

des Diäthyl-cyclobutandion-carbonsäure-äthylesters mit Chloroform ausgeschüttelt. Es wurden 1,5 g des Diäthyl-diäthoxy-pyrans erhalten, Schmp. 49–50⁰ (nach Umkrystallisieren aus Ligroin); die alkoholische Lösung des Pyrans ergibt mit Goldchlorid-Lösung einen gelben Niederschlag, Schmp. 117⁰ (nach Umkrystallisieren aus 50-proz., etwas HCl-haltigem Alkohol).

0.1562 g Sbst.: 0.0376 g Au. — C₂₈H₄₀O₈, HAuCl₄. Ber. Au 24.02. Gef. Au 24.07.

186. Hans Pringsheim und Jesaja Leibowitz: Über die Spezifität der Amylasen. (Beiträge zur Chemie der Stärke, XV.)¹⁾

[Aus d. Chem. Institut d. Universität Berlin.]

(Eingegangen am 29. März 1926.)

Im vorigen Jahre haben wir mitgeteilt,²⁾ daß die Stärke durch die Kombination von Pankreas- und Malz-Amylase weitgehend in Glucose umgewandelt werden kann. Das Mischungsverhältnis dieser von Kuhn³⁾ α - und β -Amylasen genannten Fermente war in unseren ersten Versuchen etwas willkürlicher Art. Wir haben nunmehr nach einem Optimum der Ferment-Kombination für die Glucose-Bildung gesucht, fanden es jedoch nicht in der Vereinigung von Pankreas- und Malz-Amylase gleicher Kinetik der Stärke-Spaltung; wir sind deshalb zu empirischen Zusammenstellungen übergegangen und geben im Versuchsteil Ergebnisse an, welche unsere früheren Resultate bestätigen und die im besten Falle die quantitative Verzuckerung der Stärke zu Glucose beweisen. Die Übertragung dieser optimalen Bedingungen auf die getrennten Stärke-Bestandteile, Amylose und Amylopektin, förderte keinen Unterschied gegenüber der Stärke zutage.

In einer ausgedehnten Versuchsreihe haben wir nun auch die Speichel-Amylase mit der Pankreas- und Malz-Amylase kombiniert und gefunden, daß sie im Verein mit dem tierischen Ferment gleichfalls eine enzymatische Aufspaltung der Stärke in Glucose gestattet. Jedoch ist es nicht zugänglich, daraufhin, was theoretisch am einfachsten gewesen wäre, die Speichel-Amylase gleichfalls in die Reihe der β -Amylasen einzuordnen, da sie, wie frühere Versuche zeigten⁴⁾, und wie ihre Wiederholung bestätigte, nicht imstande ist, das charakteristische Substrat der β -Amylase, die Amylobiose⁵⁾, zu spalten.

Auf Grund dieses Ergebnisses sind wir gezwungen, die Zahl der spezifischen Amylasen zu erweitern und die Annahme zu machen, daß der Wirkungsmechanismus der stärke-spaltenden Fermente eine feinere Differenzierung fordert als die bloße Einteilung in zwei Ferment-Typen. Nach diesem Ergebnisse müssen wir auch die Frage als offen erklären, ob das stärke-spaltende Ferment des Emulsins⁶⁾, dessen von uns²⁾ geforderte Verschiedenheit

¹⁾ XIV. Mitteilung: J. Leibowitz und S. H. Silmann, B. 58, 1889 [1925].

²⁾ H. Pringsheim und J. Leibowitz, B. 58, 1262 [1925].

³⁾ R. Kuhn, B. 57, 1965 [1924]; A. 443, 1 [1925].

⁴⁾ H. Pringsheim und J. Leibowitz, B. 57, 884 [1924].

⁵⁾ Im Gegensatz zur früher am Rohprodukt beobachteten schwachen Spaltbarkeit durch Pankreas-Amylase erwies sich die gereinigte Amylobiose dieser α -Amylase gegenüber als völlig resistent.

⁶⁾ R. Kuhn, H. 135, 12 [1924].

von der β -Glucosidase von Josephson⁷⁾ bestätigt worden ist, dem Typus der α -Amylasen zuzurechnen ist, da für diesen kein spezifisches Substrat bekannt ist. Ohne die Beteiligung eines Maltose oder Amylobiose spaltenden Fermentes wird die Stärke auch durch die sog. „Biolase“, über die wir an anderer Stelle ausführlich berichten⁸⁾, direkt in Glucose umgewandelt, und dasselbe gilt für die Fermente des *Saccharomyces Ludwigii* nach Gottschalk⁹⁾, welcher Hefepilz nach den Angaben dieses Forschers, die wir bestätigten, maltase- und nach unseren Untersuchungen auch amylobiosefrei ist.

Die Schlußfolgerung Gottschalks, daß im Glykogen keine Maltose-Bindungen präformiert sind, bestätigt nur unsere früheren Ergebnisse an der Stärke, da die Identität der Kohlenhydrate des Amylopektins und des Glykogens von uns schon bewiesen wurde¹⁰⁾. Im übrigen ist die Annahme Gottschalks, daß es sich beim *Saccharomyces Ludwigii* um die kombinierte Wirkung von α - und β -Amylasen handelt, angesichts der eben dargelegten Nicht-Spaltbarkeit der Amylobiose nicht aufrecht zu erhalten. Es liegt hier ein neuer Weg des amylolytischen Abbaus vor, der vielleicht mit dem der Biolase analog sein könnte. Dagegen sträuben wir uns gegen irgendwelche Schlußfolgerungen, welche bezüglich des Aufbauweges aus der Konstitution der Assimilate von Mikroorganismen gezogen werden können, also im speziellen gegen die Theorie Gottschalks, daß auch der Aufbau des Glykogens durch einen maltase-freien Pilz aus Glucose einen Beweis für die Abwesenheit von Maltose-Bindungen im Glykogen darstellt.

Wie unklar in Wahrheit der ganze Mechanismus der enzymatischen Stärke-Spaltungen noch ist, geht aus der Tatsache hervor, daß die doch offenbar spezifisch verschiedenen Amylasen, die des Pankreas, des Speichels und des Malzes, in ihrer Wirkung gegenüber demselben Substrat, nämlich dem Grenzextrin oder Trihexosan, durch denselben Aktivator, das Komplement der Amylasen, aktiviert werden¹¹⁾.

Von besonderem Interesse ist, daß der tierische Organismus zwei spezifisch verschiedene Amylasen in der Speichel- und in der Bauchspeicheldrüse ausgebildet hat, ebenso, wie er im Dünndarm und im Pankreas zwei spezifisch verschiedene Maltasen besitzt¹²⁾.

Zur Erklärung der Variationsmöglichkeiten des amylolytischen Abbaus wurde zunächst auf die Verschiedenheit der Angriffspunkte hingewiesen, die das konfigurativ-asymmetrische Stärke-Molekül den verschiedenen Amylasen bietet, und auf die Resynthesen, denen die primären Abbauprodukte unterworfen sind¹³⁾. Diese an sich richtigen Hinweise genügen angesichts der Mannigfaltigkeit der Endprodukte, die durch die Stabilisierung gleicher Spaltstücke der Stärke entstehen, nicht mehr. Es liegt nahe, die Betrachtungen, die Euler¹⁴⁾ kürzlich an dem zymochemischen Mechanismus der Gärungsreaktionen angestellt hat, nun auch auf den gleichfalls komplexen

⁷⁾ K. Josephson, B. 58, 2726 [1925]. ⁸⁾ siehe die nachfolgende Mitteilung.

⁹⁾ A. Gottschalk, H. 152, 132 [1926].

¹⁰⁾ H. Pringsheim und Goldstein, B. 55, 1446 [1922]; H. Pringsheim und A. Beiser, Bio. Z. 148, 336 [1924]; H. Pringsheim, B. 58, 1581 [1924].

¹¹⁾ H. Pringsheim und Fuchs, B. 56, 1762 [1923]; H. Pringsheim und Schmalz, Bio. Z. 142, 108 [1923]; H. Pringsheim und A. Beiser, Bio. Z. 148, 336 [1924]; H. Pringsheim und G. Otto, Bio. Z. (im Druck).

¹²⁾ H. Bierry, C. r. 149, 314 [1909]; J. Leibowitz und P. Mechlinski, H. (im Druck).

¹³⁾ H. Pringsheim, Naturwiss. 13, 1084 [1925].

¹⁴⁾ H. v. Euler, Naturwiss. 13, 938 [1925].

und in Stufenreaktionen verlaufenden diastatischen Abbau zu übertragen. Euler nimmt an, daß den Zuckern oder ihren Spaltprodukten während der Dauer ihrer Verknüpfung mit der „Zymase“ bzw. ihren Teil-Fermenten eine von der normalen abweichende Reaktionsfähigkeit zukommen muß: Die Eigenschaften der Substrat-Ferment-Verbindung können — wie die jeder Verbindung — von denen ihrer Komponenten abweichen. In ähnlicher Weise ist es denkbar, daß ein und dasselbe Spaltstück der Stärke durch seine Verknüpfung mit dem einen oder dem anderen Ferment in statu nascendi, d. h. im Augenblick seiner Freisetzung aus dem Stärke-Molekül, auf sehr verschiedene Bahnen der weiteren Abwandlung gedrängt werden kann. Diese gewiß noch sehr vagen Vorstellungen scheinen uns gegenwärtig die einzige Deutungsmöglichkeit für die Tatsache, daß sich die γ -glucosidischen Radikale aus der Stärke bei der getrennten Einwirkung von Malz-, Emulsin-, Speichel- oder Pankreas-Amylase zu Maltose stabilisieren, dagegen bei Anwesenheit bestimmter Kombinationen aus diesen Fermenten Umlagerung in normale Glucose stattfindet, während das durch Alkohol-Fällung modifizierte Malz-Ferment¹⁵⁾, zu dem also kein neues Teilferment hinzugetreten sein kann, Veranlassung zur Trisaccharid-Bildung gibt.

Beschreibung der Versuche.

Kombination von Malz- und Pankreas-Amylasen.

(Mitbearbeitet von Rahel Perewosky.)

Als β -Amylase wurde eine nach den Angaben von H. Pringsheim, A. Genin und R. Perewosky¹⁶⁾ durch Adsorption gereinigte und von Maltose befreite Malz-amylase-Lösung (M) verwandt. Als Pankreas-Amylase dienten stets frisch dargestellte Auszüge aus Pankreatin (Merck): 3 g Präparat, 16 Stdn. bei 0° mit 100 ccm Wasser ausgelaugt und filtriert (P). Auch diese Ferment-Lösung war gegenüber Maltose selbst bei langer Ausdehnung des Versuchs völlig wirkungslos.

Ansätze: 20 ccm 1-proz. Stärke-Lösung + 6 ccm Puffer-Lösung + 4 ccm Ferment-Lösung (n ccm M + (4—n) ccm P; n = 0, 1, 2, 3, 4 ccm) bei 37°; Titrationen nach Bertrand mit je 5 ccm. Das Reduktionsvermögen der Pankreatin-Lösung ist stets in Abzug gebracht. Die Kupfer-Menge ist in allen Fällen auf Maltose umgerechnet; Glucose-Bildung zeigt sich an durch ein Reduktionsvermögen, welches das für eine quantitative Umwandlung in Maltose berechnete überschreitet.

Einfluß der Acidität: Versuche mit 2 M + 2 P:

Zeit in Stdn.	PH					
	4.8		6.0		6.8	
	mg Cu	% Maltose	mg Cu	% Maltose	mg Cu	% Maltose
24	28.1	72.2	31.3	80.7	23.6	60.8
72	39.6	102.1	55.6	143.3	23.6	60.8

¹⁵⁾ R. A. Ling und D. R. Nanji, Soc. **123**, 2666 [1923].

¹⁶⁾ Bio. Z. **164**, 117, und zwar S. 124 [1925].

In den Lösungen p_H 4.8 und p_H 6.0 ließ sich nach der Spaltung die Glucose als unlösliches Glucosazon (Schmp. 205⁰) nachweisen.

Versuche bei $p_H = 6.0$:

Zeit in Stdn.	4 M		4 P		3 M + 1 P		2 M + 2 P		1 M + 3 P	
	mg Cu	%	mg Cu	%	mg Cu	%	mg Cu	%	mg Cu	%
1. 24	20.4	52.6	16.6	42.8	22.4	57.7	25.6	66.0	30.0	77.3
48	31.9	82.2	23.0	59.3	31.9	82.2	31.3	80.7	31.3	80.7
96	33.2	85.6	29.4	75.8	39.0	100.5	43.4	118.8	53.1	136.9
120	33.2	85.6	34.5	88.9	46.7	120.4	53.1	136.9	73.5	189.4

Der Versuch 1 M + 3 P ergibt, auf Glucose umgerechnet, 101.2% Spaltung. Aus dieser Lösung, sowie aus 2 M + 2 P konnte reichlich Glucosazon (Schmp. 204⁰) isoliert werden.

Zeit in Stdn.	4 M		4 P		3 M + 1 P		2 M + 2 P		1 M + 3 P	
	mg Cu	%	mg Cu	%	mg Cu	%	mg Cu	%	mg Cu	%
2. 24	26.2	67.5	31.9	82.2	29.3	75.8	33.9	87.5	32.6	84.0
72	28.8	74.2	35.8	92.3	42.8	110.3	40.3	103.9	43.5	112.1
96	29.3	75.8	35.8	92.3	41.6	107.2	40.3	103.9	53.7	138.4
3. 4	26.9	69.3	21.8	56.1	31.3	80.7	36.4	93.8	33.2	85.6
78	27.5	71.0	32.6	84.0	35.8	92.3	45.4	117.0	39.0	100.5
120	29.3	75.8	31.3	80.7	37.7	97.3	48.6	125.3	53.7	138.4

Vergleich der Einwirkung der α - und β -Amylasen-Kombination auf Stärke, Amylose und Amylopektin:

Die Stärke-Bestandteile wurden nach der von Pringsheim und Wolfsohn¹⁷⁾ modifizierten Methode von Ling und Nanji¹⁸⁾ getrennt. Ansätze und Umrechnung der Versuchsergebnisse wie oben.

Stdn.	2 M + 2 P						3 M + 1 P					
	Stärke		Amylose		Amylopektin		Stärke		Amylose		Amylopektin	
	mg Cu	%	mg Cu	%	mg Cu	%	mg Cu	%	mg Cu	%	mg Cu	%
24	32.0	82.2	34.5	88.9	33.2	85.6	30.7	79.1	32.0	82.2	35.2	90.7
48	35.2	90.7	36.4	93.8	40.9	105.4	32.6	84.0	39.0	100.5	37.1	95.6
96	37.7	97.3	41.6	107.2	40.3	103.9	35.8	93.3	38.4	99.0	37.1	95.6
144	44.1	113.7	51.2	132.0	48.0	123.7	42.2	108.8	49.2	126.8	37.1	95.6
216	51.2	132.0	51.2	132.0	48.0	123.7	50.5	130.2	52.4	135.1	39.6	102.1

¹⁷⁾ B. 57, 887 [1924].

¹⁸⁾ Soc. 123, 2666, und zwar S. 2673 [1923].

Stdn.	1 M + 3 P					
	Stärke		Amylose		Amylopektin	
	mg Cu	%	mg Cu	%	mg Cu	%
24	33.9	87.5	33.2	85.6	34.5	88.9
48	40.9	105.4	41.6	107.2	34.5	88.9
96	40.9	105.4	41.6	107.2	35.2	90.7
144	41.6	107.2	41.6	107.2	35.2	90.7
216	—	—	41.6	107.2	35.2	90.7

Kombination von Speichel- mit Malz- und Pankreas-Amylase.
(Mitbearbeitet von Dr. Wilhelm Kusenack.)

Stdn.	4 M		4 P		4 Sp		2 Sp + 2 M		2 Sp + 2 P		2 M + 2 P	
	mg Cu	%	mg Cu	%	mg Cu	%	mg Cu	%	mg Cu	%	mg Cu	%
24	26.1	67.1	35.0	90.0	28.2	72.9	28.6	73.1	33.0	85.1	32.7	84.0
48	26.1	67.1	35.0	90.0	28.2	72.9	28.6	73.1	33.0	85.1	32.7	84.0
144	27.3	70.0	38.1	98.6	31.0	79.4	28.6	73.1	37.0	95.7	37.4	96.6
192	28.2	72.8	38.7	99.8	35.4	91.2	30.4	78.3	42.1	109.4	43.0	111.4

Stdn.	3 Sp + 1 M		3 Sp + 1 P		1 Sp + 3 M		1 Sp + 3 P		3 M + 1 P		1 M + 3 P	
	mg Cu	%	mg Cu	%	mg Cu	%	mg Cu	%	mg Cu	%	mg Cu	%
24	27.9	72.0	31.4	81.1	28.9	73.7	35.6	91.4	33.6	86.6	37.1	96.0
48	31.7	81.4	35.8	92.6	31.4	81.1	42.1	109.2	33.6	86.6	40.3	104.3
144	31.7	81.4	35.8	92.6	34.2	88.0	52.5	136.6	36.4	94.3	50.6	131.5
192	35.1	90.6	40.4	104.9	36.0	92.9	53.4	138.6	42.1	109.4	51.8	134.6

Der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft, die uns bei der Ausführung der Arbeit unterstützte, sind wir zu Dank verpflichtet.