

Neue Erkenntnisse über die Spezifität und den Wirkungsmechanismus der zuckerspaltenden Enzyme.

Von Dr. RUDOLF WEIDENHAGEN, Institut für Zuckerindustrie, Berlin.

Vorgetragen in der Fachgruppe für medizinisch-pharmazeutische Chemie auf der 42. Hauptversammlung des Vereins deutscher Chemiker am 24. Mai 1929 in Breslau.

(Eingeg. 11. Juni 1929.)

Man war bisher gewohnt, für die hydrolytische Spaltung der zusammengesetzten Zucker charakteristische, spezifische Enzyme verantwortlich zu machen. So schrieb man beispielsweise die Hydrolyse der Maltose einer Maltase, die der Saccharose einer Saccharase, die der Cellobiose einer Cellobiase usw. zu. Zur Erklärung der beobachteten Erscheinungen kam man aber mit der Annahme solcher spezifischen Disaccharidasen noch nicht aus und war genötigt, innerhalb der einzelnen Enzymbereiche nochmals besondere Spezifitäten, also weitere individuelle Enzyme einzuführen. So sollten bei der enzymatischen Spaltung des Rohrzuckers, um ein Beispiel zu nennen, zwei Saccharasen, eine Gluco- und eine Fructosaccharase, tätig sein, von denen die eine im Glucose-, die andere aber im Fructoseil des Rohrzuckers angreifen sollte. Diese Anschauung ist auf Grund von Hemmungs- und Affinitätsmessungen von Kuhn¹⁾ begründet worden. Für die Maltase und die β -glucosidischen Disaccharide hat Leibowitz²⁾ ähnliche Vorstellungen entwickelt. Beide knüpfen wohl an die ältere, zuerst von Armstrong³⁾ postulierte Verschiedenheit von Emulsin- und Kefirlactase im Sinne einer Gluco- und Galactolactase an. Auf Einzelheiten, besonders auf die mathematische Behandlung des Zweienzymproblems, kann an dieser Stelle nicht näher eingegangen werden. Auch die als Zweiaffinitätstheorie in die Literatur übergegangene Auffassung der schwedischen Schule⁴⁾ soll nur kurz erwähnt werden. Danach wird die Spaltung des Rohrzuckers zwar nur durch ein Enzym, eine Saccharase, hervorgerufen, die intermediäre Verknüpfung des Enzyms mit dem Substrat während der enzymatischen Katalyse soll aber an zwei Stellen erfolgen, von denen die eine in den Fructose-, die andere in den Glucoseil verlegt wird. Es ist interessant, festzustellen, daß mit Hilfe der einzelnen Theorien immer wieder eine organische Trennung der im Tier- und Pflanzenreich am gleichen Substrat tätigen Enzyme versucht worden ist. Es darf mit vollem Recht behauptet werden, daß keine der entwickelten Vorstellungen zur Erklärung aller beobachteten Erscheinungen vollständig ausreichte. Nicht umsonst hat daher Kuhn⁵⁾ die Bahn für eine erneute Diskussion des Problems freigelegt.

Untersuchungen⁶⁾ über die enzymatische Spaltung des Rohrzuckers durch verschiedene Hefen, Aspergillaceen und tierische Organe führten uns nun zu einer Arbeitshypothese, die sich für die weiteren Untersuchungen als außerordentlich fruchtbar erwiesen hat und die

heute, glaube ich, den Anspruch erheben kann, als wohlbegründete Theorie zu gelten.

Spezifische, disaccharidsplattende Enzyme existieren überhaupt nicht. Es gibt lediglich einfache Glykosidasen⁷⁾, deren Spezifität auf die sterische und konfigurative Anordnung des glykosidisch verknüpften Zuckers beschränkt ist. Das heißt, die Natur des glykosidischen Paarlings ist für den Eintritt des Spaltungsvorganges völlig belanglos. Es ist also gleichgültig, ob die Verknüpfung mit einem Aglucon, wie bei den einfachen Glykosiden, oder mit einem Monosaccharidrest, wie bei den Disacchariden, oder schließlich mit einem Disaccharidrest, wie bei den Trisacchariden, erfolgt ist. Wenn nur der glykosidisch verknüpfte Zuckerrest unverändert erhalten ist, so ist der Angriff durch ein und dasselbe Enzym von vornherein gegeben. Eine solche Vorstellung führt zu eigenartigen Folgerungen. Für die Spaltung von Disacchariden des Maltosetyps, wo nur ein Zucker glykosidisch verknüpft ist, ist nur eine Glykosidase existenzberechtigt, dagegen ist für die nicht reduzierenden Disaccharide bei der Ungleichheit der Komponenten infolge der doppelten glykosidischen Verknüpfung die Tätigkeit zweier Glykosidasen zu fordern. Da der Rohrzucker zu dieser letzten Gruppe von Disacchariden zählt, so müssen hier in der Tat zwei Enzyme, die β -h-Fructosidase und die α -Glucosidase, in Erscheinung treten. Dieselbe α -Glucosidase muß aber infolge der gleichen α -glucosidischen Konfiguration der Maltose auch zur Maltosespaltung befähigt sein. Dieses Verlangen war zunächst nicht mit der von Willstätter und Bammann⁸⁾ bei Unterhefen durchgeführten Trennung von Maltase und Saccharase in Einklang zu bringen. Der Widerspruch konnte aber überraschenderweise geklärt werden⁹⁾. Die vermeintliche Trennung der beiden Enzyme ist nämlich in Wirklichkeit als Trennung der geforderten α -Glucosidase und β -h-Fructosidase aufzufassen. Die abgetrennte α -Glucosidase zeigt neben Maltosespaltung auch die verlangte Hydrolyse des Rohrzuckers. Diese Erscheinung ist dadurch experimentell zugänglich, daß die α -Glucosidase der Hefe bei neutraler Reaktion wirkt und im optimalen pH-Bereich von 4,7 der β -h-Fructosidase in ihrer Wirkung vollständig sistiert ist. Willstätter und Bammann haben bei ihren Trennungsversuchen naturgemäß nur im sauren pH-Bereich die Rohrzuckerspaltung verfolgt, da sie eine Spaltung dieses Zuckers durch die abgetrennte Maltase beim damaligen Stande der Forschung nicht in Erwägung ziehen konnten. Die Spaltung ist infolge der Abtrennung der β -h-Fructosidase bei einem pH von 4,7 verschwunden, tritt dafür aber bei neutraler Reaktion infolge der Anwesenheit der α -Glucosidase wieder auf.

⁷⁾ Entsprechend dem Nomenklaturvorschlag von Oppenheimer (Ztschr. angew. Chem. 37, 831).

⁸⁾ Ztschr. physiol. Chem. 151, 273.

⁹⁾ Weidenhagen, Ztschr. Ver. Dtsch. Zuckerind. 78, 539 u. 781 vgl. auch Naturwiss. 16, 654.

¹⁾ Ztschr. physiol. Chem. 129, 57; 150, 221; 163, 1.

²⁾ Ebenda 149, 184; 154, 64.

³⁾ Proceed. Roy. Soc., London, Serie B, 80, 322.

⁴⁾ v. Euler, Enzyme und Co-Enzyme als Ziele und Werkzeuge der chemischen Forschung, Stuttgart 1926.

⁵⁾ Ztschr. physiol. Chem. 163, 11.

⁶⁾ Weidenhagen, Ztschr. Ver. Dtsch. Zuckerind. 78, 125; 78, 406. Derselbe u. Dey, ebenda 78, 242.

Weitere überraschende Beobachtungen haben sich bei den vom Rohrzucker ableitbaren Trisacchariden Raffinose und Melecitose ergeben¹⁰⁾. Es zeigt sich, daß die Substitution durch einen weiteren Zuckerrest ausreicht, um die Wirkung des einen Enzyms vollständig auszuschalten. Raffinose ist nur durch β -h-Fructosidase spaltbar, die Angriffsmöglichkeit der α -Glucosidase ist sozusagen durch den Galactoserest abgeschnitten. Umgekehrt verhält es sich bei der Melecitose. Hier ist die Wirkung der β -h-Fructosidase ausgeschaltet, und nur die α -Glucosidase ist zur Spaltung befähigt. Dabei ergab sich ein sofortiger Zerfall des Trisaccharids in seine drei Komponenten. Auch der zweite Glucose-rest haftet nämlich in α -glucosidischer Bindung. Die nach der früheren Anschauung für die Spaltung des Turanosesteiles notwendige Turanase ist eben wieder identisch mit α -Glucosidase. Durch geeignete Mischungen der beiden Enzyme kann man weitere eigenartige Erscheinungen hervorgerufen. So haben wir ein Glucosidase-Fructosidase-Gemisch bereitet, bei dem die optimale Spaltung des Rohrzuckers beim Neutralpunkt, die der Raffinose aber bei einer Wasserstoffionen-konzentration von 4,7 lag. Dieser Befund kommt dadurch zustande, daß die Spaltung der Raffinose, wie bereits ausgeführt, nur durch den Fructosidaseanteil des Fermentgemisches möglich ist, daß beim Rohrzucker andererseits im sauren Bereich nur die Fructosidase wirkt, beim Neutralpunkt aber sich die Glucosidase-wirkung addiert. Eine Erklärung gemäß den früheren Vorstellungen, wonach Saccharase und Raffinase als identische Enzyme anzusehen waren, würde hier unmöglich sein. Die Trisaccharidbefunde sind aber noch in anderer Beziehung bedeutungsvoll. So günstige Verhältnisse wie bei der Hefe liegen nämlich durchaus nicht in allen pflanzlichen und tierischen Organen vor. Vielmehr ist bei den meisten die optimale pH-Wirkungszone von Glucosidase und Fructosidase identisch. Hier würde sich also die Tätigkeit der beiden Enzyme und ihr Einzelanteil an der Spaltung überhaupt nicht nachweisen lassen. Die gleichzeitige Prüfung der Trisaccharid-spaltung gibt uns die Möglichkeit an die Hand. Haben wir neben Rohrzuckerspaltung eine bedeutende Raffinosespaltung und eine zu vernachlässigende Melecitose-spaltung vor uns, so liegt Fructosidasewirkung vor wie bei den meisten Hefen. Haben wir aber neben Rohrzuckerspaltung eine bedeutende Melecitosespaltung und eine zu vernachlässigende Raffinosespaltung, so liegt hauptsächlich Glucosidasewirkung vor. Solchen Fall haben wir im Gerstenmalzauszug und in der Mucosa des Dünndarmes vorgefunden. In der Tat zeigt also der tierische Organismus eine gegenüber den Hefen abweichende Spaltung des Rohrzuckers. Sie ist aber nicht für das Tierreich als charakteristisch anzusprechen, da wir im Pflanzenreich, wie schon erwähnt, beim Gerstenmalz die gleiche Erscheinung vor uns haben. Ich möchte sogar so weit gehen, zu behaupten, daß das Gerstenmalz und der tierische Darm a priori überhaupt nicht auf die Spaltung von Rohrzucker eingestellt sind. Beide müssen ja in erster Linie auf die bei der Stärkespaltung entstehende Maltose wirken. Die Spaltung des Rohrzuckers ist lediglich eine zwangsläufige Nebenerscheinung infolge der gleichen α -glucosidischen Konfiguration dieses Substrats. Bei der leichten Spaltbarkeit des Rohrzuckers durch Mineralsäuren ist auch kaum anzunehmen, daß bei der Aufnahme von Rohrzucker durch den tierischen Organismus nennenswerte Mengen den Magen unge-

spalten passieren und erst im Darmtraktus zerlegt werden müssen.

Ich hatte eingangs erwähnt, daß Leibowitz auch für die Maltose die Existenz zweier Enzyme, nämlich von Glucosido- und Glucomaltasen, gefordert hatte. Nachdem die spezifische Maltase als solche überhaupt verschwunden ist, war von vornherein die Existenz eines noch weitergehend spezifischen Enzyms, das zu einem nicht glykosidisch verknüpften Zucker Verwandtschaft zeigen sollte, sehr unwahrscheinlich. Eine Nachprüfung der experimentellen Unterlagen hat die Haltlosigkeit der Annahme solcher Enzyme ergeben¹¹⁾. Die Glucomaltasen sind mit α -Glucosidase identisch. Abweichungen in der pH-Abhängigkeit reichen zur Charakterisierung neuer Enzyme nicht aus. Worauf die Erscheinung, daß gleiche Enzyme am selben Substrat solche Unterschiede zeigen, im übrigen zurückzuführen ist, haben wir noch nicht einwandfrei klären können.

Mit den neuen Befunden haben natürlich auch die anderen spezifischen disaccharidspaltenden Enzyme als selbständige Individuen aufgehört zu bestehen. Melibiase ist mit α -Galactosidase, Lactase mit β -Galactosidase identisch. Ebenso ist die Spaltung aller β -glucosidischen Disaccharide, wie Cellobiose, Gentiobiose und aller β -Glucoside durch dieselbe β -Glucosidase zu fordern. Unsere Untersuchungen über diesen letzten Punkt sind noch nicht abgeschlossen, bisher haben sich aber alle Erscheinungen unter der Annahme eines Enzyms erklären lassen.

Die früher als sehr verwickelt angesehenen Spezifitätsverhältnisse der Carbohydrasen sind auf drei einfache Grundtypen zurückgeführt, für welche die Bezeichnungen „Strukturspezifität“, „Stereospezifität“ und „Ringspezifität“ vorgeschlagen wurden¹²⁾. Das Bestehen von Strukturspezifität bedingt, daß bereits geringe Veränderungen am glykosidischen Angriffszucker ausreichen, um die Enzymwirkung auszuschalten. So werden epimere Glykoside von verschiedenen Enzymen gespalten; Beispiel: die Verschiedenheit von Glucosidase und Galactosidase. Aber wie bereits bei den Trisacchariden auseinandergesetzt wurde, werden schon Substitutionen im Angriffszucker nicht ohne Ausschaltung der enzymatischen Wirksamkeit vertragen. Die Asymmetrie des glykosidischen C-Atoms, die zwei stereomere strukturidentische Zucker im Gefolge hat, bedingt wieder zwei spezifische Enzyme. Beispiel: die Verschiedenheit von α - und β -Glucosidase. Diese Spezifität wurde als „Stereospezifität“ bezeichnet. Schließlich soll die „Ringspezifität“ besagen, daß Veränderungen in der Sauerstoffbrücke abermals verschiedene Enzyme im Gefolge haben. So wird β -n-Methylfructosid nicht durch β -h-Fructosidase gespalten, und α -n-Glucosidase spaltet nicht α -h-Methylglucosid. Im ganzen zeigt sich eine bemerkenswerte Übereinstimmung von Enzym und Substrat in bezug auf die Punkte, welche ihre Individualität bedingen. Ich sehe hier einen wichtigen Hinweis auf die stoffliche Natur der Carbohydrasen, deren Nachweis als das lockendste Ziel der Enzymchemie bezeichnet werden muß. Damit wird auch die Frage nach dem Wirkungsmechanismus, der Enzym und Substrat beherrscht, endgültig gelöst werden können. Seit den bahnbrechenden Untersuchungen von Michaelis und Menten¹³⁾ über die Kinetik der Invertinwirkung sind wir gewohnt, die Reaktion zwischen

¹¹⁾ Ztschr. Ver. Dtsch. Zuckerind. 78, 788.

¹²⁾ Ebenda 79, 139.

¹³⁾ Biochem. Ztschr. 49, 333.

¹⁰⁾ Weidenhagen, Ztschr. Ver. Dtsch. Zuckerind. 78, 781.

Enzym und Zucker als Zwischenreaktionskatalyse zu betrachten, deren Kinetik dem Massenwirkungsgesetz in seiner einfachsten Form folgt. Die weiteren Konsequenzen, die sich in mathematischer Beziehung aus dieser Betrachtungsweise ergeben, und die Auswertung der experimentellen Befunde können in dieser kurzen Übersicht nicht näher behandelt werden. Nur so viel sei erwähnt, daß nach unseren neuesten Untersuchungen ein Teil der Schlüsse, die zu ziehen man sich berechtigt glaubte, hinfällig geworden ist. Wir konnten zeigen¹⁴⁾, daß die β -h-Fructosidase des *Aspergillus oryzae* gemäß den Kriterien von Michaelis und Rona¹⁵⁾ eine auf Affinität beruhende Hemmung durch α -Glucose zeigt, während n-Fructose die Dissoziationskonstante bei wechselnder Substratkonzentration unverändert läßt. Die β -h-Fructosidase der Hefe zeigt aber, wie aus den umfangreichen Untersuchungen von Kuhn¹⁶⁾ hervorgeht, gerade umgekehrtes Verhalten. Nachdem wir die Identität beider Enzyme erwiesen haben, muß man annehmen, daß die erwähnten Messungen durch „akzessorische“ Begleitstoffe entstellt sind, daß also nur „schein-

bare“ Affinität vorliegt. In Wirklichkeit ist ja auch eine Verwandtschaft der β -h-Fructosidase weder zu α -Glucose noch zur β -n-Fructose zu erwarten. Das Enzym sollte lediglich zu der im Rohrzucker vorliegenden h-Form der Fructose Affinität zeigen. Das steht auch in bester Übereinstimmung mit der Wirkungsweise des Enzyms. Der direkte experimentelle Affinitätsnachweis zu h-Fructose scheitert aber an der Unzugänglichkeit bzw. Unbeständigkeit dieses Körpers. Wir müssen uns also vorläufig damit begnügen, diese Affinität theoretisch anzunehmen, und ich glaube, daß das Bestehen solcher „wirklichen“ Affinität im ursprünglichen Sinne von Michaelis und Pechstein¹⁷⁾ für den Eintritt der Spaltung als hinreichend gelten muß. Eine endgültige Klärung in diesem Punkt werden erst Untersuchungen an isolierten Enzymen geben können, ein Problem, dessen Verwirklichung hoffentlich nicht mehr in zu weiter Ferne liegt. Im Augenblick aber kann das Massenwirkungsgesetz als Grundlage der enzymatischen Kohlehydratspaltungen, wenn auch in eingeschränkter Fassung, weiter wertvolle Dienste leisten.

Bei den vorliegenden Untersuchungen wurde ich von Frl. D. Wischniewsky aufs beste unterstützt.

[A. 101.]

¹⁷⁾ Biochem. Ztschr. 60, 90.

Antike Gläser. IV.

Von Prof. Dr. BERNHARD NEUMANN.

Institut für Chemische Technologie der Technischen Hochschule zu Breslau.

(Eingeg. 26. April 1929)

Nachstehend sind die Ergebnisse der Untersuchungen an einigen antiken ägyptischen, babylonischen und römischen Gläsern mitgeteilt. Die untersuchten Gläser, die ägyptischen sowohl wie die babylonischen, sind die ältesten, von denen bis jetzt genaue Analysen gemacht worden sind. Die römischen Stücke sind deshalb besonders interessant, weil eins derselben ein Millefiori-glas ist, d. h. es sich also um Gläser handelt, die aus einer Zeit stammen, wo die römische Glasmacherkunst auf ihrer höchsten Höhe stand.

Altägyptische Gläser.

(Um 1500 v. Chr.)

Von ägyptischen Gläsern wurden von mir schon früher untersucht und besprochen: 12 Gläser aus Tel el Amarna (um 1400 v. Chr.), 10 Gläser von der Insel Elephantine (2.—1. Jahrhundert v. Chr.), und 2 alexandrinische Gläser (etwa vom Beginn unserer Zeitrechnung)¹⁾. Die gleichartige Zusammensetzung der Gläser dieser einzelnen Gruppen deutet darauf hin, daß sie lokalen Erzeugungstätten entstammen, was bei den ersten beiden Gruppen auch in anderer Weise sichergestellt ist. Bei zwei später untersuchten ägyptischen Gläsern aus Gräbern der Umgegend von Theben (etwa 1500 v. Chr.)²⁾ war das ziemlich unsicher. Nun war Herr Prof. W. Biltz, Hannover, so liebenswürdig, mir weiteres sicher datiertes Material aus den Gräbern von Gorub Medined (1500 v. Chr.) zur Verfügung zu stellen, von dem an einigen besonderen Stücken Analysen ausgeführt wurden. Es waren lauter Bruchstücke von flaschenförmigen Gefäßen. Der Untergrund, d. h. die Glasmasse, war das typische ägyptische Dunkelblau, meist nur durchscheinend. Ein Bruchstück bestand allerdings aus einem sattblauen durchsichtigen Glase, was bei Gläsern dieses Alters eine Ausnahme und auf-

fällig ist. Noch eigenartiger war ein anderes Bruchstück, ebenfalls fast durchsichtig, aber nicht blau, sondern dunkelviolet. Alle Bruchstücke hatten auf der Oberfläche die bekannten feinen Einlagerungen gelber, graublauer und weißer Streifen der üblichen Form, nur das durchsichtige blaue Glas hatte ausnahmsweise nur weiße (mit Zinnoxid getrübe) Streifen.

Die Analysen von 4 Gläsern dieser Herkunft sind nachstehend aufgeführt. Dazu ist vorher zu bemerken: Die Gläser haben alle einen geringen Wassergehalt, 0,1—0,19%, sie enthalten sämtlich kein Blei, und die Blaufärbung der ägyptischen Gläser stammt niemals von Kobalt, wie ausdrücklich wieder festgestellt wurde. Die in der Analyse angegebenen geringen Zinnmengen (und etwas Eisenoxyd) stammen aus den aufgelegten fadenförmigen getrübten Streifen, die sich nicht von der Grundmasse des Glases trennen lassen. Die Trübungsmittel finden sich also nur in den Verzierungs-fäden, nicht aber in der Grundmasse.

Ägyptische Gläser von Gorub Medined (1500 v. Chr.)

	Nr. 95 Dunkelblau durchscheinend mit grauen und gelben Einlagen	Nr. 96 Dunkelblau durchscheinend m. graublauen u. gelben Einlagen	Nr. 97 Violett, fast durchsichtig, m. graublauen u. gelben Einlagen	Nr. 98 Sattblau, durch- sichtig, mit nur weißen Streifen. Etwas blasig. Ganz klar.
	%	%	%	%
SiO ₂	67,80	62,70	62,90	67,03
CaO	3,80	8,80	8,87	7,83
MgO	2,89	3,29	5,49	4,93
Fe ₂ O ₃	0,92	1,07	1,29	1,88
Al ₂ O ₃	3,22	3,82	2,58	2,48
Mn ₂ O ₃	0,54	0,83	1,71	2,64
CuO	1,51	1,00	0,46	0,79
Na ₂ O	16,08	15,21	12,83	10,12
K ₂ O	2,08	2,12	1,86	1,82
SO ₃	1,01	0,94	1,51	0,75
SnO ₂	0,51	0,41	0,42	0,39
	100,36	100,19	99,92	100,66

¹⁾ Ztschr. angew. Chem. 1925, S. 776 u. 857.

²⁾ Ebenda 1927, S. 963.