

3-Dimethylaminomethylen-oxindol („Dehydro-oxygramin“): 20 g *N*-Acetyl-3-äthoxymethylen-oxindol wurden mit 120 cem wasserfreiem Dimethylamin im Autoklaven 2 Stdn. auf 120–130° erhitzt. Die nach dem Abdampfen der flüssigen Bestandteile hinterbleibende gelbbraune kristallisierte Substanz wurde mit wenig Alkohol von Schmierungen befreit und aus mehr Alkohol umkristallisiert; Ausb. 14 g. Blaßgelbe, glänzende Blättchen vom Schmp. 202°. Löslich in 2*n*HCl; daraus mit Natronlauge als Öl fällbar, das rasch mit unverändertem Schmelzpunkt kristallisiert.

$C_{11}H_{12}ON_2$ (188.1) Ber. C 70.21 H 6.38 N 14.89 Gef. C 70.26 H 6.42 N 14.21

Pikrat aus Alkohol: Braungelbe Prismen vom Zersp. 195°.

$C_{11}H_{12}ON_2 \cdot C_6H_3N_3O_7$ (417.1) Ber. N 16.79 Gef. N 16.54

N-Acetyl-3-diphenylaminomethylen-oxindol: wird aus 2.31 g *N*-Acetyl-äthoxymethylen-oxindol und 1.69 g Diphenylamin wie oben beschrieben erhalten. Aus Eisessig und Alkohol mehrfach umkristallisiert, gelbe Prismen vom Schmp. 196°.

$C_{23}H_{18}O_2N_2$ (354.2) Ber. C 77.93 H 5.12 N 7.91 COCH₃ 12.15

Gef. C 77.65 H 5.20 N 8.27 COCH₃ 12.08

3-[(β-Diäthylamino-äthyl)-aminomethylen]-oxindol: Entsteht aus Oxindolaldehyd und überschüssig. *N,N*-Diäthyl-äthylendiamin. Aus Benzol blaßgelbe Nadeln vom Schmp. 123°.

$C_{15}H_{21}ON_3$ (259.2) Ber. C 69.45 H 8.17 N 16.21 Gef. C 69.64 H 8.01 N 15.63

3-[(β-Carbäthoxy-äthyl)-aminomethylen]-oxindol: 1.6 g Oxindolaldehyd und 1.53 g β-Amino-propionsäureäthylester-hydrochlorid wurden in Pyridin 1/2 Stde. bei Wasserbadtemperatur gehalten, nach dem Abdampfen des Pyridins der Rückstand in Chloroform aufgenommen und mit wenig verd. Schwefelsäure durchgeschüttelt. Der Chloroform-Rückstand kristallisierte beim Anreiben mit Äther. Aus Alkohol bräunliche Blättchen vom Schmp. 107°.

$C_{14}H_{16}O_3N_2$ (260.1) Ber. C 64.58 H 6.20 N 10.77 Gef. C 64.38 H 6.12 N 10.63

3-[(β-Phenyl-äthyl)-aminomethylen]-oxindol: Die Verbindung wurde wie vorstehend beschrieben aus Oxindolaldehyd und Phenyläthylamin-hydrochlorid dargestellt. Aus Alkohol blaßgelbe Nadeln vom Schmp. 158°.

$C_{17}H_{16}ON_2$ (264.1) Ber. C 77.30 H 6.11 N 10.61 Gef. C 77.05 H 6.06 N 10.21

126. Wilhelm Franke und Liselotte Krieg: Purinoxydierende Fermente aus Schimmelpilzen, II. Mittel.: Zur Kenntnis der Aspergillus-Uricase*) **)

[Aus dem Institut für Gärungswissenschaft und Enzymchemie an der Universität Köln]
(Eingegangen am 17. März 1952)]

Die unlängst in *Aspergillus fumigatus* (und anderen Schimmelpilzen) entdeckte Uricase wurde hinsichtlich ihrer Eigenschaften, ihres Wirkungsmechanismus und ihrer Reaktionsprodukte näher untersucht. Das leicht extrahierbare Ferment erweist sich als eine typische, auch mit Acceptorfarbstoffen reagierende Aerodehydrase, sehr ähnlich der früher untersuchten sog. Glucose-oxydase aus Schimmelpilzen. Beim Wirkungsoptimum von pH 7 führt sie Harnsäure praktisch quantitativ in Allantoin und CO₂ über.

In der vorangehenden I. Mitteilung war – entgegen älteren Angaben von A. Brunel¹⁾ für *Aspergillus niger* – das sehr verbreitete Vorkommen harnsäureoxydierender Fermente in Schimmelpilzen verschiedener Gattungen und

*) Herrn Geheimrat Professor Heinrich Wieland, dem Schöpfer der Dehydrirungstheorie, in dankbarer Verehrung gewidmet.

**) I. Mittel.: W. Franke, E. M. Taha u. L. Krieg, Arch. Mikrobiol. 17, 255 [1952].

1) Bull. Soc. Chim. biol. 21, 388 [1939].

Arten nachgewiesen worden, bei deren Wirkung im allgemeinen ein Atom Sauerstoff je Harnsäuremolekül aufgenommen wurde („Uricase I“), mit Ausnahme des Ferments aus einem *Alternaria tenuis*-Stamm, bei dem der Endwert der O₂-Aufnahme zwei Atome betrug („Uricase II“)²⁾. An *Alternaria*-Rohextrakten waren einige orientierende Versuche über diese beiden Fermenttypen ausgeführt worden, die u. a. Hinweise dafür ergaben, daß der Typ I, nicht dagegen der Typ II, Allantoin als Reaktionsprodukt liefert. Es war ferner gezeigt worden, daß diese meist oder überwiegend konstitutiven Fermente leicht aus der Zelle abgetrennt werden können und daß ihre Aktivität in möglichst jungem Mycel am höchsten ist.

In der vorliegenden Mitteilung soll eine allgemeine Charakteristik des normalen Ferment-Typs I, des Mechanismus und Chemismus seiner Wirkung gegeben werden. Für die Untersuchung dieses verbreiteten Typs wurde als Fermentausgangsmaterial ein auf Würzeagar weitergezüchteter Stamm von *Aspergillus fumigatus* gewählt, der sich durch gute und über zwei Jahre hin fast konstante Fermentaktivität auszeichnete. Soweit ein Vergleich mit anderen Schimmelpilzen (z. B. *Alternaria*-Arten, vergl. die I. Mitteil.) möglich ist, kehrt dieser Ferment-Typ dort in ganz ähnlicher Form wieder, so daß die im folgenden mitgeteilten Ergebnisse als charakteristisch für „Uricase I“ angesehen werden können.

Zur Enzymgewinnung wurden durchweg zwei Tage auf Czapek-Dox-Nährlösung³⁾ (mit NaNO₃ als N-Quelle) gezüchtete, noch fast konidienfreie Myceldecken verwendet, die unter Verreiben mit Quarzsand mit Wasser extrahiert wurden. Zu den folgenden Fermentversuchen wurden teils solche zentrifugierten Rohextrakte oder (gegen Leitungswasser) dialysierte Extrakte, teils durch Ammoniumsulfatfällung (meist bei 2/3-Sättigung) und anschließende Dialyse oder (seltener) durch Acetonfällung (Extrakt: Aceton meist 1:2) gereinigte Enzympräparate benutzt.

Die Aktivität der Ferment-Lösungen wird im folgenden häufig in Form der „Atmungsgröße“ $Q_{O_2} = \frac{\text{cmm O}_2}{\text{mg Trockengew.} \times \text{Stdn.}}$ unter „Normalbedingungen“ (*m*₂₅₀-Harnsäure, pH 7.0, Luft, 30°) angegeben.

Diese sind erfüllt im sog. „Normalansatz“ der Warburg-Versuche:

- 0.1–2.0 ccm Enzym-Lösung,
- 1.0 ccm *m*₅-Phosphatpuffer pH 7,
- 1.0 ccm *m*₅₀-Lithiumurat,
- H₂O zum Gesamtvolumen 5.0 ccm.

Bisweilen findet sich auch die Angabe der um die Eigenatmung der Enzym-Lösung (*q*_{0₂}) korrigierten Atmungsgröße (*Q*_{0₂} - *q*_{0₂}). Der Berechnung wurde in jedem Falle die Anfangsgeschwindigkeit, d. h. die O₂-Aufnahme in den ersten 15 Min., zugrunde gelegt.

Trockengewichtsangaben beziehen sich bei Rohextrakten auf undialysierte, bei gereinigten Enzympräparaten auf dialysierte Lösungen.

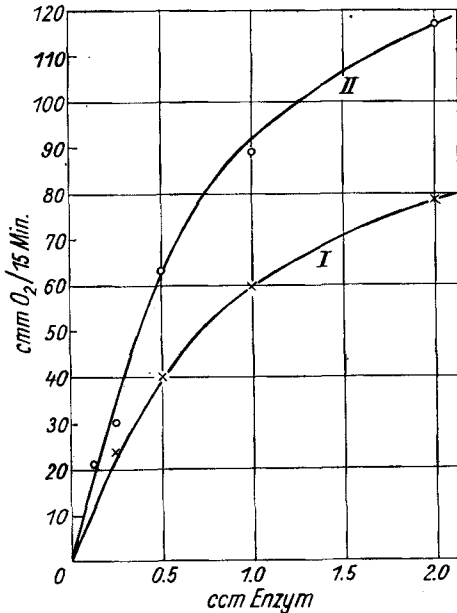
²⁾ Die Frage, ob „Uricase II“ einheitlich oder komplex ist, wurde offen gelassen.

³⁾ Vergl. z. B. K. Bernhauer, Gärungschemisches Praktikum (Berlin 1939), oder A. Janke, Arbeitsmethoden der Mikrobiologie I (Dresden u. Leipzig 1946).

1.) Kinetik der Uricasewirkung

Typische Reaktionskurven (Abhängigkeit des Umsatzes von der Zeit) sind in den Abbild. 5 und 6 (S. 797, 798) wiedergegeben.

a) Einfluß der Enzymkonzentration: Nur in einem Bereich niedriger oder mittlerer Enzymkonzentrationen besteht zumeist angenäherte Proportionalität zwischen Reaktionsgeschwindigkeit (Anfangsgeschwindigkeit) und Enzymkonzentration, während bei höheren Enzymkonzentrationen die Reaktionsgeschwindigkeit verhältnismäßig langsamer zunimmt (Abbild. 1).



Abbild. 1. Einfluß der Enzymkonzentration auf die Geschwindigkeit der Harnsäureoxydation

I Rohextrakt (23 mg Trockengew./ccm)

II Ammoniumsulfatfällung (bei 2/3-Sättigung, 4.6 mg Trockengew./ccm)

Normalansätze; O₂-Aufnahmen nach 15 Min.

Für höhere Enzymkonzentrationen gilt die Schütztsche Regel⁴⁾ recht gut. So berechnet sich beispielsweise aus den Kurven I und II der Abbild. 1 für den Quotienten

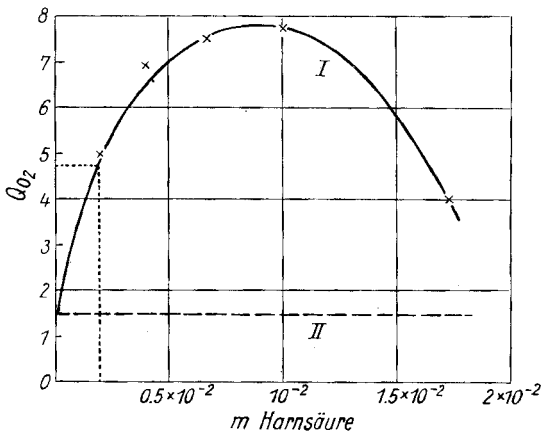
	cmm O ₂ in 15 Min.			
	√ ccm Enzym			
bei ccm Enzym	0.25	0.5	1.0	2.0
I	(47)	58	60	57
II	(60)	89	89	82

⁴⁾ Zur Interpretation der Schütztschen Regel vergl. z.B. J. B. S. Haldane u. K. G. Stern, Allgemeine Chemie der Enzyme, S. 117 (Dresden u. Leipzig 1932); E. A. Moelwyn-Hughes, a) in Nord-Weidenhagen, Handb. d. Enzymol. I, S. 220 (Leipzig 1940), b) in Sumner-Myrbäck, The enzymes I, S. 28 (New York 1950).

Diese Erscheinung, die beim Vergleich von Enzymaktivitäten (z. B. bei Reinigungs- und Hemmungsversuchen) durch Verwendung nicht zu großer Fermentmengen stets berücksichtigt werden muß, trat sowohl bei Roh- als auch bei gereinigten Fermentpräparaten (Ammoniumsulfat- und Acetonfällungen) auf.

Häufig wurde andererseits auch beobachtet, daß niedrige Fermentkonzentrationen „überproportional“ hohe Anfangsgeschwindigkeiten zeigten, die aber im weiteren Verlaufe des Versuchs stark abfielen, so daß auch nach Stunden kein Endwert erreicht werden konnte. In solchen Fällen wurde Aktivitätsberechnungen die niedrigste Fermentkonzentration zugrunde gelegt, bei der der theoretische Endwert der O_2 -Aufnahme noch erreicht wurde bzw. seine Erreichung wahrscheinlich war.

b) Der Einfluß der Substratkonzentration wurde in Normalansätzen mit Rohextrakten im Bereich zwischen $m/500$ und $m/50$ untersucht. Es ergab sich eine Kurve mit einem Konzentrationsoptimum der Reaktionsgeschwindigkeit zwischen $m/100$ und $m/125$ (Abbild. 2), aus der sich für die Enzym-Substrat-Verbindung eine Dissoziationskonstante von etwa $2 \times 10^{-3} m$ ermitteln läßt. Für tierische Uricase (aus Rinderniere) hatte M. Z. Grynberg⁵⁾ ein Konzentrationsoptimum bei etwa $m/140$ und eine Michaelis-Konstante von $4.3 \times 10^{-3} m$ angegeben.



Abbild. 2. Einfluß der Harnsäurekonzentration auf die Oxydationsgeschwindigkeit (Q_{O_2})

I Rohextrakt mit Substrat (pH 7)

II Rohextrakt ohne Substrat (Eigenatmung q_{O_2})

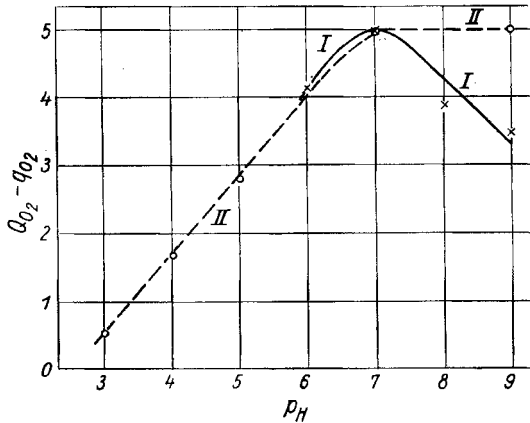
Punktierte Linien dienen der Ermittlung der Michaelis-Konstanten

(unter Abzug der Enzym-Eigenatmung)

Bei der graphischen Ermittlung der Michaelis-Konstanten (Abbild. 2) war die Enzym-Eigenatmung in Abzug gebracht worden. Dies ist nach Versuchen mit gleichzeitiger Bestimmung von O_2 -Verbrauch und Reaktionsprodukt, über die im Versuchsteil berichtet wird (Tafel 11, S. 802), in erster Annäherung zulässig.

⁵⁾ Biochem. Ztschr. 236, 138 [1931].

c) Der p_H -Einfluß auf die Aktivität und Stabilität der Aspergillus-Uricase ist in der Abbild. 3 (Kurve I und II) zur Darstellung gebracht. Das



Abbild. 3. p_H -Einfluß auf Enzymaktivität (I) und Enzymstabilität (II) in Rohextrakten

In I: p_H 6–8 Phosphatpuffer
 p_H 9 Boratpuffer

In II: Incubation des Enzyms mit Veronal-Acetat-Puffer (p_H 3–9; 15 Min. bei 20°), dann Neutralisierung und Zusatz von Phosphatpuffer p_H 7

Versuche bei 30°

nicht sehr ausgeprägte Wirkungsoptimum – die Prüfung tieferer p_H -Werte verbot die Schwerlöslichkeit der freien Harnsäure – liegt beim Neutralpunkt, also um etwa zwei p_H -Einheiten tiefer als beim tierischen Enzym^{6, 7}). Das Enzym ist im schwach alkalischen Gebiet beständig, während unterhalb p_H 7 ein beträchtlicher Aktivitätsabfall erfolgt, so daß unter den im Versuch gewählten Einwirkungsbedingungen – 15 Min. bei 20° – schon bei p_H 5 nur mehr etwa die halbe Aktivität erhalten bleibt.

d) Der Einfluß des O_2 -Partialdrucks erwies sich als auffallend gering, die Affinität des Enzyms zum Sauerstoff dementsprechend als hoch. Im Partialdruckbereich zwischen 1.0 und 0.06 (O_2N_2 , Luft) zeigte die Reaktionsgeschwindigkeit in Normalansätzen keine wesentliche Änderung, wie die folgende Tafel 1 an den aus den O_2 -Aufnahmen nach 15 Min. errechneten Q_{O_2} -Werten dartut.

Tafel 1. Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit vom O_2 -Partialdruck

O_2 -Partialdruck	1.0	0.21	0.05	0.006
Q_{O_2}	5.3	5.0	4.6	4.7

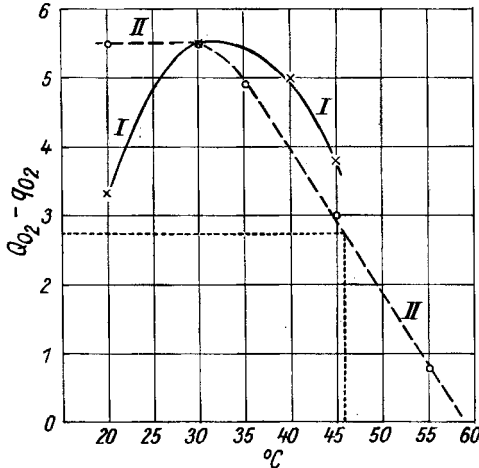
Der Befund ist insofern überraschend, als sich beim tierischen Enzym ein starker Einfluß des O_2 -Partialdrucks zeigt. So wurde beim Übergang von Luft zu reinem Sauerstoff

⁶⁾ R. Truszkowski u. S. Gubermanowna, Biochem. Journ. **29**, 2787 [1935].

⁷⁾ D. Keilin u. E. F. Hartree, Proc. Roy. Soc. London [B] **119**, 114, 141 [1936].

von F. Battelli u. L. Stern⁸⁾ und Grynberg⁹⁾ für Rohenzympräparate eine Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit auf etwa das Doppelte, von J. N. Davidson⁹⁾ für weitgehend gereinigte Präparate sogar auf das Dreifache angegeben¹⁰⁾.

e) Über den Einfluß der Temperatur sowohl auf Reaktionsgeschwindigkeit wie auf Enzymstabilität unterrichtet die Abbild. 4 (Kurve I und II). Das Temperaturoptimum der Enzymwirkung liegt bei 30°, die „Tötungstemperatur“ nach v. Eulers Definition bei 46°. Für die tierische Uricase (aus Rinderniere) gibt K. Rô¹¹⁾ ein Temperaturoptimum von 45° an.



Abbild. 4. Temperatureinfluß auf Enzymaktivität (I) und Enzymstabilität (II) in Rohextrakten

In I: Normalansätze bei verschiedenen Temperaturen
In II: Normalansätze bei 30° nach vorheriger 1/2stdg. Erwärmung des substratfreien Ansatzes auf verschied. Temperaturen

Punktierte Linien dienen der Ermittlung der „Tötungstemperatur“

2.) Beeinflussung des Ferments durch Inhibitoren

Für tierische Uricase ist wiederholt starke Hemmung durch Cyanid angegeben worden^{7, 9, 12)}; schon 10^{-4} m KCN hemmt zu etwa 90%, 10^{-3} m KCN praktisch vollständig. Weit geringer war die Hemmung durch Natriumazid (in der Konzentration $m/_{500}$ 28 bzw. 40% bei pH 8.0 bzw. 6.8)⁷⁾, während Natriumsulfid ($m/_{250}$) und Kohlenoxyd ($CO/O_2 = 8-49$) praktisch wirkungslos waren^{7, 9, 12)}.

⁸⁾ Biochem. Ztschr. 19, 219 [1909].

⁹⁾ Biochem. Journ. 36, 252 [1942].

¹⁰⁾ Fast durchweg reagieren die (metallfreien) Aerodehydrasen, zu denen nach späteren Befunden wohl auch die Uricase zu rechnen ist, mit Luft beträchtlich langsamer als mit reinem O₂ (Lit. s. W. Franke, Die Oxhydrasen, in Bamann-Myrbäck, Die Methoden der Fermentforsch. III, S. 2385, Leipzig 1941). Zu den wenigen Ausnahmen gehört die *d*-Aminosäure-oxydase (H. A. Krebs, Biochem. Journ. 29, 1620 [1935]).

¹¹⁾ Journ. Biochem. (Jap.) 14, 361 [1932].

¹²⁾ C. G. Holmberg, Biochem. Journ. 33, 1901 [1939].

Die Frage, ob tierische Uricase ein Metall-, im besonderen ein Eisen- oder Zink-Proteid sei, ist viel diskutiert worden, doch bis heute noch nicht entschieden^{9, 12, 13, 14, 15}); die neueren Befunde (uneinheitliches Hemmungsbild, geringe Metallgehalte der reinsten Präparate, z. B. 0.1–0.2% Fe, 0.06–0.09% Zn, mangelnde Proportionalität zwischen Metallgehalt und Aktivität) sprechen nicht sonderlich für diese Auffassung¹⁶).

Es schien daher von Interesse, auch beim pflanzlichen Enzym die Wirkung von Schwermetallkomplexbildnern zu prüfen. Darüber hinaus wurden auch einige andere typische Fermentinhibitoren (Narcotica, Jodessigsäure, Natriumfluorid) untersucht. Da die Hemmungen bisweilen zeitlich veränderlich sind, geben wir in der folgenden Tafel 2 die für 15 und 60 Min. Versuchszeit beobachteten Hemmungen in %.

Tafel 2. Hemmungsversuche
Normalansätze mit Ammoniumsulfatfällungen ($\frac{2}{3}$ -Sättigung)

Inhibitor	Konzentration	% Hemmung	
		in 15 Min.	in 60 Min.
KCN	$m/_{10000}$	30	40
	$m/_{1000}$	51	58
	$m/_{500}$	57	62
	$m/_{200}$	60	68
	$m/_{100}$	63	71
Na ₂ S ¹⁷)	$m/_{500}$	34	32
NaN ₃	$m/_{500}$	36	24
NH ₂ OH	$m/_{500}$	28	27
	$m/_{200}$	32	39
N ₂ H ₄	$m/_{500}$	24	17
	$m/_{200}$	35	45
Phenylurethan	$m/_{200}$	38	30
Phenylharnstoff ...	$m/_{200}$	35	29
Na-jodacetat	$m/_{200}$	40	31
NaF	$m/_{25}$	5	0

Im großen Ganzen ist das Verhalten der Pilzuricase gegenüber Inhibitoren wenig charakteristisch, zumal wenn man die für solche Versuche z. Tl. beträchtlichen Inhibitor-Konzentrationen berücksichtigt. In keinem Falle ließ sich eine auch nur annähernd vollständige Hemmung erzielen. Dies gilt im besonderen auch für die Blausäure, die zwar einwandfrei, doch wesentlich schwächer

¹³) J. N. Davidson, Biochem. Journ. **32**, 1386 [1938].

¹⁴) L. W. Wachtel, E. Hove, C. A. Elvehjem u. E. B. Hart, Journ. biol. Chem. **138**, 361 [1941].

¹⁵) E. Praetorius, Biochim., Biophys. Acta **2**, 590 [1948].

¹⁶) Ähnliche Hemmungsverhältnisse wie bei der Uricase finden sich auch bei der Diamin-oxydase (Histaminase) (E. A. Zeller, Advanc. enzymol. **2**, 93 [1942]; E. Werle, Fermentforsch. **17**, 103 [1943]), die als Flavin-Proteid zu betrachten ist (B. Swedin, Acta Med. Scand. **114**, 210 [1943]; R. Kapeller-Adler, Biochem. Journ. **44**, 70 [1949]). HCN wirkt hier offenbar als Carbonylgruppen-Inhibitor.

¹⁷) Hemmungsgrade nach Abzug der (enzymkatalysierten) Autoxydation des Na₂S.

als beim tierischen Ferment hemmend wirkt¹⁸); selbst $m/_{100}$ KCN hemmt nur etwa zu $2/3$. Die Hemmungswirkung der übrigen Schwermetallkomplexbildner ist noch weniger ausgesprochen.

Eine gewisse Hemmungswirkung der beiden Narcotica ist unverkennbar. Freilich schwanken die Literaturangaben für Dehydrasen an sich in weiten Grenzen¹⁹). Die Jodessigsäure-Hemmung (von den Narcotica vergleichbarem Ausmaß) reicht nicht aus, um die Pilzuricase unter die typischen Sulfhydrylenzyme einzureihen²⁰).

3.) Orientierende Reinigungsversuche

Obwohl eine systematische Reinigung der Pilzuricase außerhalb des Rahmens der vorliegenden Mitteilung lag, haben wir uns doch in einigen orientierenden Versuchen davon überzeugt, daß eine weitergehende Anreicherung des Ferments, z. B. durch Fällung mit Ammoniumsulfat oder organischen Lösungsmitteln (besonders Aceton) möglich ist. Wesentlich war auch der schon in der I. Mitteil. erhobene Befund, daß Rohextrakte ohne größeren Enzymverlust eine 12–36stdg. Dialyse gegen fließendes Leitungswasser vertragen²¹), wobei eine etwa dreifache Aktivitätssteigerung (bez. auf das Trockengewicht) erfolgt; daraus folgt zugleich, daß die Pilzuricase keines dialysierbaren Coferments oder Aktivators bedarf.

a) Ammoniumsulfatfällung: In der folgenden typischen Versuchsreihe wurden Rohextrakte der Ammoniumsulfatfällung bei den Sättigungsgraden 0.5, 0.67 und 0.9 unterworfen und die wieder in Wasser aufgenommenen Niederschläge nach eintägiger Dialyse gegen fließendes Leitungswasser auf ihre Aktivität geprüft, wobei zur Ermittlung des Proportionalitätsbereichs stets mehrere Konzentrationen untersucht wurden (S. 781). In der Tafel 3 werden neben den Q_{O_2} -Werten der einzelnen Präparate die zugehörigen Enzymeinheiten ($EE = Q_{O_2} \times \text{mg Gesamttrockengewicht}$), die Anreicherungsgrade $Q_{O_2}/Q_{O_2}^0$ (bez. auf Rohextrakt) und die prozentischen Enzymausbeuten ($EE/EE^0 \times 100$) bei der Ammoniumsulfatfällung angegeben.

Wie ersichtlich, steigen Anreicherungsgrad und Enzymausbeute mit steigender Ammoniumsulfatkonzentration in annähernd gleichem Verhältnis.

Noch etwas bessere Reinigungseffekte wurden erzielt, wenn vor der Ammoniumsulfatfällung der Rohextrakt i. Vak. (maximale Innentemp. 23°) eingedampft und zentrifugiert wurde. So gab ein Rohextrakt vom Q_{O_2} 6.9 (dialysiert 15.6) eine Ammoniumsulfatfällung ($2/3$ -Sättigung) mit Q_{O_2} 152, entsprechend einer 22- bzw. 9.8fachen Anreicherung.

¹⁸) Ähnliches gilt auch für das Verhalten von tierischer und pflanzlicher Histaminase (E. Werle u. A. Zabel, Biochem. Ztschr. 818, 554 [1948]).

¹⁹) Vergl. z. B. die stark gehemmte Succinodehydrase mit der kaum gehemmten Xanthindehydrase (K. C. Sen, Biochem. Journ. 25, 849 [1931]). Bei der Pilz-Glucose-oxydase hemmen Narcotica erheblich nur im sauren Gebiet (p_H 4.4), nicht beim Neutralpunkt (W. Franke u. F. Lorenz, A. 532, 1 [1937]).

²⁰) Das gleiche gilt für die besser untersuchte tierische Uricase (E. S. G. Barron u. T. P. Singer, Journ. biol. Chem. 157, 221, 241 [1945]).

²¹) Dagegen vertragen weder Rohextrakte noch gelöste Ammoniumsulfatfällungen die Filtration durch ein bakteriendichtes Schott-Filter, dies im Gegensatz zu Glucose-oxydase-Lösungen (J. Freimann u. W. Franke, A. 559, 199 [1948]); derart filtrierte Uricase-Lösungen zeigen höchstens während der ersten 5–10 Min. einen gewissen O_2 -Verbrauch.

Tafel 3. Enzymreinigung durch Ammoniumsulfatfällung*)

Reinigungsstufe	Q _{O₂}	EE	Q _{O₂} /Q ⁰ _{O₂}	EE/EE ⁰ × 100
Rohextrakt I	6.7	6300		
(dialysiert. Extrakt)	(19)			
Ammoniumsulfatfällung (0.5) dialysiert .	85	2600	12.7 (4.5)	41
Rohextrakt II	5.2	9700		
(dialysiert. Extrakt)	(14)			
Ammoniumsulfatfällung (0.67) dialysiert	107	6900	20.6 (7.7)	71
Rohextrakt II	5.2	6500		
(dialysiert. Extrakt)	(14)			
Ammoniumsulfatfällung (0.9) dialysiert .	129	5200	24.8 (9.2)	80

*) Die in Klammern angegebenen Anreicherungsgrade beziehen sich auf dialysierte Extrakte

Dagegen gelang die häufig (z.B. bei der Glucose-oxydase²²)) mit Erfolg angewandte Ausfällung inaktiven Proteins durch kurzes Erhitzen von Rohextrakten auf höhere Temperatur hier nicht; schon 5 Min. lange Einwirkung einer Temperatur von 55° führte zu starken Enzymverlusten.

Eine weitere Versuchsreihe befaßte sich mit der Möglichkeit fraktionierter Fällung. Einer Vorfällung bei den Sättigungsgraden 0.15, 0.25 und 0.33 schloß sich jeweils die Hauptfällung beim Sättigungsgrad 0.67 an. Wir beschränken uns auf die Wiedergabe der Ergebnisse des ersten Versuchs, da nur die Vorfällung beim niedrigsten Sättigungsgrad einen Vorteil gegenüber der nichtfraktionierten Fällung bietet, doch auch hier nur hinsichtlich des Reinigungseffektes, nicht hinsichtlich der Fermentaushbeute²³) (Tafel 4).

Tafel 4. Enzymreinigung durch fraktionierte Ammoniumsulfatfällung*)

Reinigungsstufe	Q _{O₂}	EE	Q _{O₂} /Q ⁰ _{O₂}	EE/EE ⁰ × 100
Rohextrakt	4.8	28600		
(dialysiert. Extrakt)	(13)			
Ammoniumsulfatfällung (0-0.15)	11	700	2.3 (0.8)	2.5
Ammoniumsulfatfällung (0.15-0.67) ...	121	14700	25.2 (9.3)	51

*) s. Anm. Tafel 3.

b) Fällungen mit organischen Lösungsmitteln haben den Vorteil, daß sie zu Trockenpräparaten führen. Wir wandten zwei bei der Glucose-oxydase bewährte Verfahren an, 1.) die Fällung mit dem 10fachen Volumen Alkohol-Äther-Gemisch (2 : 1) und 2.) die Fällung mit dem doppelten Volumen Aceton, beides bei 0°. In beiden Fällen ist rasches Zentrifugieren und Trocknen der Niederschläge zur Vermeidung von Aktivitätsverlusten notwendig.

Die Alkohol-Äther-Fällungen zeigten nur etwa 1/2-2/3 der Aktivität von Acetonpräparaten und zudem geringere Haltbarkeit, so daß ihre Darstellung nicht weiter verfolgt wurde. Von den hellbraunen Trockenpräparaten geht weniger als die Hälfte in wäßrige Lösung - der Rückstand ist nahezu inaktiv - und hiervon ist wiederum 1/2-2/3 dialysierbar.

²²) W. Franke u. M. Deffner, A. 541, 117 [1939].

²³) Es scheint, daß die jeweils mehrstündigen Filtrationen der nichtzentrifugierbaren Fällungen selbst im Eisschrank merkliche Enzymverluste mit sich führen.

Die Tafel 5 zeigt das Ergebnis zweier typischer Reinigungsversuche mit Aceton, in denen der Rohextrakt vor der Fällung i. Vak. (Innentemp. 20–24°) auf etwa $\frac{1}{3}$ des Ausgangsvolumens eingengt worden war.

Die Q_{O_2} -Werte der Acetonfällungen beziehen sich auf deren zentrifugierte und dialysierte Lösungen.

Tafel 5. Enzymreinigung durch Acetonfällung*)

Reinigungsstufe	Q_{O_2}	EE	$Q_{O_2}/Q_{O_2}^0$	$EE/EE^0 \times 100$
Rohextrakt I	6.0	14900		
(dialysiert. Extrakt)	(16)			
Acetonfällung	63	14000	10.5 (3.9)	94
Rohextrakt II	6.3	32200		
(dialysiert. Extrakt)	(19)			
Acetonfällung	92	26000	14.6 (4.8)	81

*) s. Anm. Tafel 3.

Die Reinigungseffekte sind beträchtlich, doch kleiner als bei der Ammoniumsulfatfällung, die Ausbeute eher größer. Wesentlich ist, daß die Trockenpräparate, im Vakuumexsiccator aufbewahrt, eine gewisse, wenn auch begrenzte Haltbarkeit besitzen.

Sie lassen sich wenigstens eine Woche ohne nennenswerten Aktivitätsverlust aufbewahren. Dann erfolgt ein allmählicher, sich über Wochen hinziehender Aktivitätsabfall, der sich besonders auf die späteren Reaktionsphasen bezieht, wie aus der folgenden Gegenüberstellung von O_2 -Aufnahmen (in cem) hervorgeht:

Zeit (Min.)	5	10	15	30	45	60
Frisches Präparat (6 mg)	42	59	68	114	169	194
4 Wochen altes Präparat (6 mg)	30	50	66	91	117	142

Es scheint, daß diese älteren Präparate irgendwie labilisiert sind, so daß sie während der Reaktion eine stärkere Schädigung erfahren.

Hierher gehört vielleicht auch die Beobachtung, daß sich fraktionierte Acetonfällung als Reinigungsmethode nicht bewährte. Es gelingt zwar, beim Aceton/Wasserverhältnis 0.15 eine beträchtliche, nahezu inaktive Vorfraktion abzuschneiden. Aber die folgende Hauptfraktion (Aceton/Wasser 0.3–0.4) ist trotz guter Anfangsaktivität (Q_{O_2} 80–130) so labil, daß keine vollständige Harnsäureoxydation mehr erreichbar ist. Gleiches gilt für die Endfraktion (Aceton/Wasser 0.8–2.0) mit Anfangs- Q_{O_2} -Werten von 23–70.

c) Schließlich wurde noch die Kombination von Aceton- und Ammoniumsulfatfällung versucht. Sie führte bei rund 30facher Anreicherung gegenüber dem Rohextrakt zum bisher besten Enzympräparat von $Q_{O_2} = 200$ bei 58% Ausbeute.

Tafel 6. Kombinierte Aceton- und Ammoniumsulfatfällung*)

Reinigungsstufe	Q_{O_2}	EE	$Q_{O_2}/Q_{O_2}^0$	$EE/EE^0 \times 100$
Rohextrakt	6.9	35000		
(dialysiert. Extrakt)	(18)			
Acetonfällung 1:2	108	29800	15.7 (6.0)	85
Ammoniumsulfatfällung (0.67)	200	20200	29.0 (11.1)	58

*) s. Anm. Tafel 3.

In einem weiteren Reinigungsversuch dieser Art lieferte ein Rohextrakt von Q_{O_2} 6.8 (dialysiert 16) eine Acetonfällung mit Q_{O_2} 66 und diese eine Ammoniumsulfatfällung (0.67) mit Q_{O_2} = 193. Das Verfahren ist also hinsichtlich des Endeffektes der Reinigung reproduzierbar.

4.) Wirkungsweise der Uricase

a) Die Reaktion mit Sauerstoff

Daß bei der aeroben Wirkung tierischer Uricase Hydroperoxyd gebildet wird, haben eine Reihe von Untersuchern angegeben.

Keilin und Hartree⁷⁾ konnten bei Rohenzym die intermediäre Entstehung von H_2O_2 nur indirekt — durch den Nachweis der sekundären Oxydation von *p*-Phenylendiamin (i. Ggw. von Peroxydase) und von Alkohol (i. Ggw. von Katalase) — belegen, während Holmberg¹²⁾ und Davidson⁹⁾ bei weitgehend gereinigtem Ferment auf H_2O_2 -Bildung aus Messungen des Respirationsquotienten (CO_2/O_2) und der Druckänderungen bei nachträglichem Katalasezusatz schlossen. Ein chemischer Nachweis des gebildeten H_2O_2 scheint auch in ihren Arbeiten nicht geführt worden zu sein.

Wir bedienen uns zum H_2O_2 -Nachweis einer früher bei der Glucose-oxydase²⁴⁾ mit Erfolg angewandten Methode, nämlich der selektiven Vergiftung der Katalase, die in Rohextrakten wie auch Enzymfällungen noch in erheblicher Konzentration vorhanden war.

Zur Orientierung bestimmten wir in Enzymansätzen mit $m/_{150} H_2O_2$ als Substrat (Endwert der O_2 -Entwicklung 374 ccm) die Geschwindigkeit der H_2O_2 -Spaltung durch Rohextrakt und Ammoniumsulfatfällung in einem Bereich, in dem annähernde Proportionalität zwischen Spaltungsgeschwindigkeit und Enzymkonzentration gegeben war (bei Rohextrakt etwa 1 mg, bei Ammoniumsulfatfällung etwa 0.05 ccm auf 5 ccm). Aus dieser Reaktionsgeschwindigkeit (innerhalb der 1. Min.) wurde ein Wert Q'_{O_2} der O_2 -Entwicklung, analog dem Q_{O_2} der O_2 -Aufnahme berechnet:

		Rohextrakt	Ammoniumsulfatfällung
Uricase	Q_{O_2}	5.7	98
Katalase	Q'_{O_2}	2100	10000

Mit der in den folgenden Versuchen verwendeten 20fach höheren Fermentmenge ist das eingesetzte H_2O_2 in weniger als 1 Min. vollständig zersetzt.

Als Inhibitor der Katalase erschien aus verschiedenen Gründen (geringe Hemmung der Uricase, vergl. Tafel 2, Nichtflüchtigkeit und relative Beständigkeit) Hydroxylamin besonders geeignet²⁵⁾. Schon in den ersten orientierenden Versuchen mit $m/_{500} NH_2OH$ ließ sich H_2O_2 in Normalansätzen mit angesäuerter Kaliumjodid-Lösung einwandfrei nachweisen.

Eine typische Versuchsreihe mit einer Ammoniumsulfatfällung von Q_{O_2} 98 ($2/3$ -Sättigung), in der O_2 -Aufnahme und (jodometrisch bestimmte) H_2O_2 -Bildung nach bestimmten Zeiten miteinander verglichen wurden, ist in der Tafel 7 wiedergegeben.

Der Berechnung der prozentischen H_2O_2 -Ausbeute wurden die um die Eigenatmung des Ferments (die in NH_2OH -Gegenwart kein H_2O_2 liefert) korrigierten O_2 -Aufnahmen zugrunde gelegt. Nach der Gleichung $DH_2 + O_2 \rightarrow D + H_2O_2$ entspricht 1.0 ccm $n/_{100} H_2O_2$ (bzw. $Na_2S_2O_3$) 112 ccm O_2 .

²⁴⁾ W. Franke u. F. Lorenz, A. 582, 1 [1937].

²⁵⁾ Vergl. ähnliche Hemmungsversuche bei pflanzlichen Katalasen von K. Shibata u. E. Yakushiji (Naturwiss. 21, 267 [1933]; Acta phytochim. 7, 93 [1933]) u. K. Okunuki (Acta phytochim. 11, 27 [1939]).

Tafel 7. H_2O_2 -Bildung bei der enzymatischen Harnsäuredehydrierung in Gegenwart von $m/500 NH_2OH$

Normalansätze mit je 1 ccm (= 4.0 mg) Enzym

t (Min.)	ccm O_2	ccm O_2 korr.	ccm $n/100 H_2O_2$	% H_2O_2 d. Th.
15	72	68	0.277	46
25	105	101	0.495	55
45	181	170	0.900	59
60	218	204	1.26	69

Es werden bei unseren Versuchen also die Hälfte bis zwei Drittel des nach der theoretischen Dehydrierungsgleichung zu erwartenden Hydroperoxyds gefaßt.

Worauf das Defizit zurückgeht, wurde nicht mit Sicherheit entschieden. Die Katalasehemmung durch Hydroxylamin ist nach Versuchen mit und ohne Harnsäure unter reinstem Stickstoff offenbar vollständig (vergl. Versuchsteil, Tafel 12). Es bleibt eine Reaktion intermediär gebildeten Hydroperoxyds mit Harnsäure oder Hydroxylamin. Ein Schwund anaeroben Enzymansätzen zugesetzten Hydroperoxyds ist in bescheidenem Ausmaß mit Hydroxylamin, nicht sicher mit Hydroxylamin + Harnsäure feststellbar. Auffallenderweise ist dieser H_2O_2 -Schwund in enzymfreien Ansätzen viel deutlicher und nimmt in der Reihenfolge der Ansätze Hydroxylamin + Harnsäure < Harnsäure allein < Hydroxylamin allein stark zu^{26, 27}). Es sieht so aus, als ob Hydroxylamin und Harnsäure sich gegenseitig vor dem Angriff des H_2O_2 schützen würden (vergl. Versuchsteil, Tafel 13). Es bleibt nur die Annahme, daß naszierendes H_2O_2 stärker oxydierend wirkt (offenbar hauptsächlich auf Hydroxylamin) als zugesetztes, eine Annahme, die nach Erfahrungen z. B. bei Uricase⁷) und Xanthin-dehydrase²⁸) durchaus einleuchtend ist.

Die Tatsache der Hydroperoxyd-Bildung zusammen mit der geringen HCN-Empfindlichkeit spricht gegen eine Metallprotein-Natur der Pilzuricase; denn bisher wurde bei der Wirkung metallhaltiger Oxydationsfermente in keinem Falle H_2O_2 -Bildung beobachtet²⁹), wohl aber bei der Wirkung metallfreier (hauptsächlich Flavin-)Fermente³⁰). Es wäre nicht überraschend, wenn auch die Uricase eines Tages als Flavinferment erkannt würde.

²⁶) Vergl. zur nichtenzymatischen Harnsäureoxydation mit H_2O_2 : C. S. Venable (u. R. J. Moore), Journ. Amer. chem. Soc. **39**, 1750 [1917], **40**, 1099 [1918]; F. J. Moore u. R. M. Thomas, Journ. Amer. chem. Soc. **40**, 1120 [1918]; F. Chrometzka, Ztschr. physiol. Chem. **162**, 219 [1927]; H. Wieland u. T. F. Macrae, Ztschr. physiol. Chem. **203**, 83 [1931].

²⁷) Daß Hydroxylamin durch schwache Oxydationsmittel zu N_2O bzw. N_2 oxydiert wird, ist lange bekannt (vergl. Hofmann-Rüdorff, Anorgan. Chemie, S. 135, Braunschweig 1951). Die hier zur Katalasehemmung verwendete NH_2OH -Konzentration war offenbar etwas zu hoch.

²⁸) H. Wieland u. B. Rosenfeld, A. **477**, 32 [1929]; H. Wieland u. T. F. Macrae, A. **483**, 217 [1930].

²⁹) Vergl. für Phenoloxidasen H. Wieland u. H. Sutter (B. **61**, 1060 [1928]), C. R. Dawson u. B. J. Ludwig (Journ. Amer. chem. Soc. **60**, 1617 [1938]), F. Kubowitz (Biochem. Ztschr. **299**, 32 [1938]), für Cytochrom-(Indophenol)-oxydase D. Keilin u. E. F. Hartree (Proc. Roy. Soc. London [B] **125**, 171 [1938]), für Ascorbinsäure-oxydase H. Steinman u. C. R. Dawson (Journ. Amer. chem. Soc. **64**, 1212 [1942]), D. B. Hand u. E. C. Greisen (Journ. Amer. chem. Soc. **64**, 358 [1942]).

³⁰) Vergl. W. Franke, Die Oxhydrasen in Bamann-Myrbäck, Die Methoden der Fermentforsch. III, S. 2385 (Leipzig 1941).

b) Versuche mit anderen Wasserstoffacceptoren

St. J. Przylecki u. R. Truszkowski³¹⁾ hatten nur einen spurensweisen Harnsäureangriff durch tierische Uricase i. Ggw. von Methylenblau beobachtet und Keilin u. Hartree⁷⁾ eine Acceptorwirkung von Methylenblau und Indophenolen bei rohem Leber- oder Nierenenzym überhaupt vermißt. Hochgereinigte Fermentpräparate wurden bisher nicht untersucht.

Wir konnten zunächst nach der üblichen Thunberg-Methodik bei Rohextrakten aus *Aspergillus fumigatus* eine Verwertung von Methylenblau nicht mit Sicherheit, eine solche von 2.6-Dichlor-phenol-indophenol (Tillmans Reagens) nicht in allen Fällen feststellen. Dagegen war mit Aceton- und Ammoniumsulfatfällungen ($\frac{2}{3}$ -Sättigung) für beide Farbstoffe (Konzentration $m/40000$) einwandfreie Acceptorfunktion zu beobachten. Die Tafel 8 gibt das Resultat einer Reihe typischer Entfärbungsversuche wieder.

Die Ansätze entsprachen im wesentlichen dem „Normalansatz“ (S. 780) bis auf den Zusatz der Farbstoffe. t_0 und t sind die Entfärbungszeiten in Ansätzen ohne und mit Substrat, J die daraus berechnete „Dehydrierungsintensität“ nach Thunberg: $J = 100 (1/t - 1/t_0)$. Die vorletzte Spalte enthält den Quotienten Dehydrierungsintensität/Enzym-trockengewicht (J/mg) als anaerobes Aktivitätsmaß, die letzte einen Ausdruck für das Verhältnis von anaerober und aerober Fermentaktivität.

Tafel 8. Anaerobe Acceptorversuche mit Pilzuricase

Enzym	Q_{O_2}	ccm	mg/ccm	Farbstoff	t_0 (Min.)	t (Min.)	J	J/mg	$\frac{J/mg}{Q_{O_2}}$
Acetonfäll.	108	1	2.5	Methylenblau	303	100	0.67	0.27	0.0025
Ammonium-sulfatfäll.	73	2	4.8	„	51	31	1.20	0.13	} 0.0021
Ammonium-sulfatfäll.	73	1	4.8	„	84	49	0.80	0.17	
Komb. Aceton- u. Ammoniumsulfatfäll.	200	1	2.2	„	> 500	95	1.05	0.48	0.0024
Rohextrakt	7.9	1	13.1	Indophenol	40	20	2.5	0.19	0.024
Ammonium-sulfatfäll.	73	2	4.8	„	36	6	13.9	1.46	} 0.018
Ammonium-sulfatfäll.	73	1	4.8	„	51	13	5.7	1.20	
Ammonium-sulfatfäll. II	82	1.3	1.9	„	29	12	4.9	1.98	0.024

Wie ersichtlich, reagiert Methylenblau auch mit gereinigten Fermentpräparaten wesentlich langsamer als das Indophenol, so daß sein Versagen im Versuch mit Rohenzym verständlich wird. Andererseits nimmt, wie die annähernde Konstanz der Quotienten der letzten Spalte für die beiden Farbstoffe zeigt, bei der Enzymreinigung aerobe und anaerobe Fermentaktivität in annähernd gleichem Umfang zu. Dies spricht für die Identität und Einheitlichkeit des bei O_2 - und Farbstoffreduktion wirksamen Ferments.

³¹⁾ Compt. rend. Soc. Biol. 98, 789 [1928].

In die gleiche Richtung weist die Beobachtung, daß auch die Farbstoffreduktion durch Cyanid beträchtlich gehemmt wird, wie dies die Tafel 9 für die Reduktion von Tillmans Reagens i. Ggw. eines Acetonpräparates (Q_{O_2} 108) belegt; die anaerobe Hemmung stimmt auch zahlenmäßig gut mit der aeroben (vergl. die Tafel 2) überein.

Tafel 9. Hemmung der anaeroben Farbstoffreduktion durch HCN*)

	t_0 (Min.)	t (Min.)	J	% Hemmung
ohne HCN	129	54	1.07	
mit $m/10000$ HCN	132	70	0.67	37
mit $m/1000$ HCN	120	75	0.50	54

*) Bezeichnungsweise wie in der Tafel 8.

Hinsichtlich des Fermenttypus erweisen sich die Verhältnisse bei der Pilz-uricase also recht ähnlich den früher bei der Glucose-oxydase der Schimmelpilze gefundenen^{22, 24, 32}). Wie diese gehört auch die Pilz-uricase in die Gruppe der Aerodehydrasen mit betonter Acceptorspezifität zum molekularen Sauerstoff (Oxhydrasen nach Oppenheimer³³).

Die Selektivität der Acceptorverwertung ist bei der Uricase — allerdings zum erheblichen Teil aus sekundären Gründen — noch ausgesprochener als bei der Glucose-oxydase. Bei einer Reihe weiterer Acceptorfarbstoffe, aber auch bei Chinon und Cytochrom c, wurden bisher hinsichtlich der Verwertung nur unsichere oder negative Befunde erhalten³⁴).

In einer Versuchsreihe mit Farbstoffen arbeiteten wir mit der höheren Gesamtkonzentration $m/10000$, die durch die geringe Farbintensität einzelner Farbstoffe bedingt war. In der geprüften Farbstoffreihe

2.6-Dichlor-phenol-indophenol > Toluylenblau > Thionin > Methylenblau
> Pyocyanin > Indigodisulfonat > Safranin

nahm das Redoxpotential von 0.217 V bis auf -0.289 V (bei p_H 7) ab. Allein das Indophenol zeigte gute Acceptorwirkung ($J=3.5-6.6$). Toluylenblau und Thionin konnten nicht verwendet werden, da sie i. Ggw. von Harnsäure ausflockten. Die Methylenblau-Entfärbung wurde bei der angegebenen Konzentration durch Harnsäure zum mindesten nicht beschleunigt, diejenige von Pyocyanin und Indigodisulfonat erfolgte i. Ggw. von Harnsäure sogar langsamer als in ihrer Abwesenheit³⁵). Safranin war im Substrat- wie im Kontrollversuch auch nach 12 Stdn. noch nicht entfärbt. Im aeroben Versuch hatte das verwendete Enzympräparat (Ammoniumsulfatfällung) gute Aktivität gezeigt ($Q_{O_2}=86$).

Es bestand die Möglichkeit, daß das Enzym durch die Farbstoffe als solche gehemmt wurde. Wir ließen daher einige aerobe „Normalansätze“ bei Farbstoffzugabe ($m/10000$) laufen. Nur Safranin zeigte eine leichte (10–35%), Indigodisulfonat eine stärkere Hemmungswirkung (20–50%, je nach Versuchsdauer). Das (bei der Glucose-oxydase besonders wirksam befundene) Pyocyanin bewirkt eine so enorme Steigerung der Enzymeigen-

³²) W. Franke, A. 555, 111 [1944].

³³) C. Oppenheimer, Die Fermente u. ihre Wirkungen, Suppl. II (Den Haag 1939).

³⁴) Bei der Glucose-oxydase waren Farbstoffe mit höherem Potential als dem des Pyocyanins (-0.034 bei p_H 7), dazu Chinon und (sehr langsam) Cytochrom c als Acceptoren verwertet worden^{22, 24}).

³⁵) Ein ähnliches Ergebnis wurde auch bei Verwendung des (farblosen, irreversibel zum roten Formazan reduzierbaren) Triphenyl-tetrazolium-chlorids (in der Gesamtkonzentration 0.02% = $m/1675$) erhalten.

atmung (um das 10–15fache), daß die 50–80-proz. Steigerung der Gesamtoxydation un-
auswertbar wird; sie kann Beschleunigung oder Hemmung der Harnsäureoxydation in
sich schließen.

Natürlich könnte das Versagen der Farbstoffe tieferen Potentials thermodynamisch
bedingt sein³⁶). Solange die freie Energie der Harnsäure-Abbaureaktion nicht bekannt
ist, kann darüber nichts Definitives ausgesagt werden. Dagegen müßte Chinon thermo-
dynamisch sicher imstande sein, Harnsäure zu dehydrieren (Redoxpotential 0.271 bei p_H 7).
In anaeroben Normalansätzen mit $m/_{70}$ Chinon ließ sich zwar jodometrisch eine beträcht-
liche Chinonabnahme (unter tiefer Rotbraunfärbung der Ansätze) feststellen, die aber
ohne und mit Harnsäurezusatz nahezu gleich war (s. Versuchsteil, Tafel 14).

Der Versuch ist aber insofern nicht eindeutig, als wir im üblichen O_2 -Versuch eine
beträchtliche Hemmungswirkung von Chinon beobachteten, die bei der verwendeten Kon-
zentration ($m/_{70}$) und unter Berücksichtigung der nicht unbeträchtlichen Autoxydation
des Chinons im Kontrollversuch (mit Enzym und ohne Harnsäure) 75–85% ausmachte
(s. Versuchsteil, Tafel 15).

Die Untersuchung des zellvertrauten Acceptors Cytochrom c war einmal
im Hinblick auf eine neuere Angabe von L. Margules u. M. Griffiths³⁷)
von Interesse, wonach Harnsäure (und Alloxan) Cytochrom c schon nicht-
enzymatisch im schwach alkalischen Gebiet, langsamer beim Neutralpunkt,
reduzieren. Wir konnten ihre Beobachtungen bestätigen, fanden aber, daß
Enzymzusatz die Cytochrom-Reduktion nicht beschleunigt, sondern verlang-
samt (s. Versuchsteil, Tafel 16). Wir fanden weiter, daß auch gereinigte Enzym-
lösungen (Ammoniumsulfatfällungen bei $2/3$ -Sättigung mit Q_{O_2} -Werten zwi-
schen 70 und 90) nach Zugabe von Natriumdithionit schwache Hämochrom-
genbanden bei 550 und 525 $m\mu$ erkennen ließen (nach Vergleich mit einem
Cytochrom c-Präparat von bekanntem Gehalt wären im mg Enzym etwa 0.7
bis 2.8×10^{-7} Milliatome Häm-in-Fe vorhanden³⁸). Bei anaerober Incubation
von Normalansätzen sowohl bei p_H 7 als 8 mit und ohne Harnsäure-Zusatz
traten aber im Verlauf einer Stunde in keinem Falle Hämochromogenbanden
auf; der geringe Häminkörpergehalt unserer Enzympräparate ist also offen-
bar für deren Uricase-Aktivität belanglos.

Wie wir bei Gelegenheit feststellten, enthalten auch unsere gereinigten Präparate noch
Cytochrom-(Indophenol)-oxydase. Beispielsweise zeigte ein Präparat mit der Uri-
case-Aktivität Q_{O_2} 108 die Indophenoloxydase-Aktivität 180 (mit $m/_{50}$ *p*-Phenylendiamin).
Die Wirkung war thermolabil und wurde durch $m/_{500}$ HCN praktisch vollständig gehemmt.
Weiterer Zusatz von Cytochrom c (bis zur Konzentration $6.6 \times 10^{-7} m$) erhöhte die
Enzymwirkung nicht³⁹).

5.) Chemismus der Aspergillus-Uricase-Wirkung

Über die Uricolyse, insbesondere durch tierische Fermente, ist viel ge-
arbeitet worden, ohne daß die Frage der Reaktionsprodukte bis heute restlos

³⁶) Bei der Glucose-oxydase war das nicht der Fall (vergl. neuere exakte Bestimmung-
des Glucose-Gluconsäure-Potentials (–0.43 bei p_H 7) von H. J. Strecker u. S. Kor-
kes, *Nature* 168, 913 [1951]).

³⁷) *Arch. Biochem.* 29, 225 [1950].

³⁸) Bei einem angenommenen Mol.-Gew. des Ferments von 70000 würde dies 0.5 bis
2% eines Fe-Atoms entsprechen.

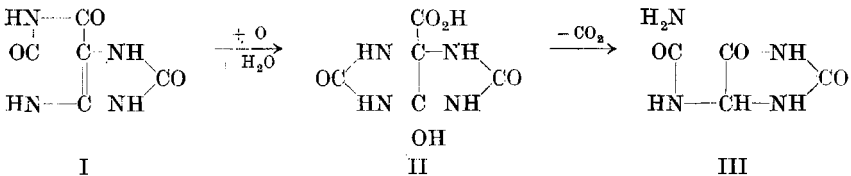
³⁹) Die Rolle des Cytochromsystems bei der Atmung von Aspergillen ist noch wenig
klar. Es scheint nach H. Tamiya (*Advanc. enzymol.* 2, 183 [1942]) nur in Schüttel-
und jungem Deckenmycel an der Atmung maßgeblich beteiligt zu sein.

geklärt wäre. Seit den schönen Untersuchungen von W. Wiechowski⁴⁰⁾ (1907) wurde vielfach Allantoin als einziges oder zum mindesten ganz überwiegendes Produkt der tierischen Uricolyse angesehen.

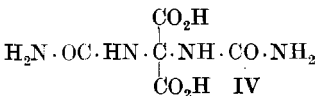
Dazu stimmte auch der Respirationsquotient (CO_2/O_2) von annähernd 2, den Battelli u. Stern⁸⁾ wenig später bei Verwendung frischen Gewebematerials gefunden hatten. Grynberg⁵⁾ erhielt mit Glycerinextrakten Werte von RQ zwischen 1.5 und 2.0, Holmberg¹²⁾ neuerdings mit weitgehend gereinigtem Leberferment (Q_{O_2} etwa 6000) nahezu theoretische RQ-Werte von 1 oder 2, je nach Ab- oder Anwesenheit von Katalase. Davidson⁹⁾ isolierte aus Ansätzen mit ähnlich weitgehend gereinigtem Ferment nur Allantoin als Reaktionsprodukt (30% d.Th. Ausb.).

Demgegenüber stehen seit den Untersuchungen von K. Felix, F. Scheel u. W. Schuler⁴¹⁾ (1929) mehrfach Befunde, wonach der Reaktionsverlauf der Uricolyse weniger einheitlich und stark durch die jeweiligen Reaktionsbedingungen (pH , Puffersubstanz) bedingt ist.

Die genannten Autoren berichteten erstmals über Versuche mit rohem Leberferment, in denen bei tieferen pH -Werten die CO_2 -Entwicklung gegenüber der O_2 -Aufnahme zurückblieb, woraus auf das Vorkommen zweier verschiedener Fermente für Oxydation und Decarboxylierung geschlossen wurde. Später führte W. Schuler⁴²⁾ weitere Versuche z. Tl. präparativer Art durch, die stark für die Rolle der „Oxyacetylen-diurein-carbonsäure“ (II) als Zwischenprodukt auf dem Wege von der Harnsäure (I) zum Allantoin (III) sprachen⁴³⁾.



In Erweiterung dieser Befunde stellte F. W. Klemperer⁴⁴⁾ 1945, mit nur schwach angereichertem Ferment arbeitend, fest, daß neben Allantoin und „Oxyacetylen-diurein-carbonsäure“ auch Uroxansäure (IV) entstehe⁴⁵⁾.



Das Mengenverhältnis dieser drei Produkte hing außer vom pH der Reaktionslösung auch stark vom verwendeten Puffer ab: bei pH 7.9 begünstigt Phosphat, bei pH 9.1 Glykokoll die Allantoin-Bildung viel stärker als Borat vom gleichen pH . Im allgemeinen begünstigt niedriges pH die Bildung von „Oxyacetylen-diurein-carbonsäure“ (was mit den Befunden von Felix u.

⁴⁰⁾ Beitr. chem. Physiol. u. Pathol. **9**, 295 [1907], **11**, 109 [1908].

⁴¹⁾ Ztschr. physiol. Chem. **180**, 90 [1929].

⁴²⁾ Ztschr. physiol. Chem. **208**, 237 [1932]; W. Schuler u. W. Reindel, ebenda **215**, 258 [1933].

⁴³⁾ Das gleiche Intermediärprodukt war schon früher von R. Behrend (A. **333**, 141 [1904]) für die rein chemische Harnsäureoxydation (z. B. mit KMnO_4) angenommen worden und wurde später durch W. Schuler u. W. Reindel (Ztschr. physiol. Chem. **208**, 248 [1932]) dort auch tatsächlich als Trisilbersalz gefaßt. Neuere Isotopenversuche haben sowohl für die chemische (L. F. Cavaliere u. G. B. Brown, Journ. Amer. chem. Soc. **70**, 1242 [1948]) wie die enzymatische Uricolyse (G. B. Brown, P. M. Roll u. L. F. Cavaliere, Journ. biol. Chem. **171**, 835 [1947]) die Bildung eines symmetrischen Zwischenprodukts eindeutig bewiesen.

⁴⁴⁾ Journ. biol. Chem. **160**, 111 [1945].

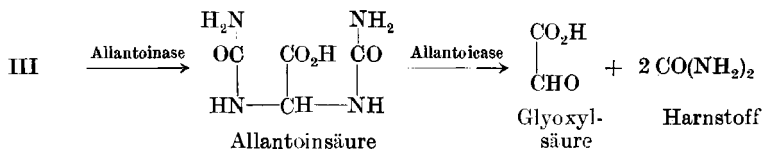
⁴⁵⁾ Uroxansäure-Bildung über „Oxyacetylen-diurein-carbonsäure“ ist für die chemische Harnsäureoxydation ebenfalls schon 1904 von Behrend⁴³⁾ angenommen worden; Uroxansäure erhält man leicht beim Eindampfen der alkalischen, Allantoin beim Eindampfen der leicht angesäuerten oxydierten Reaktionslösung.

Mitarbb. in Einklang stehen würde), mittleres die von Uroxansäure und höheres die von Allantoin. Da nach Klemperer die drei erwähnten Reaktionsprodukte i. Ggw. von Uricase beständig sind, nimmt er als Primärstufe der Enzymwirkung eine instabile Verbindung $C_5N_4O_4H_4$ an, die nichtenzymatisch in die drei Endprodukte zerfallen soll.

Nach einer neueren spektrophotometrischen Analyse des Reaktionsablaufs von E. Praetorius⁴⁶⁾ geht das hypothetische Primärprodukt über eine weitere Zwischenstufe in Allantoin über (beschleunigt durch pH -Steigerung), während ein zweiter Reaktionsweg (gefördert durch Borat) zur Oxyacetylen-diurein-carbonsäure und über diese z. Tl. weiter zur Uroxansäure führt.

Was die weit seltener und weniger eingehend studierte pflanzliche Uricolyse anbetrifft – untersucht wurden zumeist Leguminosen^{47, 48)} und höhere Pilze (Basidiomyceten)⁴⁹⁾ –, so geht sie primär offenbar ebenfalls zu Allantoin, das nach den Untersuchungen von Fosse und Brunel⁴⁸⁾ weiterhin hydrolytisch aufgespalten werden kann.

Es handelt sich hier um die beiden Enzyme Allantoinase und Allantoicase, deren weite Verbreitung in Pflanzen (aber auch in Kaltblütern und Wirbellosen) von den Autoren dargetan worden ist⁵⁰⁾. Die Reaktionsfolge ist:



Auch in *Aspergillus niger* und *Aspergillus phoenicis* wurden diese beiden Hydrolasen nachgewiesen⁵¹⁾ (dagegen keine Uricase¹⁾).

In der I. Mitteil. war bereits erwähnt worden, daß sich bei Verwendung von Enzym-Lösungen verschiedener Herkunft (Arten von *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Stemphylium* und *Fusarium*) gegen Ende der Harnsäureoxydation mit der Farbreaktion von R. Fosse u. V. Bossuyt⁵²⁾ ein mit Vorbehalt als Allantoin angesprochenes Reaktionsprodukt nachweisen ließ; denn Schuler u. Reindel⁴³⁾ haben später gezeigt, daß diese Reaktion (im Prinzip nur Glyoxylsäure erfassend) wenig spezifisch ist und auch bei Alloxansäure, Uroxansäure und Oxyacetylen-diurein-carbonsäure positiv ausfällt. Zur Entscheidung in der Frage des Reaktionsprodukts bzw. der Reaktionsprodukte war also wenigstens noch die Bestimmung des Respira-

⁴⁶⁾ Biochim., Biophys. Acta 2, 602 [1948].

⁴⁷⁾ A. Némec, Biochem. Ztschr. 112, 286 [1921].

⁴⁸⁾ R. Fosse, A. Brunel u. P. de Graeve, Compt. rend. Acad. Sciences 189, 716 [1929], 190, 79 [1930]; R. Fosse, P. de Graeve u. P.-E. Thomas, ebenda 194, 1408 [1932], 195, 1198 [1932].

⁴⁹⁾ A. Brunel, Bull. Soc. Chim. biol. 19, 747 [1937].

⁵⁰⁾ R. Fosse u. A. Brunel, Compt. rend. Acad. Sciences 188, 426, 1067 [1929]; R. Fosse, A. Brunel u. P. de Graeve, ebenda 189, 716 [1929]; A. Brunel, ebenda 192, 442 [1931], Bull. Soc. Chim. biol. 19, 805, 1027, 1683 [1937]; R. Fosse, Uriéogenèse et métabolisme de l'azote purique chez les végétaux (Paris 1939).

⁵¹⁾ A. Brunel, Bull. Soc. Chim. biol. 21, 380 [1939].

⁵²⁾ R. Fosse u. V. Bossuyt, Compt. rend. Acad. Sciences 188, 106 [1929].

tionsquotienten RQ erforderlich; denn von den bei der Harnsäureoxydation in Frage kommenden Stoffen entsteht nur das Allantoin unter gleichzeitiger CO₂-Entwicklung. Wir haben daher am Beispiel der Aspergillus-Uricase zunächst den Respirationsquotienten der Uricolyse bestimmt.

a) Der Respirationsquotient RQ wurde in einer Reihe paralleler Normalansätze mit gereinigtem Ferment (Ammoniumsulfatfällungen I, II und III bei 50- bzw. 67- bzw. 80-proz. Sättigung) nach der sog. „direkten Methode“⁵³⁾ (mit und ohne NaOH im Mitteleinsatz der Warburg-Gefäße) ermittelt. Nach bestimmten O₂-Aufnahmen wurde jeweils ein Ansatz durch Säurezugabe unterbrochen. Die Tafel 10 enthält Angaben über die unkorrigierten und die (um die Leeratmung) korrigierten Respirationsquotienten (RQ bzw. RQ_Δ).

Tafel 10. Respirationsquotient des enzymatischen Harnsäureabbaus
Eingesetzte Enzymtrockengewichte zwischen 5.7 und 7.8 mg; Versuchszeiten
zwischen 10 und 105 Min.; H = Harnsäure

Enzympräparat	cmm O ₂			cmm CO ₂			RQ	RQ _Δ
	ohne H	mit H	Δ	ohne H	mit H	Δ		
I	22	81	59	20	138	118	1.71	2.0
II	15	102	87	15	178	163	1.75	1.88
III	23	130	107	25	266	241	2.05	2.25
III	42	222	180	39	443	404	2.0	2.24

Der Respirationsquotient liegt für unsere (noch stark katalasehaltigen, S. 789) Enzym-Lösungen in der Nähe von 2, was die tatsächliche Bildung von Allantoin durch das Pilzenzym sehr wahrscheinlich macht.

In weiteren Versuchsreihen wurde das Verhältnis von O₂-Aufnahme, Harnsäure-Abnahme und Allantoin-Bildung messend verfolgt.

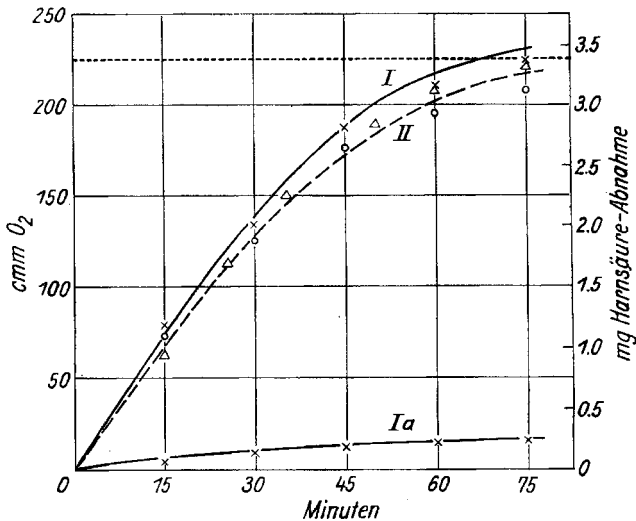
b) Zur Bestimmung der Harnsäure-Abnahme wurde von einer Anzahl paralleler Normalansätze zu bestimmten Zeiten jeweils einer abgebrochen und in einer Probe (0.2–0.5 ccm, je nach der noch vorhandenen Substratmenge) eine colorimetrische Harnsäure-Bestimmung nach der empfindlichen und recht genauen Methode von O. Folin u. H. Wu⁵⁴⁾ (in einer neueren Modifikation von M. B. Blauch u. F. C. Koch⁵⁵⁾) durchgeführt. In der Abbild. 5 sind außer den Kurven der O₂-Aufnahme – die gestrichelte ist um die Leeratmung korrigiert – die Werte der Harnsäure-Abnahme eingetragen, wobei die Maßstäbe so gewählt wurden, daß 224 cmm O₂ (= 10 μMol) 3.36 mg Harnsäure (= 20 μMol, Ausgangsmenge pro Ansatz) entsprachen. Die Abbildung zeigt – besonders gut stimmend für die korrigierten O₂-Werte –, daß je aufgenommenes Sauerstoffatom ein Mol. Harnsäure verschwindet.

⁵³⁾ Vergl. z.B. W. W. Umbreit, R. H. Burris u. J. F. Stauffer, *Manometric techniques and tissue metabolism* (Minneapolis 1949).

⁵⁴⁾ Journ. biol. Chem. **38**, 101 [1919].

⁵⁵⁾ Journ. biol. Chem. **130**, 443, 455 [1940]; vergl. F. C. Koch u. M. E. Hanke, *Practical methods in biochemistry*, S. 259 (Baltimore 1948).

c) Zur Bestimmung des Allantoins verwendeten wir die schon erwähnte Farbreaktion von Fosse u. Bossuyt⁵²⁾, bei der bekanntlich Allantoin zunächst alkalisch zu Allantoinensäure und diese hierauf sauer zu Harnstoff + Glyoxylsäure aufgespalten wird, welche letztere mit Phenylhydrazin und



Abbild. 5. O₂-Aufnahme, gemessen (x) bzw. um Enzymeigenatmung korrigiert (o), und Harnsäureabnahme (Δ) mit einer Ammoniumsulfatfällung (Halbsättigung, Q_{O₂} = 120)

I, II O₂-Aufnahme mit Harnsäure

Ia O₂-Aufnahme ohne Harnsäure

Punktierter Linie entspricht 10 μMol O₂ bzw. 20 μMol Harnsäure

K₃FeCy₆ in starker Salzsäure eine intensive Rotfärbung liefert. Diese nahm in unseren Versuchen mit steigender O₂-Aufnahme an Intensität stark zu. Um das Verfahren zur quantitativen Allantoin-Bestimmung (wie dies schon K. R δ ⁵⁶⁾ vorgeschlagen hatte) verwenden zu können, wurde es gegenüber den Literaturangaben etwas modifiziert. Die Methode ist nicht sehr genau (5–10%), eignet sich aber infolge ihrer raschen Ausführbarkeit gut zu Serien-Bestimmungen⁵⁷⁾.

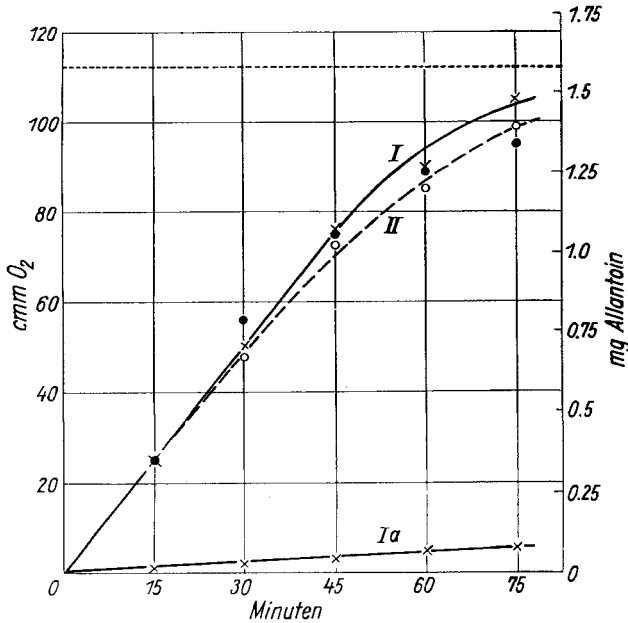
Die Abbild. 6 zeigt das Ergebnis einer Versuchsreihe, in der die O₂-Aufnahme und die entsprechende Allantoin-Bildung einander gegenübergestellt sind⁵⁸⁾. Aus der eingesetzten Harnsäuremenge (1.68 mg) könnten bei einer O₂-Auf-

⁵⁶⁾ Journ. Biochem. (Jap.) 14, 391 [1932].

⁵⁷⁾ Bei dem exakteren, aber ungleich langwierigeren Verfahren von R. Fosse, A. Brunel u. P.-E. Thomas (Compt. rend. Acad. Sciences 192, 1615 [1931]) und von M. Flörkin u. G. Duchateau-Bosson (Enzymol. 9, 5 [1940]) wird die primäre Aufspaltung zu Allantoinensäure enzymatisch (mit einem Soja-Präparat etwa 12 Std. bei 40°) vorgenommen.

⁵⁸⁾ Um in den günstigsten Meßbereich der Farbreaktion zu gelangen, wurde die Substratkonzentration hier gegenüber der üblichen auf die Hälfte reduziert ($m/_{500}$).

nahme von 112 cmm theoretisch 1.58 mg Allantoin gebildet werden. Die Übereinstimmung zwischen O_2 -Verbrauch und Allantoin-Bildung ist recht befriedigend.



Abbild. 6. O_2 -Aufnahme, gemessen (\times) bzw. um Enzymeigenatmung korrigiert (\circ), und Allantoin-Bildung (\bullet) mit einer Ammoniumsulfatfällung ($2/3$ -Sättigung, $Q_{O_2} = 50$)

I, II O_2 -Aufnahme mit Harnsäure

Ia O_2 -Aufnahme ohne Harnsäure

Punktierete Linie entspricht $5 \mu\text{Mol } O_2$ bzw. $10 \mu\text{Mol Allantoin}$

In einer weiteren Versuchsserie mit Normalansätzen wurde teils bis zum Ende der O_2 -Aufnahme (75 Min.), teils noch 30 bzw. 60 Min. darüber hinaus mit Luft geschüttelt und die jeweils vorhandene Allantoinmenge ermittelt. Sie entsprach in allen drei Fällen innerhalb der Fehlergrenzen der Theorie (97–103%).

Dementsprechend wurde auch in Ansätzen, die statt Harnsäure die äquiv. Menge Allantoin (3.16 mg) als Substrat enthielten, nach 30–60 Min. kein die Enzymeigenatmung übersteigender O_2 -Verbrauch beobachtet und bei Versuchsende 90–100% des eingesetzten Allantoins wiedergefunden.

Die Farbreaktion von Fosse u. Bossuyt, in der oben angegebenen Form ausgeführt, gestattet nicht, zwischen Allantoin und Allantoinensäure (bzw. Glyoxylsäure) zu unterscheiden. Diese Unterscheidung wird möglich, wenn man auf die alkalische Hydrolyse verzichtet und sich auf die saure beschränkt⁵⁹⁾. Derartige Versuche haben ergeben, daß eine Allantoinasewirkung in unseren Enzympräparaten keine Rolle spielt.

In einem Normalansatz mit einer Ammoniumsulfatfällung ($2/3$ -Sättigung, $Q_{O_2} = 100$) war nach 60 Min. der Endwert der O_2 -Aufnahme erreicht. Die nach saurer Hydrolyse

⁵⁹⁾ Vergl. M. Florkin u. G. Bosson, Bull. Soc. Chim. biol. 21, 665 [1939].

beobachtete minimale Farbreaktion entsprach $< 1\%$ Allantoinensäure⁶⁰). Das gleiche Ergebnis wurde erhalten, als Allantoin 1 Stde. anaerob mit dem Enzym incubiert wurde.

d) Isolierung von Allantoin: Zur Sicherheit wurde das enzymatisch gebildete Allantoin aus 14 gesammelten Warburg-Ansätzen auch noch als solches isoliert und identifiziert. Bei der Aufarbeitung der Ansätze hielten wir uns im wesentlichen an die Vorschriften von Wiechowski⁴⁰) zur Isolierung von Allantoin aus Harn, die über die schwerlösliche Quecksilber(II)-Verbindung erfolgte. Es wurde in 95 % d. Th. ein noch bräunlich gefärbtes Rohkristallinat von Allantoin erhalten, aus dem durch Umkristallisieren und Entfärben mit etwas Tierkohle 63 % d. Th. an Rein-Allantoin gewonnen wurden, das durch den Schmelzpunkt (229°) und Misch-Schmelzpunkt (229°) identifiziert wurde⁶¹).

Es kann somit als erwiesen gelten, daß Allantoin praktisch das einzige Reaktionsprodukt der Einwirkung von *Aspergillus-Uricase* auf Harnsäure beim Wirkungsoptimum pH 7 darstellt.

Der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft danken wir ergebenst für die finanzielle Unterstützung dieser Untersuchung.

Beschreibung der Versuche

1.) Pilzmaterial

Die verwendete Stammkultur von *Aspergillus fumigatus* stammte aus dem Botanischen Institut der Universität München.

Für die Züchtung in größerem Maßstabe wurden zunächst Vorkulturen in Petrischalen (10 cm \varnothing) auf Würzeagar angelegt. Wenn gute Konidien-Bildung eingetreten war, wurden mit einem sterilen Korkbohrer kleine Mycelscheibchen (0,5 cm \varnothing) ausgestanzt und zur Beimpfung der eigentlichen Kulturlösung (nach Czapek-Dox, mit technischer Glucose) verwendet; traten bei dem Pilz „Ermüdungserscheinungen“ ein, so wurden der Kulturlösung 10% Hefewasser zugesetzt. In der Hauptkultur erfolgte die Pilzzüchtung in Petrischalen von 19–22 cm \varnothing . Nach zweitägiger Incubation bei 28° wurden die rein weißen Myceldecken zwecks Verarmung von Eigensubstraten noch eine Nacht auf Leitungswasser gesetzt, am nächsten Morgen gewaschen und in der Handpresse stark abgepreßt (Trockengewicht 15–20%).

2.) Herstellung von Enzym-Lösungen

a) Rohextrakte: Das mit der Schere zerkleinerte Preßmycel wurde in der Reibschale mit dem gleichen Gewicht Seesand etwa 10 Min. und nach Zugabe des etwa doppelten Volumens Wasser weitere 10 Min. intensiv verrieben. Anschließend wurde 10 Min. bei 3–4000 U/Min. zentrifugiert, wodurch gelblich gefärbte, ziemlich stark getrübbte Enzym-Lösungen erhalten wurden, die in Eis oder im Eisschrank aufbewahrt wurden. Die Bestimmung ihrer Aktivität erfolgte in Reihen abgestufter Konzentration (zur Ermittlung des Proportionalitätsbereichs S. 781) regelmäßig noch am gleichen Tage. Sie können aber ohne größeren Aktivitätsverlust auch 1–2 Tage im Eisschrank aufbewahrt werden.

⁶⁰) Auch Brunel¹) hat in *Aspergillus niger*-Mycel, das auf Czapekscher Nährlösung gezüchtet worden war, Allantoinase vermißt, sie dagegen bei Verwendung Bertrandscher Nährlösung darin nachweisen können. Ein von uns durchgeführter orientierender Versuch mit Bertrandscher Nährlösung (Ammoniumsulfat als N-Quelle) ergab so uricasearmes Mycel, daß wir auf die weitere Untersuchung verzichteten.

⁶¹) Das Vergleichspräparat, dargestellt nach Org. Syntheses, Collect. Vol. II, S. 21 (New York 1943), schmolz bei 232° (wie stets unter Zersetzung).

Thymol (0.1%) oder Natriumfluorid (0.2%) eignen sich an sich als nichthemmende Antiseptica, wurden aber in den folgenden Versuchen nicht verwendet. Chloroform ist weniger geeignet, Toluol ungeeignet, da ihr Zusatz beträchtliche bzw. enorme Steigerung der Enzym-Eigenatmung mit sich bringt.

1 bis höchstens 2tägige Dialyse in Cellophan-Dialysierschläuchen (Kalle) gegen fließendes Leitungswasser ist ebenfalls ohne größere Enzymverluste möglich; meist begnügten wir uns mit einem Tag. Bei 2tägiger Dialyse (wie stets zu Trockengewichts-Bestimmungen von Enzym-Lösungen) reduziert sich das Trockengewicht auf 30–45%, im Mittel 37% von dem der Rohextrakte; entsprechend steigt Q_{O_2} auf das 2.2–3.3fache.

b) Ammoniumsulfatfällungen: Die Fällungen von Rohextrakten wurden stets durch Zugabe des festen Salzes bis zu bestimmten Sättigungsgraden und unter Eiskühlung vorgenommen. Da die Niederschläge bei 5000 U/Min. nicht oder nur mangelhaft zentrifugierbar waren, wurden sie im Eisschrank durch Faltenfilter filtriert, was mehrere Stunden in Anspruch nahm. Bei eintägiger Dialyse der in dest. Wasser aufgenommenen Fällungen setzten sich Niederschläge ab, die wegen ihrer schweren Zentrifugierbarkeit wieder abfiltriert werden mußten. Ihre Aktivität war – bei beträchtlicher Eigenatmung – so gering, daß sie vernachlässigt werden konnte. Am Ende wurden gelbstichige, wasserklare Ferment-Lösungen mit Trockengewichten zwischen 1.5 und 5.5 mg/ccm (nach 2tägiger Dialyse) erhalten.

c) Alkohol-Äther- und Acetonfällungen: Im ersteren Fall tropfte der Enzym-Rohextrakt in 10 Volumina des auf 0° abgekühlten Alkohol-Äther-Gemischs (2:1) ein, im letztgenannten wurden 2 Volumina gekühltes Aceton zur gleichfalls gekühlten Enzym-Lösung allmählich zugegeben. Die flockigen Fällungen wurden möglichst rasch abzentrifugiert, auf Tonteller gestrichen und in den Vakuumexsiccator gebracht. Zur Herstellung von Ferment-Lösungen werden die gelbbraunen Rückstände mit etwa der 50fachen Menge Wasser verrieben. Vom Unlöslichen, das nur minimale Aktivität zeigte, wurde abzentrifugiert. Die Lösung wurde als solche zu Enzymversuchen verwendet, zu Trockengewichts-Bestimmungen dagegen noch zwei Tage dialysiert.

3.) Bestimmung von Enzymwirkungen

a) Aerobe Versuche wurden durchweg bei 30° nach der Warburg-Methodik durchgeführt. Die Prüfung von Ferment-Lösungen auf ihre Aktivität erfolgte meist im sog. „Normalansatz“ (S. 780) oder diesem ähnlichen Ansätzen (z. B. unter Variation des Puffers oder der Substratkonzentration).

Substrat-Lösung wurde durch Eintragen umkristallisierter Harnsäure⁶²⁾ in kochendes n_{10} LiOH – dem primären Urat entsprechend – täglich frisch bereitete (selbst bei Aufbewahren im Eisschrank nimmt der Gehalt allmählich ab, die Autoxydabilität erheblich zu; gelbstichige Handelspräparate zeigen bereits in frischer Lösung beträchtliche Autoxydation⁶³⁾).

Zur Bestimmung des Respirationsquotienten liefen Parallelversuche mit und ohne NaOH im Mitteleinsatz der Warburg-Gefäße. Zu den Ansätzen ohne CO_2 -Absorption wurde zu bestimmten Zeiten je 1 ccm $2n H_2SO_4$ aus einer seitlichen Schliffretorte zugekippt und so der Differenzwert (CO_2-O_2) bestimmt. Entsprechende Ansätze liefen für die Eigenatmung der Enzym-Lösung; ferner wurde auch das in den Ansätzen zu Versuchsbeginn gebundene vorhandene CO_2 gesondert bestimmt. Die Berechnung erfolgte in der üblichen Weise⁶³⁾.

Zur Hydroperoxyd-Bestimmung wurde zu bestimmten Versuchszeiten jeweils einer der $m_{500} NH_2OH$ enthaltenden Ansätze durch Zusatz von 2 ccm 10-proz. Kaliumjodid-Lösung + 1 ccm $2n H_2SO_4$ abgebrochen und das ausgeschiedene Jod nach 30 Min. aus einer Mikrobürette mit $n_{100} Na_2S_2O_3$ titriert. (Meist negative) Kontrollen mit substrat- und NH_2OH -freien Ansätzen liefen mit.

⁶²⁾ Hrn. Prof. Dr. H. Bredereck, Stuttgart, sind wir für Überlassung von Harnsäure amerikanischer Provenienz (Pfanstiehl) zu Dank verpflichtet.

⁶³⁾ Vergl. hierzu A. Ionesco Matiu u. A. Popesco, Bull. Soc. chim. biol. **21**, 264 [1939].

b) Anaerobe Versuche wurden gleichfalls bei 30° im allgemeinen nach der Thunberg-Methodik durchgeführt. Die Einstellung der Farbstoff-Lösungen erfolgte mit $n_{/100}$ TiCl_3 .

Chinon-Ansätze (1.4 ccm $m_{/20}$ Chinon auf 5 ccm enthaltend) wurden zu bestimmten Zeiten durch Einkippen des Thunberg-Röhrcheninhalts in 5 ccm 10-proz. Kaliumjodid-Lösung + 10 ccm $2n$ H_2SO_4 gestoppt und das unterschiedene Jod nach 30 Min. mit $n_{/10}$ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ aus einer Mikrobürette titriert.

In den Versuchen mit Cytochrom c als Acceptor wurden Normalansätze mit 0.2 ccm einer oxydierten $3.3 \times 10^{-5} m$ Cytochrom c-Lösung⁶⁴) luftdicht in eine Cüvette von 2.8 cm Höhe eingefüllt. Das Auftreten der Banden des reduzierten Cytochroms (550 und 520 $m\mu$) wurde mit dem Zeiß-Handspektroskop D verfolgt, nachdem die Cüvette auf den Glastisch des Universalstativs gebracht worden war. Die Intensität der Banden wurde mit derjenigen einer Reihe von reduzierten Cytochrom-Lösungen bekannten Gehalts verglichen und so der Anteil des in der Versuchslösung reduzierten Cytochroms ermittelt; Versuchstemperatur 22°.

4.) Harnsäure-Bestimmung

Zu 0.25–1.0 ccm Reaktionslösung werden 5 ccm einer Harnstoff-KCN-Lösung (25-bzw. 2.5-proz.), hierauf 1 ccm einer 34-proz. Phosphorwolframsäure-Lösung gegeben und mit Wasser auf 10 ccm aufgefüllt. Die sich entwickelnde Blaufärbung wird nach wenigstens 20 Min. im Leitz-Kompensationsphotometer mit Filter 620 in der 0.5 cm-Cüvette photometriert. An Hand einer Eichkurve, die an Harnsäure-Lösungen verschiedenen Gehalts aufgenommen wurde, wird die Harnsäuremenge des Versuchsansatzes ermittelt. Enthalten auch die Vergleichslösungen Enzym, so kann auf die (im Originalverfahren⁵⁵) für Blut vorgesehene) Enteiweißung verzichtet werden.

Da die Eichkurve bei höheren Harnsäurekonzentrationen abflacht, wird zweckmäßig im Bereich zwischen 0.025 und 0.2 mg Harnsäure gearbeitet. Meist wurde der Harnsäuregehalt der Versuchslösung aus zwei Pipettenproben verschiedener Größe ermittelt.

5.) Allantoin-Bestimmung

a) colorimetrisch: 0.05–0.5 ccm eines Ansatzes werden mit Wasser auf 1 ccm aufgefüllt, mit 3 Tropfen $2n$ NaOH versetzt und 10 Min. im kochenden Wasserbad gehalten. Hierauf wird mit $2n$ HCl gegen Phenolphthalein neutralisiert, 1 Tropfen Salzsäure im Überschuß zugegeben und wieder 2 Min. wie oben erhitzt. Es folgt Zusatz von 6 Tropfen täglich frisch bereiteter 0.5-proz. Phenylhydrazin-hydrochlorid-Lösung und nach dem Abkühlen von 2 Tropfen 5-proz. K_3FeCy_6 -Lösung + 1.5 ccm konz. Salzsäure. Die entstandene Rotfärbung wird in der Schichtdicke 0.5 cm unter Verwendung des Filters 530 photometriert. Die Auswertung erfolgt auch hier an Hand einer Eichkurve, die, i. Ggw. von Enzym aufgenommen, die Enteiweißung erspart. Eiweißhaltige Lösungen liefern etwas tiefere Extinktionswerte als eiweißfreie.

Die Methode ist am empfindlichsten im Bereich zwischen 0.02 und 0.1 mg Allantoin. Die Genauigkeit der Einzelbestimmung dürfte kaum größer als 10–15% sein. Leicht werden zu tiefe Werte erhalten (vergl. Florkin u. Duchateau-Bosson⁵⁷). Werden aber von jedem Ansatz mehrere (2–3) Pipettenproben entnommen, die im Verhältnis 1 : 2 bis 1 : 3 variieren, dann dürfte der Mittelwert für die Ausgangskonzentration auf etwa 5% genau werden.

b) präparativ: 14 Warburg-Ansätze, die mit jeweils 2 ccm (10 mg) gereinigtem Ferment (Ammoniumsulfatfällung, $\frac{2}{3}$ -Sättigung, $Q_{O_2} = 90$) bis zum Endwert der O_2 -Aufnahme (bereits nach 20 Min. erreicht) geschüttelt wurden, wurden vereinigt (70 ccm, ursprünglich mit 47 mg Harnsäure), zur Enteiweißung mit 10 ccm 8-proz. Schwefelsäure und 2 ccm 10-proz. Phosphorwolframsäure versetzt und nach $1\frac{1}{2}$ Stdn. vom Niederschlag abfiltriert. Da die Lösung zur Allantoinfällung sulfat- und phosphatfrei sein muß⁴⁰),

⁶⁴) Aus Pferdeherz dargestellt und bestimmt nach D. Keilin u. E. F. Hartree (Proc. Roy. Soc. London [B] 122, 298 [1937]) durch Extinktionsmessung bei 550 $m\mu$ im Leitz-Kompensationsphotometer (nach Reduktion mit $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$).

wurde sie mit etwa 10 g frisch gefälltem Bleicarbonat bis zum Aufhören der CO₂-Entwicklung versetzt. Das Filtrat gab beim Versetzen mit basischem Bleiacetat keine Fällung mehr. Die Lösung wurde mit Schwefelwasserstoff entbleit, filtriert, durchlüftet, neutralisiert und schließlich mit etwa 25 ccm Wiechowskis Reagens (0.5-proz. Lösung vor Quecksilber(II)-acetat in etwa 30-proz. Natriumacetat) zur Allantoinfällung versetzt. Nach mehrstündigem Stehen wurde der Niederschlag abfiltriert, gewaschen, in 30 ccm Wasser suspendiert und mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Das Filtrat wurde i. Vak. zunächst auf etwa 10 ccm eingeeengt, nochmals filtriert und im warmen Luftstrom zur Trockne gedampft, wobei eine durchkristallisierte, etwas bräunlich gefärbte Masse (41.5 mg = 95% d. Th.) hinterblieb. Sie wurde aus möglichst wenig heißem Wasser mit etwas Tierkohle umkristallisiert und lieferte 27.6 mg farbloser Kristalle (63% d. Th.) vom Schmp. 229° (Zers.). Eine Probe selbst hergestellten Allantoins schmolz bei 232° (Zers.). Der Misch-Schmelzpunkt lag bei 229°.

6.) Bewertung der Enzymeigenatmung

Ob man zur Ermittlung des Harnsäureumsatzes generell die Enzymeigenatmung voll abziehen durfte, erschien — besonders bei größeren Werten der letzteren wie in Rohextrakten — zweifelhaft, da eine Zurückdrängung der Leeratmung in Substratgegenwart durchaus denkbar erschien. Als später erkannt worden war, daß bei Verwendung gereinigten Ferments pro Aufnahme von 1 O-Atom genau 1 Mol. Harnsäure verschwindet (Abbild. 5), wurde zur Entscheidung bei einem Rohenzym mit beträchtlicher Eigenatmung neben dem O₂-Verbrauch auch die Harnsäure-Abnahme photometrisch verfolgt, letztere in doppelten Pipettenproben. Nachstehend ist das Ergebnis eines derartigen Versuchs mit Normalansätzen wiedergegeben. Sowohl die O₂-Aufnahmen als auch die Harnsäure-Abnahmen sind in Prozente der Theorie (100% = 224 cmm O₂ bzw. 3.36 mg Harnsäure) umgerechnet worden.

Tafel II. Vergleich von Harnsäure-Abnahme und O₂-Aufnahme (mit und ohne Berücksichtigung der Enzymeigenatmung)
Jeder Ansatz enthielt 2 ccm (= 39.6 mg) Rohextrakt

Zeit (Min.)	cmm O ₂		% O ₂		Harnsäure	
	I	II	aus II	aus II—I	verblieben mg	% Abnahme
30	25	89	40	29	2.25	33
60	45	163	73	53	1.43	57
90	67	228	102	72	0.80	76
120	84	284	127	89	0.52	85

Wie ersichtlich, stimmen die in Prozenten angegebenen Harnsäure-Abnahmen weit besser mit den um die Leeratmung korrigierten (II—I) als den Brutto-O₂-Aufnahmen(II) überein, d.h. die Leeratmung darf zur Ermittlung des Harnsäureschwunds abgezogen werden⁶⁵⁾.

Die Enzymeigenatmung im obigen Versuch ist überdurchschnittlich hoch (29% des Brutto-O₂-Verbrauchs); im allgemeinen lag sie bei unseren Rohextrakten zwischen 10 und 20%.

7.) Reaktionen des Hydroperoxyds

a) Katalasespaltung: Die folgende Tafel 12 gibt ein Bild der Katalasewirksamkeit einer Ammoniumsulfatfällung (2/3-Sättigung, Q_{O₂} 98). In 4 ccm phosphatgepufferter Lö-

⁶⁵⁾ Dies scheint nicht generell zu gelten. In einem orientierenden Versuch mit einem Rohextrakt aus nichtverarmtem Mycel, dessen Eigenatmung rund 50% des Gesamt-O₂-Verbrauchs ausmachte, näherten sich die Harnsäure-Abnahmen stark den aus dem unkorrigierten O₂-Verbrauch berechneten.

sung (pH 7.0) waren zwischen 0.015 und 0.5 ccm Enzym-Lösung (Trockengew. 3.4 mg/ccm) enthalten, wozu nach Temperatúrausgleich 1 ccm $m/_{30}$ H_2O_2 zugekippt wurde. Die beiden letzten Ansätze enthielten $m/_{500}$ NH_2OH , der letzte Ansatz außerdem $m/_{250}$ Lithiumurat. Diese beiden Gefäße waren mit reinstem N_2 gefüllt.

Tafel 12. Katalasewirkung gereinigter Enzym-Lösung

ccm Enzym	cmm O_2							
	0.015	0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	0.5 + NH_2OH	0.5 + NH_2OH + Harnsäure
Zeit: 0.5 Min.	16	22	26	35	62	132		
„ 1 „	28	37	57	76	113	220		
„ 2 „	47	64	106	155	220	373		
„ 5 „	95	153	242	310	368	373	6	2
„ 10 „	167	255	356	368	368	373	9	0
„ 30 „							6	0
„ 60 „							6	0

b) H_2O_2 -Schwund in Gegenwart von NH_2OH : Normalansätzen nachgebildete Thunberg-Ansätze (5 ccm mit 1 ccm des unter a erwähnten Enzyms), die 1.0 ccm $n/_{50}$ H_2O_2 enthielten, wurden verschiedene Zeiten bei 30° incubiert und anschließend das noch vorhandene H_2O_2 jodometrisch bestimmt. Die Tafel 13 gibt die Zusammensetzung der Ansätze und die gefundenen Titrationswerte.

Tafel 13. H_2O_2 -Schwund in Gegenwart von NH_2OH

$m/_{250}$ Harnsäure $m/_{500}$ NH_2OH Enzym	ccm $n/_{50}$ H_2O_2				
	+	-	+	-	+
	-	+	+	+	+
	-	-	-	+	+
Zeit: 15 Min.	1.0	0.96	1.0	0.85	1.0
„ 30 „	0.92	0.75	0.96	0.83	1.0
„ 60 „	0.83	0.48	0.95	0.81	0.96

Bei Erhöhung der Hydroxylamin-Konzentration auf $m/_{200}$ verstärkt sich die H_2O_2 -Abnahme. So wurden im (enzymfreien) Ansatz mit Hydroxylamin allein die H_2O_2 -Werte 0.68, 0.49 und 0.18, im Ansatz mit Harnsäure + Hydroxylamin die Werte 1.0, 0.93 und 0.78 titriert.

8.) Versuche mit Chinon

a) Anaerobe Acceptorversuche: Es lief eine dreifache Reihe von Normalansätzen nachgebildeten Thunberg-Ansätzen mit jeweils 1.4 ccm $m/_{20}$ Chinon. Enzymzusatz: 1 ccm (2.9 mg) einer Ammoniumsulfatfällung (Q_{O_2} 85). Zu bestimmten Zeiten wurden je drei Ansätze nach 3b titriert (Tafel 14).

Tafel 14. Acceptorversuche mit Chinon

$m/_{250}$ -Harnsäure Enzym	ccm $n/_{10}$ Chinon (Ausgangstitier 1.38)		
	+	-	+
	-	+	+
Zeit: 15 Min.	1.33	1.14	1.10
„ 30 „	1.34	0.86	0.90
„ 60 „	1.35	0.62	0.64
„ 120 „	1.34	0.55	0.54

b) Chinonhemmung der aeroben Uricasewirkung (Tafel 15). Ansätze analog den obigen, teils mit, teils ohne Chinon.

Tafel 15. Chinonhemmung der O₂-Reaktion

m_{250} -Harnsäure m_{70} -Chinon Enzym	cmm O ₂			
	—	+	—	+
Zeit: 5 Min.	0	37	3	14
„ 10 „	0	56	6	18
„ 15 „	7	75	15	25
„ 30 „	18	121	33	51
„ 60 „	32	178	58	94

9.) Versuche mit Cytochrom

In Cüvetten luftdicht abgeschlossene Ansätze von der Art des Normalansatzes mit 0.2 ccm einer oxydierten 3.3×10^{-5} m Cytochrom c-Lösung, z.Tl. 1 ccm (3.1 mg) gereinigtes Enzym (Q_{O_2} 80) enthaltend, wurden bei 22° incubiert. Zu bestimmten Zeiten wurde das gebildete reduzierte Cytochrom c spektroskopisch (nach 3b) bestimmt. Die Ergebnisse sind in der Tafel 16 zusammengestellt.

Tafel 16. Prüfung von Cytochrom c als Acceptor

m_{250} -Harnsäure Enzym	ccm reduz. 3.3×10^{-5} m Cytochrom c		
	+	—	+
Zeit: 15 Min.	0.075	0.04	0.05
„ 30 „	0.2	0.1	0.1
„ 60 „	0.2	0.2	0.2

127. Leopold Horner und Fritz Hübennett: Studien zum Ablauf der Substitution, IV. Mitteil.**)***): Nitrierung, Entalkylierung und Diazoniumsalzbildung als Ergebnis der Einwirkung von Stickstoffdioxyd****) auf Äther

[Aus dem Institut für Organische Chemie der Universität Frankfurt/M.]

(Eingegangen am 17. März 1952)

Es wird gezeigt, daß die Einwirkung von Stickstoffdioxyd auf Äther über „Durchgangsradikale“ verläuft, deren wesentliche Merkmale charakterisiert werden. Als Hauptreaktion erfolgt die Substitution in *p*-Stellung. Nebenreaktionen sind: Entalkylierung zum Phenol unter gleichzeitiger Nitrierung in 2- und 4-Stellung sowie Einführung der Diazoniumgruppierung in *p*-Stellung. Substituenten mit „Acceptoreigenschaften“ verhindern praktisch alle 3 Reaktionen,

Vor etwa 2 Jahren hat der eine von uns in der I. Mitteil. dieser Reihe**) als Arbeitshypothese theoretische „Vorstellungen zur oxydativen Entalky-

*) Herrn Geheimrat H. Wieland in Verehrung zum 75. Geburtstag gewidmet.

**) Als I. Mitteil. dieser Reihe soll gelten: A. 566, 69 [1950], als II. Mitteil.: Angew. Chem. 62, 359 [1950], als III. Mitteil.: Angew. Chem. 63, 531 [1951].

****) Im Folgenden soll unter „Stickstoffdioxyd“ das Gleichgewichtsgemisch von Stickstoffdioxyd und Stickstofftetroxyd verstanden werden.