

# Die Nachinaktivierung bestrahlter Saccharaselösungen und der Einfluß zugesetzten Tryptophans und Hefegummis

Von

GEORG GORBACH und D. KIMOVEC

Aus dem Biochemischen Institut der Technischen Hochschule in Graz

Vorstand Prof. F. FUHRMANN

(Mit 3 Textfiguren)

(Vorgelegt in der Sitzung am 12. Mai 1932)

Im Verlauf früherer Untersuchungen konnte des öfteren beobachtet werden, daß bestrahlte Saccharaselösungen beim Stehen ihre restliche Wirkung verlieren. Im nachstehenden sind Versuchsergebnisse mitgeteilt, welche über den Verlauf dieser Nachinaktivierung in Abhängigkeit von der Bestrahlungszeit Aufschluß geben. Im Zusammenhange damit wurde auch der Einfluß studiert, den Tryptophan und Hefegummi auf die Inaktivierung beim Stehen ausüben. Diese beiden Substanzen sind selbst in den reinsten Hefesaccharasepräparaten in wechselnden Mengen zu finden<sup>1</sup>, wenn es auch in einzelnen Fällen<sup>2</sup> gelungen ist, eine von beiden abzutrennen. Es konnte gezeigt werden<sup>3</sup>, daß der Tryptophangehalt in den Präparaten bei der Reinigung ansteigt und bei der Dialyse mit dem Ansteigen und Abfallen der Wirksamkeit mitgeht. Dies legt die Vermutung nahe, daß Tryptophan und Hefegummi für die Wirkung nicht bedeutungslos sind, sondern nach modernen Vorstellungen<sup>4</sup> über das Wesen des Enzyms als Träger für die enzymatische Substanz wirken. Aus diesen Gründen war der Einfluß dieser beiden Körper auf die Nachinaktivierung von Interesse.

## Versuchsmethodik.

Hinsichtlich der Darstellung der Saccharasepräparate und

<sup>1</sup> H. EULER und K. JOSEPHSON, Ber. D. ch. G. 57, 1924, S. 859.

<sup>2</sup> R. WILLSTÄTTER, K. SCHNEIDER und E. BAMANN, Z. physiol. Chem. 142, 1925, S. 248; R. WILLSTÄTTER und K. SCHNEIDER, Z. physiol. Chem. 142, 1925, S. 257.

<sup>3</sup> G. GORBACH und K. LERCH, Biochem. Ztschr. 235, 1931, S. 259.

<sup>4</sup> A. FODOR, Das Fermentproblem. II. Aufl. Steinkopf 1929.

der Bestrahlung wurde die Versuchstechnik der früheren Mitteilungen<sup>5</sup> beibehalten. Die Wirksamkeit stellten wir refraktometrisch<sup>6</sup> unter den Bedingungen der Zeitwertsbestimmung nach O. SULLIVAN und THOMPSON<sup>7</sup> fest. Für 50 cm<sup>3</sup> 16%iger Rohrzuckerlösung wurden in jedem Falle 2·5 cm<sup>3</sup> Enzymlösung verwendet. Zur Vereinfachung der Meßmethode wurde nicht der Zeitwert, sondern die Änderung des Brechungsexponenten während der Rohrzuckerspaltung in 30 Minuten bestimmt. Die in den Tabellen angegebenen Zahlen stellen diese Änderung in Refraktometerteilstrichen (Sk. T.) vor. Das für die Versuche benötigte Tryptophan bezogen wir von der Firma Merck. Das Hefegummi wurde nach den Vorschriften von SALKOWSKI aus Bierhefe gewonnen. Von diesen Substanzen wurden 0·2%ige Lösungen hergestellt und davon 10 cm<sup>3</sup> der gleichen Menge bestrahlter Enzymlösung zugemischt, so daß die endgültige Konzentration des Tryptophans bzw. des Hefegummis in der Mischung 0·1% betrug. Als Kontrolllösung diente eine auf das Doppelte verdünnte bestrahlte Enzymlösung. Die Wirkung dieser drei Lösungen wurde sofort und nach 6, 24, 48 und 96 Stunden nach der Bestrahlung ermittelt.

### Versuchsergebnisse.

Für die Untersuchung der Nachaktivierung diente als Enzympräparat ein Tonerdeeluat, welches bei einem Trockenrückstand von 1·5 mg/cm<sup>3</sup> die Wirksamkeit von 0·36 Sk. T. in 30 Minuten aufwies. Es war aus einem mehrere Monate alten Hefeautolysat durch Essigsäurefällung, Dialyse, Adsorption an Tonerde C und nachfolgende Elution mit verdünntem Ammoniak erhalten worden. Seine Reaktion entsprach  $p_H = 9·6$ . Das Eluat wurde in Mengen von je 10 cm<sup>3</sup> während 5, 10, 20 und 40 Minuten mit der Quarzlampe bestrahlt und die Wirkung sofort nach der Bestrahlung und nach 6, 24, 48 und 96 Stunden bestimmt. Die auf diese Weise erhaltenen Versuchsergebnisse sind in der Tabelle 1 enthalten. Die prozentuelle Inaktivierung wurde unter Zugrundelegung der Wirksamkeit des unbestrahlten Eluates errechnet. Mit Hilfe dieser Werte ist in Fig. 1 der Inaktivierungsverlauf der verschieden lang bestrahlten Enzymlösungen graphisch dargestellt. Unmittelbar nach der Bestrahlung erhält man einen, monomolekularen Re-

<sup>5</sup> G. GORBACH, *Biochem. Ztschr.* 217, 1930, S. 440.

<sup>6</sup> G. GORBACH und K. LERCH, *Biochem. Ztschr.* 219, 1930, S. 122.

<sup>7</sup> O. C. SULLIVAN und F. W. THOMPSON, *Journ. Chem. Soc. London* 57, 1890, S. 834.

aktionen ähnlichen Kurvenverlauf, was mit früheren Beobachtungen<sup>8</sup> übereinstimmt. Die 40 Minuten dauernde Bestrahlung hatte einen Rückgang der Wirksamkeit auf 36% des ursprünglichen Wertes zur Folge.

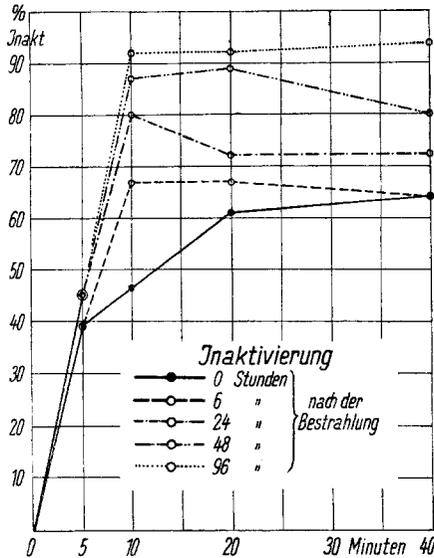


Fig. 1.

Tabelle 1.

Bestrah- lungszeit in Minuten	Wirksamkeit in Sk. T./30' nach:					Ber. Inaktivierung in % nach:				
	0h	6h	24h	48h	96h	0h	6h	24h	48h	96h
0	0·36	0·36	0·36	0·36	0·36	0	0	0	0	0
5	0·22	0·22	0·20	0·20	0·20	39	39	45	45	45
10	0·19	0·12	0·07	0·05	0·03	47	67	80	87	92
20	0·14	0·12	0·10	0·04	0·03	61	67	72	89	92
40	0·13	0·13	0·10	0·07	0·02	64	64	72	80	94

Für die Versuche unter Zusatz von Tryptophan und Hefegummi stand uns ebenfalls ein Ammoniakeluat aus Tonerde C mit einer Wirksamkeit von 0·37 Sk. T./30' und einem Trockenrückstand von 1 mg/cm<sup>3</sup> zur Verfügung. Die Wasserstoffionenkonzen-

<sup>8</sup> G. GORBACH und H. PICK, Monatsh. Chem. 61, 1932, bzw. Sitzb. Ak. Wiss. Wien (II b) 141, 1932.

tration des Eluates entsprach  $p_H = 9.6$ . Je  $30 \text{ cm}^3$  dieses Eluats wurden durch 30 und 60 Minuten bestrahlt und davon dann je  $10 \text{ cm}^3$  mit der gleichen Menge Wasser, Tryptophan und Hefegummilösung versetzt. Die nur mit Wasser verdünnte Enzymlösung diente als Kontrollösung. Die auf diese Weise erhaltenen Lösungen wurden unmittelbar nach der Bestrahlung und nach 6, 24, 48 und 96 Stunden auf ihre Wirksamkeit geprüft. Unter Verwendung des Ursprungswertes errechneten wir die prozentuelle Inaktivierung, wobei aber in diesem Falle die Wirkung des auf das Doppelte verdünnten Enzyms (0.30 Sk. T./30') als Rechnungsgrundlage diente. Die Versuchsergebnisse sind in Tabelle 2 zu-

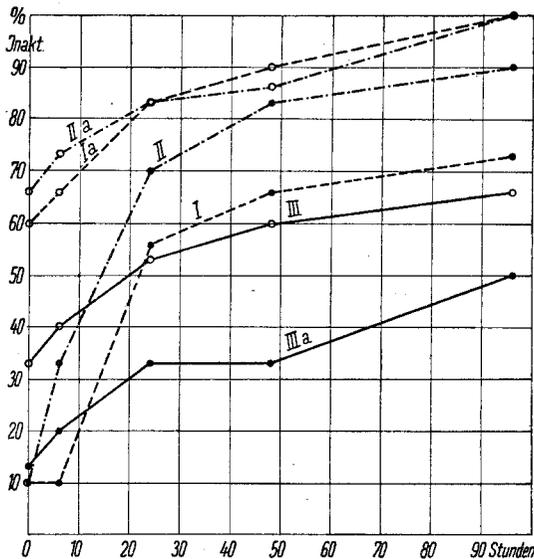


Fig. 2.

sammengefaßt. Fig. 2 gibt diese Resultate in graphischer Darstellung wieder, wobei die Kurven I und Ia den mit Tryptophan versetzten und 30 bzw. 60 Minuten bestrahlten Enzymgemischen, II und IIa den ebenso lange bestrahlten Hefegummiprobe und endlich III und IIIa den gleich behandelten zusatzfreien Enzymlösungen entsprechen.

Übereinstimmend mit den früheren Befunden nimmt die Wirkung beim Stehen nach der Bestrahlung langsam ab. Nach 96 Stunden hat die durch 30 Minuten bestrahlte Lösung 27%, die durch 60 Minuten bestrahlte 33% ihrer restlichen Wirkung verloren. Der Zusatz von Hefegummi und Tryptophan verstärkt diese

Tabelle 2.

	$p_H = 9.6$ 10 $cm^3$ bestr. Eluat + 10 $cm^3$	Wirksamkeit in Sk. T./30' nach					Ber. Inaktivierung in %				
		0h	6h	24h	48h	96h	0h	6h	24h	48h	96h
Bestrahlungszeit 30'	destilliertes Wasser..	0.26	0.24	0.20	0.20	0.15	13	20	33	33	50
	Hefegummilösung ...	0.27	0.20	0.09	0.05	0.03	10	33	70	83	90
	Tryptophanlösung ..	0.27	0.27	0.13	0.10	0.08	10	10	56	66	73
Bestrahlungszeit 60'	destilliertes Wasser..	0.20	0.18	0.14	0.12	0.10	33	40	53	60	66
	Hefegummilösung ...	0.10	0.08	0.05	0.04	0.00	66	73	83	86	100
	Tryptophanlösung ..	0.12	0.10	0.05	0.03	0.00	60	66	83	90	100

Nachwirkung des ultravioletten Lichtes. Der Einfluß des Hefegummis ist dabei größer als der des Tryptophans. Dieser Unterschied tritt besonders deutlich bei der durch 30 Minuten bestrahlten Lösung hervor. Nach 96 Stunden erscheint die zusatzfreie Enzymlösung um 50%, die Enzymlösung mit Tryptophan um 73% und jene mit Hefegummi um 90% geschädigt. Die durch 60 Minuten bestrahlte Lösung zeigt bedeutend geringere Unterschiede, denn nach 96 Stunden ist sowohl das mit Tryptophan als auch das mit Hefegummi versetzte Enzympräparat unwirksam geworden. Dafür setzt aber die alleinige Zugabe dieser Substanzen unmittelbar nach der Bestrahlung die Wirkung wesentlich herab. Die Einbuße an Wirksamkeit beträgt bei Tryptophan 27%, bei Hefegummi 33%. Diese Erscheinung wurde bei der durch 30 Minuten bestrahlten Enzymlösung nicht beobachtet.

Beim Versetzen der durch 60 Minuten belichteten schwach gelb gefärbten Enzymlösung mit Tryptophan verfärbte sie sich und wurde braun. Diese Braunfärbung erhält man auch bei der direkten Bestrahlung von reinen Tryptophanlösungen. Anfänglich führten wir diese Veränderung des Tryptophans auf die alkalische Reaktion des Eluats zurück und wiederholten deshalb die Versuchsreihe mit einem durch verdünnte Salzsäure neutralisierten Eluat. Die Resultate dieser Versuche sind in der Tabelle 3 nieder-

Tabelle 3.

	$p_H = 7.0$ 10 $cm^3$ bestr. Eluat + 10 $cm^3$	Wirksamkeit in Sk. T./30' nach					Ber. Inaktivierung in %				
		0h	6h	24h	48h	96h	0h	6h	24h	48h	96h
Bestrahlungszeit 30'	destilliertes Wasser..	0.25	0.24	0.19	0.17	0.10	16	20	36	43	66
	Hefegummilösung...	0.23	0.16	0.12	0.10	0.07	23	46	60	66	76
	Tryptophanlösung ..	0.23	0.19	0.15	0.10	0.09	23	36	50	66	70
Bestrahlungszeit 60'	destilliertes Wasser..	0.17	0.15	0.10	0.08	0.05	43	50	66	73	83
	Hefegummilösung...	0.12	0.12	0.05	0.02	0.00	60	60	83	93	100
	Tryptophanlösung ..	0.12	0.11	0.09	0.05	0.00	60	63	70	83	100

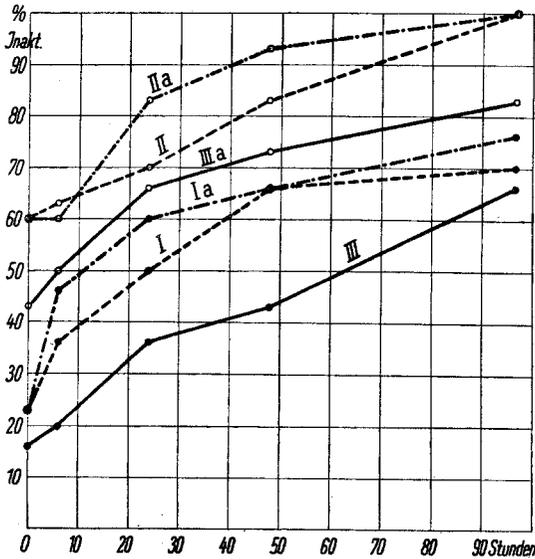


Fig. 3.

gelegt und in Fig. 3 graphisch ausgewertet. I und Ia entsprechen 30 bzw. 60 Minuten belichteten, mit Tryptophan versetzten Enzymlösungen, II und II a mit Hefegummi gemischten Proben und III und III a den ebenso bestrahlten Kontrollen.

In Übereinstimmung mit dem früheren Versuch wirkt auch beim neutralisierten Eluat Hefegummi stärker inaktivierend als Tryptophan. Trotz der Neutralisation tritt die Braunfärbung beim Zumischen der Tryptophanlösung auf, womit eine Inaktivierung der Enzymlösung einhergeht, gleichgültig, ob eine durch 30 oder 60 Minuten bestrahlte Enzymlösung Verwendung findet. Sie beträgt im ersteren Fall 7%, im letzteren 17%.

Aus beiden Versuchsreihen geht hervor, daß es unter diesen Versuchsbedingungen durch Zusatz von Tryptophan und Hefegummi nicht gelingt, eine Reaktivierung bestrahlter Saccharasepräparate zu erzielen oder die Nachinaktivierung hintanzuhalten. Es wird im Gegenteil eine Inaktivierung des Enzyms herbeigeführt. Die Veränderung der Farbe beim Zumischen des Tryptophans weist darauf hin, daß die bei der Bestrahlung entstandenen Zerfallsprodukte mit dem Tryptophan in Reaktion treten. Das veränderte Tryptophan ist nicht mehr geeignet, die vorhandenen Enzymkomplexe zu schützen, sondern führt, wie die Abnahme der Wirksamkeit zeigt, zu einer Zerstörung dieser. Nimmt man an, daß Tryptophan bzw. Tryptophanpeptid und Hefegummi die Träger der zymoaktiven Substanz sind, ohne welche sie nicht beständig sein soll, so hat man auch für die Instabilität der restlichen Wirkung nach der Bestrahlung eine Erklärung gefunden. Während der Bestrahlung werden wegen ihrer starken Absorption des ultravioletten Lichtes zuerst die Tryptophanenzymkomplexe und in weit geringerem Maße die Hefegummikomplexe zerstört. Nach der Bestrahlung treten die dabei entstandenen Zerfallsprodukte mit den noch wirksamen Enzymkomplexen in Reaktion und bewirken eine Inaktivierung. Der Zusatz von Tryptophan und Hefegummi, mit denen die Zerfallsprodukte der Bestrahlung ebenfalls reagieren, hat, wie nach dem Massenwirkungsgesetz einzusehen ist, eine Verstärkung dieses Effektes zur Folge.

#### Z u s a m m e n f a s s u n g .

Die Versuche über das Verhalten der Enzymlösungen nach erfolgter Bestrahlung und über den Einfluß von Tryptophan und Hefegummi haben zu folgenden Ergebnissen geführt:

1. Zehn Minuten und länger bestrahlte Saccharaselösungen von bestimmtem Reinheitsgrad verlieren beim Stehen nach der Bestrahlung ihre restliche Wirksamkeit, während kürzer bestrahlte Enzymlösungen sich als stabil erweisen.

2. Durch Zusatz von Tryptophan und Hefegummi kann unter

den gewählten Versuchsbedingungen keine Reaktivierung erzielt werden. Es wird im Gegenteil die Nachinaktivierung beim Stehen beschleunigt, wobei Hefegummi stärker als Tryptophan wirkt. Sowohl neutrale als auch alkalische Tonerdeeluate führen zu demselben Ergebnis.

3. Schon der Zusatz von Tryptophan und Hefegummi allein genügt, um eine teilweise Inaktivierung bestrahlter Enzymlösungen herbeizuführen.

---