

Fortschritte der physiologischen Chemie seit 1929.

II. Enzyme*)

- | | | | |
|---------------------------|---------------|----------------|--|
| 1. Esterasen und Lipasen. | 3. Proteasen. | 5. Glykolyse. | 7. Fermenthämine (einschließlich Peroxydase, |
| 2. Carbohydrasen. | 4. Gärung. | 6. Dehydrasen. | Katalase sowie Cytochrom). |

Esterasen und Lipasen.

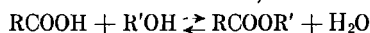
Von Dr. phil. et med. R. AMMON, Berlin.

(Eingeg. 10. April 1934.)

Inhalt: Einleitung. — Verwendung der Esterasen. — Spezielle Untersuchungen über Esterasen. — Die Cholinesterase. — Die Phosphatasen. — Die Sulfatasen.

Einleitung.

Die Esterasen sind Fermente, die die Reaktion:



katalysieren. Sie können somit sowohl eine esterbildende als auch eine esterspaltende Wirkung ausüben. Die Art des Alkohols und der Säuren bzw. der im Ester enthaltenen Radikale bedingt besondere Arten der Spezifität unter den Esterasen; handelt es sich um gewöhnliche organische Ester, so sprechen wir von Esterasen im engeren Sinne, ist der Alkohol Glycerin und die Säure eine echte Fettsäure, so haben wir es mit den eigentlichen Lipasen zu tun. Ist die Säure Phosphorsäure, so sind für die Katalyse die Phosphatasen, und ist sie Schwefelsäure, die Sulfatasen verantwortlich zu machen. Als weiterer Typ sei die Cholinesterase genannt, deren Spezifität dadurch bedingt ist, daß als Alkohol die quaternäre Ammoniumbase, das Cholin, dient. Die Tannase, die hauptsächlich in Schimmelpilzen vorkommt, spaltet Tannin und auch Gallussäuremethylester. Die Chlorophyllase rechnet man auch zu den Esterasen, obwohl sie keine Hydrolyse, sondern eine Alkoholyse bewirkt: sie spaltet Chlorophyll in Phytol und Chlorophyllid.

Alle diese Esterasen können nun noch eine stereochemische Spezifität innerhalb ihrer Typen aufweisen, wenn im Alkohol oder im Säurerest asymmetrische C-Atome enthalten sind. Die Untersuchung über diese Spezifität hat bei den Esterasen zu wichtigen fermentchemischen Erkenntnissen geführt. Bei der physiologischen Tätigkeit der Lipasen im Organismus wird die stereochemische Spezifität wohl kaum eine Rolle spielen, da die typischen Fettsäuren kein asymmetrisches C-Atom haben, es sei denn, es treten Oxyssäuren, wie z. B. Ricinolsäure, in Reaktion. Dafür ist mit der geometrischen Isomerie der ungesättigten Fettsäuren zu rechnen. Es wurde auch eine cis-trans-Spezifität bei den Esterasen festgestellt*).

Die wichtige Aufgabe, die die Esterasen im Organismus erfüllen, ist der Auf- und Abbau der Fette, der Kohlenhydrat-Phosphorsäure-Ester, der der gepaarten Schwefelsäure usw. Die Cholinesterase katalysiert die Bildung und Spaltung des physiologisch sehr wirksamen Acetylcholins.

Die Verwendung der Esterasen.

Von industrieller Seite haben die Esterasen relativ wenig Beachtung gefunden. Als älteste Anwendung sei die Fettspaltung aus Ölen mit Hilfe von Ricinuslipase genannt, ein Verfahren, das große Leistungen aufweisen

kann²⁾. Hoyer³⁾ gibt als Beispiel der Palmölsplaltungen folgende Zahlen an:

429 100 kg rohes Palmöl
 + 27 435 kg Fermentpräparat aus Ricinus, 8,7% vom Palmöl
 + 855 kg Mangansulfat (zur Aktivierung), 0,2% vom Palmöl
 + 1 290 kg Schwefelsäure (zur Herstellung einer sauren Reaktion, um das pH-Optimum herzustellen), 0,3% vom Palmöl,
 ergeben bei etwa 89 bis 90% Spaltung
 28 565 kg Glycerin, wasserfrei, 100%ig, 6,7% vom Palmöl
 + 410 360 kg Fettsäure, wasserfrei u. gebleicht, 95,6% v. Palmöl
 + 33 160 kg Mittelschicht (Glycerin, unverseiftes Fett und den größten Teil der festen Bestandteile des zur Spaltung verwendeten Ricinussamens enthaltend), 7,7% vom Palmöl.

Eine Reihe von Bauchspeicheldrüsenpräparaten, die man in Form von Pankreon- und Pankreatintabletten usw. therapeutisch verwendet, wird von den herstellenden Firmen u. a. zur Kontrolle auf ihre Wirksamkeit auch auf ihren Lipasegehalt geprüft.

Seit einigen Jahren macht die Firma *Jacobi*, Darmstadt, den interessanten Versuch, die aus dem Pankreas von Schlachtieren gewonnenen Enzympräparate, die auch lipasehaltig sind, als organisches Wäscheinweichmittel („Burnus“⁴⁾) zu benutzen. Der Grundgedanke dieses Präparates ist, eine mehrstündige (über Nacht) Einweichzeit zum fermentativen Abbau der in der Wäsche enthaltenen Schmutzteile zu benutzen. Hier helfen natürlich auch die diastatischen und proteolytischen Fermente mit.

Sonst ließen sich sicher noch weitere Anwendungsmöglichkeiten für die Esterasen eröffnen. Die gute esterbildende Wirkung könnte man leicht zur Gewinnung von sonst schwierig zugänglichen Estern benutzen (s. weiter unten). Die chemische Aufarbeitung würde in den meisten Fällen auf keine Schwierigkeiten stoßen.

Auch die Cholinesterase könnte pharmazeutisches Interesse erwecken. Neue Ester des Cholins mit therapeutischer Wirkung müssen nicht spaltbar sein durch Cholinesterase (s. später).

Eine gewisse Bedeutung haben die Esterasen in der Gärungsindustrie. Beim Keimen der Gerste findet ein Abbau der Fette statt, der für die Eigenschaften des Biers von Bedeutung ist, da die Schaumhaftigkeit der Biere durch Fett erniedrigt wird. Eine direkte praktische Anwendung der Lipasen (z. B. durch künstlichen Zusatz) scheint aber für diese Zwecke nicht vorgenommen zu werden. Bei den Gärungsvorgängen findet gleichzeitig durch Phosphatasen eine Aufspaltung organischer Phosphorverbindungen statt.

²⁾ Vereinigte Chem. Werke A.-G., Charlottenburg, jetzt: H. Böhme A.-G., Hamburg.

³⁾ E. Hoyer, in *Oppenheimer*, Die Fermente und ihre Wirkungen, Bd. IV, 1929.

⁴⁾ Patent Nr. 283 923. Es gibt auch das Enzymolin, D. R. P. Siehe auch P. Heermann, Ztschr. f. d. ges. Krankenhauswesen, Heft 5 u. 14 [1926]; K. Brünneke, ebenda, Heft 23 [1926]; B. Walther, ebenda, Heft 12 [1933].

*) Bereits erschienen: der Abschnitt „Naturstoffe“, diese Ztschr. 47, 247, 271, 286, 290, 294, 315, 318, 351 [1934].

¹⁾ W. Fabisch, Biochem. Ztschr. 234, 84 [1931]. P. Rona, R. Ammon u. H. Fischgold, ebenda 241, 460 [1931].

Eine präparativ wichtige Rolle spielen die Phosphatasen bei der Bereitung gewisser Kohlenhydrat-Phosphorsäure-Ester. So stellt man Salze der Hexose-di-phosphorsäure, 1,6-Di-phosphorsäureester der 2,5-am-Fructose, durch biochemische Phosphorylierung aus Rohrzucker oder Zymohexosen und Phosphaten mittels Hefe her⁵⁾. Ebenso wird der *Robison-Ester*⁶⁾, der aus einem Gemisch von Aldose- und Ketosemonophosphat besteht, durch enzymatische Veresterung bereitet.

Spezielle Untersuchungen über Esterasen.

Das Studium der Esterasen ist gerade durch ihre ausgeprägte stereochemische Spezifität gefördert worden. Wesentlich trug dazu bei, daß sie fähig sind, sehr gut Ester zu hydrolysieren, wie z. B. die der Mandelsäure, die in größter optischer Reinheit darzustellen sind und die infolge ihres hohen spezifischen Drehungsvermögens sehr genaue Untersuchungsmöglichkeiten gestatten. Die stereochemische Spezifität ist bei allen Fermenten theoretisch vorauszusetzen. Denn wir müssen ja annehmen, daß sie bei ihrem sehr komplizierten Bau oder wenigstens durch ihren eiweißartigen Begleitträger selbst mindestens ein asymmetrisches C-Atom enthalten. Und wenn das Ferment — in diesem Falle also die Esterase — mit einem Substrat zusammenkommt, das selbst optisch aktiv ist, so ist stets die Möglichkeit der Bildung Diastereomerer gegeben.

Hierzu muß man auf Grund der Anschauung von *Michaelis und Menten*⁸⁾, der die Anwendung des Massenwirkungsgesetzes zugrunde liegt, annehmen, daß die Fermente bei ihrer Einwirkung auf das Substrat eine Verbindung mit diesem — das Reaktionszwischenprodukt oder die Fermentsubstratverbindung — eingehen. Unter Wasseraufnahme zerfällt dann die Fermentsubstratverbindung in Ferment, Säure und Alkohol. Wirkt z. B. eine Esterase auf racemischen Mandelsäureester ein, so ist mit folgenden diastereomeren Reaktionszwischenprodukten zu rechnen: d-Ester-Enzymverbindung und l-Ester-Enzymverbindung. Diese nicht mehr antipodischen Formen können unterschiedliche Bildungs- und Zerfallsgeschwindigkeiten aufweisen, die sich mit Hilfe des Massenwirkungsgesetzes durch die Affinitäts- und Hydrolysekonstanten der diastereomeren Reaktionszwischenprodukte zum Ausdruck bringen und in vielen Fällen experimentell erfassen lassen.

Mit diesen Ableitungen gelang es, einen wichtigen, zunächst sehr widerspruchsvoll erscheinenden Befund zu klären. Es waren zahlreiche Fälle von stereochemischer Spezifität bei den Lipasen bekannt⁷⁾, so auch die Tatsache, daß Schweineleberesterase dl-Mandelsäuremethyl- bzw. -äthylester unter Bevorzugung der d-Form hydrolysieren und Schweinepankreasesterase unter Bevorzugung der l-Modifikation. Läßt man nun die reinen l- und d-Ester einzeln durch Schweinepankreasesterase spalten, so wird in Übereinstimmung mit dem Ergebnis der Racematspaltung die l-Form schneller als die d-Modifikation hydrolysiert⁸⁾; dasselbe ist aber auch bei der Spaltung durch Schweineleberesterase der Fall⁹⁾. Die Bestimmung der Affinitäts- und Dissoziationskonstanten der einzelnen diastereomeren Reaktionszwischenprodukte

führte zur Erklärung¹⁰⁾. Es wurde nämlich für die Spaltung der Mandelsäuremethylester gefunden, daß die Affinität der Schweineleberesterase zum d-Ester etwa siebenmal so stark ist wie zur l-Form, die l-Ester-Fermentverbindung zerfällt aber etwa doppelt so schnell wie die d-Ester-Fermentverbindung. Das widerspruchsvolle Resultat bei der enzymatischen Verseifung des dl-Esters und den einzelnen Modifikationen durch Schweineleberesterase läßt sich jetzt sehr leicht erklären. Ist mehr Ester als Ferment vorhanden, so wird infolge der größeren Affinität des Ferments zum d-Ester alles Ferment vom d-Ester festgehalten. Die Ferment-d-Esterverbindung zerfällt unter Wasseraufnahme und bildet d-Säure. Liegen dagegen die optisch aktiven Ester einzeln vor, so fällt der Wettbewerb um das Ferment weg, und es kommt für die Esterhydrolyse der schnellere Zerfall der Ferment-l-Esterverbindung zum Ausdruck.

Das optische Auswahlvermögen einer Esterase läßt sich beeinflussen; dies gelingt auf drei Wegen. Einmal ist es bei der Menschenleberesterase (die für diese Fragestellung ein besonders günstiges Ferment zu sein scheint) möglich¹¹⁾, lediglich durch Variation der Substratkonzentration das optische Orientierungsvermögen des Enzyms zu ändern. In höheren Konzentrationen des dl-Mandelsäureesters findet eine Bevorzugung der d-Form, in niedrigeren eine solche des l-Esters statt. Es gibt eine mittlere Konzentration, bei der eine symmetrische Spaltung des Esters erfolgt¹²⁾. Dieser sehr interessante Befund ist bisher noch nicht eindeutig geklärt. Er ist an den homologen Mandelsäureestern (von Methyl- bis n-Butyl) und ein und demselben Fermentpräparat unter völlig identischen Bedingungen weiter verfolgt. Die Konzentration des Esters, bei der das Ferment die andere Modifikation verseift, zeigt einen Gang¹³⁾. Je niedriger die C-Zahl des Alkoholrestes im Ester ist, um so höher liegt die Umschlagskonzentration. Beim n-Butylmandelat konnte aus experimentellen Gründen keine so niedrige Konzentration mehr festgestellt werden. Bei ihm wurde also keine Beeinflussbarkeit der stereochemischen Spezifität der Menschenleberesterase durch Variation der Substratkonzentration gefunden. Der Gang geht parallel der Löslichkeit der Ester im Wasser. Es scheint daher, daß die Beziehung, die zwischen Ferment und Substrat besteht und die den Einfluß auf die Konfigurationspezifität der Esterase bedingt, in der echten Lösung des Esters im Wasser herrscht. Der *Bamanns* Befund hat Veranlassung gegeben, die Frage des Massenwirkungsgesetzes als Grundlage für den Fermentwirkungsreaktionsmechanismus einer Kritik zu unterziehen. Und da ist es naheliegend, auch an adsorptive Verhältnisse zu denken, die von anderen Untersuchern allgemein als andere Grundlage für fermentative Reaktionen herangezogen wurden. Es ist nun wichtig, daß es in neuerer Zeit durch *Hitchcock*¹⁴⁾ und *Weidenhagen* und *Landt*¹⁵⁾ gelungen ist, zu zeigen, daß die von *Michaelis* und *Menten* gegebenen Formeln formell übereinstimmen mit den von *Langmuir* entwickelten Gleichungen für die Adsorption. *Fischgold* und *Ammon*¹⁶⁾ haben im weiteren Verfolg

⁵⁾ M. Kobel u. C. Neuberg, Handbuch der Pflanzenanalyse; Springer, Wien 1932.

⁶⁾ Biochem. Ztschr. 49, 333 [1913].

⁷⁾ S. Übersicht u. Literatur: P. Rona u. R. Ammon, Ergebnisse der Enzymforschung, II. Band, 1933.

⁸⁾ R. Willstätter u. F. Memmen, Ztschr. physiol. Chem. 138, 216 [1924].

⁹⁾ P. Rona u. R. Ammon, Biochem. Ztschr. 181, 49 [1927].

¹⁰⁾ R. Willstätter, R. Kuhn u. E. Bamann, Ber. Dtsch. chem. Ges. 61, 886 [1928], und H. H. Weber u. R. Ammon, Biochem. Ztschr. 204, 197 [1929].

¹¹⁾ E. Bamann, Ber. Dtsch. chem. Ges. 62, 1538 [1929].

¹²⁾ S. auch P. Rona, H. Fischgold u. R. Ammon, Biochem. Ztschr. 228, 76 [1930]. G. M. Schwab, E. Bamann u. P. Laeverenz, Ztschr. physiol. Chem. 215, 121 [1933].

¹³⁾ R. Ammon u. W. Geisler, Biochem. Ztschr. 249, 475 [1932].

¹⁴⁾ Journ. Amer. chem. Soc. 48, 2870 [1926].

¹⁵⁾ Ztschr. Ver. Dtsch. Zuckerind. 80, Techn. Teil, S. 25 [1930].

¹⁶⁾ Biochem. Ztschr. 247, 338 [1932].

dieser Überlegungen die Analogie der Ableitungen von *Langmuir* zur Theorie von *Michaelis-Menten* noch weiter-treiben können. Es gelang, alle Erweiterungen, Folge-rungen und Ableitungen der Anschauung von *Michaelis* auf die Vorstellung der Adsorption zu übertragen.

In Zusammenhang hiermit ergab sich die Möglich-keit, die Umkehrung der optischen Umstellung einiger Esterasen bei steigenden Substratkonzentrationen unter Zugrundelegung adsorptiver Verhältnisse zu deuten¹⁶⁾. Am wahrscheinlichsten erscheint folgendes: Zunächst konnte an Modellversuchen über gleichzeitige Adsorption von Aceton und Essigsäure an Tierkohle in steigenden Konzentrationen ein ähnlicher Gang wahrscheinlich ge-macht werden. Und unter Hinzuziehung von Befunden von *Michaelis* und *Menten* selbst, in denen eine Ver-schiebung des Bindungsverhältnisses von Glucose und Saccharose an Invertase mit Anstieg der Substratkonzen-tration deutlich wird, läßt sich auch die Inversion als eine von der Konzentration abhängige Verteilung zweier Körper auf das Ferment bzw. Adsorptionsmittel, in diesem Falle also als die Konkurrenz der antipodischen Estermodifikationen deuten.

*Bamanns*¹⁷⁾ zweite Möglichkeit der Beeinflussung des optischen Auswahlvermögens der Esterasen ist durch Zu-satzstoffe erreichbar. Läßt man z. B. die Spaltung von Mandelsäureestern durch Menschenleberesterase in Gegen-wart von Strychnin vonstatten gehen, so tritt eine deut-liche Änderung der stereochemischen Spezifität des Fer-mentes auf. Dieser Befund, der durch das Entstehen von neuen Reaktionszwischenprodukten mit neuen Eigen-schaften zu erklären ist, konnte auch experimentell in dieser Weise gedeutet werden. *Ammon* und *Fischgold*¹⁸⁾ bestimmten die Affinitäts- und Hydrolysekonstanten der Ferment-l- und -d-Esterverbindungen mit und ohne Strychnin und fanden, daß das Alkaloid keine Wirkung auf die Affinität des Fermentes zu den antilogen Ester-modifikationen hat, sondern lediglich den Zerfall der Ferment-l-Esterverbindung beschleunigt.

Die dritte Methode¹⁹⁾ hängt gewissermaßen mit der zweiten zusammen. Es spielt nämlich die Vorbehandlung der Fermentpräparate eine wichtige Rolle für das Aus-wahlvermögen. Durch Erhitzen des Fermentpulvers z. B. oder durch eine vorangehende Autolyse des Organbreis finden am Enzymkomplex Veränderungen statt, so daß wieder Enzymsubstratverbindungen mit neuen Eigen-schaften entstehen können. Esterasepräparate aus patho-logisch veränderten menschlichen und aus foetalen Lebern zeigen keine Änderung des optischen Auswahl-vermögens²⁰⁾.

Im Anschluß an diese kurz gestreiften Ergebnisse und durch Untersuchungen an anderen Fermenten (z. B. die Arginase bei malignen Tumoren²¹⁾) interessiert man sich mehr für die Begleitkörper am Enzymkomplex. Hierzu kommt die sehr wichtige Arbeit über ein neues Fermentmodell (an organischer Faser) von *G. Bredig* und *F. Gerstner*²²⁾. *A. I. Virtanen* und *P. Suomalainen*²³⁾ ver-

suchten, durch Injektionen von Schweinepankreaslipase (die durch Adsorption an Aluminiumhydroxyd und nach-herige Elution mit Ammoniak und Ammoniumphosphat gereinigt war) den Lipasegehalt der Organe des Kanin-chens zu erhöhen. Der größte Teil der Lipase sammelte sich in der Leber, hierbei hat aber bemerkenswerter-weise die in der Leber gesammelte Pankreaslipase die Eigenschaften einer hepatischen Esterase angenommen (d. h. sie spaltete nicht mehr Olivenöl und wurde wie eine typische Leberlipase durch Atoxyl gehemmt). Die Verfasser ziehen aus ihren Versuchen den Schluß, daß sich Pankreas- und Leberlipase nur durch die Verschie-denheit der Begleitstoffe unterscheiden. Diese Arbeit ist der erste wichtige Schritt zur Überführung von Pankreas-lipase in Leberesterase und beweist die Wichtigkeit von organeigenen Aktivatoren oder Hemmungskörpern. Es ist daher oft nicht möglich, aus einer stärkeren bzw. schwächeren Fermentwirkung auf eine Erhöhung oder Abnahme der eigentlichen Fermentmoleküle zu schließen, und schwer, Versuche in vitro mit den Verhältnissen in vivo zu vergleichen (s. auch *Klein* und *Ziese*, l. c.). Es können oft Stoffe auftreten, die hemmend oder fördernd wirken. Der kolloidale Träger kann ferner andere Eigen-schaften haben und seinerseits wieder eine andere Ak-tivierbarkeit durch hinzugesetzte Aktivierungsmittel zeigen. *Bamann* und *Laefferenz*²⁴⁾ haben in ihrer Unter-suchung über Lyo- und Desmolipasen bei der Extrahie-rung von Esterasen aus frischer bzw. autolyzierter Bauch-speicheldrüse mit verschiedenprozentigen Glycerinen durchaus unterschiedliche Esterasepräparate erhalten.

Hieran schließt sich das Studium der Fermente im wachsenden Gewebe. *K. Linderström-Lang* und *H. Holter*²⁵⁾ haben in ihren Beiträgen zur enzymati-schen Histochemie die Peptidasen verfolgt. *Ammon* und *Schütte*²⁶⁾ begannen mit dem Studium der Esterasen in bebrüteten und unbebrüteten Hühnereiern und stellten u. a. fest, daß sich das tributyrinspaltende Ferment (Lipase) ungleich schneller vermehrt, als das mehr esteratische, methylbutyratspaltende Enzym.

Es sei noch kurz die esterifizierende Wir-kung der Esterasen gestreift, deren Studium Vorstel-lungen über den Wiederaufbau der Fette im Organismus ermöglicht.

Der Nachweis einer esterbildenden Wirkung ist außer-ordentlich einfach. Das Fermentpulver wird in dem zu ver-esternden Alkohol, der eine gewisse Menge Wasser enthalten kann und gleichzeitig die zu veresternde Säure gelöst enthält, suspendiert. Durch kontinuierliche Bestimmung des Säure-titers, der bei einer stattfindenden Synthese abnimmt, erfolgt die Ermittlung des Synthesegrades. Diese Synthesebedingungen sind ganz unphysiologisch und keineswegs den wahren Bedin-gungen annähernd ähnlich (starke alkoholische Lösung, saures Medium, Fermentpulver, nicht die Möglichkeit, zu puffern).

Es ist aber doch möglich, die Synthesebedingungen den vitalen Verhältnissen mehr anzupassen, und zwar gerade bei den physiologisch wichtigen Fettsäuren. *W. Fabisch*²⁷⁾ benutzt die Unlöslichkeit, z. B. der Stearin-säure, und die Schwerlöslichkeit eines Alkohols, z. B. des Amylalkohols, und stellt mit Hilfe von Emulgatoren Emul-sionen in Wasser, das das Ferment gleichzeitig in ge-löstem Zustand enthält, her.

²⁴⁾ Ztschr. physiol. Chem. 223, 1 [1934]. Vgl. auch *Dyckerhoff*, *Miehler* u. *Tadsen*, Biochem. Ztschr. 263, 17 [1934].

²⁵⁾ Ztschr. physiol. Chem. 201, 9; 204, 15 [1931]; 215, 167 [1933]. *T. Philipson*, ebenda 223, 119 [1934]. Ferner: Die Esteraseverteilung in der Magenschleimhaut in *K. Linderström-Lang* u. *H. Holter*, Ergebn. d. Enzymforsch., Bd. III, 1934.

²⁶⁾ Im Druck.

²⁷⁾ Biochem. Ztschr. 259, 420 [1933].

¹⁷⁾ *E. Bamann* u. *P. Laefferenz*, Ber. Dtsch. chem. Ges. 63, 394 [1930].

¹⁸⁾ *R. Ammon* u. *H. Fischgold*, Biochem. Ztschr. 234, 54 [1931].

¹⁹⁾ *E. Bamann* u. *P. Laefferenz*, Ber. Dtsch. chem. Ges. 63, 2939 [1930].

²⁰⁾ *R. Ammon* u. *W. Geisler*, Virchows Archiv 285, 286 [1932]. *E. Bamann*, *S. Mahdihassan* u. *P. Laefferenz*, Ztschr. physiol. Chem. 215, 142 [1933].

²¹⁾ *G. Klein* u. *W. Ziese*, Ztschr. physiol. Chem. 222, 187 [1933].

²²⁾ Biochem. Ztschr. 250, 414 [1932].

²³⁾ Acta chem. fenn. 5, 28 [1932]; Ztschr. physiol. Chem. 219, 1 [1933].

So gelang es *Fabisch*, auch Cetylpalmitat auf fermentativem Wege zu bereiten, das *Rona*, *Ammon* und *Fischgold*²⁸⁾ früher auf dem anderen, ganz unphysiologischen Wege hier sogar noch bei Gegenwart von Äther und Aceton — zur Auflösung des Cetylalkohols und der Palmitinsäure — darstellten.

Zwischen der hydrolysierenden und esterifizierenden Wirkung der Esterasen lassen sich eine Reihe von Parallelen ziehen²⁹⁾. Der klassische Versuch von *Bodenstein* und *Dietz*³⁰⁾ über die Gleichgewichtsverhältnisse bei enzymatischer Esterhydrolyse und -synthese wurde von *Rona* und *Ammon*³¹⁾ an einem einheitlicheren Substrat, dem n-Butyl-n-butyral, wiederholt. Die Esterasen zeigen bei der esterbildenden Wirkung auch eine ausgesprochene stereochemische Spezifität³²⁾. Bei Spaltung und Bildung eines Esters durch Schweinepankreasesterase fanden *P. Rona*, *R. Ammon* und *M. Werner*³³⁾, daß die Modifikation, die schneller synthetisiert, auch bevorzugt gespalten wird (l-sek-Butyl-n-butyral).

Die fermentative Bildung der Mandelsäureester zeigt die Besonderheit, daß sie stets symmetrisch erfolgt, im Gegensatz zur Hydrolyse der Mandelsäureester³⁴⁾. (Die Verfolgung ihrer Hydrolyse unter Synthesebedingungen scheitert an der Unmöglichkeit des Eintritts der Spaltung³⁵⁾).

Das Organtrockenpulver, das für die meisten Synthesversuche benutzt wird, hat die bemerkenswerte Eigenschaft, gegen Temperaturerhöhungen relativ stabil zu bleiben. Ein Erhitzen auf 100° z. B. vernichtet nicht völlig die esterifizierende Wirkung. Auch Auszüge aus dem gedörrten Pulver sind noch hydrolytisch wirksam, wenn auch je nach der Temperatur mehr oder weniger geschwächt³⁶⁾.

Die Cholinesterase.

Die Cholinesterase ist ein im tierischen Gewebe weit verbreitetes Ferment. Als neues Vorkommen stellten *Ammon* und *Schütte* ihr Vorhandensein im Embryonal-extrakt fest³⁷⁾. In diesem und im Pferdeserum, das auch das Ferment reichlich enthält, gelang in Anlehnung an Versuche von *E. Abderhalden* und *H. Paffrath*³⁸⁾ der Nachweis der Bildung von Acetylcholin auf enzymatischem Wege³⁹⁾. Die Cholinesterase ist nicht nur durch ihre Spezifität zu Cholinestern charakterisiert — Butyryl-, Propionylcholin, Acetyl- γ -homocholin, Acetyl- β -methylcholin⁴⁰⁾ und der Bernsteinsäureester⁴¹⁾ des Cholins werden gespalten, Acetylcholinamin dagegen nicht⁴²⁾ —, son-

dern auch durch ihre Hemmbarkeit durch sehr kleine Mengen von Physostigmin. Noch $5 \cdot 10^{-6}$ mg dieses Alkaloidsulfats in 2 cm³ Gesamtversuchsflüssigkeit üben einen deutlich hemmenden Einfluß aus⁴³⁾.

Da das Acetylcholin so gut von der Cholinesterase des Gewebes gespalten wird, so ist bei Einverleibung des Acetylcholins eine längere klinische Wirkung auf den Organismus nicht zu erwarten. Es mußte daher die pharmazeutische Industrie für therapeutische Zwecke Ester herstellen, die nicht von der Cholinesterase gespalten werden, wohl aber die typische Acetylcholinwirkung haben. Ein solcher Ester des Handels ist z. B. das Doryl (Carbaminoylcholin).

Die Phosphatasen.

Die Phosphatasen, die im tierischen und pflanzlichen Organismus vorkommen, spalten aliphatische, aromatische und hydroaromatische Ester der Orthophosphorsäure; Pyrophosphorsäureester werden auch hydrolysiert. Oft benutzte Substrate sind Glycerin-, die Kohlenhydrat-, Phenyl- und Bornyl-Phosphorsäuren. Neben der Bildung der Kohlenhydratphosphorsäureester bei den Gärungsvorgängen ist eine synthetisierende Wirkung der Phosphatasen festgestellt worden.

Nach *Mariland* und *Robison*⁴⁴⁾ findet bei hohen Glycerinkonzentrationen und in Gegenwart von anorganischem Phosphat durch Knochenphosphatase eine Phosphorsäureestersynthese statt. Die Veresterung kann auch mit anderen Alkoholen, wie Glykol, Mannit, Glucose und Fructose, erfolgen. *Kay*⁴⁵⁾ erhielt aus Methyl-Äthylalkohol, Äthylglykol, Glycerin und anorganischem Phosphat Phosphorsäureesterbildung mit Säugetiernieren- und -darmextrakten. *Roche*⁴⁶⁾ beschreibt die Synthese von Glykol, Glycerin, Glycerinsäure, Glucose- und Fructose-Phosphorsäureestern durch Pferdeserum- und -erythrocytenphosphatase.

Die Phosphatasen spielen eine sehr wichtige Rolle bei der Entwicklung der Knochen⁴⁷⁾. *F. Köhler*⁴⁸⁾ konnte im Serum des tumorkranken Organismus von Tier und Mensch eine deutliche Erhöhung des Phosphatasegehaltes feststellen. Ob es sich hierbei um eine Erhöhung der eigentlichen Phosphatasenmenge handelt oder um neue Aktivatoren, ist noch zu entscheiden.

Für die Spaltung eines Phosphorsäureamids, der Kreatinphosphorsäure, machen *E. Waldschmidt-Leitz* und *F. Köhler*⁴⁹⁾ eine besondere Phosphatase, die Phosphoamidase, verantwortlich.

Zu den Phosphatasen werden noch die Lecithinase und Phytase gerechnet. Die *Lecithinase* spaltet das Lecithin. Sie wurde z. B. in der Takadiastase gefunden. Kobragift oder das Gift des Bienenstachels hydrolisiert Lecithin unter Abspaltung des Fettsäurerestes, ohne die Glycerin-Phosphorbindung anzugreifen. Das entstandene Lyolecithin erweist sich als stark hämolytischer Körper⁵⁰⁾.

Die *Phytase* spaltet Phytin, den Hexaphosphorsäureester des Inosits, unter Freisetzung von Phosphorsäure. Sie findet sich u. a. in der Reiskleie. *K. Horiuchi*⁵¹⁾ fand eine mehr oder weniger starke Wirkung auf Phytin auch von Phosphatasepräparaten aus Niere, Knochen, Muskel oder Leber.

⁴³⁾ S. auch *R. Ammon*, PFLÜGERS Arch. Physiol. 233, 486 [1933].

⁴⁴⁾ Biochemical Journ. 21, 665 [1927].

⁴⁵⁾ Ebenda 22, 855 [1928].

⁴⁶⁾ Ebenda 25, 1724 [1931]; Bull. Soc. Chim. biol. 13, 841 [1931].

⁴⁷⁾ *R. Robison*, Ergebn. d. Enzymforsch., Bd. I [1932].

⁴⁸⁾ Ztschr. physiol. Chem. 223, 93 [1934].

⁴⁹⁾ Biochem. Ztschr. 258, 360 [1933].

⁵⁰⁾ Siehe *Levene* in *Oppenheimer* u. *Pincussen*, Methodik der Fermente, 1929, S. 395.

⁵¹⁾ Journ. Biochemistry 14, 163 [1931].

²⁸⁾ Biochem. Ztschr. 241, 460 [1931]. Über eine evtl. spezielle Cerase siehe *V. Pertzoff*, Compt. rend. Acad. Sciences 187, 253 [1928], und *H. Kraut*, *H. Burger* u. *W. v. Pantschenko-Jurewicz*, Biochem. Ztschr. 269, 205 [1934].

²⁹⁾ S. auch *R. Ammon*, diese Ztschr. 45, 357 [1932].

³⁰⁾ Ztschr. Elektrochem. 12, 605 [1906].

³¹⁾ Biochem. Ztschr. 249, 446 [1932].

³²⁾ *P. Rona* u. *R. Ammon*, Übersicht s. Ergebn. d. Enzymforschung, Bd. II, 1933.

³³⁾ Biochem. Ztschr. 221, 381 [1930].

³⁴⁾ *P. Rona*, *R. Ammon* u. *H. A. Oelkers*, ebenda 231, 59 [1931]. *P. Rona*, *R. Ammon* u. *H. J. Trurnit*, ebenda 247, 100 [1932].

³⁵⁾ *R. Ammon*, unveröffentlichte Versuche.

³⁶⁾ *P. Rona*, *R. Ammon* u. *H. J. Trurnit*, Biochem. Ztschr. 247, 100 [1932]. *E. Sym*, ebenda 258, 304 [1933]. *R. Ammon* u. *E. Tabor*, ebenda 267, 26 [1933]. *Wolfekamp* u. *Griffioen*, Ztschr. physiol. Chem. 223, 36 [1934].

³⁷⁾ Im Druck.

³⁸⁾ Fermentforschung 8, 229 [1926].

³⁹⁾ *R. Ammon* u. *H. Kwiatkowski*, PFLÜGERS Arch. Physiol. 234, 269 [1934].

⁴⁰⁾ *A. Simonart*, Rev. belge Sci. méd. 5, 73 [1933].

⁴¹⁾ *E. u. E. Stedman* u. *L. Easson*, Biochemical Journ. 26, 2056 [1932]. *K. Matthes*, Journ. Physiol. 70, 338 [1930].

⁴²⁾ *R. Ammon*, Klin. Wchschr., im Druck.

Die Sulfatasen.

C. Neuberg und E. Hofmann⁵²⁾ unterscheiden drei Sulfatasen: 1. die Phenol-Sulfatase, die die Ester schwefelsaurer Salze der Phenole, 2. die Senfölglicosido-Sulfatase, die die Estersulfate der Senfölglicoside spaltet (eventuell im Verein mit Glucosidasen), und 3. die Chondrosulfatase, die die Chondroitinschwefelsäure hydrolysiert, ohne die Phenolesterschwefelsäuren anzugreifen.

⁵²⁾ Naturwiss. 1931, 484; Biochem. Ztschr. 234, 345 [1931].

Sie kann jedoch auch die Estersulfate der Senfölglicoside spalten. Die Sulfatasen sind im tierischen und pflanzlichen Organismus zu finden. Fromageot⁵³⁾ fand, daß sowohl animalische als auch vegetabilische Sulfatasen eine stereochemische Spezifität zeigen: Das dl-ester-schwefelsaure Kaliumsalz des p-sek-Butyl-phenols wird asymmetrisch hydrolysiert, und zwar unter Bevorzugung des d-p-sek-Butyl-phenols. [A. 46.]

⁵³⁾ Biochem. Ztschr. 208, 482 [1929].

Carbohydrasen.

Von Priv.-Doz. Dr. RUDOLF WEIDENHAGEN, Berlin.

(Eingeg. 4. April 1934.)

Inhalt: Spezifität und Wirkungsbereich. — Enzymatische Spaltung des Rohrzuckers. — Enzymatische Spaltung von Raffinose und Melezitose. — Spezifität des Emulsins. — Enzymatische Spaltung der Polysaccharide. — Anreicherung der aktiven Enzymsubstanz.

Unter Carbohydrasen faßt man eine große Gruppe von Enzymen zusammen, welche die hydrolytischen Spaltungen in der Kohlenhydratreihe bewirken. Sie spalten Glykoside in Zucker und Aglykon sowie Oligo- und Polysaccharide in die einfachen Zuckerbausteine. Dieser Tätigkeit entsprechend sind sie in tierischen und pflanzlichen Zellen außerordentlich weit verbreitet. Ihre Erforschung hat seit Anbeginn der Enzymologie eine besondere Pflege erfahren. Diese Tatsache ist wohl darauf zurückzuführen, daß bei den Carbohydrasen die Isolierung der aktiven Substanz von dem lebenden Zellmaterial in idealer Weise möglich ist. Weiter mag dazu beigetragen haben, daß die analytische Verfolgung ihrer Wirkung auf polarimetrischem Wege oder durch Reduktionsbestimmung der auftretenden Zuckerspaltstücke gegenüber Fehlingscher Lösung besonders einfach ist. Nicht zuletzt hat man durch die Zuckerchemie schon seit langem eine genaue Kenntnis der durch die Carbohydrasen zum Umsatz kommenden Substrate, deren konstitutionelle und konfigurative Beschaffenheit für die Charakterisierung der Enzyme so wichtig ist.

Spezifität und Wirkungsbereich.

Wie bei Enzymen anderer Gruppen zeigt sich nämlich auch bei den Carbohydrasen eine außerordentlich feine Einstellung auf bestimmte Gruppen der Substrate, eine Eigenschaft, welche man bekanntlich als die Spezifität der Enzyme bezeichnet. Ursprünglich ging man von der Auffassung aus, daß man für jedes Glykosid, für jedes Disaccharid, für jedes Trisaccharid und natürlich auch für die verschiedenen Polysaccharide ihrer absoluten Spezifität nach verschiedene Enzyme anzunehmen habe, welche die hydrolytische Spaltung dieser Substrate bewirken. Allmählich brach sich die Anschauung Bahn, daß wenigstens alle β -glucosidisch verknüpften Glykoside der Glucose unbekümmert um die Natur des Aglykons von einem einheitlichen, beispielsweise im Emulsin vorhandenen Ferment, der β -Glucosidase, gespalten werden. Dabei war aber bei den einzelnen Vertretern eine verschiedene Geschwindigkeit der Spaltung zu beobachten, was mit der Affinität zwischen Enzym und Substrat zusammenhängt und seinen Ausdruck in der relativen Spezifität findet. Weiter wurde festgestellt, daß auch die Spaltung von α -Methylglucosid und Maltose von ein und demselben Ferment bewirkt wird¹⁾, und daß auch die Rohrzucker spaltende Saccharase zur Abspaltung des Fructoserestes im Rohrzuckerteil der Raffinose befähigt ist²⁾. Diese Befunde bedeuteten eine wesentliche Einschränkung im Umfang der absoluten Spezifität der

Carbohydrasen, ohne daß man aber für die theoretische Behandlung der Spezifitätsfragen die notwendigen Konsequenzen aus diesen Beobachtungen zog.

Die Entwicklung des Spezifitätsproblems nahm vielmehr die entgegengesetzte Richtung. Auf Grund des unterschiedlichen hemmenden Einflusses der Spaltstücke des Rohrzuckers auf die durch Hefe- bzw. Takasaccharase ausgelöste Inversionsgeschwindigkeit kam Kuhn³⁾ zu der Annahme, daß die Saccharase von zwei auf die Monosaccharidkomponenten verschieden eingestellten Enzymen gespalten werden könnte. Nach der ersten Fassung dieser sogenannten Zweienzymtheorie hatte man Gluco- und Fructosaccharasen zu unterscheiden, je nachdem das Ferment mit dem Glucose- oder Fructoseil des Disaccharids das Reaktionszwischenprodukt im Sinne der Anschauungen von Michaelis und Menten⁴⁾ bildet. Diese Vorstellung ließ sich jedoch nicht in dem erwarteten Maße aufrechterhalten. Euler und Josephson⁵⁾ fanden nämlich bei der Untersuchung der Saccharase einer Stockholmer Unterhefe sowohl Hemmung durch α - als auch durch β -Glucose. Auch bei Gleichgewichtsfructose trat Hemmung von der Größenordnung wie bei α - und β -Glucose ein. Die Befunde deuteten auf eine gleiche Affinität des Enzyms zu den beiden stereoisomeren Formen der Monosaccharide. Die Untersuchung einer Reihe weiterer Hefesaccharasen⁶⁾ zeigte, daß diese bald als Gluco-, bald als Fructosaccharasen gedeutet werden mußten. Dabei ist auf eine Schwierigkeit hinzuweisen, daß nämlich die normale Fructose mit der im Rohrzucker vorliegenden h-Form nicht identisch ist. Somit sagen Hemmungsversuche mit normaler Gleichgewichtsfructose nichts aus über die wahre Affinität des Enzyms zur β -h-Fructose des Rohrzuckers. Die Zweienzymtheorie wurde schließlich dahin eingeschränkt, daß mit dem Begriff Gluco- und Fructosaccharasen nur noch die Vorstellung verbunden werden sollte, daß die einen durch α -Glucose, nicht aber durch Fructose, die anderen durch Fructose und nicht durch α -Glucose gehemmt werden. An diesem Bild wurde auch nichts geändert, nachdem erneut festgestellt wurde, daß Hemmung und Affinität nicht gleichzusetzen seien.

Auch bei der Maltase trat eine ähnliche Komplizierung des Spezifitätsproblems ein⁷⁾. Aus Gerstenmalz und Schimmelpilzen wurden maltosespaltende Enzyme isoliert, die im Gegensatz zur Hefemaltase noch im stark sauren Bereich Aktivität besaßen und gegen α -Methylglucosid völlig unwirksam waren. Zur Erklärung dieser

¹⁾ Willstätter, Kuhn u. Sobotka, Ztschr. physiol. Chem. 134, 224 [1924].

²⁾ Willstätter u. Kuhn, ebenda 125, 34 [1923].

³⁾ Kuhn, Ztschr. physiol. Chem. 129, 57 [1923].

⁴⁾ Biochem. Ztschr. 49, 333 [1910].

⁵⁾ Ztschr. physiol. Chem. 132, 301 [1924].

⁶⁾ Kuhn u. Münch, ebenda 150, 221 [1925]; 163, 1 [1927].

⁷⁾ Leibowitz, ebenda 149, 184 [1925]; 154, 64, [1926].