

p-Bromanilin-*D*-glucosid: Eine äthanol. Lösung von wasserfreier *D*-Glucose (0.5 *m*) und *p*-Bromanilin (1.0 *m*) wird unter Rückfluß gekocht. Nach 3 Stdn. wird die Lösung homogen, und man erhitzt dann noch eine weitere Stde. Beim Eindampfen im Vakuum bei 25–40° erhält man zunächst einen dicken Sirup, der zu einem farblosen, in Äthanol und Methanol löslichen, in Äther unlöslichen Produkt erstarrt. Dieses wird mit Äther gewaschen und aus Methanol umkristallisiert. Farblose Nadeln vom Zers.-P. 154–155°; $[\alpha]_{\text{D}}^{23}$: –64.4° (48 Stdn. konstant) ($c = 0.6$ und 1.0, in wasserfreiem Methanol; nach 6 Tagen bei 37° → –61°); $[\alpha]_{\text{D}}^{23}$: +26.4° (24 Stdn. konstant) ($c = 0.46$, in 0.35 *n* HCl); bei vollständiger Hydrolyse zu *D*-Glucose und *p*-Bromanilin wäre $[\alpha]_{\text{D}}$: +28.3°.

$\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_5\text{NBr} \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ (343.2) Ber. C 42.00 H 5.00 Br 23.29
Gef. C 42.74, 42.77 H 5.08, 5.11 Br 23.04, 23.06

RUDOLF WEIDENHAGEN

unter Mitwirkung von ELISABETH PRESSLER und SILVIA LORENZ

ÜBER DIE AKTIVITÄTSBESTIMMUNG VON FRUCTOSIDASE-PRÄPARATEN, ZUGLEICH EIN BEITRAG ZUR FRAGE DER ÜBERTRAGUNGSWIRKUNG DER CARBOHYDRASEN

Aus dem Zentrallaboratorium der Südd. Zucker AG., Neuoffstein (Pfalz)
(Eingegangen am 31. Januar 1957)

Herrn Professor Helferich zum 70. Geburtstag

Das reinste Fructosidasepräparat, an dem bisher transfructosidatische Wirkung nachgewiesen werden konnte, ist vom Fructosidasewert 100. Die gleiche Eigenschaft wurde für eine β -*h*-Fructosidase aus Hefe vom dreifachen Reinheitsgrad auf papierchromatographischem Wege aufgezeigt. Die transferierende Wirkung der Glykosidasen ist damit weiter gesichert.

Die Auffindung der Gruppenübertragung im Bereich der Carbohydrasen hat die Frage akut werden lassen, ob die Transglykosidierung den einzelnen Glykosidasen selbst zuzuschreiben ist und somit ein wesentliches Merkmal ihrer Wirkung darstellt, oder ob spezifische Transglykosidasen existieren, die mit den spaltenden Enzymen noch vergesellschaftet sind und demnach von ihnen abtrennbar sein müssen. Die übertragende Wirkung der Carbohydrasen ist bei der rohrzuckerspaltenden β -*h*-Fructosidase durch papierchromatographische Analyse der Spaltansätze entdeckt worden¹⁾. Dieses Enzym ist gleichzeitig besonders leicht in hoher Reinheit darstellbar und damit zur Entscheidung der oben gestellten Frage prädestiniert. Von ED. H. FISCHER und Mitarbb.²⁾ ist zu diesem Zwecke ein Fructosidasepräparat von einer nach ihrer Meinung bisher unerreichten Reinheit hergestellt und auf seine transfructosidatische Wirkung geprüft worden. Die Bildung von drei nichtreduzierenden Trisacchariden durch Über-

¹⁾ J. S. D. BACON und J. EDELMAN, Arch. Biochemistry **28**, 467 [1950]; P. H. BLANCHARD und N. ALBON, ebenda **29**, 220 [1950].

²⁾ ED. H. FISCHER und L. KOHTÈS, Helv. chim. Acta **34**, 1123 [1951]; ED. H. FISCHER, L. KOHTÈS und J. FELLIG, ebenda **34**, 1132 [1951].

tragung von Fructoseradikalen auf das Saccharosesubstrat im Verlauf der Rohrzuckerspaltung wurde papierchromatographisch bestätigt, und die Frage schien damit im Sinne eines *einheitlichen* Enzyms, das sowohl zur hydrolysierenden als auch synthetisierenden Wirkung befähigt ist, entschieden.

Die Aktivität des Fructosidasepräparates von ED. H. FISCHER und Mitarbb.²⁾ ist von diesen Autoren nach einer eigenen Methode bestimmt worden, ohne daß eine Abstimmung mit den nach anderen Methoden getesteten Fructosidasepräparaten älterer Autoren stattfand. Im Hinblick auf die Wichtigkeit des Problems schien es daher interessant, das Fructosidasepräparat von ED. H. FISCHER und Mitarbb.²⁾ mit jenen älteren Präparaten zu vergleichen.

Im Gegensatz zu den polarimetrischen Bestimmungsmethoden früherer Forscher haben FISCHER und Mitarbb. die etwas modifizierte kolorimetrische Methode von J. B. SUMNER und ST. F. HOWELL³⁾ benutzt, wobei der bei der Rohrzuckerhydrolyse gebildete Invertzucker durch Reduktion von 3,5-Dinitro-salicylsäure bestimmt wird. Die *Fructosidase-Einheit* (E) wird charakterisiert als diejenige Menge Enzym, welche 1 mg reduzierenden Zucker in 3 Min. bei 20° und p_H 4,8 in einer 2,5-proz. Saccharoselösung in Freiheit setzt (1 ccm 5-proz. gepufferte Saccharoselösung und 1 ccm Enzymlösung). Die Enzymmenge soll so abgestimmt werden, daß die Spaltung des Substrats 3% nicht überschreitet. Es wird dabei in Übereinstimmung mit SUMNER und HOWELL³⁾ Wert darauf gelegt, die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion zu erfassen, während bei den polarimetrischen Methoden meist ein Mittelwert aus einer längeren Spaltungsdauer benutzt wird, der im Hinblick auf die abfallende Reaktionsgeschwindigkeit niedriger liegt. Die *Reinheit* des Enzyms wird ausgedrückt als Quotient E/mg N (nach Kjeldahl) oder E/mg Kohlenhydrat der Enzympräparate, berechnet als Glucose. Daneben wird auch die Zahl der E/mg Gesamttrockensubstanz benutzt*). Die von FISCHER und Mitarbb.²⁾ erzielten Reinheitsgrade liegen zwischen 160–200 E/mg Trockensubstanz und bei etwa 4000 E/mg N; in einem Sonderfall konnte ein Wert von 300 E/mg Trockensubstanz erreicht werden.

Wir haben ein nach eigener Methode hergestelltes Präparat aus dem Jahre 1936⁴⁾, das in 20 Jahren praktisch seine Aktivität von ca. 300 Fructosidase-Einheiten/g Trockensubstanz (Fructosidase-Wert nach der Standardmethode von R. WEIDENHAGEN⁵⁾) behalten hatte, nach der kolorimetrischen Methode von FISCHER und Mitarbb.²⁾ mit Dinitrosalicylsäure getestet. Die Standardkurve für Invertzucker und die einzelnen Versuchswerte wurden mit dem „Spectronic 20 Colorimeter“ der Fa. Bausch & Lomb, New York, für die Wellenlänge 560 μ ermittelt. Wir erzielten dabei in wiederholten Versuchen für 2 γ unseres Enzyms eine Freisetzung von 1,62 mg Invertzucker. Das bedeutet, daß *eine* Enzymeinheit an 1,23 γ Enzymsubstanz sitzt, oder daß pro mg Trockensubstanz 810 Enzymeinheiten vorhanden sind. Die Reinheit ist also 810. Da das Präparat 7% N nach Kjeldahl besitzt, würde das 11600 E/mg N entsprechen. Unsere Substanz, die bereits 1936 hergestellt wurde, ist also in Bezug auf Gesamttrockenstoff oder Proteingehalt ca. 3-mal aktiver als das „reinste“ Präparat von FISCHER und Mitarbeitern²⁾. Sie läßt sich aber nach R. WEIDENHAGEN und L. NENNINGER⁶⁾ spie-

3) J. biol. Chemistry **108**, 51 [1935]. *) Persönliche Mitteilung.

4) R. WEIDENHAGEN und A. RENNER, Z. Wigr. Zuckerind. **86**, 473 [1936].

5) Z. Ver. dtsh. Zuckerind. **79**, 595 [1929]; vgl. auch R. WEIDENHAGEN in E. BAMANN und K. MYRBÄCK, Methoden der Fermentforschung, Verlag G. Thieme, Leipzig 1940, S. 1724.

6) Z. Wigr. Zuckerind. **89**, 141 [1939].

lend auf eine Reinheit von 600 E/g Trockensubstanz steigern, so daß wir in einem auch für große Enzymmengen geeigneten präparativen Verfahren bereits Fischer-Einheiten von 1600/mg Trockensubstanz erreicht haben. Auch dieses Enzym ist aber hinsichtlich seiner Reinheit früheren in der Literatur beschriebenen Präparaten anderer Autoren⁷⁾ noch erheblich unterlegen. Diese hochgereinigten Enzyme sind allerdings nur in sehr geringen Mengen hergestellt worden, so daß ihre Reinheit z. T. nur schwer bestimmbar war, z. T. sogar nur rechnerisch ermittelt wurde. Bei Nacharbeitung gelang es uns in Übereinstimmung mit FISCHER und Mitarbb.²⁾ z. B. nicht, zu den von ADAMS und HUDSON⁷⁾ beschriebenen Aktivitäten zu kommen. Doch spielt die als Ausgangsmaterial benutzte Hefe hier wohl eine entscheidende Rolle. So konnten wir auch nach der von H. DIEU⁸⁾ beschriebenen Methode mit der uns zur Verfügung stehenden Hefe bei weitem nicht die von diesem Forscher angegebene Reinheit erreichen. Wir sind hier aber auf eine Unstimmigkeit gestoßen. Unter den von diesem Autor beschriebenen Bedingungen hat unser Präparat vom „Fructosidasewert“ 300 eine Aktivität von 0.80 mg Invertzucker für 2 γ Enzymsubstanz, was wiederum bei 7% N für 1 mg N ca. 6000 Enzymeinheiten bedeuten würde. Das von DIEU beschriebene reinste Präparat hatte demgegenüber nur ca. 5000 Enzymeinheiten pro mg N. Dieser Autor hat nun eine Beziehung zu früheren Reinheitsbestimmungen hergestellt und sein Präparat auch nach der alten Zeitwertbestimmung von C. O'SULLIVAN und F. W. TOMPSON⁹⁾ getestet. Dabei wurde für ein Enzym mit der Reinheit 4900 ein Zeitwert von 0.059 Min. ermittelt, während unser Präparat von 6000 Dieu-Einheiten nur einen Zeitwert von 0.50 Min. lieferte. Diese Diskrepanz konnten wir bisher nicht aufklären. Vielleicht hängt sie damit zusammen, daß die alte Zeitwertbestimmung mit einer 16-proz. Saccharoselösung arbeitet, bei welcher Konzentration die transfructosidatische Wirkung bereits merkliche Form annimmt, so daß die ermittelte Polarisierung erheblich von dem der wahren Saccharosespaltung entsprechenden Wert abweichen kann. Die Erreichung des zu der Bestimmung erforderlichen Nullwertes wird dadurch unkontrollierbar beeinflusst. *Diese Methode der Enzymbestimmung ist also grundsätzlich zu verwerfen.* Sie ist aber bereits von R. WILLSTÄTTER und B. STEIBELT¹⁰⁾ zu Gunsten der Saccharase-Vergleichszeitwert-Bestimmung aufgegeben worden, und WEIDENHAGEN⁵⁾ hat schon 1929 unter Zugrundelegung dieser Methode für die Bestimmung aller Carbohydrasen eine Standardmethode empfohlen, wobei gleichzeitig für die Reinheitsfestsetzung 1 g Enzym-Trockensubstanz als Bezugsmenge zu Grunde gelegt wurde. Die noch im Jahre 1935 erfolgten Beanstandungen von SUMNER und HOWELL³⁾ gegen die alte Zeitwertbestimmung und die Empfehlung, für die Reinheitsbestimmung 1 g an Stelle von 50 mg Trockensubstanz Enzym zu verwenden, sind daher nicht ganz verständlich. Auch die grundsätzliche Ablehnung der polarimetrischen Methode scheint uns nicht ganz berechtigt. Sie läßt sich genau so schnell durchführen wie die kolorimetrische Methode. Außerdem ist sie wesentlich unabhängiger von der Enzymaktivität, der man sich im Laufe der Bestimmung noch anpassen kann, während die

⁷⁾ R. WILLSTÄTTER und F. RACKE, Liebigs Ann. Chem. **425**, 1 [1921]; H. ALBERS und I. MEYER, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **228**, 122 [1934]; M. ADAMS und C. S. HUDSON, J. Amer. chem. Soc. **60**, 982 [1938]; N. K. RICHTMYER und C. S. HUDSON, ebenda **60**, 983 [1938].

⁸⁾ Bull. Soc. chim. belges **55**, 306 [1946].

⁹⁾ J. chem. Soc. [London] **57**, 834 [1890].

¹⁰⁾ Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **111**, 157, 169 [1920].

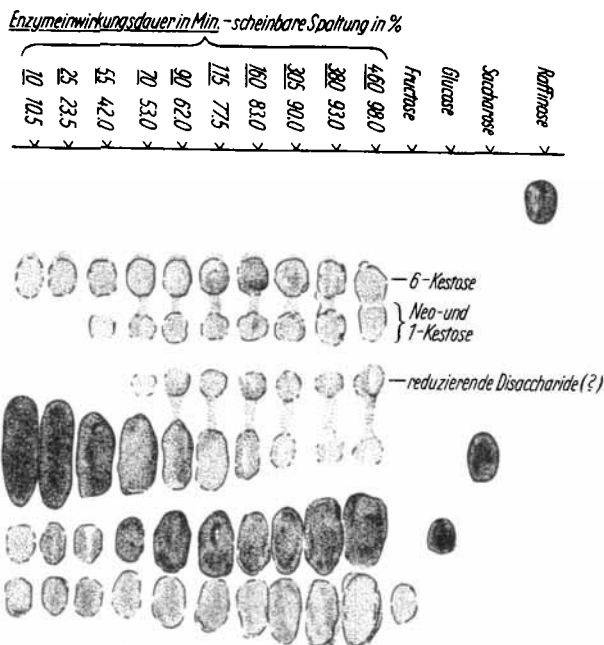
kolorimetrische Methode bei der außerordentlich geringen Zucker- und Enzymmenge unter Umständen mehrere Versager gibt, bis das richtige Verhältnis ermittelt wird, bei dem der erzielte Wert in den auswertbaren Bereich fällt.

Grundsätzlich scheint es im Hinblick auf die übertragende Wirkung der Carbohydrasen wohl aber zweckmäßig, die Aktivitätsbestimmung in dem Stadium der Reaktion abzubrechen, wo praktisch nur hydrolysierende Wirkung vorliegt. In dieser Beziehung ist die von Fischer und Mitarbb. festgesetzte Zeit von 3 Min. Einwirkungs-dauer bei höchstens 3% Spaltung daher gut geeignet, wobei es gleichgültig wäre, ob der Spaltungsgrad kolorimetrisch oder polarimetrisch festgestellt würde. Es wäre zu empfehlen, die Methode nunmehr für die Bestimmung *aller* Carbohydrasen einzuführen, um weitere Irrtümer in der Beurteilung der erzielten Reinheitsgrade zu vermeiden. Eine solche Vereinheitlichung scheint um so notwendiger, als allein für die kolorimetrische Bestimmung der enzymatischen Rohrzuckerspaltung drei verschiedene Methoden beschrieben wurden (SUMNER und HOWELL³⁾, DIEU⁸⁾, FISCHER und Mitarbb.²⁾), die sich in bezug auf Rohrzuckerkonzentration, Temperatur und Enzymmenge für die Reinheitsfeststellung unterscheiden. Die oben mitgeteilten Zahlen können dann leicht zur Umrechnung alter Bestimmungsgrößen in die neuen Kennzeichen dienen. So entspricht eine Fructosidase-Einheit nach Weidenhagen 2700 Fructosidase-Einheiten nach Fischer oder, da sich die *Reinheit* im ersten Fall auf 1g, im zweiten aber nur auf 1 mg Trockensubstanz beziehen soll: Der Fructosidasewert 1 nach Weidenhagen entspricht dem Fructosidasewert 2.7 nach Fischer.

Nach der Feststellung, daß das Fructosidasepräparat vom Enzymwert 300 dreimal stärker ist als das beste bisher zur Ermittlung der Übertragungswirkung geprüfte, haben wir erneut eine papierchromatographische Analyse der fructosidatischen Spaltung einer 47.5-proz. Saccharoselösung durchgeführt. Der in dem Ansatz jeweils erreichte Spaltungsgrad ist am Kopf des Papierchromatogramms (siehe Abbild.) verzeichnet. Er wurde polarimetrisch ohne Berücksichtigung der durch die Syntheseprodukte verursachten Drehungsbeeinflussung ermittelt, so daß es sich nur um „scheinbare“ Hydrolysewerte handelt. Als Lösungsmittel für die Verteilung wurde ein Gemisch von 7 Tln. Propanol, 1 Tl. Essigester und 2 Tln. Wasser benutzt. Als Sprühreagens zur Entwicklung der Flecken wurde eine mit Trichloressigsäure versetzte alkoholische Benzidinlösung angewandt, die mit allen Kohlenhydraten gut sichtbare gelbe bis rötlich-braune Flecken gibt. Für die Herstellung der Abbild. wurden die Flecken an Hand des farbigen Originals in schwarz nachgebildet. Die Flecken sind bei Saccharose und Invertzucker im Vergleich zu normalen Chromatogrammen sehr stark und umfangreich. Es wurden aber absichtlich größere Saccharosemengen aufgesetzt, um die Übertragungsprodukte deutlich sichtbar zu erhalten, worauf es im vorliegenden Falle wesentlich ankam. Man erkennt, daß mit fortschreitender Enzymeinwirkung die Saccharose immer mehr verschwindet und dafür Invertzucker auftritt. Gleichzeitig werden aber auch die Flecken der durch Transfructosidierung gebildeten Zucker deutlich erkennbar. Zuerst erscheint die 6-Kestose¹¹⁾ als Hauptprodukt der Übertragungsreaktion, ab 60% Spaltung treten auch die übrigen Syntheseprodukte deutlich in Er-

¹¹⁾ N. ALBON und Mitarbb., J. chem. Soc. [London] 1953, 24.

scheinung. Der unter der 6-Kestose liegende Fleck ist nach heutiger Erkenntnis¹²⁾ als Gemisch von 1-Kestose und Neokestose zu deuten, während der über Saccharose liegende Fleck wahrscheinlich von reduzierenden Disacchariden herrührt, die durch Übertragung von Fructoseradikalen an die Invertzuckerbestandteile entstehen. Gegen Ende der Spaltung verbleiben im wesentlichen Glucose und Fructose als Produkte der hydrolysierenden Wirkung des Enzyms, der schließlich alle Substrate zum Opfer fallen.



Papierchromatogramm der Transfructosidasewirkung eines β -h-Fructosidasepreparates vom Enzymwert 300 in 47.5-proz. Saccharoselösung.

Lösungsmittel: Propanol-Äthylacetat-Wasser, mit Benzidin nach 48 Std. entwickelt

Damit ist auch für das Fructosidasepreparat vom Enzymwert 300 nach WEIDENHAGEN bzw. 810 nach FISCHER und Mitarbb. die transferierende Wirkung nachgewiesen und die Annahme, daß hydrolysierende und synthetisierende Wirkung vom gleichen Enzym bewirkt werden, ist weiter gestützt. Nachdem aber auch dieses Präparat nur zu einem Bruchteil aus aktiver Enzymsubstanz besteht, bleibt die Forderung aufrecht, die Prüfung der einheitlichen Enzymwirkung mit noch wesentlich reineren Enzympräparaten zu wiederholen.

¹²⁾ D. GROSS, in *Compte-Rendu IX. Assemblée de la Commission Int. Technique de Sucrerie de Betterave*, Brüssel 1955, S. 14 [1957].