

Die Bestimmung der gebildeten Kohlensäure ist wieder elektrolitisch-potentiometrisch möglich. Tabelle 7 zeigt, daß brauchbare Werte erhalten werden und es möglich ist, organisch gebundenen Kohlenstoff bis herab zu 0,05 mg in wenigen Minuten sicher zu erfassen.

Substanz	Einwaage netto mg	Amp.	sec.	Coulomb	C theor. mg	C gefund. mg
Na-Oxalat	0,565	0,04	39,6	1,58	0,101	0,098
1 mg —	0,234	0,02	32,0	0,64	0,042	0,040
0,179 mg C	0,388	0,02	57,0	1,14	0,069	0,071
1:100 CuO	0,256	0,02	38,8	0,78	0,046	0,048
Thioharnstoff	0,820	0,04	52,2	2,09	0,130	0,130
1 mg —	0,936		55,8	2,23	0,148	0,139
0,158 mg C	0,918		56,6	2,26	0,145	0,141
1:100 CuO	0,412	0,02	53,7	1,08	0,065	0,067
	0,386	0,02	50,6	1,02	0,061	0,063
Weinsäure	0,365	0,04	47,0	1,88	0,115	0,117
1 mg —	0,550	0,04	71,0	2,84	0,173	0,176
0,314 mg C	0,186	0,02	47,2	0,94	0,058	0,058
1:100 CuO	0,536	0,04	70,2	2,81	0,168	0,174

Berechnung: 1 Coulomb = 0,0623 mg Kohlenstoff

Tabelle 7  
Elektrolitisch-potentiometrische Bestimmung des Kohlenstoffs aus organischen Substanzen

### Zusammenfassung

Die elektrolitische Titration beruht auf dem Faradayschen Gesetz. Anfang und Ende der elektrolitischen Reaktionen werden potentiometrisch bestimmt. Aus der verbrauchten Strommenge wird die Menge der zu bestimmenden Substanz ermittelt.

Die erforderliche, einfache Elektrolysierereinrichtung wird beschrieben. Durch den Zusatz eines Leitsalzes wird nicht nur die Empfindlichkeit der potentiometrischen Anzeige wesentlich gesteigert, sondern auch der quantitative Umsatz nach dem Faradayschen Gesetz erst ermöglicht. Für die Platin-Indikatorelektrode ist außerdem noch

die Anwesenheit von Wasserstoffsuperoxyd erforderlich, dessen Menge gleichfalls erheblichen Einfluß auf die Ausschlagsweite des Meßinstruments bei der Potentialbeobachtung hat. Kolloide Substanzen, die z. B. durch das Leitsalz in die Reaktionslösung gelangen können, führen zum Auftreten von Störungen. Sie können aus dem neutralen Leitsalz durch Aktivkohle oder auch aus der Lösung elektrolitisch entfernt werden. Dann lassen sich Säuren und Laugen noch in einer Menge von etwa 0,02 mg in 100 ml quantitativ erfassen. Auf dieser Grundlage kann auch Schwefel in organischen und anorganischen Träger-substanzen bestimmt werden. Dazu werden diese mit Kupferoxyd als Katalysator gemischt und im stark strömenden Sauerstoff bei 1200° C verbrannt. Das gebildete Schwefeldioxyd wird in einer Vorlage, die Wasserstoffsuperoxyd enthält, absorbiert und zu Schwefelsäure umgesetzt. Die Absorption wird aber erst bei Anwesenheit einer becherförmigen Platin-Netzelektrode quantitativ. Dann aber ist bei elektrolitischer Titration der genaue Nachweis von weniger als 0,05 mg Schwefel in 4 min möglich. Auch zur Bestimmung des Kohlenstoffs werden die Substanzen mit Kupferoxyd als Kontakt im Sauerstoff-Strom verbrannt. Die entstehende Kohlensäure wird dann in einer sehr verdünnten Barytlauge absorbiert, deren Potentialdifferenz gegen die 1n-Kalomelektrode gerade gleich Null ist. Die folgende Ausfällung von Bariumcarbonat, die zu einer sehr starken Änderung der Ionenkonzentration führt, ist am Potential gut erkennbar. Durch elektrolitische Titration läßt sich die Potentialdifferenz Null wiederherstellen. So kann Kohlenstoff zwischen 0,2 und 0,05 mg in wenigen Minuten quantitativ nachgewiesen werden.

Der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaften sind wir für die Unterstützung unserer Arbeiten zu großem Dank verpflichtet.

Eingeg. am 22. September 1951 [A 400]

## Zuschriften

### Über die gruppenübertragende Wirkung von disaccharid-spaltenden Enzymen\*)

Von Priv.-Doz. Dr. K. WALLENFELS und stud. chem. E. BERNT

Aus dem biochemischen Laboratorium Tutzing der C. F. Boehringer & Soehne G.m.b.H., Mannheim-Waldhof.

Seit den Mitteilungen von Bacon und Edelman<sup>1)</sup> sowie Blanchard und Albon<sup>2)</sup> über die gruppenübertragende Wirkung von Hefe-invertase und dem von uns zuerst erhobenen Befund<sup>3)</sup> der Oligosaccharid-Synthese bei der enzymatischen Hydrolyse von Lactose, Maltose und Saccharose durch die Hydrolasen aus Schimmelpilzen, sind zahlreiche ähnliche und gleiche Beobachtungen veröffentlicht worden<sup>4-7)</sup>.

Alle Ergebnisse sprechen dafür, daß der Saccharase, Maltase und Lactase verschiedenen Ursprungs eine gruppenübertragende Wirkung zukommt.

#### 1. Kinetik von Hydrolyse und Gruppenübertragung

Papierchromatographisch ist es möglich, die Kinetik der enzymatischen Hydrolyse von Disacchariden unter dem Gesichtspunkt der Gruppenübertragung erneut zu untersuchen.

\*) Ergänzende Zusammenfassung eines Vortrages der GDCh-Hauptversammlung 1951 in Köln.

<sup>1)</sup> Arch. Biochemistry 28, 467 [1950].

<sup>2)</sup> Ebenda 29, 220 [1950].

<sup>3)</sup> K. Wallenfels, Naturwiss. 38, 306 [1951].

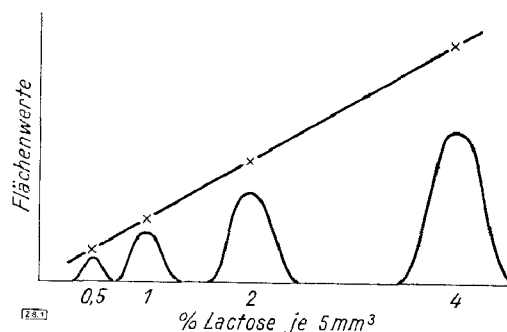
<sup>4)</sup> S. C. Pan, L. W. Nicholson u. P. Kolachov, J. Amer. Chem. Soc. 73, 2547 [1951].

<sup>5)</sup> J. Amer. Chem. Soc. 73, 3536 [1951].

<sup>6)</sup> R. H. Fischer, L. Kohles u. J. Fellig, Helv. chim. Acta 34, 1132 [1951].

<sup>7)</sup> J. Edelman u. J. S. D. Bacon, Biochemic. J. 40, 529 [1951].

Papierchromatogramme der Hydrolysate lassen sich quantitativ auswerten, indem man sie in der Laufrichtung des Lösungsmittels in Streifen schneidet, durch Einlegen in Bromnaphthalin-Paraffinöl durchsichtig macht und nach Grassmann und Hannig<sup>8)</sup> direkt photometriert. Die erhaltenen Meßpunkte ergeben Flächenwerte, aus denen sich die einzelnen Zuckermengen errechnen lassen (s. das Beispiel Lactose, Bild 1). Für die verschiedenen Komponenten eines Hydrolysates (Mono-, Di- und Trisaccharide) lassen sich Faktoren bestimmen, deren Multiplikation mit den gefundenen Flächenwerten die in den einzelnen Sacchariden enthaltenen Hexose-Mengen ergeben. Die Summe der Hexose-Äquivalente zeigt über den ganzen Verlauf der Hydrolyse von Maltose und Lactose annähernde Konstanz mit einer mittleren Schwankung von  $\pm 8\%$  (\*\*).



<sup>8)</sup> Naturwiss. 37, 496 [1950].

\*\*) Die quantitative Auswertung der Chromatogramme wurde zusammen mit Dr. K. Möhler, Tutzing ausgeführt. Hierüber und über die Anwendung auf lebensmittelchemische Untersuchungen soll noch berichtet werden.

So war es möglich, die Spaltung von Lactose und Maltose über einen weiten Bereich zu verfolgen. Die Tabellen 1 und 2 geben die durch Multiplikation mit dem Umrechnungsfaktor korrigierten Flächenwerte der einzelnen Zucker des Spaltungsgemisches an:

Zeit in h	0	1/4	1/2	1	2	4	8	24	32	Umrechnungsfaktor
Glucose . . . .	—	3,6	5,2	7,6	11,8	13,8	15,2	17,0	19,6	1
Galactose . . .	—	1,5	2,4	4,4	7,2	10,5	14,0	19,2	21,0	1
Lactose . . . .	41,0	30,5	25,5	19,7	15,4	10,4	8,0	4,0	2,0	2,75
1. Disaccharid	—	—	—	1,0	1,3	3,3	2,2	1,5	1,5	2,75
2. Disaccharid	—	—	—	0,5	1,1	3,3	2,2	1,2	0,3	2,75
Lactotriose . .	—	6,0	7,0	7,0	5,0	4,0	2,0	—	—	4,5
Summe der Flächenwerte:	41,0	41,6	40,1	40,2	41,8	45,3	43,6	42,9	44,4	

Tabelle 1. Lactose-Hydrolyse

Zeit in h	0	1/4	1/2	1	2	4	8	24	32	Umrechnungsfaktor
Glucose . . . .	—	2,7	10,5	13,1	16,0	19,0	24,8	30,0	32,6	1
Maltose . . . .	36,0	15,8	5,0	1,7	0,5	—	—	—	—	2,75
Disaccharid . .	—	1,2	1,5	5,5	5,0	3,3	1,5	—	—	2,75
Isomaltose . .	—	3,5	9,0	10,3	11,0	10,0	9,5	7,7	6,6	2,75
Maltotriose . .	5,0	5,5	1,4	0,4	—	—	—	—	—	4,5
Oligosacch. 1	—	7,5	10,2	7,2	6,0	5,4	1,2	—	—	4,5
Oligosacch. 2	—	—	1,2	1,8	4,5	5,4	1,5	0,6	0,5	4,5
Summe der Flächenwerte:	41,0	36,2	38,8	40,0	43,0	43,1	38,5	38,3	39,7	

Tabelle 2. Maltose-Hydrolyse

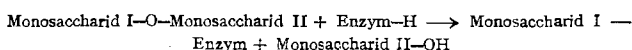
Die Kinetik der Saccharose-Hydrolyse konnte bisher noch nicht untersucht werden, weil die Silbernitrat-Ammoniak-Methode nicht anwendbar ist. Die Entwicklung der Chromatogramme mit Naphthoresorein-Trichloressigsäure zeigt jedoch einen im Prinzip übereinstimmenden Spaltungsverlauf.

## 2. Synthese neuer fruktosehaltiger Disaccharide durch Spaltung von Lactose und Maltose in Gegenwart von Fruktose

Führt man die Hydrolyse von Lactose und Maltose in Gegenwart größerer Mengen Glukose oder Fruktose durch, so zeigt sich, daß sowohl Hydrolyse wie Synthese durch Gruppenübertragung gehemmt sind. Inkubiert man Lactose oder Maltose mit dem Enzym unter Zusatz eines Überschusses von Fruktose, so zeigt das Chromatogramm, daß neue Syntheseprodukte entstehen, welche ohne Fruktose-Zusatz nicht nachweisbar sind. Die beiden neuen Zucker laufen im Chromatogramm mit dem Rf-Wert von Disacchariden, reduzieren Silbernitrat und geben eine positive Reaktion mit Naphthoresorein-Trichloressigsäure. Weder im Spaltungsansatz mit Glukose noch bei Inkubation des Enzyms mit Fruktose allein läßt sich ein derartiger Zucker nachweisen. Offenbar werden die beiden neuen Disaccharide durch Gruppenübertragung eines Monosaccharid-Restes auf Fruktose gebildet. Eine Gruppenübertragung auf zugesetzte freie Glukose wurde schon von *Pazur* und *French*<sup>9)</sup> nachgewiesen, die zeigten, daß bei Hydrolyse von Maltose mit einem Enzym aus *Aspergillus oryzae* in Gegenwart von <sup>14</sup>C-haltiger Glukose radioaktive Isomaltose gebildet wird. Die Konstitution unserer neuen fruktosehaltigen Disaccharide kann erst ermittelt werden, wenn größere Mengen davon verfügbar sind. Es ist anzunehmen, daß aus Maltose und Fruktose eine Glukosido-Fruktose und aus Lactose und Fruktose eine Galaktosido-Fruktose gebildet wird.

## 3. Mechanismus von Hydrolyse und Gruppenübertragung

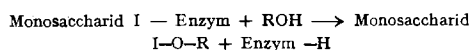
Die primäre Reaktion der Einwirkung eines disaccharid-spaltenden Enzymes ist die Bildung eines Monosaccharid-Enzymkomplexes unter Freilegung des zweiten Monosaccharid-Restes:



Das Papierchromatogramm der Lactose-Spaltung zeigt, daß bei entsprechender Enzymkonzentration in der ersten Phase nur Glukose freigelegt wird, also die Galaktose durch das Enzym abgehängt und übertragen wird. Untersuchungen der Saccharose-Spaltung mit Hefesaccharase<sup>1, 2)</sup> sprechen dafür, daß Fruktose durch das Enzym gebunden wird und in diesem Fall die neuen Saccharide durch Übertragung des Fruktose-Restes gebildet werden. Bei

der Maltosespaltung wird im Primärakt die 1,4-Glykosidbindung gespalten und eine Glukose-Enzymverbindung gebildet.

Es folgt die Spaltung der Monosaccharid I - Enzymverbindung:



ROH ist im einfachsten Fall Wasser (R=H), kann aber auch ein primärer Alkohol<sup>9)</sup> (R=CH<sub>2</sub>), oder freie Glukose<sup>5)</sup>, freie Fruktose, Lactose, Saccharose, Maltose oder auch ein Trisaccharid sein.

Es entstehen je nach Reaktionspartner Alkylglykoside, Di-, Tri- oder Tetrasaccharide. Zucker reagieren nach den bisherigen Erfahrungen mit ihrer 6-ständigen CH<sub>2</sub>OH-Gruppe. Aus Maltose und Glukose entsteht so Isomaltose (6-Glukosidoglukose<sup>5)</sup>). Durch Gruppenübertragung auf Maltose selbst entsteht 6-Glukosido-maltose bzw. 4-Glukosidoisomaltose<sup>4, 10)</sup>. Die hydrolytische Spaltung dieses Trisaccharids an der Maltose-Bindung liefert weitere Isomaltose, welche enzymatisch nur schwer angreifbar ist und sich deshalb anhäuft. Die Bildung verschiedener Di- und Trisaccharide, welche bei vorgeschrittener Reaktion im Chromatogramm nachweisbar sind (beim Maltose-Hydrolysat mindestens 3 Disaccharide und 3 Trisaccharide) wird man aus der hydrolytischen Spaltung der höheren Oligosaccharide an verschiedenen Glykosid-Bindungen zu erklären haben. Es wird mühsam sein, die einzelnen Komponenten zu isolieren und ihre Konstitutionen zu klären.

Die Bindungsenergie der Glykosid-Bindung des ursprünglichen Disaccharides stellt offenbar die treibende Kraft für die verschiedenen genannten Umsetzungen dar. Diese Bindungsenergie muß in der intermediären Enzymmonosaccharid-Verbindung im wesentlichen noch vorhanden sein. Sie wird für die Synthese der neuen Saccharide benötigt. Daraus, daß z. B. bei der Gruppenübertragung des Glukose-Restes aus Maltose (4-α-D-Glukopyranosido-glukose) die Isomaltose (6-α-D-Glukopyranosidoglukose) gebildet wird, könnte man schließen, daß die 4-Glukosid-Bindung eine höhere Energie besitzt als die 6-Glukosid-Bindung<sup>11)</sup>. Dies muß nicht unbedingt der Fall sein. Neben der Gruppenübertragung findet ja stets hydrolytische Spaltung des Monosaccharid-Enzymkomplexes statt, bei welcher die gesamte Bindungsenergie frei wird, so daß die Reaktion in diese Richtung getrieben wird. Der Umfang, in welchem Syntheseprodukte gebildet werden, hängt wohl hauptsächlich von der Affinität des Enzymkomplexes für die verschiedenen Acceptoren des Monosaccharid-Restes ab. Die Affinität zu den Acceptoren Alkohol und Zucker muß wesentlich größer sein als zu Wasser, da deren Konzentration in den Spaltungsansätzen weitaus geringer ist als die von Wasser und trotzdem so erhebliche Mengen an Syntheseprodukten entstehen.

## 4. Höhere Syntheseprodukte und mögliche biologische Bedeutung der Synthese durch Gruppenübertragung

Die präparative Fraktionierung größerer Spaltungsansätze<sup>12)</sup> hat gezeigt, daß offenbar auch ein gewisser Anteil noch höherer Syntheseprodukte gebildet wird, welcher sich im Chromatogramm so wie Dextrin verhält, d. h. eine verwaschene reduzierende Zone niedriger Wanderungsgeschwindigkeiten ergibt. Man kann an die Möglichkeit denken, daß die enzymatische Synthese der Oligosaccharide aus den Disacchariden die biologische Bedeutung besitzt, auf diese Weise Katalysatoren zu bilden, welche für die phosphorylatische Synthese von Polysacchariden wie z. B. Stärke notwendig sind. Die optimale Kettenlänge dieser sog. „primer“-Molekeln wurde von *Weibull* und *Tiselius*<sup>13)</sup> sowie *Swanson* und *Cori*<sup>14)</sup> mit 3-6 bzw. 4-5 Glukose-Einheiten gefunden. Reine Maltose ist dagegen nicht in der Lage, die phosphorylatische Stärke- oder Glykogensynthese aus Glukose-1-phosphat in Gang zu setzen<sup>15)</sup>. Wenn diese Überlegung richtig ist, sollte es möglich sein, durch Zufügung von reiner Maltase zum Ansatz aus *Cori*-Ester, Maltose und Phosphorylase die Synthese von Stärke zu katalysieren. In diesem Zusammenhang kommt vielleicht einem Befund von *M. Calvin*<sup>16)</sup> und Mitarbb. besondere Bedeutung zu, der feststellen konnte, daß der erste freie Zucker, welcher bei der Photosynthese durch Grünalgen gebildet wird, ein Disaccharid - wahrscheinlich Saccharose - ist.

Eingegangen am 1. November 1951 [Z. 8]

<sup>9)</sup> I. S. D. Bacon, Pers. Mitteilung.

<sup>10)</sup> M. L. Wolfson, A. Thompson u. T. T. Galkowski, J. Amer. Chem. Soc. 73, 4093 [1951].

<sup>11)</sup> O. Hoffmann-Ostenhof, Disk. Bemerkt. Chem. Tagung Köln Oktober 1951.

<sup>12)</sup> Chromatographie an Aktivkohle-Kieselgur nach J. Amer. Chem. Soc. 72, 677 [1950].

<sup>13)</sup> Arch. Kemi. Mineral. Geol. A 19, (A), 1 [1945].

<sup>14)</sup> J. biol. Chemistry 172, 815 [1948].

<sup>15)</sup> D. E. Green u. P. K. Stumpf, J. biol. Chem. 142, 355 [1942].

<sup>16)</sup> J. Amer. Chem. Soc. 72, 1710 [1950]; vgl. diese Ztschr. 63, 176 [1951].