totalsynthese bei einem niedrigeren Werte stehen. Um festzustellen, daß diese Verschiebung der Gleichgewichtslage von der Anwesenheit des Enzyms unabhängig ist, wurde der Rückgang der Drehung eines enzymfreien Oxynitrils untersucht. Ein mit Benzol ausgeschütteltes Oxynitril wurde in pufferhaltigem Alkohol gelöst und die Lösung in drei Teile geteilt. Die Ausgangsdrehung war im 2-dm-Rohr 1,15°. Die drei Lösungen wurden bei verschiedenen Temperaturen gehalten und die Drehungen ab und zu kontrolliert (Tabelle XIII).

Tabelle XII.

Temperatur:	0°				25°				35°				60°			
	Zeit	Drehung	AgNO <sub>3</sub> ccm	Total-synthese Proz.	Drehung	AgNO <sub>3</sub> ccm	Total-synthese Proz.	Drehung	AgNO <sub>3</sub> ccm	Total-synthese Proz.	Drehung	AgNO <sub>3</sub> ccm	Total-synthese Proz.	Drehung	AgNO <sub>3</sub> ccm	Total-synthese Proz.
5 Minuten . . .																
10 " . . .					2,10°									0,0°		
26 " . . .					2,40	2,5	90,0	0,85°	3,0	88,0	0,0	3,6	84,7	0,0		
30 " . . .					2,45			0,95								
45 " . . .					2,45			0,95								
1 Stunde . . .		2,60°			2,45	1,6	93,6	0,95	1,8	92,8	0,0	3,6	84,7	0,0		
2 Stunden . . .		3,00		90,8				0,85								
3 " . . .		3,10		92,8				0,75	1,2	95,2						
3,5 " . . .					2,20	1,4	94,4									
4,5 " . . .								0,60								
5,5 " . . .					2,10	1,2	95,2									
6 " . . .		3,15		93,9										0,0	3,4	86,4
8 " . . .					2,00	0,8	96,9	0,45								
26 " . . .														0,0	3,4	86,4

Tabelle XIII.

Zeit	0°	25°	60°
1 Stunde . . . .	1,15 <sup>0</sup>	1,10 <sup>0</sup>	0,10 <sup>0</sup>
4,5 Stunden . . .	1,10	0,95	0,05
21 „ . . . .	1,05	0,55	0,00
30 „ . . . .	1,05	0,40	0,00
ccm AgNO <sub>3</sub> zu 5 ccm Lösung .	0,2	0,4	1,0

Die Silbertitrierung wurde nach 30 Stunden vorgenommen. Es geht aus der Tabelle XIII, wie ich früher gefunden habe, hervor, daß die Racemisierungsgeschwindigkeit mit der Temperatur vergrößert wird. Da das Oxynitril nicht ganz benzolfrei war, kann seine Menge bei der Titrierung nicht genau berechnet werden. Indessen sehen wir, daß die Verschiebung des Gleichgewichts durch die Anwesenheit des Enzyms nicht bedingt war.

Die Angabe von *Rosenthaler*, daß die größte Drehung bei 25 bis 30° erreicht werden sollte, ist offenbar nicht stichhaltig. Bei 0° wird die Drehung größer, ihre Ausbildung aber verläuft langsamer.

Da die Annahme nahe liegt, daß die Hitzeinaktivierung der Oxynitrilase in einer Racemisierung besteht, habe ich einen approximativen Vergleich zwischen den Temperaturabhängigkeiten der zwei Reaktionen angestellt. Die Racemisierungsgeschwindigkeit meines Oxynitrils wird verzehnfacht durch etwa 15° Temperaturerhöhung (30 bis 60°, zweite Abhandlung, S. 394). Die Hitzeinaktivierung erfährt dieselbe Vergrößerung ihrer Geschwindigkeit im Zeitintervall von etwa 6°.

#### VI. Ergebnisse der Reinigungsversuche. Eigenschaften gereinigter Enzympräparate.

Das *Roh-Emulsin* wird am besten durch Extraktion von Mandelpulver mit schwach alkalischem Wasser hergestellt. Dabei werden die Säuren neutralisiert und das in den Zellen festgehaltene Enzym frei gemacht. Natürlich wird auch eine große Menge inaktiver Substanz herausgelöst. Durch Fällung mit 2 Volumen Aceton wird alles Enzym in einem leichten gelblichen Pulver erhalten. Da viel Mandelöl aus dem Niederschlag frei gemacht wird und nur mit großen Mengen Aceton oder Äther beseitigt werden kann, ist es einfacher, von fettarmem Mandelpulver („Placent“) auszugehen. Man erhält daraus ebenso gute Präparate.

Die *Reinigung des Roh-Emulsins*, d. h. die Beseitigung der inaktiven Beimischungen, habe ich unter Anwendung folgender Methoden versucht:

Dialyse,  
Fällung mit Säure,  
Sorption mit  $\text{Al}(\text{OH})_3$  und  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  und Elution,  
Fällung mit Bleiacetat,  
Fällung mit Tannin.

Mit diesen Methoden können auch Mandelextrakte direkt gereinigt werden.

*Dialyse.* Das Enzym kann Kollodiumschläuche nicht durchdringen. Durch mehrtägige Dialyse gegen strömendes Wasser kann beinahe alle Asche und etwa die Hälfte der organischen Substanz beseitigt werden, ohne daß die enzymatische Wirkung abnimmt. Eine dialysierte Enzymlösung ist nur nach Zusatz eines geeigneten Elektrolyten mit Aceton fällbar.

*Reinigung mit Säure.* Bringt man durch Säurezusatz die Acidität der Enzymlösung auf  $p_{\text{H}} = 4,8$ , so wird die größte Menge der Verunreinigungen gefällt. So können aus Roh-Emulsin etwa drei Viertel der Trockensubstanz ohne Enzymverlust entfernt werden.

*Tonerdehydrat und Ferrihydrat*, nicht aber Kaolin, sorbieren das Enzym, am besten bei  $p_{\text{H}} = 6$  bis 7. Das auch im Sorbat wirksame Enzym wird durch Wasser nicht herausgelöst, wohl aber durch Alkali oder noch besser durch alkalische Phosphat- oder Arsenatlösung, wobei die Acidität  $p_{\text{H}} = 8$  bis 11 die beste Ausbeute gibt. Wiederholte Adsorption hat nicht zum größeren Reinheitsgrad geführt.

*Bleiacetat* (neutrales oder basisches) fällt das Enzym. Der Niederschlag ist aktiv. Mit  $\text{H}_2\text{S}$  kann das Enzym ausgelöst werden, wobei die Verunreinigungen größtenteils ungelöst bleiben. Durch Wiederholung der Bleiacetatbehandlung kann ein hochaktives Enzympräparat erhalten werden. Unter Zuhilfenahme der früher beschriebenen Methode konnten z. B. 98 Proz. der Verunreinigungen einer Roh-Emulsinlösung ohne wesentliche Abnahme der enzymatischen Wirkung entfernt werden. Durch diese Methode wird der Reinheitsgrad der Oxynitrilase viel mehr gesteigert als der des vergesellschafteten Enzyms  $\beta$ -Glucosidase.

Gereinigte Enzympräparate zeigen keine Eiweißreaktionen und nur schwache Molischreaktion. Die Fällbarkeit durch Phosphorwolframsäure kann dagegen auf Anwesenheit alkaloidartiger Stoffe deuten.

Als obere Grenze des *Molekulargewichts* wurde durch Diffusionsversuche der Wert 5000 erhalten.

Die spezifische Drehung der Enzympräparate sinkt während der Reinigung von etwa  $-45^{\circ}$  auf etwa  $-35^{\circ}$ . Diese spezifische Drehung ist indessen von der Aktivität des Präparats nicht merkbar abhängig.

*Stabilität.* Das Enzym ist bei Zimmertemperatur sehr stabil, sowohl in saurer als alkalischer Lösung ( $p_H = 3$  bis 11). Die Inaktivierungstemperatur, wobei das Enzym während einer Stunde seine halbe Aktivität verliert, liegt ein wenig höher als  $75^0$ .

*Die optimale Acidität* ist  $p_H = 5,2$  bis  $5,4$  im alkoholischen Substratgemisch. Da das gereinigte Enzym kein Silbernitrat verbraucht, kann die Oxynitrilbildung sehr bequem durch Silbertitrierung bestimmt werden.

Es ist durch meine Versuche wahrscheinlich gemacht, daß das Enzym mit HCN eine Verbindung eingeht, welche das rechtsdrehende Oxynitril liefert. [Diese Versuche machen die eigentümliche Theorie von *Erlenmeyer*<sup>1)</sup> über die optische Aktivität des Benzaldehyds noch unwahrscheinlicher.] Die d-Oxynitrilmenge ist bei nicht allzu großen Drehungen der Enzymmenge proportional. Das Enzym wird von dem Oxynitril gebunden, und zwar am stärksten von der d-Form. Dies stimmt sehr gut mit der Beobachtung von *Bredig* und *Fiske*<sup>2)</sup>, daß bei der Oxynitrilsynthese durch Alkaloide diese sehr kräftig von dem Oxynitril gebunden wurden.

Als spezifische Drehung des d-Oxynitrils gibt *Feist*<sup>3)</sup> den Wert  $14^0$  an. *Rosenthaler*<sup>4)</sup> erreichte durch Amygdalinspaltung  $27^0$ . Ich habe unter optimalen Versuchsbedingungen den Wert  $30^0$  ermittelt (Na-Licht). Im Zusammenhang mit den Ergebnissen von *Krieble*<sup>5)</sup> dürfte daraus hervorgehen, daß dieser Wert die spezifische Drehung des nahezu reinen d-Oxynitrils ist.

Die in den Substratgemischen beobachtete Rechtsdrehung ist der Menge d-Oxynitril proportional. Die Racemisierung des d-Oxynitrils ist von der Anwesenheit des Enzyms unabhängig und wird durch Temperaturerhöhung und Verminderung der Acidität beschleunigt. Durch Temperaturerhöhung wird die Gleichgewichtslage ein wenig gegen größere Spaltung verschoben.

Ehe ich zu einer Zusammenfassung meiner Arbeiten über Oxynitrilbildung übergehe, möchte ich an dieser Stelle auf zwei ältere Hypothesen über die *Wirkungsweise des Enzyms* hinweisen.

1. *Fajans*<sup>6)</sup> setzt den enzymatischen Effekt in Analogie mit der Wirkung einiger bekannten Substanzen, nämlich gewisser Alkaloide wie Chinin und Chinidin. Bei Anwesenheit dieser Stoffe kann nach Belieben das d- oder l-Oxynitril in Überschuß erhalten werden, wenn Benz-

<sup>1)</sup> Diese Zeitschr. **64**, 382, 1914.

<sup>2)</sup> Ebendasselbst **46**, 7, 1912.

<sup>3)</sup> Arch. der Pharm. **247**, 226, 1909.

<sup>4)</sup> Ebendasselbst **248**, 105, 1910.

<sup>5)</sup> Journ. Americ. Chem. Soc. **43**, 164, 1921.

<sup>6)</sup> Zeitschr. f. physik. Chem. **73**, 25, 1910.

aldehyd und HCN in Chloroform gemischt werden. Die Ursache des Effektes liegt nach *Bredig* und *Fiske* in der Bindung zwischen Katalysator und Oxynitril. In Übereinstimmung damit habe ich gefunden, daß das Oxynitril (Rechtsform) vom Enzym kräftig gebunden wird. *Fajans* nimmt an, daß die Asymmetrie bei der Synthese dadurch verursacht wird, daß das Emulsin die Spaltung des l-Oxynitrils beschleunigt. *Rosenthaler*<sup>1)</sup> hebt dagegen hervor, daß, wenn also die Emulsinwirkung eigentlich eine asymmetrische *Spaltung* ist, die d-Form entstehen sollte, wenn inaktives Oxynitril in Anwesenheit von Emulsin gespalten wird. Statt dessen entsteht die Linksform in Überschuß.

2. *E. Erlenmeyer*<sup>2)</sup> versucht die asymmetrische Synthese so zu erklären, daß Emulsin und die oben genannten Alkaloide den Benzaldehyd „aktivieren“. Benzaldehyd soll nämlich in zwei Spiegelbildisomeren existieren können, und durch Emulsin usw. soll die eine Form in Überschuß gebildet werden. Beide Formen reagieren mit derselben Geschwindigkeit mit HCN, aber die eine Form des Oxynitrils wird in Überschuß gebildet werden. Das Enzym vergrößert also nicht die totale Reaktionsgeschwindigkeit. Das letzte stimmt mit meiner Beobachtung überein, daß bei konstanter Acidität die totale Reaktionsgeschwindigkeit durch Emulsinzusatz nicht merkbar geändert wird.

Die Möglichkeit der Existenz von d- und l-Form des Benzaldehyds, die von *Erlenmeyer* und von *H. Pauly*<sup>3)</sup> hervorgehoben wird, hat *Erlenmeyer* experimentell zu beweisen versucht, er hat dabei aber eine schwere Kritik von *E. Wedekind*<sup>4)</sup> erfahren. *Krieble*<sup>5)</sup> kommt indessen auch zu dem Schluß, daß zwei Benzaldehyde existieren können, denn Emulsin gibt mit dem Aldehyd des Handels d-Oxynitril, aber mit Aldehyd aus l-Amygdalin l-Oxynitril.

In diesem Zusammenhang sei hervorgehoben, daß die Dissoziation des Benzaldehyds in Betracht gezogen werden muß. Speziell bei Versuchen zur Deutung der  $p_H$ -Kurve muß man beachten, daß die Konzentration der reaktionsfähigen Form des Aldehyds ein  $p_H$ -Maximum aufweisen kann. Die Dissoziationskonstante des Aldehyds ist zwar sehr klein (etwa  $10^{-14}$ ), aber es ist möglich, daß aus der Dihydroxyform eine Art von Zwitterionen gebildet werden kann, welche wahrscheinlich eine große Reaktionsfähigkeit besitzt.

---

<sup>1)</sup> Diese Zeitschr. **73**, 760, 1910.

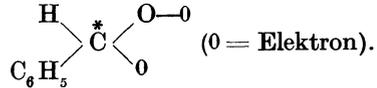
<sup>2)</sup> Ebendasselbst **64**, 382, 1914.

<sup>3)</sup> Ebendasselbst **67**, 439, 1914.

<sup>4)</sup> Ber. **47**, 3172, 1914.

<sup>5)</sup> Journ. Americ. Chem. Soc. **34**, 716, 1912.

Nach der Valenzelektronformel von *Pauly* können theoretisch zwei stereoisomere Benzaldehyde erwartet werden:



Wegen der leichten Verschiebbarkeit der Elektronen wäre es schwer, einen eventuellen asymmetrischen Aldehyd beizubehalten

Es scheint indessen, als sollte die Annahme von der primären Anlagerung von HCN an das Enzym die Hypothese von verschiedenen Formen des Aldehyds überflüssig machen. Es ist durchaus denkbar, daß die an ein optisch-aktives Alkaloid gebundene Cyanwasserstoffsäure den Aldehyd nur zu der einen Oxynitrilform addiert. Es ist übrigens eine bekannte Tatsache, daß Aldehyde und wässriges HCN lösliche Salze geben, die bei Erwärmen gespalten werden. Aus absolutem Alkohol können die Salze in kristallisierter Form gewonnen werden, aber beim Stehen an der Luft nehmen sie Wasser auf und zerfallen. In Analogie mit der Bindung des Emulsins an das d-Oxynitril stehen Versuche von *Betti* und *v. Giffen*<sup>1)</sup>, die gefunden haben, daß mit der optischen Base  $\beta$ -Hydroxynaphthylbenzylamin racemische Oxynitrile asymmetrisch gespalten werden, wobei kristallisierte Salze optisch aktiver Aldehyd-Basenverbindungen isoliert werden können.

Gewisse andere Beobachtungen stimmen mit der Alkaloidtheorie überein. So haben *Traube* und *Onodera*<sup>2)</sup> gezeigt, daß hochmolekulare Alkaloide, wie Atropin und Chinin, in Wasser sich in kolloider Form lösen, während ihre Salze echte Lösungen bilden. Dies steht möglicherweise mit dem von mir gefundenen hohen Molekulargewicht in Übereinstimmung.

#### Zusammenfassung meiner Arbeiten über Oxynitrilbildung.

Schon lange ist bekannt, daß viele Aldehyde leicht Cyanwasserstoff addieren und Oxynitrile (Cyanhydrine) liefern. *Rosenthaler*<sup>3)</sup> fand, daß, wenn Emulsin bei der Reaktion anwesend war, die Oxynitrile oft optisch aktiv wurden, Benzoxynitril z. B. rechtsdrehend. Die Synthese dieses Oxynitrils wurde näher von *Rosenthaler* studiert, und er fand unter anderem, daß die Asymmetrie ihr Maximum bei einer bestimmten Temperatur und nach einer bestimmten Zeit erreichte. Er fand auch bei Anwesenheit von Enzym eine Vergrößerung sowohl der Reaktionsgeschwindigkeit als der Ausbeute.

Da die Fähigkeit einer Emulsinlösung, ein optisch aktives Oxynitril zu erzeugen, durch Erwärmung auf 75 bis 80° verloren ging,

1) Gazzetta 42, 316, 1912.

2) Intern. Zeitschr. f. phys.-chem. Biol. 1, 35, 1914.

3) Literaturhinweis siehe diese Zeitschr. 118, 16, 1921.

nahm *Rosenthaler* an, daß in dem Emulsinpräparat ein Enzym anwesend sei, das die Bildung des d-Oxynitrils beschleunigt. Dieses Enzym nannte er syn-Emulsin, oder nach dem Nomenklaturvorschlag von *Euler* Oxynitrilase. Da gefunden wurde, daß in gewissen Fällen ein linksdrehendes Oxynitril gewonnen werden konnte, wurde die Existenz von zwei Enzymen, d-Oxynitrilase und l-Oxynitrilase, angenommen. Ersteres konnte gewonnen werden, wenn Emulsin zuerst mit Säure und dann mit Alkali behandelt wurde.

Eine Lösung von Amygdalin wird bekanntlich durch Emulsin gespalten, und man nimmt an, daß Benzoxynitril dabei als Zwischenprodukt auftritt. Das Zerfallen des Oxynitrils in Aldehyd und HCN soll nach *Rosenthaler* durch ein Enzym, dia-Emulsin, geschehen, das aus einer Emulsinlösung dadurch isoliert werden konnte, daß sie mit  $MgSO_4$  gefällt wurde, wobei das Enzym ins Filtrat ging.

Im Anschluß an diese Arbeiten von *Rosenthaler* habe ich die Rolle des Emulsins bei der Einstellung des Oxynitrilgleichgewichtes studiert. *Die wichtigsten Resultate meiner Arbeiten werden hier zusammengefaßt:*

1. *Vergrößerung der Reaktionsgeschwindigkeit.* Über die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Acidität sind von mir quantitative Versuche angestellt worden. Daraus geht hervor, daß die Reaktionsgeschwindigkeit in saurer Lösung klein ist, um gegen den Neutralpunkt zuzunehmen. Wird durch Pufferzusatz die Acidität geregelt, hat die Anwesenheit von Emulsin keinen merkbaren Einfluß auf die Reaktionsgeschwindigkeit. Ohne Puffer wird die Acidität durch Emulsinzusatz vermindert (Eiweiß und dergleichen bindet Säure), wobei die Synthesegeschwindigkeit wächst. Die in Frage kommende Säure ist Benzoesäure, die ja äußerst leicht bei der Oxydation des Aldehyds gebildet wird.

2. *Vergrößerung der Ausbeute.* Dieselbe Menge Oxynitril wird gewonnen, sei es, daß Emulsin anwesend ist oder nicht, aber wegen der Aciditätsverschiebung wird das Gleichgewicht schneller mit Emulsin erreicht, und man findet nach einer kurzen Zeit eine größere Oxynitrilmenge als ohne Emulsin.

3. *syn- und dia-Emulsin.* Daß das von *Rosenthaler* hergestellte syn-Emulsin die totale Synthese beschleunigt, beruht auf dem Alkaligehalt der Enzymlösung. Ähnliche Aciditätsänderungen sind auch die Ursache davon, daß die Gleichgewichtslage der Oxynitrilspaltung in Wasserlösung bei Anwesenheit von dia-Emulsin schneller erreicht wird.

4. *Sämtliche symmetrisch-kinetischen Wirkungen* werden also als Aciditätswirkungen erklärt, und auf diese können auch mehrere andere der Versuchsergebnisse *Rosenthalers* zurückgeführt werden. So beruht z. B. das Abnehmen der Drehung nicht auf enzymatischer Spaltung

(dia-Emulsin), sondern auf der Racemisierung, deren Geschwindigkeit durch Aciditätsverminderung vergrößert wird.

5. *Enzymatische Wirkung.* Als einzige Wirkung eines enzymatischen Katalysators ist die *optische Aktivität* des Oxynitrils zu betrachten. Um diesen Katalysator, von mir hier Oxynitrilase genannt, zu studieren, habe ich Reinigungsversuche vorgenommen.

6. *Reinigung.* Fettarmes Mandelpulver wird durch alkalisches Wasser extrahiert und der Extrakt mit Aceton gefällt (Reinheitsgrad rund 100). Weitere Reinigungsmethoden:

Dialyse, erhaltener Reinheitsgrad rund . . . . . 200  
Fällung mit Säure, erhaltener Reinheitsgrad rund . . . . . 500  
Sorptions u. Elution, erhaltener Reinheitsgrad rund . . . . . 700  
Bleiacetatfällung, erhaltener Reinheitsgrad rund . . . . . 3000 (zweimal: 10000).

7. *Eigenschaften der Präparate.* Meine reinsten Präparate enthalten kein Eiweiß und nur wenig Kohlehydrat. Das Molekulargewicht dürfte nicht größer als 5000 sein. Die spezifische Drehung der Präparate sinkt ein wenig während der Reinigung. Das Enzym ist sehr stabil bei gewöhnlicher Temperatur. Die Temperatur der halben Inaktivierung bei einstündiger Erhitzung liegt ein wenig über 75°. Die optimale Acidität (in wässrig-alkoholischer Lösung) ist  $p_H = 5,2$  bis 5,4.

Das Enzym bildet möglicherweise mit HCN eine Verbindung, die den Aldehyd zu d-Oxynitril addiert. Die spezifische Drehung des d-Oxynitrils dürfte 30° nur wenig übersteigen. Die in der Reaktionsmischung beobachtete Drehung ist dem d-Oxynitrilgehalt proportional.

8. *d- und l-Oxynitrilase.* Krieble<sup>1)</sup> fand, daß ein Emulsinpräparat, das mit Amygdalin l-Oxynitril gab, 2 Jahre später rechtsdrehendes Oxynitril erzeugte. Er erklärt dies in folgender Weise: Emulsin enthält zwei synthetisierende Enzyme, von welchen die l-Oxynitrilase schnell zerstört wird. Daß die Präparate *Rosenthalers* d-Oxynitril gaben, sollte darauf beruhen, daß seine Präparate viel älter waren als die von *Krieble*. Diese Erklärung scheint nicht wahrscheinlich. Keines von meinen vielen Präparaten hat in irgend einem Stadium von Reinheit oder Alter l-Oxynitril gegeben. (Einige Präparate wurden teils unmittelbar nach der Darstellung und teils nach mehr als einem Jahre untersucht.) In teilweisem Anschluß an *Rosenthaler* finde ich eine einfachere Erklärung folgendermaßen: Aus Amygdalin wird d-Oxynitril abgespalten und dann in der neutralen Lösung schnell racemisiert. Der Oxynitril zerfällt nun, und wegen der Anwesenheit des Emulsins wird die d-Form schneller gespalten, wobei die Lösung Linksdrehung zeigt. Durch die Annahme, daß die Oxynitrilase sowohl in die Bildung als in die Spaltung

---

<sup>1)</sup> Biochem. Bull. 2, 227, 1912/13.

des *d*-Oxynitrils eingreift, werden Hypothesen von einem 1-Enzym überflüssig. Zur Bekräftigung bedarf indessen dieser Punkt einer weiteren experimentellen Untersuchung.

Weil das Enzym sowohl bei der *Bildung* wie bei der *Spaltung* des *d*-Oxynitrils teilnimmt, kann es vielleicht unnötig erscheinen, es als ein besonders synthetisierendes Enzym (Oxynitrilase) anzusehen und es könnte wohl auch Oxynitrilase genannt werden. Indessen sind die **Eigenschaften** und die **Wirkungsweise** des Enzyms nur durch das Auftreten des optisch aktiven Endproduktes studiert, und es dürfte deshalb angezeigt sein, den Namen Oxynitrilase bis auf weiteres beizubehalten.

*Durch meine Arbeiten habe ich gezeigt, daß entgegen der früheren Theorie über die Mitwirkung des Emulsins bei dem Benzoxynitrilgleichgewicht der einzige Effekt des enzymatischen Katalysators die optische Aktivität des Oxynitrils ist.*

Meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. *H. v. Euler*, sage ich für die Anregung zu dieser Arbeit, für die vielseitige Unterstützung und das mir stets bewiesene Wohlwollen meinen wärmsten Dank.