

3. 3-Methyl-*N*-acetyl-glucosamin: 300 mg 3-Methyl-glucosamin-hydrochlorid¹³⁾ wurden unter Zusatz von 0.2 ccm Triäthylamin in 20 ccm Methanol mit Keten acetyliert (10 Min.). Der kristalline Abdampfrückstand wurde in 2–3 ccm absol. Methanol gelöst und tropfenweise mit soviel trockenem Aceton versetzt, bis Kristallisation einsetzte (7–10 ccm), die durch Stehenlassen bei 4° vervollständigt wurde. Nach Absaugen und Waschen mit Aceton, das wenig Methanol enthielt, wurden 82 mg 3-Methyl-*N*-acetyl-glucosamin vom Schmp. 183–185° erhalten. Es war papierchromatographisch einheitlich; $R_{\text{Glucose}} = 1.60$.

4. Alkalische Entmethylierung des 3-Methyl-*N*-acetyl-glucosamins. a) Nachweis durch Methoxybestimmung: 5.275 mg 3-Methyl-*N*-acetyl-glucosamin wurden im Zeisel-Kölbchen in 5 ccm 0.025*n* Na₂CO₃ 5 Min. in siedendem Wasserbad erhitzt. Die erhaltene Lösung wurde mit verd. Salzsäure vorsichtig neutralisiert und danach gefriergetrocknet. Die im Exsiccator über Diphosphorpentoxyd und Kaliumhydroxyd nochmals 24 Stdn. getrocknete Substanz wurde der Methoxybestimmung unterworfen. Gef. 0.19% OCH₃.

b) Nachweis durch Papierchromatographie: Hierzu wurde 3-Methyl-*N*-acetyl-glucosamin in der gleichen Weise alkalisch behandelt, wie wir dies für die AAG-Bildung aus *N*-Acetyl-glucosamin in unserer früheren Arbeit³⁾ beschrieben haben. Auf den Chromatogrammen sah man reichlich AAG ($R_{\text{Glucose}} = 1.70$) sowie eine Spur *N*-Acetyl-glucosamin ($R_{\text{Glucose}} = 1.24$), dagegen weder restliches 3-Methyl-*N*-acetyl-glucosamin ($R_{\text{Glucose}} = 1.60$) noch eine schneller als AAG wandernde Substanz, die man als Methyl-AAG hätte ansprechen können.

183. Richard Kuhn und Heinz Tiedemann: Enzymatische Spaltung von *N*-Acetyl- β -*D*-glucosaminiden

[Aus dem Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung, Institut für Chemie, Heidelberg]

(Eingegangen am 6. Juni 1954)

In der Hypodermis des Hummers findet sich ein Ferment, das β -Glucoside des *N*-Acetyl-*D*-glucosamins unter Bildung von *N*-Acetyl-*D*-glucosamin spaltet. *N*-Acetyl- β -*D*-glucosaminidase aus *Aspergillus oryzae* wurde frei von Lactase erhalten. Sie hydrolysiert Methyl-, Äthyl-, *n*-Propyl-, Benzyl- und Phenyl-*N*-acetyl- β -*D*-glucosaminid sowie *N,N'*-Diacetyl-chitobiose und Lacto-*N*-biose II, nicht aber Lacto-*N*-tetraose und Lacto-*N*-biose I. Das p_{H} -Optimum liegt bei p_{H} 4, die Michaelis-Menten-Konstante für Äthyl-*N*-acetyl- β -*D*-glucosaminid als Substrat beträgt ~ 0.005 Mol/Liter. Aus *N*-Acetyl-glucosamin + Äthanol erhält man durch enzymatische Synthese β -Äthyl-*N*-acetyl-glucosaminid frei von der α -Verbindung.

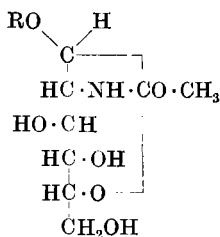
Für die Konstitutionsaufklärung der aus Frauenmilch isolierten Oligosaccharide ist zunächst die partielle Hydrolyse mit verd. Mineralsäure¹⁾ herangezogen worden. Es war zu erwarten, daß mit Hilfe von Enzymen manche Spaltstücke in besserer Ausbeute zu gewinnen sein würden und daß ein genauerer Einblick in die Verknüpfungsweise mancher Bausteine (*N*-Acetyl-*D*-glucosamin, *D*-Glucose, *D*-Galaktose, *L*-Fucose) auf diese Weise möglich werden könnte.

¹³⁾ A. Neuberger, J. chem. Soc. [London] 1941, 50.

¹⁾ R. Kuhn, A. Gauhe u. H. H. Baer, Chem. Ber. 87, 289 [1954].

Von der Vorstellung ausgehend, daß die Bildung des Chitinpanzers bei den Crustaceen einen bedeutenden, vermutlich enzymatischen Umsatz von *N*-Acetyl-glucosamin-Resten zur Voraussetzung hat, haben wir geprüft, ob nicht die dem Panzer auf der Innenseite anliegende Gewebeschicht, die Hypodermis, Sitz von Fermenten ist, die β -glykosidische Bindungen von *N*-Acetyl-glucosamin-Resten zu lösen bzw. zu knüpfen vermögen.

Wir haben gefunden, daß sich aus der Hypodermis des Hummers Enzymlösungen gewinnen lassen, die Methyl-(I), Äthyl-(II), *n*-Propyl-(III) und Benzyl-*N*-acetyl- β -*D*-glucosaminid (IV) unter Bildung von *N*-Acetyl-glucosamin hydrolytisch spalten²⁾. Das p_H -Optimum liegt bei etwa 4.5.



- I: R = -CH₃
 II: R = -C₂H₅
 III: R = -CH₂·CH₂·CH₃
 IV: R = -CH₂·C₆H₅
 V: R = -C₆H₅

Wirksamer auf dieselben Substrate fanden wir Fermentlösungen, die aus *Aspergillus oryzae* gewonnen wurden. Daß dieser Pilz ein Ferment enthält, das Chitin spaltet, hatten bereits W. Grassmann und H. Rubenbauer³⁾ erkannt. In den Handelspräparaten Luizym⁴⁾ und Dymal⁵⁾ wiesen wir Fermente nach, die gleichfalls die vier genannten β -Glucoside des *N*-Acetyl-*D*-glucosamins hydrolysieren.

Zur Gewinnung größerer Mengen fanden wir die Züchtung von *Aspergillus oryzae*, Stamm Ehrlich, auf Weizenkleie + Glucose als besonders geeignet. Durch Ammoniumsulfat-Fällungen bei verschiedenem p_H , durch Fällung von Begleitstoffen mit Hefenucleinsäure sowie durch fraktionierte Fällungen mit Aceton ließ sich das Ferment reinigen und in einer unter gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung bei -15° recht haltbaren Form gewinnen. Auf solche Art gereinigte Präparate waren frei von Lactasewirkung, wenn der Pilz auf Weizenkleie + Glucose gezüchtet war, während gleichartig gereinigte Präparate aus Dymal Milchzucker hydrolysierten.

Das gereinigte Enzym aus *Aspergillus oryzae* zeigt ein Wirkungs-Optimum bei etwa p_H 4. Es spaltet von den geprüften stickstoffhaltigen β -Glucosiden am besten die Phenylverbindung (V)⁶⁾. In der Reihenfolge Methyl-, Äthyl-, Propyl- nimmt die Spaltbarkeit zu. α -Methyl-⁷⁾ und α -Benzyl-*N*-acetyl-*D*-

²⁾ Für die Überlassung dieser Substrate, deren Darstellung von R. Kuhn u. W. Kirschenlohr, Chem. Ber. 86, 1331 [1953] beschrieben wurde, danken wir Herrn W. Kirschenlohr bestens. ³⁾ Münchener Med. Wschr. 78, 1817 [1931].

⁴⁾ Luitpoldwerke, München. ⁵⁾ C. F. Boehringer & Söhne, Mannheim-Waldhof.

⁶⁾ Bei den stickstofffreien Verbindungen ist gegenüber Emulsin schon lange dasselbe bekannt. β -Phenyl-*D*-glucosid wird viel rascher als β -Methyl-*D*-glucosid gespalten (B. Helferich, R. Gootz u. G. Sparmberg, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 205, 201 [1932]).

⁷⁾ R. Kuhn, F. Zilliken u. A. Gauhe, Chem. Ber. 86, 466 [1953].

glucosaminid⁸⁾ werden gar nicht angegriffen. Das Ferment erscheint somit als spezifisch für β -glucosidische Derivate des *N*-Acetyl-*D*-glucosamins. Zu diesen gehört auch die *N,N'*-Diacetyl-chitobiose⁹⁾, die glatt zu 2 Moll. *N*-Acetyl-*D*-glucosamin aufgespalten wird. Inwieweit der Acetyl-glucosamin-Rest außer am C-Atom 1 noch Substituenten tragen darf, bedarf noch der Prüfung. Es ist jedenfalls bemerkenswert, daß die aus Frauenmilch gewonnene Lacto-*N*-tetraose¹⁰⁾ nicht gespalten wird, während die aus der Tetraose durch partielle Säurehydrolyse erhaltene Lacto-*N*-biose II¹⁾ vom Ferment in *D*-Galaktose + *N*-Acetyl-*D*-glucosamin zerlegt wird. Das zweite stickstoffhaltige Disaccharid, das aus Lacto-*N*-tetraose durch partielle Säurehydrolyse erhalten wurde, nämlich die isomere Lacto-*N*-biose I¹⁾, bleibt unangegriffen.

Im allgemeinen haben wir den Spaltungsgrad dadurch bestimmt, daß das in Freiheit gesetzte *N*-Acetyl-glucosamin mit Hypojodit titriert wurde. Für β -Äthyl-*N*-acetyl-*D*-glucosaminid als Substrat hat sich die Bestimmung des abgespaltenen Äthanol – wie zur Bestimmung des Alkohols im Blute üblich – mit Alkohol-Dehydrogenase als genau und sehr substrat-sparend erwiesen. Die β -Äthyl-Verbindung ist dadurch für kinetische Messungen mit dem Enzym besonders geeignet. Für dieses Substrat ergab sich, daß die Anfangsgeschwindigkeiten der Hydrolyse den angewandten Fermentmengen im geprüften Bereich proportional sind und daß die Ferment-Substrat-Verbindung bei einer Molarität der Äthylverbindung von 0.005 etwa zur Hälfte dissoziiert ist.

Läßt man das Ferment auf eine 5-proz. Lösung von *N*-Acetyl-*D*-glucosamin in 15-proz. Äthanol bei 30° mehrere Tage einwirken, so findet man, daß ein Teil in β -Äthyl-*N*-acetyl-*D*-glucosaminid ($R_{\text{Galactose}} = 1.8$) übergegangen ist, während noch viel unverändertes *N*-Acetyl-*D*-glucosamin vorhanden ist.

Schwache Spaltung von Chitobiose durch Emulsinpräparate hat bereits Zechmeister¹¹⁾ festgestellt. Ob dieses Ferment bzw. das chitinspaltende¹²⁾ des Emulsins oder dasjenige, welches die Bakterien¹³⁾ im Hepato-pankreas-Saft der Weinbergschnecke produzieren, mit dem aus *Asp. oryzae* identisch ist, bedarf noch der Prüfung.

Frau Hannelore Mährlein möchten wir für ihre technische Mitarbeit bei einem Teil der Versuche auch an dieser Stelle danken.

Beschreibung der Versuche

Die Enzymaktivität wurde auf 2 Wegen bestimmt: 1) jodometrisch nach M. MacLeod und R. Robison¹⁴⁾ (Reduktionsvermögen des gebildeten Acetylglucosamins), 2) fermentchemisch im Falle des β -Äthyl-*N*-Acetyl-*D*-glucosaminids (enzymatische Dehydrierung des

⁸⁾ Herrn Dr. H. H. Baer danken wir für die Überlassung bestens. Für Schmp. und Drehungsvermögen vergl. Chem. Ber. 86, 1331 [1953].

⁹⁾ Für ein aus Oktaacetyl-chitobiose durch methanolisches Ammoniak gewonnenes Präparat, das chromatographisch einheitlich war, haben wir Dr. A. Gauhe vielmals zu danken.

¹⁰⁾ R. Kuhn, A. Gauhe u. H. H. Baer, Chem. Ber. 86, 466 [1953].

¹¹⁾ L. Zechmeister u. G. Toth, Enzymologia [Den Haag] 7, 165 [1939].

¹²⁾ L. Zechmeister, G. Toth u. M. Balint, Enzymologia [Den Haag] 5, 302 [1938]; L. Zechmeister, G. Toth u. E. Vajda, ebenda 7, 170 [1939].

¹³⁾ Ch. Jeuniaux, Arch. int. Physiol. 58, 350 [1950]; P. Karrer u. A. Hoffmann, Helv. chim. Acta 12, 616 [1929]. ¹⁴⁾ Biochem. J. 23, 517 [1929].

gebildeten Äthanols zu Acetaldehyd durch Alkohol-Dehydrogenase) nach Th. Bücher und H. Redetzki¹⁵⁾.

Jodometrischer Test: 2 ccm Fermentlösung + Wasser, 0.6 ccm Pufferlösung und 0.4 ccm Substrat-Lösung (β -Phenyl- und β -Benzyl-*N*-acetyl-glucosaminid wurden wegen der geringen Löslichkeit direkt eingewogen) wurden in 10-ccm-Erlenmeyer-Kolben mit Glasstopfen bei 28° inkubiert. Durch Zugabe von 2.0 ccm 0.3*n* Ba(OH)₂ und 1.0 ccm 5-proz. Zinksulfatlösung wurde enteiweißt. Nach dem Zentrifugieren entnahm man 3 ccm Zentrifugat und stellte die Wasserstoffionenkonzentration mit 5-proz. Natriumcarbonatlösung auf p_H 9.0 ein. Je nach dem p_H -Wert des verwendeten Puffergemischs wurden 0.2 bis 0.4 ccm 5-proz. Natriumcarbonat-Lösung benötigt.

Wird β -Phenyl-*N*-acetyl-glucosaminid als Substrat verwendet, so verbraucht auch das abgespaltene Phenol Jod. Es bildet sich Trijodphenol¹⁶⁾. Wir haben geprüft, wieviel Jod das Phenol unter den Bedingungen von MacLeod-Robison im Vergleich zur jodometrischen Phenolbestimmung nach J. D'Ans¹⁶⁾ verbraucht. Es ergab sich, daß die gefundenen Werte etwa um 4% höher sind. Es wird auch etwas mehr Lautemannsches Rot gebildet, das die Erkennung des Endpunktes bei der jodometrischen Titration jedoch nicht stört. Vom gesamten Verbrauch an Hypojodit entfallen 25% auf *N*-Acetylglucosamin und 75% auf Phenol.

Fermentchemischer Test für *N*-Acetyl-glucosaminidase: Das Substrat ist β -Äthyl-*N*-acetyl-glucosaminid¹⁷⁾. Der abgespaltene Äthylalkohol wird durch Alkohol-Dehydrogenase¹⁸⁾ zu Acetaldehyd dehydriert. Diphosphopyridin-nucleotid (DPN) nimmt den Wasserstoff auf und wird zu Dihydro-diphosphopyridin-nucleotid (DPN H₂), dessen Absorption bei 336 μ spektrophotometrisch bestimmt wird.

Zusammensetzung der Testlösung:

0.1 ccm β -Äthyl-*N*-acetyl-glucosaminid (30 mg/10 ccm)

0.3 ccm *m*/15 Phosphatpuffer, p_H 5.0

0.1 ccm Fermentlösung

Die Reaktion wurde durch 4 Min. langes Erhitzen auf 80° abgestoppt. Zu der abgekühlten Lösung wurden zugegeben

2.88 ccm Semicarbazidlösung

0.1 ccm Co-Zymase (20 mg 75% DPN/ccm)

0.02 ccm Alkoholdehydrogenase (30 mg/ccm in 40-proz. (NH₄)₂SO₄-Lösung)

3.5 ccm Gesamtvolumen

1-cm-Küvette

Semicarbazidlösung: 3.30 g Semicarbazid-hydrochlorid¹⁹⁾ und 10 g Natriumpyrophosphat werden in Wasser gelöst, 24 ccm *n*-NaOH zugegeben und mit Wasser auf 300 ccm aufgefüllt (p_H 8.6). Auf die Reinheit des Semicarbazid-hydrochlorids muß besonders Wert gelegt werden, da ältere Präparate oft Verunreinigungen enthalten, die DPN reduzieren. Dieser Test ist gegenüber der jodometrischen Bestimmung des fermentativ abgespaltenen *N*-Acetyl-glucosaminids wesentlich empfindlicher. Es werden nur 0.3 mg Substrat benötigt. Der Test eignet sich besonders für kinetische Messungen.

Gewinnung und partielle Reinigung des Fermentes aus Hummer-Hypodermis: Ein Hummer wurde mit Kohlensäureschnee erstickt und gefroren, die Hypodermis von der Chitinhülle abgelöst und mit dem Fleischwolf zerkleinert. 30 g Hypodermisbrei wurden 1 Stde. mit 100 ccm Wasser von 0° extrahiert. Die Extraktion wurde mit der gleichen Menge Wasser wiederholt. 200 ccm der klar zentrifugierten Lösung haben wir mit 70 g Ammoniumsulfat versetzt und 10 Min. bei 20000 g zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 60 ccm Wasser von 0° gelöst und mit 30 ccm Citratpuffer von p_H 3.0

¹⁵⁾ Klin. Wschr. 29, 156 [1951].

¹⁶⁾ Z. analyt. Chem. 96, 4 [1934].

¹⁷⁾ R. Kuhn u. W. Kirschenlohr, Chem. Ber. 86, 1331 [1953].

¹⁸⁾ C. F. Boehringer & Söhne, Mannheim-Waldhof.

¹⁹⁾ Riedel-de-Haen. Seelze bei Hannover.

versetzt (p_H der Lösung etwa 4.5). Es bildete sich ein Niederschlag, der das gesuchte Ferment nicht enthielt und abzentrifugiert wurde. Den Überstand haben wir langsam mit Ammoniumsulfat bis zu 60% der Sättigung versetzt und nach 1stdg. Aufbewahren bei 0° die Fällung abzentrifugiert. Die für einen Test benötigte Menge der Fällung war etwa $\frac{1}{60}$ der gesamten Enzym-Ausbeute aus einem Hummer.

Partielle Reinigung des Fermentes aus *Aspergillus oryzae*: Als Ausgangsmaterial dienten Extrakte aus *Aspergillus oryzae*, der auf Weizenkleie gewachsen war. Für einen Teil der Versuche verwendeten wir das Präparat Dymal⁶) als Ausgangsmaterial. Je 1 kg Weizenkleie wurde mit 4 l 5-proz. Glucoselösung vermischt, auf 100° erhitzt (30 Min.) und mit einer Suspension von *Aspergillus oryzae*-Sporen beimpft. Die Kolben blieben bei 35° unter guter Luftzufuhr stehen. Nach 6 bis 8 Tagen war die Weizenkleie reichlich von einem grauweißen Mycel durchwachsen. Weizenkleie und Mycel wurden durch eine Fruchtpresse abgepreßt und der Preß-Saft bei 2200 g zentrifugiert*). Zur Gewinnung der Sporen wurde *Aspergillus oryzae*, Stamm Ehrlich (Baarn, Holland, Centralbureau voor Schimmelcultures) auf Bier-Würze-Agar gezüchtet.

In je 500 ccm zentrifugierten Preßsaft werden bei 4° langsam 192 g Ammoniumsulfat eingerührt. Nach 1stdg. Stehenlassen wird zentrifugiert. Den Niederschlag von je 500 ccm Preßsaft nimmt man in 50 ccm Wasser auf. Zu der etwas trüben Lösung werden 0.3 ccm Nucleinsäurelösung (500 mg Hefenucleinsäure in 20 ccm Wasser + 0.8 ccm *n* NaOH, p_H 4.5) hinzugefügt, worauf man mit *n* Essigsäure auf p_H 3.0 bis 3.1 ansäuert; bei 25000 g wird 20 Min. zentrifugiert. Die klare überstehende Lösung bringt man mit *n* NaOH auf p_H 6.0 bis 6.1 und rührt dann langsam festes Ammoniumsulfat ein, bis 55-proz. Sättigung erreicht ist. Nach 1stdg. Aufbewahren bei 0° wird das ausgefallene Protein abzentrifugiert. Den Niederschlag löst man in 30 ccm Wasser. Nach dem Abzentrifugieren eines unlöslichen Rückstandes gibt man aus einer Bürette 90 ccm Aceton (0–4°) zu. Der Niederschlag wird abzentrifugiert und gleich wieder in 20 ccm Wasser gelöst. Zu der Lösung gibt man 60 ccm kaltgesättigte Ammoniumsulfatlösung und zentrifugiert. Der überstehenden Lösung werden weitere 20 ccm Ammoniumsulfatlösung zugesetzt. Nach 2stdg. Stehenlassen wird der Niederschlag abzentrifugiert. Das Protein, das die Hauptmenge der Fermentwirkung enthält, kann bei –15° in gesättigter Ammoniumsulfatlösung ohne Wirkungsverlust mehrere Wochen aufbewahrt werden. Bei der letzten Ammoniumsulfat-Fraktionierung empfiehlt es sich, alle Niederschläge auf Fermentaktivität zu testen, da es von noch vorhandenen Verunreinigungen abhängt, bei welcher Ammoniumsulfatkonzentration die Hauptmenge des Fermentes ausfällt.

Zur Gewinnung aus Dymal wurden 50 g zerriebene Dymaltabletten 1 Stde. mit 400 ccm Wasser bei 4° unter häufigem Umrühren extrahiert und anschließend zentrifugiert. 320 ccm Überstand wurden mit 140 g Ammoniumsulfat versetzt. Die abzentrifugierte Ammoniumsulfatfällung wurde in 50 ccm Wasser aufgenommen. Die Fällung der Nucleoproteine erfolgte in der oben beschriebenen Weise. Nach der zweiten Fällung mit Ammoniumsulfat (50-proz. Sättigung) wurde das Abzentrifugierte wieder in 50 ccm Wasser gelöst und mit 55 ccm Aceton versetzt. Das Ferment fiel aus, während der Hauptteil der gefärbten Verunreinigungen in Lösung blieb. Anschließend wurde, wie oben beschrieben, fraktioniert mit Ammoniumsulfat gefällt. So erreichte man eine ungefähr 25fache Reinigung des Fermentes.

Die Bestimmung der Ausbeute war nicht sehr genau wegen der hohen Blindwerte für die rohen Fermentextrakte. In diesen wurden die Proteine nach Fällung mit Trichloroessigsäure (Endkonzentration 10%) durch Bestimmung des Kjehldahl-Stickstoffs ermittelt. Den Proteingehalt der ammoniumsulfathaltigen Lösungen haben wir mit Hilfe der Biuret-Reaktion ermittelt²⁰).

*) Züchtung der Pilze in Weinsäure und glucosehaltiger Salzlösung (Raulinsche Lösung) und Homogenisieren des gewaschenen Pilzmycels für 3 Min. im Starmix gab wesentlich geringere Enzymausbeuten.

²⁰) G. Beisenherz, H. J. Boltze, Th. Bücher, R. Czork, K. H. Garbade, E. Meyer-Arendt u. G. Pfeleiderer, Z. Naturforsch. 8 b, 576 [1953] (Biuret-Bestimmung).

Abhängigkeit der Fermentaktivität von der Wasserstoffionen-
konzentration

Enzym aus Hummer-Hypodermis. Citratpuffer nach Sörensen, 7 Stdn. bei 28°;
Substrat: β -Benzyl-*N*-acetyl-glucosaminid

p_H	$n/_{200}$ Thiosulfat verbraucht	mg <i>N</i> -Acetyl- glucosamin gebildet	% Spaltung
4.0	4.90	2.70	58%
4.6	6.10	3.36	72%
5.0	3.80	2.10	45%
5.9	3.15	1.74	37%
6.4	2.50	1.38	29%

Enzym aus *Aspergillus oryzae* (Dymal). 180 Min. bei 28°, Citratpuffer nach Sörensen; Substrat: β -Benzyl-*N*-acetyl-glucosaminid

3.3	4.85	2.68	57%
4.1	5.00	2.76	59%
4.6	4.65	2.57	55%
4.8	4.10	2.26	48%
5.8	3.90	2.15	46%

Spaltbarkeit verschiedener Substrate

Hummer-Enzym: Mit $m/_{15}$ Phosphatpuffer wurde p_H 5.5 eingestellt und 7 Stdn. bei 28° gehalten. Die Ansätze enthielten äquimolekulare Mengen an Substrat, und zwar β -Methyl-, β -Äthyl-, β -Propyl-, β -Benzyl-, β -Phenyl-*N*-acetyl-glucosaminid, 5.0 mg, 5.3 mg, 5.6 mg, 6.6 mg, 6.3 mg.

Substrat	ccm $n/_{200}$ Thiosulfat verbraucht	% Spaltung
β -Methyl- <i>N</i> -acetyl-glucosaminid	5.05	59
β -Äthyl- „ „	5.25	62
β -Propyl- „ „	5.50	65
β -Benzyl- „ „	4.90	58

Enzym aus *Aspergillus oryzae* (Dymal): Mit Phosphatpuffer wurde p_H 5.5 eingestellt und 120 Min. bei 28° gehalten.

β -Methyl- <i>N</i> -acetyl-glucosaminid	2.20	26
β -Äthyl- „ „	3.90	46
β -Propyl- „ „	4.70	55
β -Benzyl- „ „	4.70	55

Vergleich der Spaltbarkeit von β -Phenyl- und β -Benzyl-*N*-acetyl-glucosaminid in 90 Min. bei 28°; p_H 5.5. Das Enzym wurde 1:10 verdünnt.

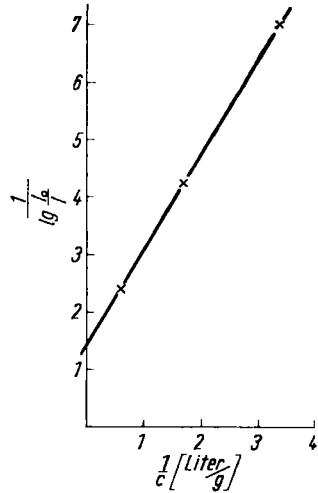
β -Benzyl-	0.50	5.9
β -Phenyl-	0.85	10.5

Die Michaelis-Menten-Konstante, bestimmt nach der Methode von H. Lineweaver und D. Burk²¹⁾, beträgt 0.005 Mol/l (Abbild. 1).

²¹⁾ J. Amer. chem. Soc. 56, 658 [1934].

<i>c</i> Äthylverbindung (g/l)	0.3	0.6	1.8
log i_0/i	0.143	0.238	0.429

Abbild. 1. Substrat-Konzentration
und Reaktionsgeschwindigkeit



Die Anfangsgeschwindigkeit der Substratspaltung ist proportional der Fermentkonzentration (Substrat: β -Äthyl-*N*-acetyl-glucosaminid).

Fermentverdünnung	1:15	1:30	1:60	1:120
log i_0/i	0.262	0.151	0.075	0.038

Zeitlicher Verlauf der Spaltung von β -Äthyl-*N*-acetyl-glucosaminid

Minuten	5	10	15
log i_0/i	0.276	0.419	0.664

Das Auftreten von Syntheseprodukten bei der Spaltung von *N,N'*-Diacetyl-chitobiose ließ sich papierchromatographisch nachweisen. Die Versuchsansätze enthielten 20 mg *N,N'*-Diacetyl-chitobiose und 0.2 ccm Ferment (die Ammoniumsulfatsuspension des Fermentes wurde zentrifugiert, die überstehende Ammoniumsulfatlösung sorgfältig entfernt und das Protein in der gleichen Menge Wasser gelöst). p_H mit verd. Essigsäure eingestellt. Zum Abstoppen der Fermentreaktion wurde 4 Min. auf 80° erwärmt. Nach dem Abkühlen wurde auf ca. 2 ccm mit Wasser verdünnt, Ionenaustauscher Amberlite IR 120 und Amberlite IR 45 zugegeben und etwa 30 Min. geschüttelt. Das Filtrat wurde i. Vak. auf ein kleines Volumen eingengt. Papier: Schleicher & Schüll 2043b. Mit Pyridin: Essigester: Wasser = 1:2:2 (obere Phase nach dem Schütteln des Gemisches) wurde das Chromatogramm absteigend 36 Stdn. entwickelt. Die reduzierenden Zucker wurden mit Anilinphthalat, das *N*-Acetyl-glucosamin wurde durch die Morgan-Elson-Reaktion²²⁾ und das β -Äthyl-*N*-acetyl-glucosaminid nach dem Prinzip von H. N. Rydon und P. W. G. Smith²³⁾ nachgewiesen.

Nach 9stdg. Inkubation bei p_H 6 war die *N,N'*-Diacetyl-chitobiose fast vollständig gespalten und neben viel *N*-Acetyl-glucosamin ein neues, langsamer wanderndes Produkt aufgetreten ($R_{\text{Galactose}} = 0.8$).

Nach 14stdg. Inkubation bei p_H 6 und nach 9stdg. Inkubation bei p_H 4 waren keine Syntheseprodukte mehr nachzuweisen. Bei dem neuauftretenden Produkt könnte es sich um eine Verbindung mit 3 *N*-Acetyl-glucosamin-Resten, Triacetyl-chitotriose, handeln. Chitotriose-undekaacetat wurde durch partielle Hydrolyse von Chitin mit Salzsäure gewonnen²⁴⁾. Nach ammonolytischer Abspaltung der an Sauerstoff gebundenen Acetylreste war $R_{\text{Galactose}} = 0.75$.

²²⁾ L. A. Elson u. W. T. J. Morgan, Biochem. J. 28, 988 [1934].

²³⁾ Nature [London] 169, 922 [1953].

²⁴⁾ L. Zechmeister u. G. Toth, Ber. dtsh. chem. Ges. 65, 161 [1952].