

Über die Fermentpolymerisation. I*

Die Bildung von Dextran

Von

F. Patat

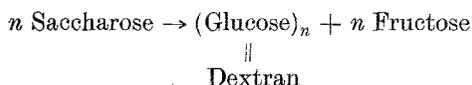
Aus dem Institut für Chemische Technologie der Technischen Hochschule
München

(Eingegangen am 10. Juli 1957)

Die experimentellen Ergebnisse fremder und eigener Versuche über die Bildung von Dextran werden zusammengestellt und durch ein Reaktionsschema, das widerspruchsfreier ist als die bisher vorgeschlagenen, gedeutet.

1. Der Reaktionstyp der Fermentpolymerisation

Die Bildung von Dextran aus Saccharose und Dextransucrase nach der Bruttoformel



qualifiziert sich in kinetischer Hinsicht als Polymerisation. An einem Startschritt, in dem durch das Enzym die Saccharose in einen Glucosylrest und Fructose gespalten wird, schließt sich das Wachstum zu hochpolymeren Polyglucosen an, deren Molekulargewichte wohl durch Zusätze beeinflusst werden können, die aber keine Zwischenstufen im Wachstumsprozeß erkennen lassen. In einer Hinsicht weicht diese Fermentpolymerisation jedoch in Analogie zu anderen Fermentreaktionen von den in den letzten 20 Jahren bevorzugt studierten Polymerisationen ab. Diese Polymerisationen sind dadurch charakterisiert, daß in einem Startschritt ein Radikal, Anion oder Kation, kurz, ein wachstumsfähiger Keim gebildet wird und dieser aktive Keim im Polymerisationsmilieu wächst,

* *Fritz Wessely* zum 60. Geburtstag in Freundschaft und Verbundenheit zugeeignet.

bis er vernichtet wird. Während des Polymerisationsablaufes existieren also eine große Zahl von aktiven wachsenden Polymeren, die unabhängig von ihrer Bildungsgeschichte sich durch ihre erhöhte Reaktionsfähigkeit von den Ausgangs- und Endprodukten unterscheiden. Wir wollen diesen Polymerisationstyp als „Keimtyp“ bezeichnen.

Bei Fermentpolymerisationen ist das Wachstum mit dem Enzym, das den Start injiziert, gekoppelt. Das Polymerisationsgeschehen spielt sich am Enzym so ab, daß ein neues „Monomeres“ an die am Enzym haftende, bereits gebildete Polymerkette geknüpft wird. Was im Polymerisationsmilieu auftritt, sind nur fertig gebildete inaktive Polymere. Aus dem Enzymkomplex werden die fertigen Polymeren wie aus der Spritzdüse herausbefördert oder geprägt; wir wollen daher diesen Polymerisationstyp als „Prägungstyp“ bezeichnen.

Er gewinnt seit kurzem über den Spezialfall der Fermentpolymerisation hinaus dadurch Bedeutung, daß die neuen von *Ziegler* und *Natta* gefundenen Polymerisationskatalysatoren offensichtlich auch nach diesem Typ arbeiten und wohl auch eine Reihe der früher als Anionpolymerisation klassifizierten Polymerisationen hierher gehören.

2. Experimentelle Ergebnisse der Dextransynthese

Die aufschlußreichsten Befunde über die Dextranbildung mit Dextran-sucrase aus *Leuconostoc mesenteroides*, NRRL, B 512, verdanken wir Bemühungen amerikanischer Forscher, das Molekulargewicht von nativem Dextran durch Zusätze zu beeinflussen, speziell soweit zu erniedrigen, daß es unmittelbar als „klinisches Dextran“ verwendet werden kann. Die dabei ermittelten Ergebnisse, die von 12 Forschern in einer gemeinsamen Arbeit¹ abgeglichen wurden und die wir bestätigen und in quantitativer Hinsicht erweitern konnten, sind folgende:

1. Aus der Herstellung von Dextran-sucrase ergeben sich keine Hinweise auf das Vorliegen mehrerer Fermente. Alle diesbezüglichen Versuche deuten auf nur ein Ferment hin. Diesen Befund konnten wir nicht nur unmittelbar bestätigen, sondern auch mittelbar durch die Verfolgung der Dextranbildung bei Zerfallstemperaturen, siehe weiter unten.

2. Das native Dextran aus Normalansätzen (bis 10% Saccharose, 50 Enzym DSU pro ml, Temperaturen bis 30°, pH = 5) zeigt relativ große Einheitlichkeit und hohes Molekulargewicht unabhängig vom Umsatz.

3. Demgegenüber zeigt Dextran, das unter Zusatz niedrigmolekularer Anteile, sogenannter „primer“ gebildet wird, eine breite, niedrige, von

¹ H. M. Tsuchiya, N. N. Hellman, H. J. Koepsell, J. Corman, C. S. Stringer, S. P. Rogovin, M. O. Bogard, G. Bryant, V. H. Feger, C. A. Hoffman, F. R. Senti und R. W. Jackson, J. Amer. Chem. Soc. 77, 2412 (1955).

der Primer-Konzentration abhängige Dextranskomponente, neben der hohen nach 2.

4. Werden einfache Zucker als Primer zugesetzt, so entstehen praktisch nur Oligosaccharide, zum Teil erstmalig beschriebene, zum Teil noch unbekannte. Die Bildungsgeschwindigkeit nimmt dabei nach der Art der zugesetzten Zucker in der Reihe Isomaltose, Maltose, α -Methylglucosid, Glucose, Fructose, Galactose stark ab. Sehr viele Zucker (über 20 untersuchte) zeigen keinen Effekt.

5. Die Steigerung der Saccharose über 10% hinaus bis 70% ergibt steigende Mengen von niedrigmolekularem Dextran und Oligosacchariden.

6. In allen Fällen tritt neben Dextran freie Glucose auf, die normalerweise nur 1% beträgt, in Extremfällen aber auch ein Vielfaches (10% und mehr) ausmachen kann.

7. Der Einfluß der Temperatur und der Enzymkonzentration auf die Molekulargewichtsverteilung zeigt bei hohen Temperaturen (30° C) ein deutliches Anwachsen der niedrigmolekularen Komponente bei hohem Enzymgehalt, aber keine Depolymerisationswirkung, wenn nach Beendigung der Synthese frisches Dextran zugesetzt wird. Bei niedriger Temperatur hat die Menge der Dextransucrase praktisch keinen Einfluß auf die Molekulargewichtsverteilung, auch wenn sie zwischen 1,25 und 160 DSU. Fermenteinheiten pro ml Reaktionslösung variiert wird. Der hochmolekulare Anteil wird aber bei 15° gegenüber dem niedrigmolekularen kleiner gefunden.

Zur Beweiskraft dieser experimentellen Befunde ist freilich zu bemerken, daß die Aussagen über die Molekulargewichtsverteilung keineswegs quantitativer Natur sind, da ihre Ermittlung auf Grund von Fällkurven mit Methylalkohol erfolgte und in keinem Fall eine eindeutige Molekulargewichtsbestimmung durchgeführt wurde².

8. Da wir aus Absorptions- und Lichtstreuungsmessungen zeigen konnten³, daß bei niedrigen Temperaturen entsprechende Dextrane bei gleichem Molekulargewicht einen 50- bis 100fachen zweiten Virialkoeffizienten aufweisen, also wesentlich gestreckter gebaut sind als die Hochtemperaturdextrane und ein besseres Lösungsvermögen aufweisen, sind speziell Aussagen über Unterschiede in der Molekulargewichtsverteilung bei verschiedenen Temperaturen, wie in 7 beschrieben, kaum stichhaltig zu diskutieren.

9. Bei Verfolgung der Dextransynthese bei Temperaturen über 30° C ergeben Zusätze von verdünnten Dextranlösungen zu den Synthesegemischen eine deutliche Umsatzsteigerung. Die thermische Beständigkeit der Dextransucrase ist abhängig von der Menge des vorhandenen

² Über eine Zusammenfassung quantitativer Messungen „Zur Struktur der Dextrane“ siehe *H. P. Frank* und *H. Mark*, Mh. Chem. 85, 307 (1954).

³ Versuche mit *H. Frömbling*.

Dextrans und kann durch entsprechende Zusätze erheblich gesteigert werden⁴.

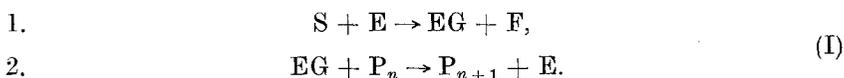
10. Die Umsatzsteigerung bei Zusatz von Dextran zu Synthesegemischen ist abhängig von der Menge des zugesetzten Dextrans in einer Art, die auf ein Gleichgewicht zwischen gebildetem Dextran und Dextran-Enzym-Komplex hindeutet. Dabei zeigen Dextrane verschiedenen Molekulargewichtes die gleiche Wirkung, wenn sie etwa in gleichen Gewichts- und nicht Molkonzentrationen zugesetzt werden. Die Wirkung ist verschieden groß je nach der Bildungstemperatur des zugesetzten Dextrans sowie seiner weiteren Verarbeitung und Aufbewahrung (Alterungseffekte)⁴.

11. Ebenso zeigte die kinetische Analyse, daß die Dextranbildung bei niedrigen Saccharosekonzentrationen im gesamten Temperaturgebiet, in dem die Dextransucrase stabil ist, nach *Michaelis* und *Menten* beschrieben werden kann, woraus auf ein Gleichgewicht zwischen dem Enzym und der Saccharose einerseits und einem Enzym-Saccharose-Komplex andererseits geschlossen werden muß⁵.

3. Diskussion des Reaktionsablaufes

Der Reaktionsablauf der Dextranbildung wurde zunächst analog den anderen Fermentkatalysen gedeutet, bei denen durch Übertragung von Monosacchariden Oligosaccharide entstehen^{6, 7, 8}.

Die Saccharose S reagiert danach mit dem Enzym Dextransucrase E unter Abspaltung von Fructose F zu einem Glucosyl-Enzymkomplex EG. Mit diesem reagiert ein polymerer Zucker P und bildet unter Addition des Glucosylrestes das Enzym zurück.



In der oben erwähnten zusammenfassenden Arbeit von *Tsuchiya* und anderen¹ wird bereits darauf hingewiesen, daß speziell die Befunde 2 und 7 mit diesem Reaktionsschema nicht in Einklang zu bringen sind. Die Reaktion nach 2 müßte in allen Fällen eine vom Umsatz abhängige Molekulargewichtsverteilung ergeben, da ja sämtliche Polymerisationsstufen durchlaufen werden und in steigendem Maße Fructose gebildet wird, die durch Bildung von Oligosacchariden das mittlere Molekulargewicht drücken sollte. Auch ein Einfluß der Enzymkonzentrationen auf die Molekulargewichtsverteilung bleibt nach Schema (I) unerklärbar.

⁴ Versuche mit *H. Ringelmann*.

⁵ Versuche mit *H. Meyer*.

⁶ *E. H. Fischer, L. Kohles* und *J. Fetting*, *Helv. Chim. Acta* **34**, 1132 (1951).

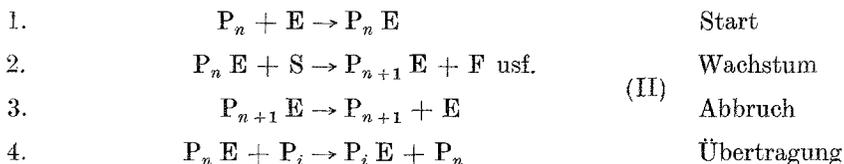
⁷ *K. Wallenfels*, 4. Colloquium Moosbach, Springer-Verlag, 1953.

⁸ Als Übersicht siehe *J. Edelmann*, *Adv. Enzymol.* **17**, 221 (1956).

Die größte Schwierigkeit scheint uns aber in der Deutung der hohen Molekulargewichte zu liegen, wonach eine steigende Affinität des Akzeptormoleküls mit steigendem Molekulargewicht anzunehmen wäre, um die hohen Molekulargewichte bis 10^9 zu erklären. Präziser gesagt: die Beantwortung der Frage, auf Grund welcher Eigenschaften das Enzym erkennen soll, ob es seinen Glucosylrest an ein 100gliedriges oder 10^6 gliedriges Glucosepolymeres knüpft. Nach unserem derzeitigen Wissen über das Wachstum von Polymerisationsketten kann die Reaktionsgeschwindigkeit des Verknüpfungsschrittes nach wenigen Gliedern praktisch kaum mehr verschieden sein.

Tsuchiya und andere schlagen daher einen der üblichen Polymerisation analogen Kettenmechanismus vor, bei dem aber das „synthetisierende“ Enzym in Verbindung mit dem Polysaccharid bleibt¹ und „das Dextran als wesentlicher Bestandteil der wirksamen Dextranucrase“ erscheint⁹ in Übereinstimmung mit früheren allgemeinen Vorschlägen von *Stacey*¹⁰ und *Hehre*⁹.

In einem Primärschritt bildet sich dabei ein Enzymakzeptorkomplex, das Wachstum erfolgt durch dessen Reaktion mit Saccharose, wobei ein Glucosylrest auf die Akzeptorkette übertragen wird. Der Abbruch erfolgt durch Dissoziation des Enzyms von der Akzeptorkette. Die Kettenübertragung soll so zustande kommen, daß das Enzym von einer Akzeptorkette zu einer anderen überwechselt. Mit der gleichen Bedeutung der Buchstaben wie oben ergibt sich auf diese Weise die Reaktionsfolge (II).



Mit diesem Mechanismus lassen sich die Befunde 1 bis 6 von *Tsuchiya* und anderen besser deuten als mit der Reaktionsfolge (I). Das Schema (II) erfordert aber auch die Zusatzannahme, daß die Übertragungsreaktion um so seltener geschieht, je größer das Molekulargewicht des Akzeptormoleküls ist, bzw. je länger der Akzeptor im Enzymkomplex bereits gewachsen ist. Das Enzym muß also eine „Affinitätswitterung“ besitzen, eine Annahme, die für einen Enzymakzeptorkomplex zwar nicht so schwer erklärbar wäre, wie die nötige Selektivität von Akzeptorpolymeren mit steigendem Molekulargewicht für die Reaktionsfolge (I), aber doch recht problematisch wird, wenn man den von uns ermittelten Befund 8 bedenkt. Aus ihm geht hervor, daß der Verknüpfungsschritt der Glucosylreste mit

⁹ *E. J. Hehre*, Adv. Enzymol. **11**, 297 (1951).

¹⁰ *M. Stacey*, Chem. and Ind. **62**, 110 (1943).

schon gebildeten polymeren Zuckern offensichtlich nicht besonders selektiv geschieht, wie die Formänderung des Moleküls mit sinkender Temperatur zeigt, oder — anders ausgedrückt — wie der andere Verzweigungsgrad zeigt, den die Glucosen bei niedrigerer Temperatur aufweisen.

Ferner kann der Befund 7 nur zum Teil und mit einer weiteren Zusatzannahme verstanden werden. Der größere Teil Niedrigpolymerer bei 15° C gegenüber 30° weist auf höhere Wirkung zugesetzter Primer-Moleküle hin, die nur so zustande kommen kann, daß das Verhältnis Übertragungs- zu Wachstumsgeschwindigkeit bei niedriger Temperatur zugunsten der Übertragung verschoben wird. Die Wachstumsgeschwindigkeit müßte also rascher mit der Temperatur abnehmen als die Übertragungsgeschwindigkeit und somit das intramolekulare Wachstum eine höhere Aktivierungshemmung aufweisen als die intermolekulare Übertragung. Die verschiedene Wirkung der Enzymkonzentration auf die Molekulargewichtsanteile bei 30° bleibt unklar. Ebenso lassen sich die von uns erhobenen Befunde 10 und 11, die auf Gleichgewichte sowohl zwischen Saccharose als auch den gebildeten und abgewandelten Polyzuckern (primer) mit dem aktiven Enzymkomplex hinweisen, nur durch weitere Zusatzannahmen deuten.

Auch schon *Tsuchiya* und andere sehen die Reaktionsschemen nur als vorläufig an und *Edelmann*⁸ betont in seiner zusammenfassenden Arbeit, daß ohne weiteres Versuchsmaterial kaum zwischen den Reaktionsfolgen (I) und (II) entschieden werden bzw. darüber Zuverlässiges ausgesagt werden kann, wie weit diese Folgen im Fall der Dextranpolymerisation modifiziert werden müssen.

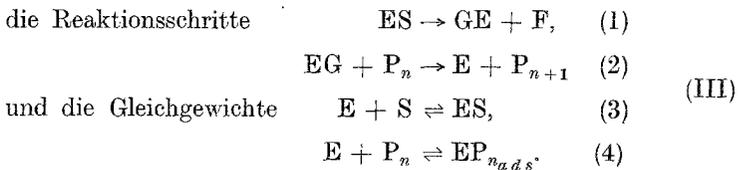
Wie unter 11 ausgeführt, zeigt die Bruttoreaktion der Dextranbildung bei kleinen Saccharosekonzentrationen den für Fermentreaktionen üblichen Verlauf nach *Michaelis* und *Menten* und ist damit durch die Reaktionsfolgen des Schemas 2 nicht ohne einschneidende Zusatzannahmen zu deuten. Uns soll vorerst nur die niedrige Gesamtordnung der Dextranbildung interessieren, die auch von kinetischer Seite her darauf hinweist, daß die Fructoseabspaltung und Dextranbildung kaum in einem Reaktionsschritt geschehen, sondern voneinander unabhängig verlaufen dürfte. Dafür sprechen auch die vielen gefundenen Möglichkeiten der Beeinflussung des Reaktionsablaufes und der Gestalt und Größe des gebildeten Dextrans, die im vorhergehenden Abschnitt aufgeführt sind. Speziell die unter 9 bis 11 beschriebenen Befunde sowie die mit Primer-Zusätzen weisen darüber hinaus auf Gleichgewichte zwischen Saccharose und dem reaktionsfähigen Fermentkomplex einerseits sowie zwischen diesem und verschiedenen als Akzeptor wirkenden Zusätzen andererseits hin. Diese beiden Gruppen von Gleichgewichten unterscheiden sich dadurch, daß das Saccharosegleichgewicht einer eindeutigen Reaktion vorgelagert ist, während die vielfache Variation des Reaktionsgeschehens durch Zu-

gabe von Akzeptoren kaum allein durch die Empfindlichkeit der Verknüpfungsreaktion gegenüber diesen Akzeptoren erklärt werden kann. Führt doch die Verknüpfungsreaktion schon unter einfachen Normalbedingungen je nach der Temperatur zu verschiedenartigen Endprodukten (Befund 8 des vorigen Kapitels).

Entsprechenderweise werden wir also für die Spaltungsreaktion der Saccharose den Schritt I von Schema (I) ansetzen. Der Abreaktion des gebildeten Glucosylfermentkomplexes muß aber irgendein Reaktionsschritt vorgelagert sein, in dem dieser Komplex mit den gebildeten bzw. zugesetzten Zuckern oder Primern in Austausch treten kann. Wir sehen diese Austauschmöglichkeit in einem Adsorptionsgleichgewicht am aktiven Fermentkomplex, wobei keine chemische Bindung des Dextrans bzw. der Zusätze mit dem Ferment notwendig ist. Dextran und Zusätze reagieren nicht unmittelbar mit dem Enzymglucosylkomplex, sondern werden zunächst adsorbiert, wobei die höheren Polymeren die niedrigmolekularen Anteile verdrängen werden. Je größer das Zuckerpolymer also ist, um so besser wird es adsorbiert und um so größer ist seine Chance, zu wachsen. Die wachsende Kette braucht dabei nicht am Ferment eingespannt zu bleiben, wie nach Schema (II), sie kann nach jedem Wachstumsschritt abgebrochen werden, hat aber, je größer sie ist, dadurch, daß sie adsorbiert bleibt, die um so bessere weitere Wachstumschance.

Zu den beiden Reaktionsschritten, dem spezifischen der Saccharose-spaltung und dem unspezifischen des Polyzuckeraufbaues, des Schemas (I), haben wir somit im einfachsten Fall zwei Gleichgewichtsbedingungen, eines zwischen Saccharose und Enzym, und ein Adsorptionsgleichgewicht der vorhandenen Zucker mit dem Enzym, in Betracht zu ziehen.

Schematisch ausgedrückt erhalten wir



Will man der gefundenen stabilisierenden Wirkung von Dextran auf die Enzymaktivität noch explizit Rechnung tragen, so müßte der adsorbierte Polyzucker mit dem Enzym reagieren, bevor der Glucosylrest angeknüpft werden kann, schematisch nach



Dieses bei jedem Schritt alternierende Wachstum weist auch auf eine recht einfache Möglichkeit der vorliegenden Fermentkatalyse hin. In der Spaltungsreaktion wird vom Katalysator ein Wasserstoffatom — wahrscheinlich als Ion — an die Fructose abgegeben und diese abgespalten.

Im Wachstumsschritt gibt der Zucker, an den das Glucosyl geknüpft wird, das Wasserstoffatom an das Ferment unter seiner Freisetzung zurück. Das diskutierte Adsorptionsgleichgewicht sorgt dafür, daß der für die Wachstumsreaktion nötige Polyzucker entsprechend seiner Adsorptionsfähigkeit zur Verfügung steht. Diskutiert man einen definierten Enzympolymerkomplex nach Reaktion (5), so kann selbstverständlich dieser Reaktionsschritt analog Schema (II) auch die Reaktionsfolge einleiten.

Mit diesem vorgeschlagenen Schema lassen sich sämtliche bis jetzt an der Dextranpolymerisation erhobenen Befunde ohne weitere Zusatzannahme zwanglos deuten. Man versteht das uniforme Wachstum zu hohem Molekulargewicht in den Fällen, in denen keine größeren Mengen (Konzentration!) von Primern zugesetzt sind, durch die stetig wachsende Adsorbierbarkeit der Zuckerpolymeren mit steigendem Molekulargewicht und dadurch bedingte größere Reaktionsschance. Auch die von uns ermittelten Gleichgewichtsbefunde ergeben sich aus dem der Saccharosepaltung vorgelagerten Gleichgewicht mit Saccharose und dem Adsorptionsgleichgewicht. Der von *Tsuchiya* und anderen gefundene Unterschied in der Enzymwirkung bei 15 bis 30° folgt aus dem Temperatureinfluß auf das Adsorptionsgleichgewicht, wonach sich die Unterschiede verlieren, je tiefer die Temperatur wird. Es soll aber nochmals darauf hingewiesen werden, daß die genaue Diskussion dieser Befunde erst nach Vorliegen stichhaltiger Molekulargewichtsverteilungen möglich ist.

Abschließend soll noch darauf hingewiesen werden, daß die Reaktionsfähigkeit des Glucosylenzymkomplexes selbstverständlich verschieden sein wird, je nachdem der zu knüpfende Zucker die sterischen Voraussetzungen für die Verknüpfung mit dem Glucosylrest am Enzymkomplex besitzt. So wird die gefundene gute Wirkung einiger niedriger Zucker, wie Isomaltose, und das Ausbleiben der Reaktion mit anderen verständlich. Diese Reaktionsdifferenzierung und eine mögliche Blockade der Adsorptionszentren sind für die Umsatzmöglichkeiten des Enzymkomplexes in jedem Fall in Betracht zu ziehen. Das von uns gefundene Absinken der Reaktionsgeschwindigkeit bei Zusatz verschieden gealterter Dextrane ist beispielsweise auf beide Effekte zurückzuführen: einmal auf die Verdrängung wachstumsfähiger Zucker vom Enzymkomplex, zum anderen auf dessen geschwächerte Additionsfähigkeit. Das Auftreten von erhöhten Mengen Glucose bzw. niedrigen Oligosacchariden in allen Fällen der gehemmten Dextranbildung zeigt, daß das immer in großem Überschuß vorhandene Wasser (Konzentration!) oder ein anderer in relativ hoher Konzentration vorliegender Akzeptor, z. B. Zucker, als Reaktionspartner mit dem Enzymkomplex einspringen kann.

Das vorgeschlagene Schema (III) gestattet auch, die bisher ermittelten kinetischen Messungen zu deuten. Es erklärt, wie schon erwähnt, die

niedrige Gesamtordnung, das Ansteigen der Bruttogeschwindigkeit bei kleinen Saccharosekonzentrationen und den Abfall der Bruttogeschwindigkeit mit steigender Saccharosekonzentration, indem diese die Dextranbildung zurückdrängt. Der Versuch, die bis jetzt ermittelten Ergebnisse quantitativ durchzurechnen, soll einer weiteren Veröffentlichung vorbehalten bleiben¹¹.

¹¹ Über die Fermentpolymerisation II. Kinetik der Dextranbildung. *F. Patat* und *H. Meyer*, *Z. Biochem.*, im Druck.