

produit commercial jusqu'à la première cristallisation est de 12%.

La comparaison entre les  $\alpha$ -amylases de pancréas et de bactérie montre que ces deux substances ne sont pas identiques, car les  $p_H$  optimum de l'activité, l'influence des sels sur l'activité et l'affinité pour le substratum<sup>1</sup> sont différents. L'action sur l'amidon est par contre la même pour les deux amylases.

Ce travail a été encouragé par des crédits ouverts par la Confédération en vue de créer des possibilités de travail.

K. H. MEYER, MARIA FULD et P. BERNFELD

Laboratoires de chimie inorganique et organique de l'Université de Genève, le 12 août 1947.

### Summary

The purification and crystallization of bacterial  $\alpha$ -amylase are described. It is not identical with pancreatic  $\alpha$ -amylase, but its action on starch is the same.

<sup>1</sup> P. BERNFELD et H. STUDER, à publier.

## Aktivierung einer alkalischen Phosphatase

Die Frage, ob aus einer  $\beta$ -Glycerophosphatase eine prosthetische Gruppe bzw. eine Cophosphatase reversibel abgetrennt werden kann, ist in letzter Zeit wiederholt bearbeitet worden. Daß «alkalische Phosphatasen» durch  $Mg^{++}$  aktiviert werden, wurde schon 1927 in diesem Institut<sup>1</sup> nachgewiesen. Analoge Wirkungen des  $Mn^{++}$  stellten J. ROCHE und Mitarbeiter<sup>2</sup> fest. Später hat H. ALBERS<sup>3</sup> auf Grund von Versuchen, welche von seinen 1935 hier ausgeführten Arbeiten<sup>4</sup> durchaus unabhängig sind, Cofermentwanderungen angenommen, bei welchen eine Holophosphatase ihr Coenzym an eine zweite Apophosphatase abgibt, so daß also der Aufbau einer neuen Phosphatase postuliert wird<sup>5</sup>. Einige Jahre später schrieb D. ALBERS<sup>6</sup>, daß es ihm gelungen sei, durch Dialyse aus einer alkalischen Phosphatase ein Coenzym abzutrennen, welches wieder ein Apoenzym aktiviert, und ähnliche Angaben machte A. RUFFO<sup>7</sup>. Spezielle Vorstellungen über die Konstitution der alkalischen Phosphatasen hat dann R. CLOETENS<sup>8</sup> entwickelt.

Die Entscheidung, ob solche Cophosphatasen, wie die beschriebenen, tatsächlich existieren, erscheint um so wichtiger, als hochgereinigte Präparate von  $\beta$ -Glycerophosphatase auch aus Nukleotiden  $PO_4$  abspalten und das Coenzymproblem auch die Nukleotidasen betrifft. Vermutlich besitzen auch die alkalischen Phosphatasen einen hohen Grad von Substratspezifität.

Die Reinigung unserer Darmphosphatase beschreiben wir an anderer Stelle und kommen dann auf die bemerkenswerten Ergebnisse von J. ROCHE und seiner Mitarbeiter<sup>9</sup> zurück, nach welchen die alkalische Phos-

phatase ein Metallprotein ist und durch Alanin aktiviert wird<sup>1</sup>.

Auf eine vorhergehende Untersuchung von EULER, HAHN und SALUSTE<sup>2</sup> über  $\beta$ -Glycerophosphatase aus Darmschleimhaut von Kalb verweisend, konzentrieren wir uns hier auf die Beschreibung von Dialyse- und Elektrophoreseversuchen, welche sich auf den Nachweis einer Cophosphatase beziehen.

### Methodik

**Substrate.** Reines  $\beta$ -Glycerophosphat verdanken wir Herrn Direktor Dr. O. BAILLY, Montreuil-sur-Bois.

Die  $PO_4$ -Abspaltung wurde bei  $p_H = 9,2$  in  $NH_3 - NH_4Cl$ -Pufferlösung unter Zugabe von Magnesiumsulfat bei 37° C kolorimetrisch im Stufenphotometer verfolgt. Das früher beschriebene Verfahren wurde insofern modifiziert, als die Menge des zugesetzten Magnesiums auf das Dreifache erhöht wurde (0,5 ml Mg-Azetatlösung enthaltend 3 mg Mg/ml pro Ansatz). Auf diese Weise wird auch bei weitgehender Spaltung und Ausfällen von  $MgNH_4PO_4$  ein Überschuß von Mg gesichert. Das Abbrechen der Enzymreaktion erfolgte durch Zusatz von 2 ml 0,5% Ammoniummolybdatlösung in 3% Schwefelsäure + 5% Trichloressigsäure.

Als Maß der Aktivität wurde, wie in der früheren Mitteilung, der reziproke Wert der Zeit (Minuten) gewählt, der zur Abspaltung von 10% Phosphat durch 1 ml Enzymlösung erforderlich ist.

**Spezifische Aktivität** = Aktivität per mg Trocken-substanz.

Über absolute Aktivitäten von Alkali-Phosphatase-Präparaten ist bisher wenig bekanntgeworden. Die von H. ALBERS<sup>3</sup> berechnete Einheit entspricht 0,1 unserer an  $\beta$ -Glycerophosphat gemessenen Einheit ( $\beta$ -glph. Einh.), unter Voraussetzung, daß die  $PO_4$ -Abspaltung zwischen 0 und 10% Substrat linear verläuft. H. ALBERS gab für seine Präparate 40–80, im besten Fall 108 Einheiten an. Diese Zahlen entsprechen also 4–8 bzw. 10,8 unserer  $\beta$ -glph. Einheit, während unser elektrophoretisch gereinigtes Präparat 25  $\beta$ -glph. Einheiten enthält.

### Dialyse

Diese Versuche wurden bei 10° C ausgeführt, und zwar wurde ein elektrophoretisch gereinigtes Präparat

- A gegen fließendes Wasserleitungswasser ( $p_H = 6$ ),
- B gegen fließenden Azetatpuffer,  $p_H = 4,5$ , Ionenstärke 0,01, und
- C gegen fließenden Boratpuffer,  $p_H = 10,5$ , Ionenstärke 0,01, dialysiert.

Dialysendauer im Versuch A 96 Stunden, in den Versuchen B und C 48 Stunden. Nach beendeter Dialyse wurde die Aktivität mit der bei gleicher Temperatur aufbewahrten undialysierten Enzymlösung verglichen. Im Versuch A wurde der Gehalt an Trockensubstanz vor und nach der Dialyse ermittelt.

	Aktivität per ml Lösung	Abnahme der Aktivität in % der Ausgangs-Aktivität	Spezifische Aktivität
Vor Dialyse . .	6,5–7,2	0	8,0
Nach Dialyse A	5,5	19	7,9
B	1,4	79	–
C	5,2	23	–

### Elektrophorese

Der hierzu verwendete Apparat ist eine Vergrößerung des von HAHN und TISELIUS<sup>4</sup> beschriebenen Mehrzellen-

<sup>1</sup> Siehe hierzu: C. A. ELVEHJEM und E. B. HART, J. biol. Chem. 134, 425 (1940).

<sup>2</sup> H. v. EULER, L. HAHN und E. SALUSTE, Svensk Vet. Akad. Ark. f. Kemi 24 A, Nr. 5 (1946).

<sup>3</sup> H. ALBERS, Z. physiol. Chem. 261, 43 (1939).

<sup>4</sup> L. HAHN und A. TISELIUS, Biochem. Z. 314, 336 (1943).

<sup>1</sup> H. ERDTMAN, Z. physiol. Chem. 172, 182 (1927); 177, 211 (1928).

<sup>2</sup> J. ROCHE, C. R. Soc. Biol. 139, 807 (1944). – J. ROCHE und Mitarbeiter, C. R. Acad. Sci. 219, 102 (1944).

<sup>3</sup> H. ALBERS, Z. Angew. Chem. 49, 448 (1936); Ber. Dtsch. chem. Ges. 71, 1913 (1938).

<sup>4</sup> H. und E. ALBERS, Z. physiol. Chem. 232, 165 und 189 (1935).

<sup>5</sup> H. ALBERS, Zbl. inn. Med. 63, 111 (1941).

<sup>6</sup> H. ALBERS, Z. physiol. Chem. 261, 43 und 269 (1939).

<sup>7</sup> A. RUFFO, Boll. Soc. Ital. Sper. 19, 9 (1941).

<sup>8</sup> R. CLOETENS, Naturwiss. 28, 252 (1940). – Siehe auch: ERWIN BAUER, Z. physiol. Chem. 248, 213 (1937). – F. CEDRANGOLO, Arch. Sci. Biol. 23, 504 (1937).

<sup>9</sup> J. ROCHE, NGUYEN-VAN THOAI und M. ROGER, C. R. Acad. Sci. 222, 246 (1946). – Arch. intern. Physiol. 54, 209 (1946).

apparates, und faßt je nach Bedarf 200–1000 ml. Es wurden 200 ml der gereinigten Phosphatase-Lösung während 40 Stunden bei  $p_H$  8 der Elektrophorese unterworfen. Dieses  $p_H$  wurde in den Separationszellen mittels Durchspülung der Elektrodenzellen mit 0,01 m  $NH_4OH-NH_4Cl$ -Puffer von  $p_H$  9,6 erzielt. Stromstärke 33 mA. Aktivitätsbestimmungen ergaben 79,5 % der Aktivität in der Anodenzone und 20,5 % in der Kathodenzone. Wie ersichtlich, ist die gesamte Ausgangsaktivität nach der Elektrophorese wiedergefunden worden. Dagegen hat der Trockensubstanzgehalt der Gesamtlösung während der Elektrophorese durch Herauswandern der niedermolekularen Bestandteile abgenommen. Folgende Zahlen machen die Zunahme der spez. Aktivität ersichtlich.

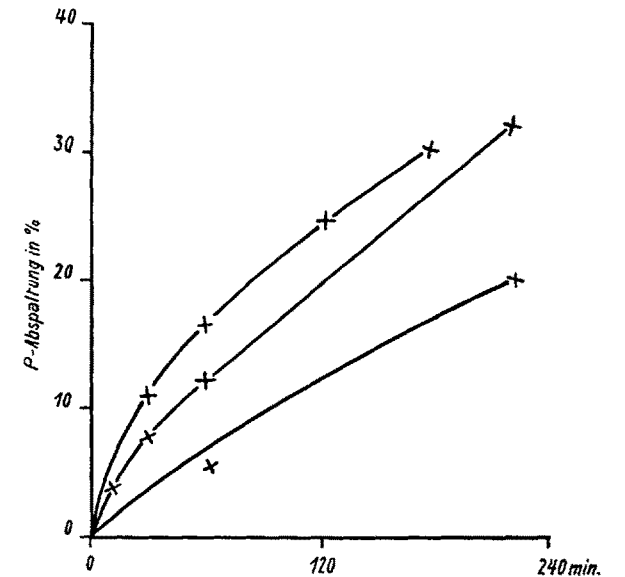
	Aktivität per ml	Spezifische Aktivität
Ausgangslösung . . . . .	11,1	2,98
Nach Elektrophorese { Anodenlösung . . . . .	7,4	25,7
Kathodenlösung . . . . .	2,0	7,3

Aktivierung der Phosphatase durch thermisch inaktivierte Enzymlösung

Ein Teil der elektrophoretisch gereinigten Phosphatase-Lösung wurde 1 Minute auf 100° C erhitzt. Diese Lösung erwies sich als vollständig inaktiv und wurde zu folgenden Versuchen verwendet:

- A: 7,7 ml wurden mit 1,3 ml unbehandelter Enzymlösung vermischt.
- B<sub>1</sub> und B<sub>2</sub>: 10,0 ml wurden mit 1,4 ml Phosphatase-Lösung, die durch Dialyse bei  $p_H$  4,5 teilweise inaktiviert wurde, vermischt.
- C: wie B, jedoch wurde die Mischung 24 Stunden bei Zimmertemperatur und darauffolgend 48 Stunden im Kühlschrank aufbewahrt.
- D: wie B, jedoch wurden 2 ml hitzeinaktivierte Enzymlösung statt 10 ml verwendet.

Die Aktivität dieser Mischungen wurde verglichen mit der am gleichen Tage gemessenen Aktivität der entsprechenden Mengen von Enzymlösung, zu welcher kein Kochsaft zugesetzt wurde.



Die durch die Kurven dargestellten Enzymlösungen sind (von oben): undialysiert; aktiviert durch Kochsaft; dialysiert.

Die Figur zeigt den Reaktionsverlauf der  $PO_4$ -Abspaltung im Versuch D.

Tabelle I

Versuch	Aktivität per ml Lösung		Zunahme der Aktivität in %
	Ohne Zusatz	plus Kochsaft	
A	4,05	5,65	39
B <sub>1</sub>	0,85	1,63	92
B <sub>2</sub>	0,68	1,43	110
C	0,76	1,70	123
D	0,72	1,55	115

Zusatz veraschter Enzymlösung. 10 ml elektrophoretisch gereinigte Phosphatase-Lösung wurden eingedunstet und mit Schwefelsäure verascht. Die Sulfatasche wurde in 5 ml warmer 1 n. HCl-Lösung gelöst, worauf die Lösung mit KOH neutralisiert wurde. Es wurden nun 0,6 ml der elektrophoretisch gewonnenen + -Lösung zugesetzt und die Bestimmung wie üblich ausgeführt. Parallelversuch wurde mit 0,6 ml der gleichen + -Lösung allein gemacht.

Substrat: Na- $\beta$ -Glyzerophosphat in Ammoniakpuffer  $p_H$  9,2 in Mg-Azetat in den üblichen Konzentrationen.

Tabelle II

Enzymlösung I mit Aschenzusatz			
Min.	Extinktion	$\gamma P$	% P
0	0,421	34,8	12,2
30	0,676	55,8	19,5
60	0,776	64,1	22,4
180	1,201	99,3	34,7
Enzymlösung II ohne Aschenzusatz			
Min.	Extinktion	$\gamma P$	% P
0	0,173	14,3	5,0
30	0,404	33,4	11,7
60	0,576	47,6	16,7
180	1,022	84,5	29,6

Da die Asche selbst ohne Wirkung ist, erhält man nach Korrektur für das freie  $PO_4$ , das in der Enzymlösung und im Substrat enthalten ist, folgende Werte für die  $PO_4$ -Abspaltungszeiten:

- Abspaltungszeiten:
- 10%ige Spaltung:
    - Enzymlösung I 52 Minuten Konst. = 3,2
    - Enzymlösung II 48 Minuten Konst. = 3,5
  - 20%ige Spaltung:
    - Enzymlösung I 142 Minuten Konst. = 1,18
    - Enzymlösung II 134 Minuten Konst. = 1,25

Der Effekt des Aschenzusatzes ist also sehr gering; die Wirkung der thermisch inaktivierten Enzymlösung kann also nicht auf die darin enthaltenen Metallsuren zurückgeführt werden.

Die gemessene Aktivierung unserer alkalischen Darmphosphatase muß durch einen organischen, thermisch abspaltbaren Bestandteil des durch Dialyse und elektro-

phoretisch gereinigten Phosphatasepräparates bewirkt worden sein.

Frl. Ingenieur BARBRO EK danken wir für wertvolle Mitarbeit.

H. v. EULER und L. HAHN

Institut für organisch-chemische Forschung der Universität Stockholm, den 14. August 1947.

### Summary

$\beta$ -Glycerophosphatase prepared from the intestinal mucosa of the calf was purified by fractionated precipitation with alcohol. A further concentration of the enzyme activity was attained by electrophoresis.

The activity of the purified enzyme solution was reduced to  $\frac{1}{3}$  of its original value when dialysed for 48 hours at  $p_H$  4.5. At  $p_H$  6 and at  $p_H$  10.5 only a less pronounced decrease of the activity occurred.

By addition of heat-inactivated  $\beta$ -glycerophosphatase to the enzyme solution which was partly inactivated by dialysis at  $p_H$  4.5 the activity of the latter was increased by about 100%.

### In-vitro-Versuche über die Methämoglobinbildung durch Chinonderivate

HEUBNER<sup>1</sup> führt die Reaktion des Hämoglobins bzw. Oxyhämoglobins mit chinoiden Substanzen auf das Bestehen einer Spannung zwischen zwei Oxydations-Reduktions-Systemen zurück.

Da bei den Chinonen nach DIMROTH<sup>2</sup> eine annähernd «dynamisch homologe Reihe» vorliegt, müßten die Chinone untereinander in ihrer Fähigkeit zur Methämoglobinbildung der von DIMROTH angegebenen Formel

$$\log \frac{k_2}{k_1} = m (E_2 - E_1)$$

entsprechen, wenn diese Fähigkeit tatsächlich nur vom Oxydations-Reduktions-Potential der beteiligten Systeme abhängig wäre. In der Formel bedeuten  $k_1$  und  $k_2$  die Gleichgewichtskonstanten

$$k = \frac{[\text{Methämoglobin}] \cdot [\text{Hydrochinon}]}{[\text{Hämoglobin}] \cdot [\text{Chinon}]}$$

für die beiden zu vergleichenden Chinone,  $E_1$  und  $E_2$  die Oxydations-Reduktions-Potentiale, die ja für die meisten Chinone bekannt sind, und schließlich  $m$  einen konstanten Proportionalitätsfaktor.

Im Rahmen unserer Untersuchungen über die biochemischen Eigenschaften der Chinone erschien uns eine Prüfung dieser Verhältnisse als notwendig. Bei den Versuchen verwendeten wir Hundeblut, das aus einer Beinvene entnommen wurde. Die Wirkung der Chinone wurde sowohl an durch Hämolyse freigesetztem Hämoglobin als auch an unversehrten Erythrozyten untersucht. Die Methämoglobinbestimmung wurde im Havemann-Kolorimeter<sup>3</sup> nach einer Vorschrift von HAVEMANN, JUNG und v. ISSEKUTZ jun.<sup>4</sup> gemessen. Die Messungen wurden nach verschiedenen Zeitabständen vorgenommen; nach 5 Stunden wurden die Versuche abgebrochen, da etwa nach dieser Zeit mit störenden Neben-

reaktionen zu rechnen ist. Die kolorimetrische Messung ist nur mit hämolysiertem Blute möglich, weshalb wir bei den Messungen an unversehrten Erythrozyten diese nachträglich hämolysieren mußten. Zur Ausschaltung einer Einwirkung der Chinone mit dem freigesetzten Hämoglobin wurden die Erythrozyten vor der Hämolyse dreimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen.

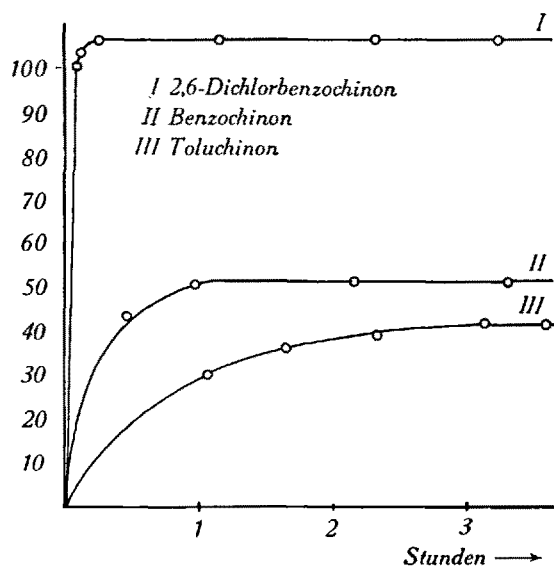


Fig. 1. Ordinate: mg Methämoglobin/100 cm<sup>3</sup>.

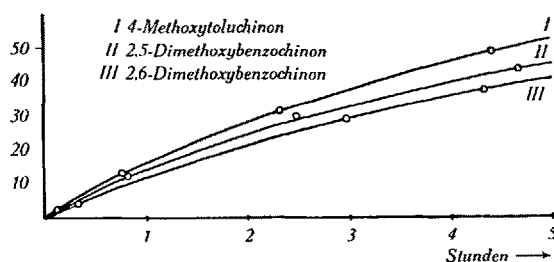


Fig. 2. Ordinate: mg Methämoglobin/100 cm<sup>3</sup>.

Die Standardblutlösung, die in der Hauptversuchsreihe zur Anwendung gelangte, enthielt  $0,8 \cdot 10^{-4}$  Äquivalente Hämoglobin im Liter. Zur Erreichung von Gleichgewichten erwies es sich am günstigsten, die Chinone im dreifachen Überschuß zuzusetzen. Da 1 Mol Chinon theoretisch imstande ist, 2 Äquivalente Hämoglobin zu oxydieren, wurde eine Chinonkonzentration von  $1,2 \cdot 10^{-4}$  Mol/l angewandt. Wir arbeiteten bei 9° und  $p_H = 6,8$  (Phosphatpufferlösung). Wegen der geringen Wasserlöslichkeit mancher Chinone enthielten sämtliche Versuchsansätze 12% Äthylalkohol. Vergleichsversuche mit rein wässrigen Lösungen ergaben nur geringe Unterschiede gegenüber unserer Hauptversuchsreihe.

Unsere Absicht, gut vergleichbare Gleichgewichte zu erhalten, ließ sich nicht überall verwirklichen. Einige Chinone mit niedrigem Oxydations-Reduktions-Potential ergaben keine Gleichgewichtseinstellung; die Zeit-Konzentrationsdiagramme zeigen in diesen Fällen ein stetes Ansteigen der Methämoglobinkonzentration ohne Erreichung eines stationären Zustandes. In den anderen Fällen wurden ausgezeichnet reproduzierbare Gleichgewichte erhalten. Die Ergebnisse der Hauptversuchsreihe sind in Zeit-Konzentrationsdiagrammen in den Figuren 1–4 dargestellt.

<sup>1</sup> W. HEUBNER, Erg. Physiol. 43, 9 (1940).

<sup>2</sup> O. DIMROTH, Z. angew. Chem. 46, 571 (1933).

<sup>3</sup> P. HAVEMANN, Biochem. Z. 301, 105 (1939).

<sup>4</sup> P. HAVEMANN, F. JUNG und B. v. ISSEKUTZ jun., ib. 306, 224 (1940).