

382. A. Stepanow und A. Kusun:**Über die Synthese einer Kohlenstoffkette mittels Enzyme. II. Mitteilung: Zum Studium der Carboligase.**

[Aus d. Laborat. für organ. Chemie d. Medizin. Fakultät u. d. Wissenschaftl. Forschungs-Instituts für Chemie an d. I. Moskauer Universität.]

(Eingegangen am 11. Juni 1930.)

Unsere vorhergehende Arbeit¹⁾ über die Wirkung der Hefen-Enzyme auf die Glyoxylsäure veranlaßte uns, an die Untersuchung des synthetisierenden Agens, der Carboligase, näher heranzutreten. Unser Interesse richtete sich auf die Darstellung eines trocknen Präparates, da das Arbeiten mit dem Macerationssaft es unmöglich macht, die Konzentration des wirkenden Agens zu erhöhen, und andererseits der Macerationssaft ein Aufbewahren ausschließt, wodurch das Anstellen von Versuchen zur quantitativen Untersuchung der Enzym-Wirkung erschwert wird. Zur Fällung des wirkenden Agens benutzten wir Alkohol, ein Gemisch von Alkohol und Aceton, Ammoniumsulfat, sowie die Adsorption durch Aluminiumhydroxyd. Zur Bestimmung der Aktivität der erhaltenen Präparate diente uns die Synthese von Methyl-acetyl-carbinol aus Brenztraubensäure²⁾. Die Fällung durch Alkohol lieferte kein aktives Präparat; die durch ein Alkohol-Aceton-Gemisch gab nur schwach wirkende Niederschläge, die durch Ammoniumsulfat führte zu ausreichend aktiven Präparaten, die erhaltenen Niederschläge waren aber unbedeutend, insbesondere bei Anwendung eines durch lang dauernde Maceration erhaltenen Saftes (s. Versuchsreihe 1) (die lang dauernde Maceration war zwecks vollständigerer Enzym-Extraktion erwünscht).

Die erhaltenen Suspensionen lassen sich durch Zentrifugieren schwer trennen, und nur ihre Adsorption durch Aluminiumhydroxyd (Orthohydroxyd, γ -Form³⁾) lieferte ein Präparat von ausreichender Aktivität und in guter Ausbeute. Der erhaltene Niederschlag, rasch im Vakuum getrocknet, gibt ein weißes, schwach gelblich getöntes Pulver, dessen Aktivität stets größer ist als die der zur Darstellung des Präparates benötigten Menge des Saftes (s. Versuchsreihe 2, Versuche 4 und 6). Das erhaltene Präparat wurde 4 Monate aufbewahrt (s. Versuchsreihe 3). Es wurde das proportionale Verhältnis zwischen der Konzentration des erhaltenen Präparates und der Ausbeute an Methyl-acetyl-carbinol gezeigt (s. Versuchsreihe 4).

Die Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der Reaktion bildete den Inhalt der Versuchsreihe 5. Um die Abhängigkeit des Verlaufs der Synthese von der Temperatur aufzuklären, wurden Versuche bei verschiedenen Temperaturen angestellt und die Mengen des entstandenen Methyl-acetyl-carbinols bestimmt. Wie aus der Versuchsreihe 6 ersichtlich ist, kann die Synthese schon bei 0° nachgewiesen werden; als Höchsttemperatur erscheint 60°, das Optimum liegt bei 25–35°. Das Sinken der Aktivität oberhalb 35° veranlaßte uns, die Entaktivierung des Enzyms durch vorläufiges Erwärmen auf verschiedene Temperaturen einer näheren Betrachtung zu unterziehen (s. Versuchsreihe 7). 5 Min. langes Erhitzen ergab ein scharfes Sinken der Aktivität bereits bei 40° (um 58%). Bei 50° sank die Aktivität um 90%. Bei 55° wurden nur Spuren Methyl-acetyl-carbinol gebildet. Parallel wurden Versuche mit demselben Präparat angestellt, um die Ausscheidung des

¹⁾ B. 68, 1147 [1930].

²⁾ Biochem. Ztschr. 131, 178 [1922].

³⁾ Nach R. Willstätter, H. Kraut u. O. Erbacher, B. 56, 1118 [1923], 57, 1088 [1924].

Kohlendioxyds (Einfluß der Carboxylase) festzustellen. Wie die Tabelle zeigt, wurde bis 50° keine merkliche Behinderung der Carboxylase-Wirkung beobachtet. Schließlich wurde die Einwirkung des Chloroforms auf das erhaltene Präparat untersucht, die in einer fast völligen Unterbindung der Carboligase bei kaum veränderter Carboxylase-Wirkung bestand (s. Versuchsreihe 8).

Die erhaltenen Resultate liefern das Material zur Beurteilung des enzymatischen Charakters der sich hier abspielenden Synthese und zeigen einige Unterschiede in den Eigenschaften des hier wirkenden Agens (Carboligase) von denen der Carboxylase, in deren Wirkung W. Dirschel⁴⁾ die einzige Ursache der Synthese der Kohlenstoffkette in den Versuchen mit dem Hefesaft sieht. Für diesen Unterschied kann auch die Synthese der Oxy-oxo-bernsteinsäure in unseren Versuchen über die Einwirkung des Hefesaftes auf die Glyoxylsäure⁵⁾ Zeugnis ablegen. In Zukunft werden wir unsere Versuche mit der Glyoxylsäure unter Benutzung eines trocknen, besser gereinigten Carboligase-Präparates fortsetzen. Gegenwärtig sind wir mit einer Untersuchung der Verbreitung des synthetisierenden Agens in den Pflanzen beschäftigt.

Beschreibung der Versuche.

Zur Darstellung der Präparate benutzten wir in unseren Versuchen bei 35° getrocknete Bierhefe für Obergärung. Die Aktivität der erhaltenen Präparate wurde folgendermaßen untersucht: das Präparat wurde in 5 ccm Wasser gelöst und die Lösung mit 10 ccm einer 0.25 g Brenztraubensäure und 1.64 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + 12\text{H}_2\text{O}$ enthaltenden Lösung gemischt. Die Gesamtlösung wurde unter Toluol-Zusatz in einen Thermostaten gebracht. Nach Verlauf einer bestimmten Zeitdauer (s. Versuche) wurden zur Lösung 5 ccm einer gesättigten Bleiacetat-Lösung zugefügt. Das bezweckte einerseits, die Reaktion zum Stillstand zu bringen, andererseits die Haupt-Eiweißmasse zu entfernen, da sie durch Schaumbildung die spätere Destillation sehr erschwert. Hierauf wurde zentrifugiert, dann die klare Flüssigkeit vom Toluol getrennt und in einen Wurtz-Kolben eingetragen; nach Zusatz von 5 ccm einer 20-proz. Eisenchlorid-Lösung wurden genau 10 ccm Flüssigkeit in eine eisgekühlte Vorlage abdestilliert. Zur Gewinnung vergleichbarer Resultate wurde stets ein und derselbe Destillationsapparat benutzt. Das Destillat wurde der Reihe nach versetzt mit 20 Tropfen einer 25-proz. Ammoniak-Lösung, 10 Tropfen einer Hydroxylamin-Hydrochlorid-Lösung und 5 Tropfen einer 10-proz. Nickelchlorid-Lösung. Nach 3-stdg. Erwärmen und anschließendem 24-stdg. Stehenlassen wurden die ausgeschiedenen charakteristischen Nadeln des Nickelsalzes des Dimethyl-glyoxims mit Hilfe eines Mikro-trichters abfiltriert, bei 100° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und schließlich gewogen. Die Aktivität kommt in den folgenden Tabellen in Milligrammen des erhaltenen Salzes zum Ausdruck. Das während der Reaktion sich ausscheidende Kohlendioxyd wurde volumetrisch bestimmt.

Versuchsreihe 1: Einfluß der Macerations-Dauer.

	Macerations-Dauer	Aktivität von 10 ccm Saft	Menge des Saftes aus 100 g Hefe	
Versuch 1	2.5 Stdn.	32	80 ccm	
	5 „	50	173 „	
	2	4 „	60	150 „
		7 „	80	185 „

⁴⁾ Ztschr. physiol. Chem. 188, 225 [1930].

⁵⁾ B. 63, 1147 [1930].

Versuchsreihe 2: Untersuchung der Fällbarkeit des Enzyms.

Versuchsnummer	Verfahren zur Darstellung d. aktiven Saftes	Menge des zum Vers. verwendeten Saftes (in ccm)	Fällungs-Agens	Menge d. Fällungs-Agens	Menge d. erhaltenen trocknen Präparats (in g)	Zur Untersuchung verwendet	Aktivität
1	Nach Büchner	10	Gesättigt. Ammoniumsulfat-Lsg.	50 ccm	—	d. gesamte Niederschl.	80
2	" "	10	96-proz. Athylalkohol	30 "	—	" "	0
3	" "	10	96- " " + Aceton	20+20ccm	—	" "	13
4	" "	10	(ohne Fällung)	—	—	" " Saft	21
5	" "	10	gesättigt. Ammoniumsulfat-Lsg.	30 "	—	" " Niederschl.	42
6	" "	10	(ohne Fällung)	—	—	" " Saft	19
7	" Lebedew						
	Maceration 4 Stdn.	15	Sättigung mit Ammoniumsulfat	15 g	—	" " Niederschl.	60
8	" " 4 "	25	" " " "	25 g	—	" "	105
9	" " 2 "	20	" " " "	20 g	0.6	" "	52
10	" " 2 "	20	Ammoniumsulfat gelöst	10 g	0.2	" "	36
11	" " 2 "	20	Bleiacetat	5 g	—	" "	0
12	" " 4 "	100	Ammoniumsulfat gelöst	50 g	1.1	" "	22
13	Zentrifugat d. Vers. 12	100	" " "	50 g	1.8	" "	24
14	" " " 13	100	Adsorption durch Orthoaluminiumhydroxyd γ	0.5 g	2.3	" "	35
15	Maceration 7 Stdn.	80	Ammoniumsulfat gelöst	40 g	0.2	" "	13
16	" " 3 "	100	" " "	70 g	1.37	" "	49
17	Zentrifugat d. Vers. 16	100	Adsorption durch Orthoaluminiumhydroxyd γ	0.9 g	4.76	" "	40
18	Maceration 4 Stdn.	330	Ammoniumsulfat gelöst	230 g	} 11.2	} 0.2 g	} 43
			Orthoaluminiumhydroxyd zugefügt	1.8 g			

Im folgenden arbeiteten wir mit dem Präparat Nr. 18 dieser Versuchsreihe.

Versuchsreihe 3: Aufbewahrbarkeit des Enzyms.

Dauer der Aufbewahrung	frisch	nach bereitet	nach 1 Monat	nach 2 Mon.	nach 3 Mon.	nach 4 Mon.
Aktivität von 0.2 g d. Präparats	40	41	38	41	39	

Versuchsreihe 4: Abhängigkeit des Reaktions-Verlaufs von der Enzym-Konzentration.

Menge des Enzym-Präparats pro Volumen-Einheit.	0.2 g	0.3 g	0.4 g	0.8 g
Aktivität	33	46	70	92

Versuchsreihe 5: Zeitverlauf der Synthese bei 35°.

Zeit seit Beginn der Reaktion (in Stdn.)	1	4	8	24	48	72
Menge des entstandenen Methyl-acetyl-carbinols	5	17	32	103	94	70

Versuchsreihe 6: Verlauf der Synthese bei verschiedenen Temperaturen.

Versuchs-Temperatur in °	0	10	25	30	40	50	55	60
Menge des in 24 Stdn. entstandenen Methyl-acetyl-carbinols	8	18	115	122	78	23	10	0

Versuchsreihe 7: Entaktivierung des Enzyms durch Erwärmen.

Die Entaktivierung dauerte 5 Min. bei der jeweiligen Temperatur. Nach dem Abkühlen wurde Brenztraubensäure zugefügt und die Aktivität bei 30° geprüft. Zur Entaktivierung wurden 0.4 g des Präparats Nr. 18 in 5 ccm Wasser verwendet.

Entaktivierungs-Temperatur in °	30	40	50	55	60	62
Aktivität der Carboligase	210	88	20	Spuren	0	0
„ „ Carboxylase (in ccm CO ₂)	22	22	22	11	4	1

Versuchsreihe 8: Einwirkung des Chloroforms.

0.3 g des Präparats Nr. 18 wurden in 5 ccm Wasser gelöst und 5 Min. mit 0.5 ccm Chloroform geschüttelt, worauf wie stets Brenztraubensäure zugefügt wurde.

	Ohne Chloroform	Mit Chloroform Versuch 1	Versuch 2
Aktivität der Carboligase	200	3	5
„ „ Carboxylase (in ccm CO ₂)	25	20	24

383. Stig Veibel und Margrethe Hejde Simesen: Über die Darstellung von Methyläthern der Chinon-oxime.

(Eingegangen am 25. August 1930.)

Die Methyläther der Chinon-oxime sind nach zwei prinzipiell verschiedenen Methoden dargestellt worden: 1. Aus Chinon und *O*-Methylhydroxylamin und 2. aus Salzen der Chinon-oxime (Nitroso-phenole) und Methyljodid oder Diazo-methan. Während die erste Methode keinen Zweifel an der Konstitution der entstehenden Verbindungen läßt, sind nach der zweiten im voraus zwei Möglichkeiten vorhanden: es können Nitroso-anisole oder Chinon-oximäther entstehen, und die Konstatierung, daß beim Behandeln des *p*-Nitroso-phenol-Silbers mit Methyljodid Chinon-oxim-methyläther entstand¹⁾, war ein sehr wichtiges Argument für die Annahme der Chinon-oxim-Struktur des *p*-Nitroso-phenols. Daß es sich wirklich

¹⁾ Bridge, A. 277, 86 [1893].