

# Die Ultraviolett-Inaktivierung von Saccharase in ihrer Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration und dem Ozon

Von

GEORG GORBACH und HANS PICK

Aus dem Biochemischen Institut der Technischen Hochschule in Graz  
Vorstand Prof. F. FUHRMANN

(Mit 3 Textfiguren)

(Vorgelegt in der Sitzung am 12. Mai 1932)

Es ist schon lange bekannt, daß kurzwellige Strahlen im allgemeinen auf Fermente hinderlich oder zerstörend wirken, eine Erscheinung, die in besonderem Maße auch für die Saccharase zutrifft. Es erschien uns nun für die Erklärung der Ultraviolett-inaktivierung der Saccharase im Sinne der modernen Fermentauffassung überhaupt wünschenswert, die herrschenden Beziehungen zur Wasserstoffionenkonzentration und zum Ozon experimentell festzustellen.

## 1. Versuchstechnik.

Zur Darstellung der Enzympräparate verwendeten wir Bierhefe (Brauerei Reininghaus, Graz), die unter Toluolzusatz autolytisch wurde. Solche gealterte Autolysate wurden nun durch Fällung mit Essigsäure, Dialyse, Kaolin- und Tonerde C-Adsorption und schließlich Elution mit 0.5% sek. Kaliumphosphat oder 0.05%igem Ammoniak gereinigt<sup>1</sup>. Die als Dialysenmembran dienenden Rindsdärme mußten durch eine Vorbehandlung mit wenig wirksamen Enzymlösungen bis zur Absättigung der Adsorptionskräfte so präpariert werden, daß jede weitere Fermentanlagerung und damit verbundene Verluste vermieden sind. (Vgl. GORBACH und LERCH<sup>2</sup>.)

Die Feststellung der *enzymatischen Aktivität* wurde nach

<sup>1</sup> G. GORBACH und K. LERCH, Einfluß des ultravioletten Lichtes auf die Saccharase. I. Biochemische Zeitschrift 219, 1930, S. 127.

<sup>2</sup> G. GORBACH und K. LERCH, Einfluß des ultravioletten Lichtes auf die Saccharase. II. Biochemische Zeitschrift 235, 1931, S. 260.

der Methode von GORBACH<sup>3</sup> refraktometrisch unter den Bedingungen der Zeitwertsbestimmung durchgeführt. Als Maß für die Wirkung diente entweder der Zeitwert oder die Brechungsänderung in Refraktometerteilstrichen für 30 und 50 Minuten.

Als Lichtquelle für die Bestrahlungsversuche fand die Analysenquarzlampe der Firma Heraeus in Hanau (110 Volt, 4 Amp. Gleichstrom) Verwendung. Die Bestrahlungstechnik wurde in der früheren Art und Weise durchgeführt<sup>4</sup>. Als Bestrahlungsgefäße benützten wir flache Schalen, die in dünner Schicht mit der Enzymlösung gefüllt wurden. Zur Kühlung derselben wurden sie in eine zweite Tasse gestellt, welche mit Eiswasser gefüllt war. Der Durchmesser der Schalen betrug 10 cm, die Menge des Enzyms 5 cm<sup>3</sup>.

Für die Versuche über den Einfluß des  $p_{\text{H}}$ -Wertes der Enzymlösung wurden vier Schalen mit je 6 cm Durchmesser, beschiekt mit den Enzymlösungen von verschiedenen  $p_{\text{H}}$ -Werten, gleichzeitig bestrahlt. Zur Erzielung einer gleichmäßigen Lichtwirkung wurde die große Kühlschale, in welche die kleinen Schalen eingestellt waren, ständig gedreht.

Für die Versuche unter Ausschaltung des Luftsauerstoffes benutzten wir die in Figur 1 schematisch dargestellte Apparatur: Zwei Quarzeprouvetten (Q) von 15 cm Länge, 2 cm lichter Weite und einer kugeligen Erweiterung von 4 cm im Durchmesser sind in eine mit Eis und Wasser gefüllte Schale (K) schräg eingestellt. Die Erweiterung dient zur Aufnahme des bei der Gasdurchleitung etwa auftretenden Schaumes der Enzymlösung. Den Verschuß bildet ein doppelt durchbohrter Kautschukstopfen. Durch die eine Bohrung wird ein bis zum Boden reichendes, durch die zweite ein kurzes Kapillarrohr eingeführt.  $T_1$  und  $T_2$  sind Blasenähler, welche einerseits das Kontrollieren des Gasstromes und andererseits den luftdichten Abschluß der Eprouvetten gestatten. Die Blasenähler wurden mit Wasser gefüllt. Die Sauerstoff- bzw. Stickstoffzufuhr erfolgt bei  $T_1$ , während das Gas bei  $T_2$  nach dem Durchströmen der Enzymlösung die Apparatur verläßt. Für jeden Versuch verwendeten wir 5 cm<sup>3</sup> Enzymlösung. Der Gasstrom wurde bei beiden Versuchen mit Hilfe von Schraubenquetsch-

<sup>3</sup> G. GORBACH, Über die Verwendbarkeit des Zeißschen Eintauchrefraktometers zur Messung der Saccharasewirkung. Biochemische Zeitschrift 217, 1930, S. 440.

<sup>4</sup> G. GORBACH und K. LERCH, Biochemische Zeitschrift 219, 1930, S. 129.

hählen derart gedrosselt, daß durch die Blasenähler durchschnittlich 60 Gasblasen in der Minute liefern.

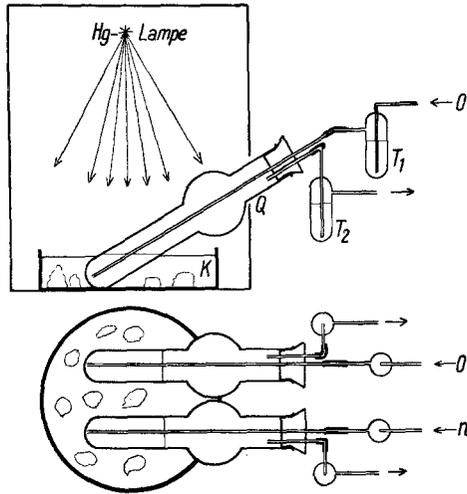


Fig. 1.

Die Messung des  $p_{\text{H}}$ -Wertes wurde kolorimetrisch innerhalb des  $p_{\text{H}}$ -Bereiches 3—8.4 nach MICHAELIS und bei den stark alkalischen Lösungen mit der Tropfenmethode nach TÖDT ausgeführt. Die Einstellung eines bestimmten  $p_{\text{H}}$ -Wertes bewerkstelligten wir durch Zusätze verdünnter Salzsäure und Natronlauge. Um die Konzentration der Enzymlösung in allen Fällen gleichzuhalten, wurden für jeden Versuch  $10 \text{ cm}^3$  Enzymlösung verwendet, auf den  $p_{\text{H}}$ -Wert eingestellt und dann im Meßkölbchen auf  $20 \text{ cm}^3$  aufgefüllt.

## 2. Versuchsreihen.

### A. Zeitlicher Inaktivierungsverlauf.

Im folgenden sind die Versuchsserien mitgeteilt, welche den Einfluß der Bestrahlungszeit auf verschieden reine Enzympräparate darlegen. Die anfänglichen Versuche führten wir mit gealterten Hefeautolysaten aus. Unter den angegebenen Bestrahlungsbedingungen konnte selbst nach zweistündiger Bestrahlung kaum eine Inaktivierung beobachtet werden. Erst die daraus durch Dialyse und Adsorption an Kaolin und Tonerde C gewonnenen Eluate zeigten eine starke Beeinflussbarkeit durch ultraviolettes Licht. Berücksichtigt man die Konzentration der Enzymlösung, so hat eine Bestrahlung von 80 Minuten eine Schädigung

von 90% herbeigeführt. Viel intensiver ist die Wirkung des ultravioletten Lichtes auf Saccharaselösungen von noch höherem Reinheitsgrad. Die Tabelle 1 gibt die Werte wieder, welche mit Eluaten vom Zeitwert 5·9 und 4·8 erhalten worden sind.

Tabelle 1.

Bestr.-Zeit in Minuten	Tonerdeeluat Z. W. 5·9		Tonerdeeluat Z. W. 4·8	
	Sk. T./60'	Inaktivierung in %	Sk. T./60'	Inaktivierung in %
0	1·44	0	1·75	0
5	0·85	41	0·85	51
10	0·67	54	0·65	68
15	—	—	0·20	88
25	0·23	84	0·00	100
35	0·02	98	—	—

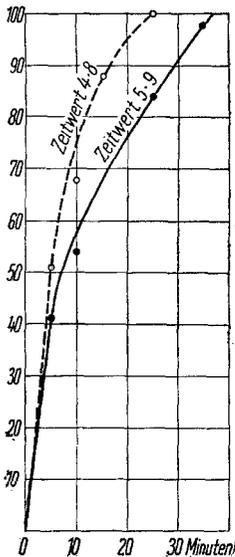


Fig. 2.

Es ergibt sich daraus, daß bei diesen Lösungen eine Bestrahlungszeit von 35 bzw. 25 Minuten genügt, um eine völlige Zerstörung der Wirkung herbeizuführen. Über den Zusammenhang der Inaktivierung mit der Bestrahlungsdauer orientieren die aus den Werten der Tabelle 1 konstruierten Kurven der Fig. 2. Die Inaktivierung verläuft zu Beginn der Bestrahlung unabhängig vom Reinheitsgrad linear. Nach längerer Bestrahlung erscheint die photochemische Reaktion verzögert. Die zerstörten Enzymkomplexe wirken scheinbar als Schutzsubstanzen, welche die weitere Inaktivierung der Lösungen erschweren. Im allgemeinen zeigen Kurven von weniger reinen Präparaten einen Verlauf, wie ihn monomolekulare Reaktionen aufweisen.

### B. $p_{\text{H}}$ -Wert und Bestrahlungsinaktivierung.

Die folgenden Versuche geben über die Abhängigkeit der Inaktivierung vom  $p_{\text{H}}$ -Wert der Enzymlösung Aufschluß. Zur Bestimmung der Wirkung wurde bei diesen Versuchen statt eines 16%igen ein 8%iger Rohrzuckergehalt verwendet. Für einen Ver-

suchsansatz von  $50 \text{ cm}^3$  gebrauchten wir  $5 \text{ cm}^3$  der Enzymlösung. Im übrigen wurden die Bedingungen der Zeitwertsbestimmung eingehalten. Die Versuche führten wir mit einem gealterten, durch fraktionierte Autolyse gewonnenen Autolysat, mit verschiedenen Dialysaten und einem Tonerdeeluat aus. Die in den Tabellen angegebenen  $p_{\text{H}}$ -Werte wurden vor der Bestrahlung bestimmt. In vielen Fällen kann nach der Bestrahlung eine Verschiebung des  $p_{\text{H}}$ -Wertes beobachtet werden. Dies gilt besonders für den alkalischen Ast. Sie verschieben sich in das Gebiet der höheren Wasserstoffionenkonzentration. Sämtliche Enzymlösungen überprüften wir vor und nach der Bestrahlung auf ihre enzymatische Wirksamkeit. Die Tabelle 2 enthält die Ergebnisse, welche wir mit einem Autolysat ( $0.80 \text{ Skt}/30'$ , Trockenrückstand  $0.1 \text{ g/cm}^3$ ) erhielten.

Tabelle 2.

Enzym	Anfangs- $p_{\text{H}} =$	4.4	5.9	7.3	7.8
Autolysat	Wkg. vor Bestrahlung in Sk. T./80'.....	0.67	0.79	0.75	0.69
	Wkg. nach 60'-Bestrahlung in Sk. T./30'.....	0.67	0.73	0.74	0.69
	Inaktivierung in % ...	0	0.70	0	0

Trotz zweistündiger Bestrahlung konnte kaum eine Inaktivierung durch das kurzwellige Licht festgestellt werden. An diesem Ergebnis ändert auch der wechselnde  $p_{\text{H}}$ -Wert nichts, wenn man von der geringen Schwächung bei  $p_{\text{H}} 5.9$  absieht. Wesentlich anders wird das Ergebnis, wenn statt der Autolysate Dialysate versucht werden.

Tabelle 3.

Enzym	Anfangs- $p_{\text{H}} =$	3.2	7	8.2	9.2
Dialysat 24 Std.	Wkg. vor Bestrahlung in Sk. T./30'.....	0.67	0.80	0.62	0.59
	Wkg. nach 60'-Bestrahlung in Sk. T./30'.....	0.31	0.45	0.25	0.30
	Inaktivierung in % ...	54	44	60	49

Wie Tabelle 3 zeigt, wird das aus dem Autolysat der Tabelle 2 erhaltene 24stündige Dialysat bei einer Bestrahlungszeit von nur 60 Minuten bereits um durchschnittlich 50% geschädigt. Die Abhängigkeit der Inaktivierung von der H-Konzentration ist jedoch klein. Trotz der großen Aziditätsunterschiede waren die Werte ziemlich ähnlich. Die geringste Schädigung zeigte die neutrale Enzymlösung, während bei der Bestrahlung von sauren und alkalischen Enzymlösungen etwas höhere Werte erhalten wurden. Prinzipiell dasselbe Ergebnis lieferte ein 24stündiges Dialysat, welches von einem gealterten Autolysat stammte. Tabelle 4 zeigt die Resultate dieses Versuches.

Tabelle 4.

Enzym	Anfangs- $p_H =$	3·0	7·0	8·4	9·3
Dialysat 24 Std.	Wkg. vor Bestrahlung in Sk. T./50'.....	0·61	0·60	0·59	0·56
	Wkg. nach 60'-Bestrahlung in Sk. T./50'.....	0·29	0·31	0·25	0·12
	Inaktivierung in % ...	53	49	58	79

Die Schädigung ist bei  $p_H$  7 am geringsten. Auffallend erscheint die starke Inaktivierung bei  $p_H$  9·3. Auch der dritte in Tabelle 5 wiedergegebene Parallelversuch bestätigt diese Befunde.

Tabelle 5.

Enzym	Anfangs- $p_H =$	3·9	5·4	7·3	8·4
Dialysat 24 Std.	Wkg. vor Bestrahlung in Sk. T./50'.....	0·60	0·52	0·51	0·51
	Wkg. nach 60'-Bestrahlung in Sk. T./50'.....	0·27	0·25	0·26	0·18
	Inaktivierung in % ...	55	52	49	65

Das Dialysat der letzten Versuchsreihe wurde durch Adsorption an Tonerde unter Zusatz von 40% Azeton weiter gereinigt. Das erhaltene Eluat hatte einen sehr guten Zeitwert (1·27) und war durchschnittlich zwölfmal reiner als das Dialysat. Die damit erhaltenen Versuchsergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengestellt.

Tabelle 6.

Enzym	Anfangs- $p_H =$	5.5	6.9	8.4	9.0
Tonerdeeluat	Wkg. vor Bestrahlung in Sk. T./30'.....	0.68	0.70	0.73	0.67
	Wkg. nach 60'-Bestrahlung in Sk. T./30'.....	0.44	0.40	0.43	0.41
	Inaktivierung in % ...	35	43	41	39

Trotz des hohen Reinheitsgrades wird diese Enzymlösung bei gleicher Bestrahlungszeit (60') nur um zirka 40% geschädigt. Die Abhängigkeit vom  $p_H$ -Wert ist dabei sehr gering, denn man erhält nur wenig differierende Werte.

### C. Ozonversuche.

Eine Reihe von Untersuchungen haben wir der Lösung der Frage gewidmet, ob das bei der Bestrahlung mit der Quarzlampe auftretende Ozon die Zerstörung der enzymatischen Wirkung zur Folge hat oder ob es sich dabei um eine direkte Einwirkung kurzwelliger Strahlen auf das Enzym selbst handelt. Durch Vorversuche wurde die Einwirkung von ozonisiertem Sauerstoff auf Saccharasepräparate studiert. Als Enzymlösung stand uns ein durch Adsorption an Kaolin vorgereinigtes Tonerdeeluat vom Zeitwert 4.7 zur Verfügung. Zur Ausführung dieses Versuches füllten wir zwei Eprouvetten mit gleichem Durchmesser mit 5  $cm^3$  Eluat. In die eine Eprouvette wurde mit Hilfe des SIEMENSschen Ozonisators ozonisierter Sauerstoff, in die zweite molekularer Sauerstoff eingeleitet.

Bereits nach einer zwei Minuten dauernden Einleitung sind 90% der ursprünglichen Wirkung verlorengegangen. Eine Durchleitungszeit von 4 Minuten genügt, um das Präparat völlig zu inaktivieren. Im Parallelversuch mit molekularem Sauerstoff bleibt die Wirkung während dieser Zeit erhalten. Ozon ist nach diesen Versuchen tatsächlich geeignet, starke Inaktivierungen herbeizuführen, was mit den bezüglichen Untersuchungen SVANBERG<sup>5</sup> im Einklang steht.

Um die Wirkung des Ozons mit Sicherheit auszuschalten, wurden die folgenden Versuche unter Einleiten von Stickstoff

<sup>5</sup> O. SVANBERG, Archiv for Kemi 8, 1921.

während der Bestrahlung durchgeführt. Um aber die Wirkung des eventuell gebildeten Ozons zu erkennen, leiteten wir in einer Parallelprobe während der Bestrahlung reinen Sauerstoff zu. Für diese Versuche wurde das Eluat vom Zeitwert 4·7 verwendet, welches sich nach den oben mitgeteilten Versuchen gegen Ozon als sehr empfindlich erwies. Vor dem Beginn der Durchstrahlung wurden die beiden Gase fünf Minuten hindurch in die Proben eingeleitet, um die Luft zu entfernen. Zur Bestrahlung kamen je 5 cm<sup>3</sup> der Enzymlösung. Nach bestimmten Bestrahlungszeiten wurden die Proben untersucht und durch neue ersetzt. Die auf diesem Wege erhaltenen Versuchsergebnisse sind in der Tabelle 7 (Versuch I und II) enthalten.

Tabelle 7.

Versuch	Enzym	Bestrahlungszeit in Minuten	0	10	20	30	50
I	Tonerdeeluat	Stickstoffversuch: Wkg. in Sk. T./60'	0·91	0·92	0·47	0·31	0·10
		Sauerstoffversuch: Wkg. in Sk. T./60'	0·91	0·95	0·69	0·49	0·16
II	Tonerdeeluat	Stickstoffversuch: Wkg. in Sk. T./60'	0·93	0·83	0·69	—	0·39
		Sauerstoffversuch: Wkg. in Sk. T./60'	0·93	1·02	0·79	—	0·65

Die auf Grund dieser Werte konstruierten Kurven der Figur 3 zeigen deutlich, daß die Inaktivierung der Saccharase durch kurzweiliges Licht auch unter vollkommenem Sauerstoffabschluß bewirkt wird.

Sie ist sogar stärker als im Parallelversuch mit reinem Sauerstoff, bei welchem optimale Bedingungen zur Bildung des Ozons durch ultraviolettes Licht geschaffen erscheinen. Es tritt in diesem Falle sogar eine geringe Erhöhung der Enzymwirkung nach 10 Minuten dauernder Bestrahlung ein. Um Zufallsergebnisse auszuschalten, wiederholten wir die Versuchsreihe. Die Ergebnisse sind ebenfalls in Tabelle 7 verzeichnet. Wie die daraus erhaltenen Kurven aber zeigen (Fig. 3), erhält man ein ähnliches Bild. Wiederum erscheint die stickstoffgesättigte Probe in der Zeiteinheit stärker geschädigt als die sauerstoffgesättigte. Die beobachtete Aktivierung der sauerstoffgesättigten Probe nach

einer Bestrahlung von 10 Minuten tritt in diesem Versuch noch bedeutend stärker hervor. Es wurde nicht verabsäumt, den von der Probe während der Bestrahlung abziehenden Sauerstoff auf Ozon zu prüfen. Die Jodkaliumstärkeprobe fiel in jedem Zeitpunkt der Bestrahlung negativ aus. Zur Erklärung der Erscheinung, daß Bestrahlungen in Sauerstoffatmosphäre sogar eine

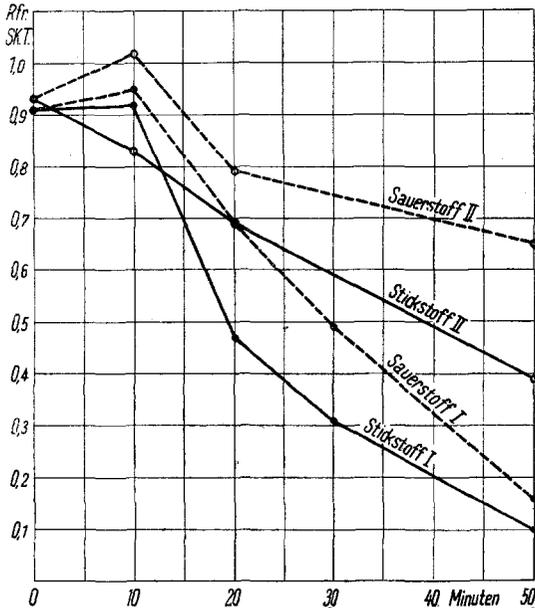


Fig. 3.

Aktivierung der Enzymlösung herbeiführen, kann die Annahme dienen, daß die neben der enzymatisch wirkenden Substanz vorhandenen Hemmstoffe durch den aktivierten Sauerstoff oxydiert und dadurch unschädlich werden. Mit dieser Annahme steht die beobachtete Inaktivierung bei Verlängerung der Bestrahlungszeit durchaus nicht im Widerspruch. Denn selbst dann wird die Zerstörung des Enzymkomplexes durch die Oxydation der Begleitsubstanzen teilweise kompensiert, nur überwiegt die Inaktivierung der zymoaktiven Substanz die durch Entfernung der hemmenden Begleitstoffe bewirkte Aktivierung.

### Zusammenfassung.

Aus den mit Saccharasepräparaten angestellten Bestrahlungsversuchen geht hervor, daß der Reinheitsgrad der Enzym-

lösung für die Wirkung ultravioletter Strahlung von ausschlaggebender Bedeutung ist. Während Hefeautolysate selbst nach zweistündiger Bestrahlung kaum geschädigt erscheinen, haben Präparate von hohem Reinheitsgrad schon nach 20—30 Minuten die Wirkung verloren.

Hinsichtlich der Abhängigkeit dieser Inaktivierung von der Zeit hat sich die Beziehung ergeben, daß die Inaktivierungskurve bei kurz gewählten Bestrahlungszeiten linear verläuft. Bei längerer Bestrahlung wird die beobachtete Inaktivierung pro Zeiteinheit immer kleiner. Man erhält einen einer monomolekularen Reaktion zugeordneten Kurvenverlauf.

Die Wasserstoffionenkonzentration der Enzymlösungen ist von geringem Einfluß auf den Inaktivierungsgrad. Saure und alkalische Lösungen werden durchschnittlich stärker inaktiviert als neutrale. Dieser Unterschied verwischt sich bei den reinsten Saccharasepräparaten.

Ozon inaktiviert Saccharaselösungen in kürzester Zeit. Doch kann die Schädigung durch ultraviolettes Licht nicht auf die Wirkung des bei der Bestrahlung entstehenden Ozons zurückgeführt werden. Unter völligem Luftabschluß in einer Stickstoffatmosphäre durchgeführte Versuche zeigen, daß dadurch die Zerstörung der Wirksamkeit nicht hintangehalten werden kann. Sie ist sogar bedeutend stärker als in Parallelproben, welche in reiner Sauerstoffatmosphäre bestrahlt wurden. Die Versuche unter Zufuhr von molekularem Sauerstoff führten nach 10 Minuten der Bestrahlung sogar zu einer Aktivierung der Saccharasepräparate. Diese Beobachtung wird mit der Annahme erklärt, daß der durch ultraviolettes Licht aktivierte Sauerstoff die wirkungshemmenden Begleitstoffe des Enzyms oxydiert und sie dadurch unschädlich macht.

Nach diesen Ergebnissen erfolgt die Inaktivierung durch die Aufnahme der Lichtenergie von der enzymatischen Substanz selbst oder über die sie notwendig begleitenden Stoffe. Es kann sich bei der Wirkung des Ozons höchstens um eine Nebenerscheinung handeln.