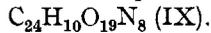


triphenyläther durch einige neue Beobachtungen zu ergänzen. Schon Trautner hat bei der Untersuchung des Stoffes Anzeichen für Dimorphie gefunden, ohne ihnen weiter nachzugehen⁷⁾. Unsere Präparate davon, von deren Reinheit wir uns durch die Analyse überzeugt hatten, schmolzen, aus ihrer langsam erkaltenden Lösung in siedendem Alkohol auskrystallisiert, bei 107° (Form I), durch rasches Abkühlen abgeschieden, dagegen bei 87° (Form II). Wurde eine Probe von Form II auf dem Wasserbade erwärmt, so verflüssigte sie sich zunächst, erstarrte dann wieder und schmolz nunmehr bei 107°. Ein Gewichtsverlust (Abgabe von Krystall-Alkohol) trat dabei nicht ein. Form II erwies sich ferner als stark licht-empfindlich. Sie blieb, im Dunkeln aufbewahrt, wochenlang unverändert, färbte sich aber schon im zerstreuten Tageslicht von der Oberfläche her bald dunkel blaugrau, ohne daß die Lage des Schmelzpunktes dadurch nachweisbar beeinflußt worden wäre⁸⁾.

Dinitro-phloroglucin-tris-[dinitro-phenyl]-äther,



Trägt man 2 g Dinitro-phloroglucin-triphenyläther in 10 ccm Salpetersäure (D. 1.52) ein, so löst er sich unter lebhafter Entwicklung von Stickoxyden. Man erhitzt 2 Stdn. auf dem Wasserbad, gießt nach dem Erkalten auf Eis und löst die Fällung nach dem Auswaschen und Trocknen in warmem Nitrobenzol. Sie krystallisiert daraus beim Anspritzen mit Alkohol in gelblich-weißen Nadeln vom Schmp. 279°.

2.798 mg Sbst.: 4.129 mg CO₂, 0.443 mg H₂O. — 0.1238 g Sbst.: 17.0 ccm N (18°, 756 mm).

C₂₄H₁₀O₁₉N₈. Ber. C 40.30, H 1.40, N 15.70. Gef. C 40.26, H 1.77, N 16.04.

183. Karl Josephson: Die Enzyme des Emulsins (II.).

[Aus d. Biochem. Laborat. d. Hochschule Stockholm.]

(Eingegangen am 1. Februar 1926.)

In der vorigen Mitteilung über die Enzyme des Emulsins¹⁾ wurden Versuche beschrieben, welche die Scheidung der β-Glucosidase von der in den Mandeln vorkommenden Amylase bezweckten. Durch vergleichende Versuche über die β-Glucosidase- und Amylase-Wirkung wurde festgestellt, daß das Stärke-Spaltungsvermögen gewisser Emulsin-Präparate nicht auf das 1.4-β-Glucosid spaltende Enzym^{2a)} zurückgeführt werden kann.

Bei den damals vorgenommenen Reinigungsoperationen war besonders die Adsorption mit Tonerdehydrat benutzt worden. Obwohl das Aluminiumhydroxyd ein ziemlich geringes Adsorptionsvermögen für die β-Glucosidase in den durch eine Alkohol-Fällung gereinigten Emulsin-Lösungen

⁷⁾ Dissertation, S. 58 (Göttingen 1922).

⁸⁾ Über Beobachtungen gleicher Art am 2.4-Dinitro-resorcin-dimethyläther, dessen Umsetzungen wir zur Zeit untersuchen, siehe Beilstein, Handbuch, 4. Aufl., Bd. VI, S. 827.

¹⁾ B. 58, 2726 [1925].

^{2a)} Nach der letzten Arbeit von Charlton, Haworth und Peat, Soc. 129, 89 [1926], wäre das bisher als 1.4-β-Glucosidase bezeichnete Enzym als 1.5-β-Glucosidase zu formulieren.

besaß, und obwohl die Elution der β -Glucosidase aus dem Adsorbat mit Schwierigkeiten verbunden war, wurden doch Präparate erhalten, welche bei Spaltung von β -Glucosiden eine stärkere Aktivität als die früher dargestellten Präparate zeigten. Das beste Präparat, dessen Darstellung in der genannten Mitteilung beschrieben wurde, zeigte $\text{Sal. f} = 0.61$, oder unter Anwendung der Willstätterschen Bezeichnungsweise für die β -Glucosidase-Aktivität $\beta\text{-Gl.-W.} = 10.1$.

Die neuen Versuche, welche im Folgenden beschrieben werden, betreffen teils die Reinigung der β -Glucosidase durch Kaolin-Adsorption, teils wurden die Adsorptionsverhältnisse der β -Glucosidase bei Anwendung sowohl von Kaolin als Aluminiumhydroxyd als Adsorptionsmittel, und zwar die Bedeutung der Wasserstoff-ionen-Konzentration für die Adsorptionsfähigkeit der beiden Adsorbenda näher untersucht.

Die durch Kaolin-Adsorption gereinigten Präparate sind bedeutend aktiver als die früheren durch Tonerde-Adsorption gewonnenen. Die besten Präparate, welche unten beschrieben werden, zeigen nämlich eine enzymatische Aktivität, welche, durch die Salicin-Spaltungsfähigkeit charakterisiert, $\text{Sal. f} = 4.8-4.9$ entspricht; nach dem von Willstätter benutzten Ausdruck zur Messung der β -Glucosidase-Aktivität entsprechen diese Präparate einem $\beta\text{-Gl.-W.}$ von rund 80. Bei Anwendung der Kaolin-Adsorption zur Reinigung können auch hohe Ausbeuten an den hochaktiven Präparaten erzielt werden.

Zu Orientierungen über die chemische Zusammensetzung solcher weitgehend gereinigten Präparate sei hier angegeben, daß Molischs Reaktion negativ ausfällt (die Präparate sind also frei von Kohlenhydrat); weiter ist die Xanthoprotein-Reaktion nur sehr schwach positiv.

Schließlich werden einige Versuche mitgeteilt, welche die p_{H} -Abhängigkeit der β -Glucosidase-Wirkung dieser Präparate betrifft. Es hat sich dabei gezeigt, daß die Aktivitäts- p_{H} -Kurven der Salicin- und Helicin-Spaltung bei Anwendung der weitgehend gereinigten Präparate durchaus ähnlich sind, und zwar wurde dieselbe Aktivitäts- p_{H} -Kurve erhalten, die ich vorher bei Anwendung von weniger gereinigten Präparaten gefunden hatte²⁾. Die Unabhängigkeit der spezifischen Enzym-Wirkungen vom Reinheitsgrad des Enzyms bestätigt sich also in Übereinstimmung mit den früheren, bei dem Enzym Saccharase erhaltenen Befunden.

Bei der Fortführung der Versuche sollen die anderen Enzym-Wirkungen des Emulsins berücksichtigt werden.

Beschreibung der Versuche.

Reinigung der β -Glucosidase durch Kaolin-Adsorption nach vorangegangener Vorreinigung durch Alkohol-Fällung.

Zu den neuen Reinigungsversuchen wurde ein durch Alkohol-Fällung gereinigtes Präparat mit $\text{Sal. f} = 0.25$ benutzt. Dieses Präparat, welches mit E_{12} bezeichnet wurde, war in folgender Weise erhalten:

400 g entfettetes Mandel-Pulver (Placenta amygdalarum amararum von der Firma Vitrum in Stockholm) wurden mit 1000 ccm 0.1-n. Ammoniak während 3 Stdn. auf der Schüttelmaschine geschüttelt. Nach Trennung der Extraktionsflüssigkeit von den nicht in Lösung gegangenen Teilen des Pulvers durch Zentrifugierung wurden die letzteren

²⁾ H. 147, 1 [1925].

nochmals mit verd. Ammoniak (800 ccm 0.02-n. NH_3) extrahiert. Die vereinigten Lösungen wurden mit 45 ccm 2-n. Essigsäure versetzt und die dabei ausfallenden Eiweißstoffe durch Zentrifugieren abgetrennt. Die erhaltene Lösung (1300 ccm) wurde in der 3-fachen Menge 95-proz. Alkohol eingetragen. Nach Abtrennen von der Flüssigkeit und Wiederauflösen der Fällung in Wasser wurde mit Kieselgur geklärt. Die Aktivitätsbestimmung ergab $\text{Sal. f} = 0.25$.

Um die Wirksamkeit des Kaolins als Adsorptionsmittel für die β -Glucosidase zu untersuchen, wurden zuerst einige orientierende Versuche angestellt. Von diesen wird der folgende hier angeführt:

50 ccm E_{12} wurden mit 20 ccm Kaolin-Suspension (enthaltend 3.44 g Kaolin) versetzt. Das Adsorbat wurde durch Filtrieren abgetrennt und die Aktivität der Restlösung geprüft. Es zeigte sich, daß 40 % von der in den 50 ccm E_{12} vorhandenen β -Glucosidase-Menge vom Kaolin sorbiert waren. Allerdings waren bedeutende Mengen anderer Stoffe auch adsorbiert, so daß die β -Glucosidase-Aktivität der Restlösung pro Gramm Trockengewicht derselben sogar etwas verbessert war. Sal. f der Restlösung war nämlich von 0.25 auf 0.34 gestiegen.

Dieser Versuch zeigt, daß die Adsorption an sich zur Reinigung der β -Glucosidase nicht günstig ist. Die großen Fortschritte der Reinigung treten nicht bei der Adsorption ein, sondern bei der darauf folgenden Elution des Enzyms aus dem Sorbat:

Aus 100 ccm E_{12} wurden durch 14 g Kaolin rund 50 % der β -Glucosidase sorbiert. Die Restlösung zeigte $\text{Sal. f} = 0.31$. Zur Elution wurde das Sorbat in 80 ccm 0.01-n. Ammoniak suspendiert. Nach Trennung der Elutionsflüssigkeit von dem Kaolin wurde mit Essigsäure die Acidität auf p_{H} rund 5 gebracht. Hierbei trat eine Ausflockung des zum Teil kolloidal verteilten Kaolins ein. Nach Abfiltrieren von diesen Kaolinresten (unter Zusatz von Kieselgur) wurde die Aktivität der jetzt klaren Lösung bestimmt. Sal. f betrug 1.24 (β -Gl.-W. = 20). ($E_{12}K_1$) Elutionsausbeute 60 %.

Bei einem zweiten Versuch, welcher unter Berücksichtigung der optimalen Acidität der Adsorption (siehe unten) ausgeführt wurde, konnte die Reinigung noch etwas gesteigert werden: 500 ccm E_{12} wurden mit 50 ccm 0.4-n. Essigsäure und 500 ccm Kaolin-Suspension (entsprechend 86 g Kaolin) versetzt. Die Elution aus dem Adsorbat geschah mit 500 ccm 0.01-n. Ammoniak. Die Aktivität der mit Kieselgur geklärten Elution ($E_{12}K_2$) entsprach $\text{Sal. f} = 1.6$ (β -Gl.-W. = 26). Die Ausbeute betrug 60 % von der angewandten Enzym-Menge.

Die durch Kaolin-Adsorption und darauffolgende Elution mit NH_3 gewonnenen β -Glucosidase-Lösungen lassen sich durch Dialyse von verunreinigenden Salzen und anderen niedrigmolekularen Stoffen befreien. Während die früheren Versuche zur Dialyse von β -Glucosidase-Lösungen nicht ohne große Verluste an enzymatischer Aktivität durchgeführt werden konnten³⁾, trat bei der Dialyse des oben erwähnten Präparates von $\text{Sal. f} = 1.6$ nur eine Aktivitätsverminderung von etwa 10 % ein. Durch die Entfernung von Verunreinigungen war aber der Reinheitsgrad nach der Dialyse sehr verbessert. Sal. f des dialysierten Präparates wurde nämlich zu 4.8 (β -Gl.-W. = 80) bestimmt.

Die Elution nach der ersten Kaolin-Adsorption läßt sich auch durch eine erneute Adsorption mit Kaolin weiter reinigen. Die nach der zweiten Kaolin-Adsorption mit einer Ausbeute von 44 % erhaltene Elution $E_{12}KK$ zeigte vor der Dialyse $\text{Sal. f} = 3.07$, also β -Gl.-W. = rund 51 und nach der Dialyse (3 Tage) $\text{Sal. f} = 4.9$, also β -Gl.-W. = 81.

³⁾ Josephson, a. a. O.

Bei der Adsorption wurden 400 ccm $E_{12}K$ (Sal. f = 1.6) mit 4 ccm 0.4-n. Essigsäure versetzt und dann 75 ccm Kaolin-Suspension (entsprechend 13 g Kaolin) hinzugesetzt. Die Elution aus dem abzentrifugierten und einmal mit Wasser gewaschenen Adsorbat geschah mit 200 ccm 0.01-n. NH_3 . Bei der Dialyse trat eine Aktivitätsverminderung von 38 % ein. Wäre diese Aktivitätsverminderung auf die Auslöschung der enzymatisch aktiven Gruppen allein zurückzuführen, so wäre also der Reinheitsgrad des Enzyms nach der Dialyse auf Sal. f = rund 7.9 [β -Gl.-W. 130] zu schätzen⁴⁾. Eine solche Berechnungsweise scheint mir aber nicht unbedingt zulässig zu sein⁵⁾.

Die kaolin-adsorbierten Präparate gaben nicht die Molischsche Reaktion. Bei Erwärmung mit Salpetersäure trat eine sehr geringe Gelbfärbung ein; bei darauffolgender Übersättigung mit Natronlauge trat eine deutliche, aber nur schwache Braunfärbung ein.

Mit den Präparaten E_{12} und $E_{12}K$ sowie der Restlösung $E_{12}R$ nach Kaolin-Adsorption wurden Versuche zur Prüfung der Amylase-Aktivität ausgeführt. Die Werte von Sal. f, Sf^{30} und der Quotient Sal. f/ Sf^{30} sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt:

Tabelle 1.

Präparat	Sal. f	Sf^{30}	Sal. f/ Sf^{30}
E_{12}	0.25	0.00026	960
\downarrow $\nearrow E_{12}K$	1.24	0.00026	4080
\downarrow $E_{12}R$	0.31	0.00056	550

Während bei dem Ausgangsmaterial (Placenta amygdalarum amararum) das Verhältnis Sal. f/ Sf^{30} 200 betrug, war also dieser Quotient bei dem kaolin-adsorbierten Präparat $E_{12}K$ auf 4080 gestiegen. Der Gehalt dieses Präparates an Mandel-Amylase war also äußerst gering.

Sorption von β -Glucosidase durch Kaolin bei wechselnder Wasserstoff-ionen-Konzentration.

Zum Studium der Bindungsart der Enzyme an verschiedenen Sorptionsmitteln scheint mir der Einfluß der Acidität auf die Sorbierbarkeit besonders wichtig. Einen solchen Einfluß zu kennen, ist von großem theoretischen Wert; nicht weniger bedeutungsvoll muß dieser Aciditätseinfluß sein für die praktische Anwendung von Sorptionsmitteln bei Versuchen, die Enzyme in möglichst reiner Form zu erhalten. Durch die Änderung der Adsorptionsfähigkeit eines Adsorptionsmittels beim Wechseln der Acidität ist die Möglichkeit gegeben, ein Enzym bei einer bestimmten Acidität zu adsorbieren und bei einer anderen Acidität wieder aus dem Adsorbat abzulösen (eluierten).

Die Versuche über Kaolin-Adsorption der β -Glucosidase bei wechselnder Acidität wurden mit der Lösung E_{12} (Sal. f = 0.25) ausgeführt. Die Einstellung der verschiedenen Aciditäten geschah durch Acetat-Puffer. Auf 10 ccm der Enzym-Lösung kamen 2 ccm 0.4-n. Pufferzusatz.

⁴⁾ vergl. Willstätter, Graser und Kuhn, H. 123, 1, und zwar S. 37 [1922]; Willstätter, Schneider und Wenzel, H. 151, 1 [1926].

⁵⁾ Euler und Josephson, B. 56, 1097, und zwar S. 1098 [1923].

Nach Eintragen der Kaolin-Suspension und kurzem Umschütteln wurde zentrifugiert und 5 ccm der Restlösung zur Aktivitäts-Bestimmung herausgenommen. Aus der zurückbleibenden Aktivität wurde die sorbierte Menge in Prozenten von der ursprünglichen β -Glucosidase-Menge berechnet. Die p_H -Bestimmungen wurden elektrometrisch unter Anwendung der Gasketten-Methode ausgeführt. Die Versuchsergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Tabelle 2.

p_H	Reaktionskonstante, $k \times 10^4$, mit 5 ccm Restlösung	Adsorption in %	Relative Adsorption
3.76	8.8	88	95
3.89	6.7	91	98
4.35	5.6	93	100
4.75	8.6	89	96
5.14	13.2	82	88
5.50	31.0	59	63

Das Sorptions- p_H -Optimum liegt also nach diesen Versuchen bei $p_H = 4.4$. Das p_H -Optimum der Sorption der β -Glucosidase durch Kaolin fällt mit dem Optimum der Enzym-Wirkung zusammen.

Sorption von β -Glucosidase durch Aluminiumhydroxyd bei wechselnder Wasserstoff-ionen-Konzentration.

Die Versuche über Sorption von β -Glucosidase durch Aluminiumhydroxyd bei wechselnder Acidität wurden teils mit 5 ccm Tonerdehydrat-Suspension (0.21 g Al_2O_3), teils mit 1 ccm derselben Suspension (0.042 g Al_2O_3) auf 10 ccm Enzym-Lösung E_{12} + 2 ccm Acetat-Puffer ausgeführt. Bei Anwendung der größeren Menge des Sorptionsmittels trat beim p_H -Optimum der Sorption 100-proz. Sorption ein. Die Versuche sind in der Tabelle 3 zusammengestellt.

Tabelle 3.

p_H	Sorption in %
3.50	63
3.78	88
4.19	99
4.59	100
5.37	100
5.71	100

Tabelle 4.

p_H	Sorption in %	Relative Sorption
3.69	16	52
3.96	18	58
4.55	22	71
5.76	30	97
6.17	31	100
6.53	31	100
6.86	31	100
9.08	28	90

Die Versuche mit der kleineren Menge Tonerdehydrat gaben das in der Tabelle 4 dargestellte Ergebnis.

Das p_H -Optimum der Sorption der β -Glucosidase durch Tonerdehydrat wurde also in der Nähe des Neutralpunktes gefunden. Bei p_H etwa 6 beginnt die Sorption geringer zu werden, wenn die Reaktion stärker sauer wird. Bei alkalischer Reaktion sinkt die Sorptions- p_H -Kurve langsam. Noch bei $p_H = 9$ wurden 90% von der Sorption beim Optimum gefunden. Hierdurch werden die geringen Elutionsausbeuten bei den Versuchen, die an Tonerde-

hydrat sorbierte β -Glucosidase durch schwach alkalische Reaktion zu eluieren, verständlich⁶⁾).

Die Aktivitäts- p_H -Kurve der Salicin- und Helicin-Spaltung durch β -Glucosidase.

Nach den Angaben von Willstätter und Oppenheimer⁷⁾ soll das p_H -Optimum der Salicin-Spaltung bei $p_H = 4.4$ liegen, während das entsprechende Optimum der Helicin-Spaltung von denselben Autoren zu $p_H = 5.3$ angegeben wurde. Die neueren Versuche, welche ich an anderer Stelle mitgeteilt habe⁸⁾, konnten nur die erste Angabe bestätigen. Das p_H -Optimum der Helicin-Spaltung liegt nämlich nach meinen Messungen bei Anwendung von Enzym-Präparaten mit Sal. f = 0.20 bei $p_H = 4.5$, fällt also sehr nahe mit dem Optimum der Salicin-Spaltung zusammen. Da nunmehr die weitgehend gereinigten Präparate zur Verfügung standen, schien es mir wichtig nachzuprüfen, ob das von mir vorher gefundene p_H -Optimum der zwei Enzym-Wirkungen bestätigt werden konnte.

Zu den neuen Versuchen wurde das Präparat E₁₂KK mit Sal. f = 3.07 (β -Gl.-W. = 51) verwendet. Die Versuchsergebnisse sind in den folgenden Tabellen zusammengestellt.

Tabelle 5.

Aktivitäts- p_H -Kurve der Salicin-Spaltung.2.2 mg Präparat E₁₂KK in 50 ccm Reaktionsmischung. 2% Salicin.

p_H	Min.	Drehung	$k \times 10^4$	$k \times 10^4$ Mittel	Relative Reaktions- geschwindig- keit
3.56	0	-1.90	—	57	85
	30	-0.93	59		
	45	-0.62	57		
	60	-0.35	56		
	∞	+0.98	—		
4.54	0	-1.90	—	67	100
	30	-0.82	68		
	45	-0.45	68		
	60	-0.20	65		
4.93	0	-1.90	—	63	94
	30	-0.86	65		
	45	-0.51	64		
	60	-0.27	60		
5.87	0	-1.90	—	49	78
	30	-1.05	51		
	45	-0.75	49		
	60	-0.50	48		
6.27	0	-1.90	—	33	49
	30	-1.30	34		
	45	-1.07	33		
	60	-0.86	32		

⁶⁾ Josephson, B. 58, 2726 [1925].

⁷⁾ Willstätter und Oppenheimer, H. 121, 183 [1922].

⁸⁾ Josephson, H. 147, 1, und zwar S. 33ff. [1925].

Tabelle 6.

Aktivitäts- p_H -Kurve der Helicin-Spaltung.
0.88 mg Präparat E₁₂KK in 50 ccm Reaktionsmischung, 2% Helicin.

p_H	Min.	Drehung	$k \times 10^4$	$k \times 10^4$ Mittel	Relative Reaktions- geschwindig- keit
3.55	0	-1.69	—	72.5	79
	22	-0.89	72 }		
	30	-0.65	73 }		
4.39	0	-1.69	—	91.5	100
	22	-0.71	93 }		
	30	-0.48	90 }		
4.62	0	-1.69	—	91.5	100
	22	-0.70	94 }		
	30	-0.49	89 }		
4.86	0	-1.69	—	90	98
	22	-0.72	91 }		
	30	-0.49	89 }		
5.95	0	-1.69	—	64.5	71
	22	-0.96	65 }		
	30	-0.76	64 }		

Diese Versuche zeigen, daß die Aktivitäts- p_H -Kurven der beiden Glucosid-Spaltungen durchaus ähnlich sind, und daß die Optima ($p_{H1} = 4.4-4.6$) nahe zusammenfallen. Beim Vergleich der obigen Zahlen über die Salicin-Spaltung mit meinen früheren Zahlen findet man in beiden Fällen die Wasserstoff-ionen-Konzentration, bei welcher die halbe enzymatische Wirksamkeit der β -Glucosidase am alkalischen Ast der Kurve vorhanden ist, bei $p_H =$ etwa 6.25.

134. Kurt Maurer:

Synthese des Sarkosin-glucosids. (I. Mitteilung über Reaktionen zwischen Zuckern und Aminosäuren.)

[Aus d. Organ. Abteil. d. Chem. Laborat. d. Universität Jena.]

(Eingegangen am 13. März 1926.)

Über Umsetzungen von Aminosäuren mit Zuckern ist bis jetzt wenig bekannt. Bei der Hydrolyse der in biologischer Hinsicht wichtigen Glucoproteide wurden Zucker und Eiweißstoffe als Bausteine gefunden. Synthetische Versuche sind kaum unternommen worden. C. L. Maillard¹⁾ berichtet von Polymerisationsprodukten, die er durch Kochen von Glucose und Glykokoll in wäßriger Lösung erhalten und in enge Beziehung zu den Huminen und Melanoiden gesetzt hat. S. Kostytschew und W. Brilliant²⁾ stellten spontane Vereinigung von Aldosen und Aminosäuren in alkalischem Medium durch Hefe-Autolysat fest; die mit Kupferhydroxyd fällbaren Reaktionsprodukte waren aber nicht einheitlicher Natur. Krystallisierte Substanzen erhielt B. Schilling³⁾ durch Einwirkung von Aldosen auf aro-

¹⁾ C. r. 154, 66 [1912].

²⁾ H. 127, 224 [1923].

³⁾ B. 34, 902 [1901].