

und spült sie ganz vorzüglich ab; nach kurzer Zeit fließt die Lösung bei A farblos. Man spritzt nun das Rohr noch äußerlich ab, und die Destillation ist beendet. Die Lösung in der Flasche titriert man in bekannter Weise zunächst soweit, bis sich bei mäßigem Schwenken der offenen Flasche die wäßrige Schicht nicht mehr anfärbt, verstopft die Flasche, schüttelt sie kräftig und wiederholt dies nach jedem Reagens-Zusatz, bis beide Schichten farblos sind; der Umschlag ist außerordentlich scharf und deutlich.

In zwei Fällen können gegen diese Arbeitsweise gewisse Bedenken bestehen: wenn die Stoffe zu leicht oder zu schwer mit der Salzsäure reagieren<sup>3)</sup>; in beiden Fällen kann die gleiche, geringfügige Änderung der Anordnung jede Gefahr vermeiden. Man läßt bei E einen Tropftrichter T<sub>2</sub> durchschmelzen, der zentral durch den Kolbenhals geht und dessen Spitze gerade eben in den Kolben hineinragt. Dann kann man erstens den Apparat mit Substanz, Tetrachlorkohlenstoff, Jodid-Lösung beschicken und darauf erst die Salzsäure einfließen lassen, so daß unmöglich Chlor entweichen kann, anderseits kann man, wenn bei schwer zersetzbaren Stoffen die ersten 5 ccm Salzsäure nicht ausreichen sollten, davon nachfüllen. Da man selbstverständlich auch den Tetrachlorkohlenstoff zum Nachspülen durch T<sub>2</sub> einführen kann, ist bei dieser Anordnung T<sub>1</sub> entbehrlich; es entfällt damit nur die Möglichkeit, auf beendete Zersetzung zu prüfen.

Zur Erprobung wurde eine Manganlösung mit Wasserstoffsuperoxyd und Natronlauge gefällt, der Niederschlag auf dem Wasserbade getrocknet, sehr gut verrieben und nun Proben davon einerseits durch unmittelbares Lösen in schwach saurer Jodid-Lösung, anderseits durch Destillation bestimmt; in beiden Reihen wichen die Einzelbestimmungen vom Mittel aller Werte um höchstens 1 Tropfen n/10-Lösung ab. Es wurden ferner verschiedene Braunstein-Proben von Studierenden im Praktikum analysiert; die erhaltenen Werte stimmten durchweg unter sich und mit den Sollwerten befriedigend überein, und zwar ohne einen einzigen Mißerfolg.

Frankfurt a. M., Chem. Institut d. Universität.

#### 84. James B. Sumner:

#### Über die Reinigung der Urease durch Krystallisation und über die elementare Zusammensetzung der Krystalle.

[Aus d. Biochem. Institut d. Universität Stockholm.]

(Eingegangen am 6. Januar 1930.)

Nachdem ich in früheren Arbeiten<sup>1)</sup> hatte zeigen können, daß Urease-Präparate von sehr hohem Reinheitsgrad in Krystallform gewonnen werden können, war es der Zweck dieser Untersuchung, Reinheit und Aktivität der Krystalle noch weiter zu steigern und womöglich auf ein Maximum zu

<sup>3)</sup> Die Gefahr, daß aus leicht reagierenden Gemischen Chlor entweicht, bevor der Kolben an den Apparat angesetzt wird, ist gering, weil der Tetrachlorkohlenstoff Chlor sehr gut löst; man wird aber bei leicht zersetzlichen Stoffen vorteilhaft schon vor dem Ansetzen des Kolbens den Apparat mit Jodid-Lösung bis über H füllen, indem man S vorübergehend mit einem Stopfen verschließt.

<sup>1)</sup> Sumner u. Hand, Journ. biol. Chem. **76**, 149 [1928]. — Sumner u. Holloway, ebenda **79**, 489 [1928].

bringen, und diese Präparate hinsichtlich ihrer elementaren Zusammensetzung zu untersuchen.

Ausgangsmaterial: Jack-Bohnen-Mehl. Wie in meinen früheren Mitteilungen nachgewiesen war, sind gewisse Jack-Bohnen urease-reicher als andere, ferner können manche Arten von Jack-Bohnen Urease in großen Mengen enthalten, aber in solchem Zustande, daß das Enzym aus dem Mehl nur schwierig mit Aceton extrahiert werden kann. Es ist somit notwendig, ein besonders geeignetes Jack-Bohnen-Mehl als Ausgangsmaterial zu wählen, wenn man die von mir beschriebenen hochaktiven Krystalle in guter Ausbeute erhalten will<sup>2)</sup>.

Prof. Albert Muller hatte die Freundlichkeit, Jack-Bohnen für mich in Mayaguez, Porto Rico, keimen zu lassen, wobei Bohnen ausgesät wurden, welche ich früher reich an Urease gefunden hatte, und aus welchen Urease nach unseren Versuchen leicht extrahierbar war. Der dortige Boden und die klimatischen Bedingungen waren mir als günstig beschrieben worden, und es wurde auch eine ausgezeichnete Ernte erhalten. Um gute Ausbeuten an den hochaktiven Krystallen aus Jack-Bohnen-Mehl zu erhalten, ist es notwendig, Mehl von möglichst feiner Verteilung zu verwenden. Eine Voraussetzung ist, daß das Mahlen der Bohnen ohne Erhitzen durchgeführt wird, und daß durch die angewandte Mahlmaschine keine Schwermetalle, wie Kupfer, in das Produkt hinein gelangen. Da die Schalen der Jack-Bohnen keine Urease enthalten, ist es vorteilhaft, diese vor dem Mahlen zu entfernen. Dieser Dienst ist mir von der Arlington Chemical Company of Yonkers New-York, geleistet worden, welche die Bohnen unter Ausschluß der Schalen mahlen. Dieses Produkt lieferte eine hohe Ausbeute an Krystallen; es unterschied sich aber von dem Mehl, welches ich 1926 angewandt hatte, darin, daß es einen ziemlich schweren Niederschlag von amorpher Eiweiß-Verunreinigung gleichzeitig mit den Krystallen lieferte.

Darstellung der hochaktiven Krystalle: Dieselben wurden, wie bereits früher<sup>3)</sup> beschrieben, gewonnen, indem ich 8 Portionen von je 100 g des Mehles gleichzeitig verarbeitete. Das Filtrat ließ ich in einem Eiskasten 2 Tage, manchmal 3 Tage stehen, um die Ausbeute zu vermehren. Ein langes Aufbewahren des Filtrates vor dem Zentrifugieren macht es notwendig, eine größere Menge von Eiweiß-Verunreinigung abzuscheiden, und ist deswegen von zweifelhaftem Wert. Nach dem Zentrifugieren des Niederschlages, welcher die Krystalle enthält, wurde das Material 2-mal gewaschen, indem es mit eiskaltem 32-proz. Aceton aufgeführt wurde, welches ein wenig Phosphat von  $pH = 5.9$  enthielt; dann wurde wieder zentrifugiert. Die Lösung der Krystalle in 40—45 ccm eiskaltem Wasser war mit suspendierten Stoffen stark verunreinigt; es war etwa  $1\frac{1}{2}$ -stdg. Zentrifugieren nötig, um die gröberen Anteile abzuscheiden. Um das Präparat auf tiefer Temperatur zu halten, wurde das Zentrifugieren jedesmal nur 10 Min. lang fortgesetzt und durch 15 Min. langes Abkühlen unterbrochen. Eine vollständige Klärung der Lösung durch Zentrifugieren konnte nicht erreicht werden; sie wäre möglich gewesen, wenn eine kräftige Zentrifuge innerhalb eines Eiskastens hätte verwendet werden können.

Das Umlösen der Krystalle geschah in der bereits beschriebenen Weise<sup>4)</sup>. Hierauf wurden, falls weiteres Umkrystallisieren nicht beabsichtigt war, die Krystalle abzentrifugiert.

<sup>2)</sup> Ich möchte auch an dieser Stelle der Heckscher-Stiftung, begründet von Aug. Heckscher an der Cornell-Universität, meinen Dank ausdrücken für die Übernahme der Kosten für die Keimung und das Mahlen der Bohnen.

<sup>3)</sup> Sumner, Journ. biol. Chem. **69**, 935 [1926].

<sup>4)</sup> Sumner, Journ. biol. Chem. **70**, 97 [1926].

fugiert und einmal gewaschen, indem sie mit ein wenig eiskaltem 35-proz. Aceton aufgerührt und dann wieder zentrifugiert wurden. Die überstehende Flüssigkeit, soweit sie nicht aus den Zentrifugen-Röhren abtropfte, wurde mit reinem Filtrierpapier sorgfältig abgesaugt. Alles bei diesen Arbeiten verwendete Wasser war durch Umdestillieren in einem Glaskühler gereinigt worden.

Versuch I: Die Urease wurde einmal umkrystallisiert, und nach dem Waschen mit 35-proz. Aceton wurden die Krystalle in 32 ccm Wasser wieder aufgelöst. Die Lösung war trübe und wurde durch Zentrifugieren von suspendierten Stoffen befreit; es war aber nicht möglich, sie in dieser Weise vollkommen wasserklar zu erhalten.

Die Aktivität der Urease wurde bestimmt, indem 1 ccm, abgemessen in einer Folin-Ostwald-Pipette, mit 400 ccm einer 2-proz. Lösung von Gummi arabicum versetzt und wie üblich geprüft wurde. Ferner wurde 1 ccm der Lösung in einem gewogenen Platintiegel pipettiert und auf dem Wasserbade bei 95° und dann in einem Exsiccator getrocknet. Der Trockengehalt betrug 5.2 mg; aus dem Wert von 598 meiner früher benutzten Aktivitäts-Einheiten<sup>5)</sup> per ccm wurde errechnet, daß dieses Urease-Präparat 114000 Einheiten per g enthielt. Später ergab eine Aschen-Bestimmung 2% Asche. Berechnet man die Aktivität des Materials auf aschen-freie Substanz, so ergeben sich 116000 Einheiten per g (es soll hiermit natürlich nicht entschieden werden, ob die Asche ganz oder teilweise Verunreinigung ist oder zur Urease gehört).

Die übrige Urease-Lösung wurde in einer Krystallisierschale bei 95° im Wasser-Trockenschrank getrocknet. Der Rückstand wurde dann mit einiger Schwierigkeit mittels eines Nickelspatels abgeschabt und hierauf in Präparaten-Röhrchen über Phosphor-pentoxyd zur Analyse getrocknet.

Versuch II: Mein zweites Urease-Präparat bildete nach dem zweiten Umkrystallisieren kleine Krystalle, welche nicht ohne Schwierigkeit abzentrifugiert werden konnten. Während des langwierigen Zentrifugierens verdampfte so viel Aceton aus der Flüssigkeit, daß die Krystalle sich zum Teil wieder auflösten. Dies verursachte eine geringe Ausbeute. Auf Grund dieser Erfahrung wurden dicht anliegende Papierhüllen über die Zentrifugen-Röhren gestülpt; in späteren Versuchen wurden diese Hüllen stets verwendet, wodurch die Urease-Lösung auch vor hineinfallenden Stoffteilchen geschützt wurde.

Die beim zweiten Umkrystallisieren erhaltenen Krystalle wurden 3-mal umgelöst. Nach Waschen mit 35-proz. Aceton wurden die Krystalle in Wasser aufgelöst und die Lösung möglichst klar zentrifugiert, was aber nicht vollständig gelang. Ein aliquoter Teil wurde auf enzymatische Aktivität hin untersucht, der Rückstand wurde in einem Platintiegel getrocknet und später verascht. Die Asche betrug 1%, und die Aktivität dieser Probe, auf aschen-freie Substanz berechnet, war 128000 Einheiten per g. Dieser Wert stimmt gut mit demjenigen von 129000 Einheiten per g überein, welchen ich früher<sup>6)</sup> für meine aktivsten Krystalle gefunden habe.

Versuch III: Die dritte Urease-Portion wurde 2-mal umkrystallisiert. Während des ersten Umlösens wurden 4 Quantitäten von großen und wohl ausgebildeten Krystallen erhalten. Der vierte Anteil wurde erhalten durch Zufügen von einigen Tropfen 0.4-molaren sekundären Natriumcitrates von der angenäherten Acidität  $p_H = 5$ . Es erschien von Interesse, die letzte Krystallisation einzeln zu analysieren und zu sehen, ob die Aktivität per Gewicht-Einheit von den früheren Werten abweichen würde. Als diese Krystalle in Wasser gelöst wurden, gaben sie eine Lösung von vollkommener Klarheit. Dies ist meiner Ansicht nach darauf zurückzuführen, daß die drei vorhergehenden Krystallisationen alle suspendierten Verunreinigungen mit

<sup>5)</sup> Auf den Vergleich dieser empirischen Einheit mit Einheiten vom Typus Xf soll in einer anderen Mitteilung zurückgekommen werden.

<sup>6)</sup> Sumner u. Hand, Journ. biol. Chem. 76, 149 [1928].

sich niedergeschlagen hatten. In diesem Zusammenhang ist es von Interesse, festzustellen, daß Urease-Lösungen, welche aus besonders gutem Mehl 1929 gewonnen waren, durch kurzes Zentrifugieren ebenfalls leicht wasserklar erhalten wurden.

Die Enzymlösung wurde wie gewöhnlich getrocknet; das Gesamtgewicht wurde zu 37.8 mg festgestellt und die Aktivität aus den Analysen zu 4910 Einheiten berechnet. Das Gewicht der Asche betrug 1.6%. Berechnet auf aschen-freie Substanz, war also die Aktivität 132000 Einheiten per g. Dieser hohe Wert ist zweifellos teilweise darauf zurückzuführen, daß die Lösung keinerlei verunreinigende Suspension enthält. Die Tatsache, daß der letzte Anteil der Krystalle, welche aus der Lösung abgeschieden wurden, durchaus ebenso aktiv war wie die ganze Fällung, deutet darauf hin, daß die Krystalle die Urease nicht als Verunreinigung enthalten. Wenn das Enzym eine absorbierte Verunreinigung der Krystalle wäre, würde man erwarten müssen, daß die ersten Krystalle den größten Betrag des Enzyms enthielten, und daß die letzten Krystalle ärmer an dieser aktiven Verunreinigung wären. Allerdings ist dabei stets mit der gleichen Aceton-Wasser-Mischung gearbeitet worden; aber bei jedem Umlösen wurde eine nicht geringe Menge sehr wenig aktiver und nicht krystallisierter Substanz abgeschieden, worauf eben die Reinigung durch Krystallisation beruht. Die drei ersten Ausbeuten an Krystallen wurden vereinigt, in eiskaltem Wasser gelöst und nach Zufügen von soviel Aceton, daß die Lösung 32-proz. wurde, ein geringes Volumen Phosphat-Lösung ( $p_H = 5.9$ ) in 32-proz. Aceton zugefügt. Nachdem diese Mischung über Nacht auf Eis gestanden hatte, hatten sich keine Krystalle gebildet, hingegen war der größte Teil der suspendierten Verunreinigung, welche ich früher nicht hatte abzentrifugieren können, nunmehr niedergeschlagen. Deshalb wurde die Lösung wieder zentrifugiert und dadurch fast vollkommen geklärt. Der Niederschlag erwies sich als inaktiv und wurde verworfen. Dieses Verfahren scheint mir wert, in die Methodik eingeführt zu werden, um die suspendierten Stoffe zu entfernen. Nun wurde mehr Aceton-Phosphat während einer Periode von 3 Tagen zugegeben, wodurch eine Ausbeute an großen und gut ausgebildeten Krystallen erhalten wurde. Nachdem einmal mit 35-proz. Aceton gewaschen worden war, um Phosphate zu entfernen, löste ich die Krystalle in Wasser und erhielt eine Lösung, welche zwar nicht vollkommen klar, aber doch klarer war als sonst. Die Lösung wurde durch Zentrifugieren vollkommen geklärt, ein aliquoter Teil auf enzymatische Aktivität untersucht und der Rückstand wie gewöhnlich getrocknet. Totalgewicht desselben 119.1 mg. Aus der Aktivität wurde berechnet, daß dieses Material 133400 Urease-Einheiten per g enthält. Das getrocknete Enzymmaterial wurde von der Glasschale in Präparaten-Röhrchen zur Analyse übergeführt.

Ergebnisse der Analysen: Bei Mikroanalysen nach Pregl wurden die nachstehend erhaltenen Werte gewonnen: A ist die einmal umkrystallisierte Urease des Versuchs I, mit B wird die zweimal umkrystallisierte Urease des Versuchs III bezeichnet.

- A) C 52.1, H 7.2, N 15.4, S 1.3 (24.1% O, 2% Asche).  
B) „ 51.6, „ 7.1, „ 16.0, „ 1.2.

Diese Zahlen zeigen, daß die gewonnenen krystallinischen, hochaktiven Urease-Präparate I und III die typische Zusammensetzung eines Proteins besitzen. Die Zahlen deuten auch darauf hin, daß Nicht-

Proteinstoffe höchstens in so kleiner Konzentration anwesend sind, daß sie sich dem Nachweis durch die Elementaranalyse der Gesamtsubstanz entziehen.

#### Ergebnisse.

Aus Jack-Bohnen-Mehl wurden Krystalle von sehr hoher Urease-Aktivität dargestellt, und es konnte gezeigt werden, daß die Aktivität der Krystalle nach 1-, 2- oder 3-maligem Umlösen nicht abnahm, sondern im Gegenteil etwas zunahm. Wäre die Aktivität der Krystalle durch verunreinigende bzw. adsorbierte Urease bedingt, so wäre eine Abnahme der Aktivität beim Umlösen zu erwarten.

Zwei hochaktive Präparate der erwähnten Krystalle, von denen das eine einmal, das andere zweimal umgelöst war, erwiesen sich auf Grund der Elementaranalyse als Proteine.

### 85. N. M. Carter<sup>1)</sup>: Notiz über Synthese des $\beta$ -Phenol-glucosids.

[Aus d. Kaiser-Wilhelm-Institut für Leder-Forschung in Dresden.]

(Eingegangen am 21. Januar 1930.)

Die Phenol-glucoside bzw. ihre Tetracetylverbindungen sind bisher durch Behandlung von Aceto-halogenglucosen mit Phenol-kalium<sup>2)</sup> oder mit einer Lösung des betreffenden Phenols in alkohol. Alkali<sup>3)</sup> oder Chinolin<sup>4)</sup> erhalten worden. Silbercarbonat als Kuppelungsmittel scheint hierfür noch nicht angewendet zu sein.

Infolgedessen versuchte ich, aus Aceto-bromglucose und verschiedenen Phenolen mittels Silbercarbonats die Tetracetyl-glucoside zu gewinnen. Im Falle des Phenols habe ich unschwer als Hauptprodukt Tetracetyl- $\beta$ -phenol-*d*-glucosid erhalten. Aber mit substituierten Phenolen, z. B. *p*-Kresol und Eugenol, waren meine Versuche erfolglos. Es trat Oxydation des substituierten Phenols durch das Silbersalz ein.

Tetracetyl- $\beta$ -phenol-glucosid: Eine Lösung von 2 g getrocknetem Phenol und 2 g Aceto-bromglucose in 10 ccm wasser-freiem Benzol wurde nach Zugabe von 2 g trockenem Silbercarbonat etwa 2 Std. geschüttelt, bis die Kohlensäure-Entwicklung beendet war. Die filtrierte Benzol-Lösung wurde jetzt unter vermindertem Druck eingengt, der sirup-artige Rest 4-mal mit je 100 ccm Wasser verrieben, dann in 10 ccm warmem Alkohol gelöst und durch Zugabe der gleichen Wasser-Menge wieder abgeschieden. Durch Abkühlung auf 0° wurden 0.9 g Tetracetyl- $\beta$ -phenol-glucosid vom Schmp. 126° erhalten, entspr. 43% der Theorie.

$$[\alpha]_D^{20} = -1.82^\circ \times 2.9684/1 \times 0.896 \times 0.2023 = -29.8^\circ \text{ (in Benzol)}^5).$$

<sup>1)</sup> Canadian National Research Council Stipendiat.

<sup>2)</sup> E. Fischer, E. F. Armstrong, B. **34**, 2885 [1901].

<sup>3)</sup> A. Michael, Amer. chem. Journ. **1**, 307 [1879]; W. Koenigs und E. Knorr, B. **34**, 957 [1901].

<sup>4)</sup> E. Fischer und L. von Mechel, B. **49**, 2813 [1916].

<sup>5)</sup> E. Fischer und L. von Mechel, a. a. O.; B. Helferich und R. Gootz, B. **62**, 2791 [1929].