

Die Sulfatasen.

C. Neuberg und E. Hofmann⁵²⁾ unterscheiden drei Sulfatasen: 1. die Phenol-Sulfatase, die die Ester schwefelsaurer Salze der Phenole, 2. die Senfölglycosido-Sulfatase, die die Estersulfate der Senfölglycoside 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 Senfölglycoside 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-esterschwefelsaure 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 Emulsion 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 verschiedenen 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 Fructoseteil 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

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].

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

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

Erscheinung wurde in Anlehnung an die Zweisaccharastheorie auch eine Zweiteilung der Maltasen in Glucosid- und Glucomaltasen vorgenommen, je nachdem das Enzym auf die glucosidisch verknüpfte oder auf die als Paarling fungierende Glucose eingestellt ist. Beide Zweienzymtheorien bringen zum Ausdruck, daß die Spaltung der Disaccharide nicht durch einheitliche Enzyme bewirkt wird, sondern daß eine ganze Reihe von Enzymen wirksam sind, die mit einer noch feineren Spezifität begabt sind, deren Ursache in den einzelnen Komponenten der Disaccharide zu suchen ist. Bei den Gluco- und Fructosaccharasen wäre also sozusagen als obere Spezifität die spezifische Einstellung auf den Rohrzucker als Disaccharid anzusehen, die beide Enzyme umfassen würde. Als untere Spezifität, welche das Bestehen der oberen Spezifität aber voraussetzt, hätte man dann die spezifische Einstellung der Enzyme auf die Teilkomponenten des Rohrzuckers zu verstehen. Gegenüber dieser Vorstellung, die in allen Fällen neue Enzymindividuen annimmt, sieht die Zweiaffinitätstheorie von Euler⁸⁾ beispielsweise bei der Saccharase nicht neue Enzymtypen vor, aber eine wechselnde Spezifität der Saccharase für die eine oder andere Komponente des Rohrzuckers. Das Wesen dieser Vorstellung liegt darin, daß ganz allgemein für die Verbindung eines hydrolyzierenden Enzyms mit dem Substrat nicht nur eine, sondern zwei verschiedene Affinitätsstellen in Betracht kommen sollen.

Gemeinsam ist den Vorstellungen also eine weitere Verfeinerung in den Beziehungen zwischen Enzymen und Substraten hinsichtlich der absoluten Spezifität. Gegenüber solchen Anschauungen schien die Tatsache vergessen, daß für die Spaltung von α -Methylglucosid und Maltose nur ein Enzym verantwortlich gemacht zu werden brauchte. Diesen beiden Substraten ist aber nur die in ihrer α -Konfiguration verknüpfte Glucosekomponente gemeinsam. Die konsequente Weiterführung dieser Überlegung führte zu einer neuen Spezifitätstheorie der Carbohydrasen⁹⁾, die sich in den letzten Jahren weit über den Rahmen einer einfachen Arbeitshypothese hinaus entwickelt hat. Danach ist es ausreichend, für die Spaltung der Glykoside und Oligosaccharide und vielleicht sogar für die Spaltung einiger Polysaccharide einfache Glykosidasen anzunehmen, deren absolute Spezifität sich auf die Konstitution und Konfiguration des glykosidisch verknüpften Zuckers beschränkt. Die Natur des glykosidischen Paarlings, ob Zucker oder Aglykon, ist für den Spaltungsvorgang als solchen unwe sentlich und übt nur einen Einfluß auf die relative Spezifität aus, die sich vornehmlich in einer unterschiedlichen Spaltungsgeschwindigkeit ausdrückt. Durch diese Annahme wird der Zusammenhang zwischen der chemischen Konstitution und der enzymatischen Spezifität wesentlich enger, als er bisher bei den zusammenhanglosen Spezifitäten der Carbohydrasen gewesen ist.

Für die Eingruppierung eines Glykosides bezüglich seiner Zuckerkomponente und damit auch im weiteren Sinne für die ebenfalls als Glykoside zu betrachtenden Oligosaccharide sind in erster Linie drei charakteristische Merkmale maßgebend, die als Zuckerisomerie, α, β -Isomerie und als Ringisomerie bezeichnet werden können. Unter Zuckerisomerie ist dabei die Stereoisomerie an den nichtglykosidischen C-Atomen (Glucose und Galaktose) und auch die Konstitutionsiso-

merie zwischen Aldosen und Ketosen (Glucose, Fructose) zu verstehen. α, β -Isomerie ist die Konfigurationsisomerie am glykosidischen C-Atom des gleichen Zuckers, und Ringisomerie bedeutet die Isomerie durch Verschiebung des Laktolringes ebenfalls beim gleichen Zucker. Mit der Feststellung dieser drei Kennzeichen ist der Typus des glykosidisch verknüpften Zuckers eindeutig festgelegt. Die sich auf dieser Basis ergebenden Verwandtschaften zwischen den einzelnen Glykosiden und Oligosacchariden sind aus der folgenden Tabelle¹⁰⁾ zu entnehmen:

Z u c k e r	P a a r l i n g	G l y k o s i d
α -n-Glucose	< Methyl	α -n-Methylglucosid
α -n-Glucose	< 4-Glucose <	Maltose
α -n-Glucose	<> β -h-Fructose	Saccharose
α -n-Glucose	<> β -h-Fructose > α -Glucose	Melezitose
α -n-Glucose	< β -h-Fructose >> α -Glucose	Melezitose
β -n-Glucose	< Methyl (Aglykon)	β -n-Methylglucosid (die natrl. Glykoside)
β -n-Glucose	< 4-Glucose <	Cellobiose
β -n-Glucose	< 6-Glucose <	Gentiobiose
β -h-Fructose	<> α -Glucose	Saccharose
β -h-Fructose	<> α -Glucose > α -Galaktose	Raffinose
α -n-Galaktose	< 6-Glucose <	Melibiose
α -n-Galaktose	< α -Glucose >> β -h-Fructose	Raffinose
β -n-Galaktose	< 4-Glucose <	Laktose

Die Aufzeichnung ist der besseren Übersicht halber rein schematisch. Die glykosidischen Bindungen sind durch Winkel dargestellt, deren Spitze den Sitz des glykosidischen Hydroxyls bedeuten soll. Für die enzymatische Spaltung ergibt sich als bemerkenswertes Ergebnis dieser Anschauungsweise, daß die doppelt glykosidisch verknüpften Zucker an zwei Stellen des Schemas erscheinen, je nachdem, welchen der beiden Zucker man als „Bezugszucker“ zugrunde legt.

Den drei charakteristischen Isomeren der Zucker stehen nun drei gleichartige Spezifitäten der Carbohydrasen gegenüber: Zucker spezifität, α, β -Spezifität und Ringspezifität. Mit diesen drei Spezifitäten finden sämtliche hydrolytischen Zuckerspaltungen eine ausreichende Erklärung.

Die experimentellen Grundlagen für diese Theorie haben sich ausnahmslos schaffen lassen. Als deren wichtigste kann die von der Theorie geforderte Spaltung der Saccharose durch zwei verschiedene Enzyme (α -Glucosidase und β -h-Fructosidase) gelten¹¹⁾.

Die enzymatische Spaltung des Rohrzuckers.

Infolge der Einengung der Enzymspezifität auf den glykosidisch verknüpften Zuckerrest müssen beim Rohrzucker wegen der doppelt glykosidischen Verknüpfung dieses Disaccharids nämlich zwei ihrer absoluten Spezifität nach verschiedene Enzyme zur Spaltung befähigt sein. Auf Grund von Konstitution und Konfiguration muß dieselbe rohrzuckerspaltende α -Glucosidase aber auch zur Spaltung von Maltose und Melezitose befähigt sein, während die rohrzuckerspaltende β -h-Fructosidase ohne weiteres auch eine raffinosespaltende Wirkung an der fructosidischen Bindung dieses Trisaccharids besitzen muß. Der Nachweis der Rohrzuckerspaltung durch zwei verschiedene Enzyme war demnach identisch mit dem Nachweis einer rohrzuckerspaltenden Wirkung der Maltase. Sie gelang überraschend schnell mit der α -Glucosidase der Hefe, deren Abtrennung von der β -h-Fructosidase in Fortführung und Verbesserung der alten Trennung von Saccharase und Maltase durch Willstätter und Bamann¹²⁾ durchgeführt wurde¹³⁾. Diese Abtrennung

¹⁰⁾ Aus Weidenhagen: Chemische Konstitution und enzymatische Hydrolyse, Stuttgart 1932, S. 13.

¹¹⁾ L. c. 10.

¹²⁾ Ztschr. physiol. Chem. 151, 273 [1926].

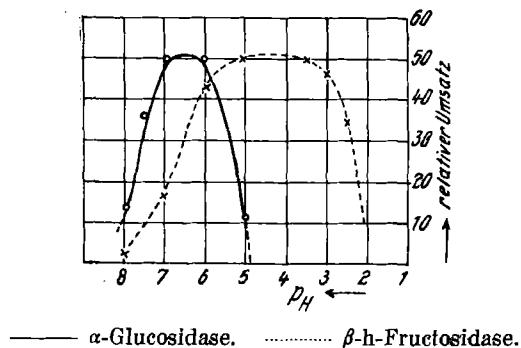
¹³⁾ Weidenhagen, Ztschr. Ver. Dtsch. Zuckerind. 80, 155, 374 [1930]; 82, 503 [1932].

⁸⁾ Ztschr. physiol. Chem. 143, 79 [1925]; Chemie der Enzyme, München 1928, II, S. 186.

⁹⁾ Weidenhagen, Naturwiss. 16, 654 [1928]; Ztschr. Ver. Dtsch. Zuckerind. 78, 539, 781 [1928]; Erg. Enzymf., Leipzig I, S. 168, 1932.

dürfte heute zu den best beherrschten enzymatischen Operationen gehören. Eine Diskussion von Spezifitätsfragen der Carbohydrasen wird diese Tatsache immer berücksichtigen müssen.

Für die Bestimmung der beiden rohrzuckerspaltenden Enzyme nebeneinander sind folgende Gesichtspunkte maßgebend¹⁴⁾). Die α -Glucosidase der Hefe wirkt sowohl auf Maltose als auch auf Saccharose. Ihr Wirkungs optimum liegt in der Nähe des Neutralpunktes und ist bei einem pH von 4,7, der für die Fructosidase optimal ist, völlig wirkungslos. (Vgl. die Aktivitäts-pH-Kurve der beiden Enzyme.) Man führt nun zweckmäßig die Ab-



trennung der α -Glucosidase mit wenig gealtertem Aluminiumhydroxyd B präparativ so weit durch, daß sie bei einem pH von 4,7 keine Rohrzuckerspaltung mehr zeigt. Das bedeutet, daß die Fructosidase aus dem Enzymgemisch verschwunden ist. Wenn man jetzt die Rohrzuckerinversion der fructosidasefreien Glucosidase beim Neutralpunkt prüft, so zeigt sich wieder eine kräftige Spaltung des Rohrzuckers, die nur so erklärt werden kann, daß die maltosespaltende α -Glucosidase die α -glucosidische Bindung des Rohrzuckers gelöst hat und somit in ihrer absoluten Spezifität wirklich in dem geforderten Sinne beschränkt ist. Die rohrzuckerspaltende Wirkung der α -Glucosidase kommt aber auch in der ursprünglichen Hefe zum Ausdruck. Beim optimalen pH der Fructosidase tritt die Wirkung der α -Glucosidase nicht in Erscheinung, da sie sistiert ist. Dagegen macht sie sich bei einem pH von 7,0 bemerkbar. Die Fructosidase zeigt hier auf Grund ihrer bekannten pH-Aktivitätskurve noch etwa 40% der optimalen Wirksamkeit. Dazu addiert sich die Tätigkeit der α -Glucosidase in voller Höhe, so daß man bei einer normalen untergärigen Bierhefe am Neutralpunkt noch etwa 61,8% der optimalen Inversionsfähigkeit vorfindet¹⁵⁾. Dieser Befund, der bisher trotz des langen Bekanntseins der Aktivitäts-pH-Kurve des Invertins übersehen war, hat vor allem für Untersuchungen über die Gärfähigkeit des Rohrzuckers Bedeutung, um so mehr, als sich die Tätigkeit der rohrzuckerspaltenden α -Glucosidase sogar bis ins schwach alkalische Gebiet erstreckt.

Die enzymatische Spaltung von Raffinose und Melezitose¹⁶⁾.

Die beiden Trisaccharide sind als Derivate des Rohrzuckers aufzufassen. Bei der Raffinose ist in den Glucoseteil der Saccharose ein Galaktoserest eingetreten, bei der Melezitose ist der Fructoseteil der Saccharose durch einen weiteren Glucosederest substituiert. Es zeigt sich, daß in beiden Fällen die Substitution ausreicht, um die Wirkung des einen Enzyms jeweils auszuschalten. Raffinose ist

¹⁴⁾ Vgl. auch Weidenhagen in Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, Abt. IV, II, S. 2057, 1933.

¹⁵⁾ Weidenhagen, Ztschr. Ver. Dtsch. Zuckerind. 80, 376 [1930].

¹⁶⁾ Weidenhagen, ebenda 78, 794 [1928].

nur durch β -h-Fructosidase spaltbar, umgekehrt wird Melezitose nur von α -Glucosidase angegriffen. Diesem Enzym bieten sich aber zwei Angriffsmöglichkeiten, da auch die zweite Glucosekomponente der Melezitose in der α -Konfiguration vorliegt. Daher zerfällt das Trisaccharid sofort in ein Gemisch von zwei Teilen Glucose und einem Teil Fructose, wie sich leicht analytisch nachweisen läßt. Man beobachtet dabei einen fast theoretischen Zerfall des Trisaccharids in die drei Komponenten, was wohl auf einer gleich großen Affinität der α -Glucosidase zu den beiden Bindungsstellen des Moleküls beruht. Diese ist aber durchaus nicht von vornherein als gegeben anzunehmen, vielmehr wechselt im allgemeinen die Spaltungsgeschwindigkeit bei gleicher Bindung und gleichem Enzym mit der Natur des an dieser Bindung befindlichen Substituenten. Dieser Frage kommt eine besondere Bedeutung insofern zu, als es Fälle gibt, in denen die Spaltungsgeschwindigkeit so stark verlangsamt ist, daß sie die Nullgrenze erreicht und damit eine neue absolute Spezifität vortäuschen kann. Ein solcher Fall liegt bei der α -Methylglucosidspaltung durch die α -Glucosidase des Gerstenmalzes und der Takadiastase vor, der Pringsheim¹⁷⁾ und Mitarbeiter immer wieder zur Verfechtung der überholten Zweimaltasentheorie von Leibowitz veranlaßte. Wenn man den Beweis der Nichtspaltbarkeit führen will, sind nach Helferich¹⁸⁾ die Methylglucoside ganz allgemein infolge ihrer geringen Spaltbarkeit recht ungeeignete Substrate. Bei solchen Prüfungen sind die entsprechenden Phenolglykoside zu verwenden, mit denen man auch im obigen Fall ohne weiteres die α -glucosidatische Wirkung dartun kann¹⁹⁾. Für diese Wirkung spricht beim Gerstenmalz auch der mit fast theoretischen Werten verlaufende Zerfall der Melezitose in zwei Mol Glucose und ein Mol Fructose.

Die an den Trisacchariden gewonnenen Ergebnisse sind aber für die Natur der Rohrzuckerspaltung noch ganz allgemein von Bedeutung. So günstige Verhältnisse, daß die Glucosidasewirkung im optimalen pH-Bereich der Fructosidase sistiert ist, liegen nämlich nur bei der Hefe vor. Die Empfindlichkeit der Glucosidase im sauren Bereich ist bei diesem Spaltpilz wohl auf besonders labile Trägerstoffe zurückzuführen. Bei vielen anderen Materialien, die untersucht wurden, ist die Aktivitäts-pH-Kurve für beide Enzyme identisch mit einem normalen Optimum im sauren Bereich. Eine Entscheidung darüber, ob die Spaltung des Rohrzuckers in solchen Fällen durch Glucosidase oder Fructosidase oder durch beide zusammen bewirkt wird, ist also auf direktem Wege gar nicht möglich. Erst die gleichzeitige Untersuchung der Trisaccharidspaltung gibt wenigstens qualitativ einen Aufschluß. Erhält man neben Rohrzuckerhydrolyse eine kräftige Raffinosespaltung und demgegenüber geringe Melezitosespaltung, so liegt hauptsächlich Fructosidasewirkung vor. Tritt aber umgekehrt die Raffinosespaltung zurück und die Melezitosespaltung in den Vordergrund, so überwiegt Glucosidasewirkung. Solche Fälle finden sich in dem schon erwähnten Gerstenmalz und im Macerationssaft der Dünndarmschleimhaut. Es scheint, daß diese beiden Materialien von vornherein gar nicht auf die Spaltung des Rohrzuckers eingestellt sind, denn beide sollen ja in erster Linie auf die aus der Stärke entstandene Maltose wirken. Demnach wäre die Rohrzuckerspaltung eine zwangsläufige Nebenerscheinung infolge der gleichen α -glucosidischen Verknüpfung der Glucose. Für das tierische Enzym ist allerdings die charakteristische Hydrolyse der Melezitose noch nicht eindeutig nachgewiesen wor-

¹⁷⁾ Z. B. Ztschr. physiol. Chem. 202, 23 [1931]; 207, 241 [1932].

¹⁸⁾ Ebenda 208, 82 [1932].

¹⁹⁾ Weidenhagen, ebenda 216, 255 [1933].

den. Außerdem ist die ganze Frage insofern noch unklar, als bisher Spaltung von Rohrzucker nur in Darmsaft und Leukocyten, nicht in Organen gefunden worden ist. Während die tierische „Saccharase“ nach Bierry²⁰⁾ auf Raffinose vollständig unwirksam ist, also wahrscheinlich gar keine Fructosidase enthält, ist im Gerstenmalz auszugehen der Melezitosespaltung auch eine schwache Raffinosespaltung zu beobachten, was auf das Vorhandensein einer geringen Menge Fructosidase schließen läßt. Gelegentlich doch beobachtete Raffinosespaltung durch Dünndarmschleimhaut oder Blutplasma²¹⁾ hat vielleicht alimentäre Ursachen.

Die Spezifität des Emulsins.

Auch für die klassische Spaltung des Amygdalins, des Mandelsäurenitrilglykosids der Gentiobiose, konnte der Anschluß an die neuen Vorstellungen über Spezifität hergestellt werden²²⁾. Es zeigte sich, daß die scheinbar nach einer monomolekularen Reaktion verlaufende Gesamtspaltung des Amygdalins dahin aufzulösen ist, daß zunächst die Disaccharidbindung mit erheblich größerer Geschwindigkeit gespalten wird als die Zuckerglykombindung, so daß die Gentiobiosespaltung wesentlich schneller zu Ende läuft als die Prunasinspaltung. Ein Hintereinanderlaufen der beiden Spaltungskurven ist offenbar deswegen nicht möglich, weil die Konzentration des erst im Verlaufe der Spaltung entstehenden Prunasins zunächst außerordentlich klein ist. Weiterhin dürften aber verschiedene Affinitäten mit ausschlaggebend sein. Auch für die β -Glucosidase der Hefe hat sich bezüglich der Amygdalinspaltung die Identität mit der β -Glucosidase des Emulsins nachweisen lassen. Eine eingehende Untersuchung über den weiteren Wirkungsbereich der Emulsinfermenter verdanken wir Helferich²³⁾ und Mitarbeitern. Die Prüfung wurde nach Art der von Willstätter angewandten Methode des Zeitwertquotienten durchgeführt, wobei Emulsinpräparate verschiedensten Reinheitsgrades und verschiedenster Herkunft verwendet wurden. Besonders eingehend ist in diesem Zusammenhang die Frage nach der evtl. Identität von β -d-Glucosidase und β -d-Galaktosidase studiert worden. Das Ergebnis dieser Prüfung läßt nach Helferich die einfachste Annahme, daß ein Ferment Glucoside und Galaktoside spaltet, durchaus möglich erscheinen. Dagegen scheinen spezifische Fermente für die Spaltungen von α -d-Mannosiden, α -d-Galaktosiden und β -L-Arabinosiden zu existieren. Aus diesen Befunden muß man schließen, daß die Zuckerspezifität nicht streng absolut ist, sondern daß vielleicht eine ganze Reihe von Änderungen im Zuckeranteil der β -d-Glucoside nur eine Änderung der relativen Spezifität bedingen. In diesem Zusammenhang ist es nicht ohne weiteres zu verstehen, warum das Spaltungsverhältnis für Glucoside und Galaktoside, das beim Emulsin sehr zugunsten der Glucoside liegt, sich bei den Milchzuckerhefen umkehrt²⁴⁾. Der gleiche Fall wurde für die Cellobiose- und Salicinspaltung beobachtet²⁵⁾. Hier beträgt der β -Glucosidasewert des Emulsins mit Cellobiose als Substrat nur etwa ein Achtel gegenüber dem Standardsubstrat Salicin. Im Gegensatz dazu spaltet die β -Glucosidase des Gerstenmalzes die Cellobiose etwa viermal schneller als Salicin. Nach früheren Anschauungen müßte man hier für ver-

schiedene Enzyme plädieren. Der Beweis der Einheitlichkeit ist sicher schwer zu führen. Wenn sie hier trotzdem angenommen wird, so geschieht es mit aller Vorsicht. Es bedarf noch weiterer Beweise, daß die Begleitstoffe oder vielleicht auch verschiedene Trägersubstanzen die Ursache für diese Umkehr sind.

Die enzymatische Spaltung der Polysaccharide.

Eine einheitliche Behandlung der polysaccharidspaltenden Enzyme hat sich bisher noch nicht ohne weiteres durchführen lassen. Das Spezifitätsproblem dieser Enzyme hängt eng zusammen mit dem Problem der Konstitution und Konfiguration ihrer Substrate. Anders als bei den Glykosiden und Oligosacchariden stehen hier keine definierten Substrate zur Verfügung, und auch die zur näheren Charakterisierung der Spezifität unerlässlichen unphysiologischen Substrate sind nur in bescheidenem Umfang zugänglich. Nach unseren Kenntnissen sind die Polysaccharasen jedoch als echte Carbohydrasen aufzufassen. Ihre Tätigkeit beruht höchstwahrscheinlich nicht auf einer Überführung der hochmolekularen Kolloide in kristalloide Zuckerderivate durch Aufhebung von übermolekularen oder Nebenvalenzkräften, sondern auf der Spaltung echter glykosidischer Bindungen. Am leichtesten hat sich das Problem der Inulinspaltung einer Lösung entgegenführen lassen²⁶⁾. Hier konnte gezeigt werden, daß die β -h-Fructosidase, die zur Rohrzucker- und Raffinosespaltung befähigt ist, auch die Spaltung des fructosidisch aufgebauten Inulins bis zur d-Fructosestufe bewirken kann. Sogar das unsymmetrisch aufgebaute Irisin wird von dem gleichen Enzym vollständig in Fructose übergeführt²⁷⁾. Allerdings ist die Spaltungsgeschwindigkeit, mit der die Spaltung des Inulinmoleküls vor sich geht, etwa 5000mal kleiner als beim Rohrzucker, und beim Irisin ist die Reaktionsgeschwindigkeit nochmals um das 50fache herabgesetzt. Es erhebt sich damit die für das Spezifitätsproblem außerordentlich wichtige Frage, ob es berechtigt ist, bei so großen Differenzen in der Reaktionsgeschwindigkeit in der Tat noch das gleiche Enzym für die Spaltung verantwortlich zu machen. Bei der Fructosidase hat sich bei 38facher Reinigungssteigerung das Verhältnis der Spaltungsgeschwindigkeiten für die einzelnen Substrate als konstant erwiesen, so daß man wohl an ein einheitliches Enzym denken kann. Immerhin ist mit Rücksicht auf die Befunde bei der Cellulosespaltung eine Aufspaltung in Poly- und Oligofructosidase ins Auge zu fassen. Hier konnte nämlich nachgewiesen werden²⁸⁾, daß Schimmelpilze eine spezifische Polyglucosidase enthalten, welche die native Cellulose sowie hoch- und höhermolekulare Abbaustoffe spaltet, während die normale β -Glucosidase nur β -Glucoseketten bis zu sechs Gliedern hinauf spaltet. Die beiderseitigen Spezifitätsgebiete überlagern sich ungefähr bei dem Molekulargewicht gleich 1000 (Hexaoestufe). Dieser Befund steht im vollen Einklang mit der für die Glykosid- und Oligosaccharidspaltung diskutierten Theorie insofern, als der Spezifitätsbereich der β -Glucosidase bis zum Hexasaccharid hinauf ausgedehnt wird. Daß daneben noch spezifische Polysaccharasen existieren, ist von dieser Theorie nicht ausgeschlossen worden. Lediglich auf Grund der Befunde bei der Inulinspaltung war an die Möglichkeit einer allgemeinen Ausdehnung der Spezifität auf die Polysaccharide gedacht worden. Auf alle Fälle hat die

²⁰⁾ Biochem. Ztschr. 44, 426 [1916].

²¹⁾ Weidenhagen, Ztschr. Ver. Dtsch. Zuckerind. 82, 318 [1932].

²²⁾ Weidenhagen, ebenda 79, 599 [1929].

²³⁾ Zusammenfassung in Erg. Enzymf. II, 74 [1933].

²⁴⁾ Neuberg u. Hofmann, Biochem. Ztschr. 256, 450, 462 [1932]. Vgl. auch E. Hofmann, ebenda 265, 209 [1933].

²⁵⁾ Weidenhagen, Ztschr. Ver. Dtsch. Zuckerind. 80, 12 [1930].

²⁶⁾ Weidenhagen, Naturwiss. 20, 254 [1932]. Ztschr. Ver. Dtsch. Zuckerind. 82, 316, 912 [1932].

²⁷⁾ Weidenhagen, Ztschr. Ver. Dtsch. Zuckerind. 83, 1042 [1933].

²⁸⁾ Graßmann u. Mitarbeiter, LIEBIGS Ann. 502, 20 [1933]; 503, 167 [1933]. Ber. Dtsch. chem. Ges. 67, 1 [1934].

neue Theorie auch auf die enzymatische Polysaccharidforschung außerordentlich befriedigend gewirkt.

Am schwierigsten liegen die Verhältnisse zweifellos auf dem Gebiete der enzymatischen Stärke spaltung. Hier tritt das Fehlen einheitlicher und vergleichbarer Substrate besonders unangenehm in Erscheinung. Als sicher kann heute gelten, daß zwei verschiedene Amylasetypen am Abbau der Stärke beteiligt sind. Nachdem bereits Kuhn²⁹⁾ nachgewiesen hatte, daß die Malzamylase die Gesamtmenge der von ihr gebildeten Maltose in der β -Modifikation, die Pankreas- und Takadiastase in der α -Modifikation in Freiheit setzen, und daß demzufolge in diesem Sinne α - und β -Amylasen existieren, konnte schließlich Ohlsson³⁰⁾ auch bei der Malzamylase eine Aufspaltung in zwei verschiedene Amylasen vornehmen. Bringt man Malzextrakt bei 0° während 15 Min. auf pH 3,3 und setzt dann sek. Natriumphosphat bis zu pH 6 zu, so findet man nur noch 1—2% der ursprünglichen Dextrinbildung, dagegen 70—80% der Zuckerbildung zurück. Umgekehrt wird durch Erhitzen während 15 Min. auf 70° bei pH 6,5 das zuckerbildende Vermögen stark herabgesetzt, während das Dextrinbildungsvermögen bis zu 75% bestehen bleibt. Beide Amylasen wurden von Ohlsson als Saccharogenamylase (β -Amylase) und Dextrinogenamylase (α -Amylase) bezeichnet. Neuerdings hat sich auch auf adsorptivem Wege eine Trennung der beiden Malzamylasen durchführen lassen. Eine eingehende Behandlung des Spezifitätsproblems der Amylasen hat in letzter Zeit von Klinkenberg³¹⁾ durchgeführt. Dabei ergab sich überraschenderweise, daß das sogenannte dextrinierende Enzym mehr Maltose zu bilden vermag aus dem gleichen Substrat als das verzuckernde. Nur wenn man die Jodreaktion verfolgt, kann man von einem dextrinierenden Enzym sprechen, da diese Reaktion nur bei der Wirkung der α -Amylase verschwindet. In dieser Hinsicht wären aber auch die tierischen Amylasen dextrinierende Enzyme. Die Abbaugrenze der β -Malzamylase ist mit etwa 64% Maltosebildung anzusetzen, ohne daß die Jodreaktion verschwindet. Die α -Amylase bildet sehr schnell unter Verschwinden der Jodreaktion α -Maltose bis zu einer Verzuckerungsgrenze von 36%, während die weitere Verzuckerung dann sehr viel langsamer verläuft. Diese scharfen Grenzen wurden von Klinkenberg allerdings nur bei Lintnerstärke beobachtet. Zur Erklärung dieser Erscheinung wird von Klinkenberg die Hypothese aufgestellt, daß die Stärke ein Gemisch von zwei Komponenten, α - und β -Stärke, vorstellt, die in dem Verhältnis 36 : 64 nebeneinander vorkommen. Die α -Stärke wird nur von α -Amylasen, die β -Stärke nur von β -Amylasen verzuckert. Das Gemisch der beiden Stärken wird dabei als ein Gleichgewichtszustand angesehen, von denen nur die α -Stärke befähigt ist, sich mit Jod zu färben. Besonders interessante Befunde haben sich dabei beim tierischen Glykogen ergeben. Dieses Polysaccharid besteht nämlich im Gegensatz zu den pflanzlichen Produkten aus α -Stärke, die sich nur zu einem geringen Teil in die β -Form hat umlagern können. Demzufolge besitzt die β -Amylase zur tierischen Stärke nur eine sehr geringe Affinität. Das Glykogen verhält sich wie das Restprodukt der β -Amylasewirkung, und α -Malzamylase bildet aus Glykogen nahezu die gleiche Zuckermenge wie aus einer gleich konzentrierten Menge des Restproduktes. Nach Klinkenberg ist die Zusammensetzung des Glykogens vor allem dadurch interessant, daß im Tierkörper sowie in Pilzen und Bak-

terien entsprechend nur α -Amylase aufgefunden wird. Umgekehrt findet man in der grünen Pflanze, wo ein Gemisch von α - und β -Stärke vorliegt, auch α - und β -Amylase nebeneinander. β -Amylase ist das typische Enzym der grünen Pflanze. Hiermit wird also erneut betont, daß die Stärke ein Gemisch von α - und β -glucosidischen Bindungen enthält, wie es schon von Kuhn aus dem verschiedenen Mutarotationsverhalten der bei der Verzuckerung entstehenden Maltose geschlossen wurde. Es darf nicht verkannt werden, daß die vom enzymatischen Standpunkt aus zu erhebende Forderung sich noch in scharfem Widerspruch mit den rein chemischen Ergebnissen befindet, wonach die Stärke in Analogie zur Cellulose als eine Kette von α -glucosidisch verknüpften Maltosen aufzufassen ist. Bei der strengen Spezifität, mit der die Enzyme behaftet sind, wird man aber wohl an den enzymchemischen Befunden, die unleugbar den heterogenen Aufbau des Polysaccharids hinsichtlich der glucosidischen Bindungen darstellen, nicht vorübergehen können. Es ist eine dankbare Aufgabe, die hier noch entgegenstehenden Ansichten auf eine gemeinsame Basis zu bringen. Vielleicht ist die genaue Eingliederung der Amylasen erst möglich, wenn definierte Abbauprodukte der Stärke als Substrate in ausreichender Zahl zur Verfügung stehen. Kürzlich ist in dieser Beziehung durch die Herausarbeitung einer kristallisierten Hexaose der Anfang gemacht worden³²⁾.

Über die Anreicherung der aktiven Enzymsubstanz.

Wenn auch die Spezifitätsforschung bereits eine eingehende Klassifizierung der Carbohydrasen ermöglicht hat, so muß doch das letzte Ziel der Enzymforschung die präparative Isolierung der aktiven Substanz bleiben. Gerade die Tatsache, daß sich bei den neuen Untersuchungen über die Spezifität der Carbohydrasen weitgehende Analogien zur Chemie ihrer Substrate ergeben haben, sollte dieser Richtung der Enzymologie neue Anreize geben. Hier waren die Arbeiten lange Zeit auf dem Stande der von Willstätter³³⁾ und seiner Schule erarbeiteten Resultate stehengeblieben. Die wesentliche Aufgabe dürfte heute sein, Verfahren zu finden, um große Mengen Ausgangsmaterial zu verarbeiten, um dann schließlich doch noch ausreichende Mengen der hochgereinigten Substanz zur Verfügung zu haben für rein organisch-chemische Operationen. Die Wichtigkeit der Fructosidase liegt für dieses Problem in ihrer unerhörten Beständigkeit und der außerordentlich leichten Bestimmbarkeit der gespaltenen Rohrzuckermenge auf optischem Wege. Auch die Hefe wird lange Zeit noch das ausschließliche Ausgangsmaterial bleiben. Das Enzym liegt hier an sich schon in einer ungewöhnlich hohen Konzentration vor, die durch besondere Stimulationsverfahren noch weitgehend gesteigert wird. Das von Willstätter³⁴⁾ eingeführte intermittierende Verfahren mit Hilfe niedrig konzentrierter Zuckerlösungen konnte für große Mengen und einen Arbeitsgang umgestaltet werden³⁵⁾, so daß es heute möglich ist, in kurzer Zeit große Hefemengen auf einen hohen Enzymgehalt zu treiben. Die Anregungen kommen hier auch der technischen Enzymchemie zugute, weil man heute bereits große Mengen konzentrierter Invertaselösungen benötigt, die die zuckerverarbeitende Industrie zur Weichhaltung von Marzipan- und Fondantmassen aufnimmt. Die Anreicherung der gewonnenen

²⁹⁾ LIEBIGS Ann. 443, 1 [1925].
³⁰⁾ Compt. rend. Lab. Carlsberg 16, Nr. 7, S. 1 [1926].
Ztschr. physiol. Chem. 189, 17 [1930].

³¹⁾ Zusammenfassung in Erg. Enzymf. III, 73 [1934].

³²⁾ Waldschmidt-Leitz u. Reichel, Ztschr. physiol. Chem. 223, 76 [1934].
³³⁾ Untersuchungen über Enzyme, Berlin 1928, Bd. I, Zur Kenntnis des Invertins I—XII.

³⁴⁾ Ztschr. physiol. Chem. 146, 158 [1925].

³⁵⁾ D. R. P. 585 992, Weidenhagen, unveröffentlicht.

Autolysate konnte früher mit einiger Ausbeute nur auf adsorptivem Wege erreicht werden. Die reinsten Präparate standen aber schließlich nur in sehr geringer Menge zur Verfügung, so daß außer den Zahlen der Mikronanalysen keine weiteren Anhaltspunkte für den chemischen Charakter des Enzyms gewonnen werden konnten. Bei der Übertragung der Adsorptionsmethoden ins Große haben sich erhebliche Schwierigkeiten herausgestellt, die einmal in der Herstellung großer Mengen gleichmäßiger Adsorptive liegen, zum andern aber in der Schwierigkeit der Verdampfung großer Flüssigkeitsmengen bei niedriger Temperatur begründet sind. Man wird also in Zukunft Fällungsmethoden, die das Enzym erfassen, den Vorzug geben. Zurzeit ist es wichtig, geeignete und möglichst selektiv wirkende Fällungsmittel

für solche Zwecke herauszufinden. Bei Fructosidase und Malzamylase hat sich Tannin außerordentlich bewährt³⁶⁾. Auch bei der β -Glucosidase des Mandelkerns sind durch Anwendung von Tannin und Silberoxyd erhebliche Erfolge erzielt worden³⁷⁾. Diese Fortschritte berechtigen zu der Hoffnung, schließlich doch zu einer so weit angereicherten Substanz zu gelangen, um dann mit Hilfe chemischer Methoden einen Einblick in das Molekül des Enzyms und den Wirkungsmechanismus zwischen Enzym und Substrat zu gewinnen. [A. 44.]

³⁶⁾ Weidenhagen, Ztschr. Ver. Dtsch. Zuckerind. 81, 501 [1931].

³⁷⁾ Helferich u. Mitarbeiter, Ztschr. physiol. Chem. 208, 95; 209, 272 [1932].

Analytisch-technische Untersuchungen

Potentiometrische Methode zur Trennung von Chrom und Wolfram, insbes. zu ihrer Bestimmung in Chrom-Wolfram-Stählen.

Von Prof. Dr. H. BRINTZINGER und Dr. E. JAHN.

Anorganische Abteilung des Chemischen Laboratoriums der Universität Jena.

(Eingeg. 13. Januar 1931.)

Die von uns vor einiger Zeit beschriebene fällungsanalytische potentiometrische Methode¹⁾ zur Einzelbestimmung von Wolframat und Chromat durch Titration mit Bariumchloridlösung, wobei als Indikatorelektroden ein Wolframdraht bzw. ein verchromter Draht angewandt werden, legte den Gedanken an ein auf dieser Grundlage beruhendes Trennungsverfahren für Wolframat und Chromat nahe. Ein solches Verfahren würde für die angewandte analytische Chemie, insbesondere für die quantitative Untersuchung von Chrom-Wolfram-Stählen von großer Bedeutung sein.

Die Durchführbarkeit einer solchen Methode hatte von vornherein eine große Wahrscheinlichkeit für sich, da Bariumchromat und Bariumwolframat verschieden schwer löslich sind und unter den Bedingungen der Analyse ein Einbau von Bariumwolframat in das Kristallgitter des schwerer löslichen, also zuerst ausfallenden Bariumchromats nicht anzunehmen war.

Die Versuche wurden so ausgeführt, daß die neutrale, Chromat und Wolframat enthaltende Lösung mit Bariumchloridlösung titriert wurde, wobei als Indikatorelektrode für die zuerst erfolgende Reaktion $Ba^{++} + CrO_4^{=} \rightleftharpoons BaCrO_4$, ein verchromter Draht²⁾ bzw. Stab diente; diese Elektrode wurde nach dem ersten Potentialsprung gegen einen die nun einsetzende Reaktion $Ba^{++} + WO_4^{=} \rightleftharpoons BaWO_4$ anzeigenenden Wolframdraht³⁾ ausgetauscht, worauf die Titration bis zum zweiten Potentialsprung fortgesetzt wurde. Als Vergleichselektrode diente dabei eine $n/10$ -Kalomelektrode. Der Verbrauch an Maßflüssigkeit vom Beginn der Titration bis zum ersten Potentialsprung entspricht dann der vorhandenen Menge des Chromats, der Verbrauch vom ersten bis zum zweiten Potentialsprung der Menge des Wolframat. Notwendig für eine gute Potentialeinstellung ist gute Temperaturkonstanz der zu titrierenden Flüssigkeit. Wir hielten während der ganzen Titration die Temperatur auf 85° konstant mit Hilfe eines

in die Lösung eintauchenden, als Thermoregulator geschalteten Thermometers, der einen den Titrierbecher umfassenden elektrischen Heizofen mit sehr geringer Wärmekapazität steuert.

Eine derartige Titration ist in Tab. 1 und Abb. 1 wiedergegeben.

Tabelle 1.

cm ³	Teilstriche Differenz		Teilstriche Differenz	
	am Meßdraht	auf 1 cm ³ ber.	am Meßdraht	auf 1 cm ³ ber.
0,0	125		4,0	183,5
1,0	125		8,0	185
2,0	125		10,0	186
2,5	125		11,0	188
2,7	126		11,1	189,5
2,75	127	20	11,12	191
2,77	129,5	50	11,14	192,5
2,78	132,5	60	11,15	194
2,79	149	1 650	11,16	197
2,80	150	100	11,17	208
2,82	150,5	25	11,20	209
2,84	151,5		11,4	212
2,90	153		12,0	214
3,0	154		14,0	217
4,0	156			

Elektrodenwechsel!

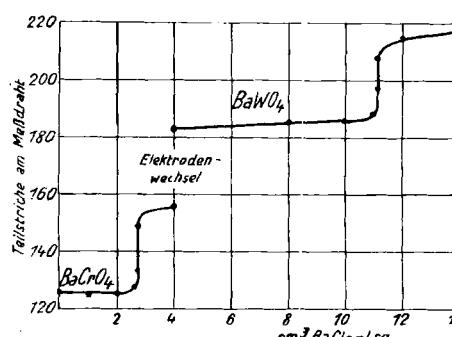


Abb. 1. Titrationsverlauf bei der unter Elektrodenwechsel durchgeföhrten Trennung von Chromat und Wolframat.

Im Verlauf unserer Untersuchungen zeigte sich, daß die gemeinsame Titration von Chromat und Wolframat auch durchgeführt werden kann, wenn beide Elektroden gleichzeitig in die Flüssigkeit eintauchen. Man spart sich auf diese Weise das Herausnehmen und Abspülen der Chromelektrode und das Einsetzen der Wolframelektrode während der Titration.

¹⁾ H. Brintzinger u. E. Jahn, Ztschr. analyt. Chem. 94, 396 [1933].

²⁾ Als Chromelektrode eignen sich matt verchromte Stahldrähte sowie nach dem Verfahren der elektrochemischen Abteilung von Siemens u. Halske schwarz verchromte Stahldrähte.

³⁾ Es ist vorteilhaft, den Wolframdraht vor Gebrauch schwach auszuglühen.