

stellung der *Oxalessigsäure* beim Citratabbau durch Bakterien enthält diese kaum  $\frac{1}{2}$  Seite umfassende Mitteilung indes kein Wort. In der soeben erschienenen ausführlichen Veröffentlichung finden sich sehr sorgfältig ausgeführte und gut stimmende Bilanzen unter Berücksichtigung aller Nebenprodukte (die jedoch keineswegs für den *Citronensäure*-abbau durch *Aerogenes* charakteristisch sind, sondern sich — in teilweise erheblich größerer Menge — auch beim *Glucose*-abbau finden). Ferner wird der Einfluß der „Gewöhnung“ an einem Beispiel erläutert sowie eine Zusammenstellung der durch den Organismus vergärbaren und nichtvergärbaren Substrate gegeben; unter den ersteren findet sich keines, das nicht schon von Wieland und seiner Schule am Hefe-*Aerogenes* präparativ untersucht worden wäre, unter den letzteren merkwürdigerweise die Aconitsäure, wohl sicher wegen Verwendung des ungeeigneten *trans*-Isomeren, dessen Reaktionsträgheit schon vom tierischen Citratabbau her bekannt ist. Trotz interessanter Einzelheiten, welche die Arbeit der amerikanischen Autoren enthält, muß hier doch nochmals daran festgehalten werden, daß ihr Hauptergebnis, das mit dem unsrigen identische Abbauschema der Citronensäure, schon vor Jahresfrist von Deffner an einem — wie die Autoren richtig vermuten — mit ihrem *Aerobacter indologenes* nahe verwandten Mikroorganismus gewonnen und publiziert worden ist.

---

## Zur Kenntnis der sog. Glucose-oxydase. II;

von *Wilhelm Franke* und *Michael Deffner*.

Mit 2 Figuren im Text.

(Eingelaufen am 22. August 1939.)

---

Vor rund 2 Jahren haben Franke und Lorenz<sup>1)</sup> die Glucose-oxydase der Schimmelpilze, deren Entdeckung und erste Beschreibung man D. Müller<sup>2)</sup> verdankt, einer eingehenden Untersuchung unterzogen. Das wesentlichste Ergebnis der Arbeit war gewesen, daß dieses Oxydationsenzym zwar nicht — wie Müller angenommen hatte — *ausschließlich*, aber doch sehr *bevorzugt* mit *Sauerstoff* reagiert, insofern als daneben nur chinoide Verbindungen hohen Redoxpotentials (wie Chinon und Indophenole) als H-Acceptoren zu fungieren

---

<sup>1)</sup> I. Mitt. A. 532, 1 (1937).

<sup>2)</sup> Bio. Z. 199, 136 (1928); 205, 111 (1929); 213, 211 (1929); 232, 423 (1931); Erg. Enzymforsch. 5, 259 (1936).

vermochten; ferner, daß sich bei der Reaktion mit  $O_2$  der — von Müller vergeblich versuchte — Nachweis von *Hydroperoxyd* bei geeigneter Vergiftung der in den Enzympräparaten stets vorhandenen Katalase mit u. U. *quantitativer*  $H_2O_2$ -Ausbeute führen läßt. Aus diesen Gründen, zu denen noch die Unempfindlichkeit des Ferments gegen Schwermetallkomplexbildner (wie HCN,  $H_2S$ ,  $NaN_3$ , CO), die recht strenge Substratspezifität und einige weitere, minder bedeutende Argumente kamen, rechneten wir die Glucose-„oxydase“ — im Gegensatz zu der schon in der Benennung zum Ausdruck kommenden Auffassung D. Müllers — zu den *Dehydrasen*, und zwar zur Untergruppe der *Aero-dehydrasen* oder — nach Oppenheimer<sup>1)</sup> — *Oxhydrasen*.

Die Zahl dieser besonders acceptorspezifischen „*Pseudo-oxydasen*“ — denen weiterhin noch die Unabhängigkeit ihrer Wirkung von der Gegenwart eines *dialysierbaren* „Cofermments“ gemeinsam ist — befindet sich in stetem Zunehmen; sie umfaßt heute die *oxytropen Dehydrasen*<sup>2)</sup> der Glucose, der Oxalsäure, Ascorbinsäure, Dioxymaleinsäure, der d-Aminosäuren, der Monoamine (Tyraminase), der Diamine (Histaminase) sowie der Harnsäure (Uricase)<sup>3)</sup>.

<sup>1)</sup> Die Fermente u. ihre Wirkungen, Suppl. S. 1164 (Den Haag 1937).

<sup>2)</sup> Zusammenfassung von W. Franke bei Bamann-Myrbäck, D. Methoden d. Fermentforsch., im Druck (Leipzig 1940).

<sup>3)</sup> In einigen Fällen (Ascorbino-, Dioxymaleino-, Diamino-oxydase, Uricase) scheint das oben angeführte Kriterium der *HCN-Unempfindlichkeit* nicht oder nur bedingt zu gelten. Wie schon Franke u. Lorenz in der 1. Mitteilung abschließend betont haben, liegen die Verhältnisse hier im einzelnen wenig übersichtlich. Bei der *Histaminase* ist es nach Zeller [Helv. 21, 880, 1645 (1938)] zum mindesten zweifelhaft, ob HCN an einem aktiven Schwermetallatom angreift. Wir halten es aber für durchaus denkbar, daß die Gruppe der Oxhydrasen in *schwermetallhaltige* und *schwermetallfreie* zu unterteilen ist. Manches spricht dafür, daß an der Wirkung der Ascorbinsäure-oxydase *Kupfer* [C. G. King u. Mitarb., J. biol. Chem. 119, 511 (1937); 128, 455 (1939); N. Ito, Bull. agric. chem. Soc. Jap. 14, 9 (1938); E. Silverblatt u. King, Enzymol. 2, 222 (1938)], an derjenigen der Dioxymaleinsäure-oxydase *Mangan* [H. Theorell u. Swedin, Naturwiss. 27, 95 (1939)] und an der Uricase-wirkung — nicht häminartig gebundenes — *Eisen* [J. N. Davidson, Biochem. J. 32, 1386 (1938)] beteiligt ist. [Vgl. jedoch zum letztgenannten Punkte C. G. Holmberg, Nature 143, 604 (1939)].

Als wesentlichsten, richtungweisenden Fortschritt, der in der Erforschung dieser Enzymgruppe in den letzten Jahren erzielt worden ist, betrachten wir die Warburg und Christian<sup>1)</sup> sowie Negelein und Brömel<sup>2)</sup> (1938/39) geglückte „Konstitutions“aufklärung der *d-Aminosäure-oxydase*. Sie fanden, daß sich in diesem Ferment an einen Eiweißkörper ein *Alloxazin-adenin-dinucleotid* als prosthetische Gruppe bindet, deren reversibel oxydier- und reduzierbarer *Flavin*anteil die Oxhydrase in die Klasse der „gelben Fermente“<sup>3)</sup> einreicht. Bald darauf hat E. G. Ball<sup>4)</sup> im Warburgschen Institut auch das altbekannte Schardinger-Enzym (bzw. die *Xanthin-dehydrase*) der Milch — von den vorerwähnten Oxhydrasen (im engeren Sinne) lediglich durch seine zu O<sub>2</sub> wie zu anderen Acceptoren ziemlich *gleichmäßig* entwickelte Affinität unterschieden — als „gelbes Ferment“ mit einer dem erwähnten Dinucleotid ähnlichen, vielleicht zu einem Teil sogar damit identischen Wirkgruppe erkannt. Da auch in der Gruppe der Oxhydrasen offenbar alle Übergänge von fehlender über angedeutete [*Aminosäure*-<sup>5)</sup> und *Monoamin-oxhydrase*<sup>6)</sup>] zu ausgesprochener Fähigkeit zur anaeroben Acceptorhydrierung (*Glucose-oxydase*, vgl. auch später S. 141 f.) bestehen, gewinnt der Grenzfall des Schardinger-Enzyms in diesem Zusammenhang gleichfalls erhebliches Gewicht. (Über weitere, in allerletzter Zeit als „*Alloxazinproteide*“ erkannte Oxydationsfermente — die „*Diaphorasen*“ = *Dehydrasen* der *Dihydro-codehydrasen* — vgl. Tab. 18, S. 149.)

In der Untersuchung von Franke und Lorenz waren fast durchweg *Enzym-Rohpräparate* zur Verwendung gekommen, die durch Alkohol-Atherfällung von Pilzpreßsäften

<sup>1)</sup> Bio. Z. **298**, 150 (1938).

<sup>2)</sup> Bio. Z. **300**, 225 (1939).

<sup>3)</sup> Grundsätzliche Bemerkungen hierzu bei O. Warburg u. Christian, Bio. Z. **298**, 368 (1938).

<sup>4)</sup> J. biol. Chem. **128**, 51 (1939).

<sup>5)</sup> H. A. Krebs, Biochem. J. **29**, 1620 (1935); F. u. M. L. C. Bernheim, J. biol. Chem. **109**, 131 (1935); **111**, 217 (1935).

<sup>6)</sup> F. J. Philpot, Biochem. J. **31**, 856 (1937).

— dargestellt nach dem Verfahren von Buchner — gewonnen worden waren. Bisweilen war durch Wiederauflösen der Niederschläge, Dialyse und erneute Fällung eine oberflächliche Reinigung durchgeführt worden. Die *Atmungsgröße*  $Q_0$ , (=  $\text{mm O}_2/\text{mg Enzym} \times \text{Stunden}$ ) unserer reinsten Präparate lag unter den — nichtoptimalen — Bedingungen des Testversuchs in der Nähe von 50, unter optimalen Bedingungen war sie  $2\frac{1}{2}$ —3-mal größer. Die *Anreicherung*, bezogen auf die Aktivität des Pilzmycels, war etwa 4—10-fach. Da die Enzympräparate sich sowohl im gelösten wie insbesondere im festen Zustand als sehr gut haltbar erwiesen, erschien der Versuch einer weiteren Reinigung lohnend und war schon in der 1. Mitteilung in Aussicht gestellt worden.

Drei Möglichkeiten hinsichtlich der Natur der *aktiven Gruppe* in der Glucose-oxydase — vielleicht auch in anderen Aero-dehydrasen — zogen wir zu Beginn der vorliegenden Untersuchung als Arbeitshypothesen in Erwägung: 1. Die Glucose-oxydase mochte ein *aktives Schwermetall-atom*, etwa *Kupfer* oder *Mangan* enthalten; 2. sie konnte ein fest gebundenes *Redoxsystem von Farbstoffcharakter* besitzen; 3. sie mochte ein *farbloses Überträgersystem* fest, d. h. nicht abdialysierbar gebunden enthalten, z. B. ein Pyridin-nucleotid (eine „Codehydrase“).

Für die Möglichkeit 1 sprachen ältere Versuche von H. A. Krebs<sup>1)</sup>, der die Autoxydation von Glucose (und anderen Zuckern) in schwach alkalischer Lösung durch geringe Schwermetallzusätze — und zwar durch Cu und Mn viel stärker als durch Fe — katalytisch beschleunigen konnte. Für diese Autoxydation, bei der nach den Angaben von Krebs auffallend *wenig CO<sub>2</sub>* und nach eigenen orientierenden Versuchen eine *Säure* entsteht, ist offenbar die freie Carbonylgruppe notwendig, da zwar Robison-, nicht aber Harden-Young-Ester sich als autoxydabel erweisen<sup>2)</sup>. Für *Kupfer* im besonderen sprach das ungewöhnlich hohe katalytische Vermögen dieses Metalls bei der *Ascorbinsäure-oxydation* — auch in Proteinbindung (vgl. Lit. in Fußnote 3, S. 118) —, woraus bisweilen — wohl zu Unrecht<sup>3)</sup> — auf die Nichtexistenz einer *spezifischen* Ascorbino-oxhydrase geschlossen wurde; ferner war die Tatsache bemerkenswert, daß sich bei der Autoxydation von Cu<sup>1</sup>, im Gegensatz

<sup>1)</sup> Bio. Z. **180**, 377 (1927).

<sup>2)</sup> O. Meyerhof u. Lohmann, Bio. Z. **185**, 113 (1927).

<sup>3)</sup> F. B. Straub, H. **254**, 205 (1938).

zu  $\text{Fe}^{II}$ , *Hydroperoxyd* nachweisen läßt<sup>1)</sup>. Ein Mangan-gehalt der Glucose-oxydase andererseits war nach Angaben von Bernhauer<sup>2)</sup>, der bei *wachsendem Mycel* Aktivierung der Gluconsäuregärung durch  $\text{MnSO}_4$ -Zusatz gefunden hatte, nicht unwahrscheinlich. Für die *Dioxy-maleino-oxydase* ist die Beteiligung von Mangan zudem auch am *isolierten Ferment* äußerst wahrscheinlich gemacht worden (Lit. Fußnote 3, S. 118). Schließlich war in diesem Zusammenhang der von Warburg<sup>3)</sup> erhobene Befund *HCN-unempfindlicher* Mangan-katalysen im Auge zu behalten.

Für Fall 2 mochte man eine Stütze sehen in der schon in der 1. Mitteilung angegebenen schwachen *Gelbfärbung* konzentrierterer Enzymlösungen; ferner war die HCN-Unempfindlichkeit und die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildung nach den Erfahrungen beim *Flavinferment*<sup>4)</sup> für diesen Fall besonders zwanglos zu deuten. Die später hinzukommenden, schon erwähnten Befunde Warburgs und Balls an der Aminosäure-oxhydrase bzw. dem Schardinger-Enzym stellten natürlich analogiemäßig einen starken zusätzlichen Hinweis in Richtung der Möglichkeit 2 dar.

Für die Möglichkeit 3 sprach die bereits von Franke u. Lorenz hervorgehobene Übereinstimmung von *Glucose-dehydrase* (z. B. der Leber) und *Glucose-oxydase* in verschiedenen wesentlichen Punkten (wie Substratspezifität und -affinität, Hemmbarkeit durch Sulfit) sowie die offenbare Existenz von *Übergangsformen* [etwa in Essigbakterien<sup>5)</sup>]. Der Übergang vom dialysablen „*Cof ferment*“ zum festgebundenen „*Agon*“ würde diesen Verhältnissen formal gut gerecht werden, wengleich natürlich die im letzteren Grenzfall anzunehmende *Reaktionsfähigkeit* einer Codehydrase gegenüber  $\text{O}_2$  ohne zusätzliche Annahmen schwer verständlich bleibt. (Eine intramolekulare Kombination der Gruppierungsmöglichkeiten 2 + 3 könnte diese Schwierigkeit grundsätzlich beseitigen; vgl. hierzu S. 148.)

Unsere Reinigungsversuche an der Glucose-oxydase haben, um das wesentliche Ergebnis gleich vorwegzunehmen, zu Präparaten mit einer *Atmungsgröße* von fast 3000 unter den üblichen Testbedingungen, rund 8000 unter optimalen Bedingungen geführt<sup>6)</sup>. Der Anreicherungsgrad liegt — je

<sup>1)</sup> H. Wieland u. Franke, A. 473, 289 (1929).

<sup>2)</sup> H. 177, 86 (1928).

<sup>3)</sup> Bio. Z. 231, 493; 233, 245 (1931).

<sup>4)</sup> Vgl. z. B. Zusammenfassung von H. Theorell, Erg. Enzymforsch. 6, 111 (1937).

<sup>5)</sup> K. Tanaka, Acta phytochim. 7, 265 (1933).

<sup>6)</sup> An den ersten Reinigungsstufen — bis etwa  $Q_{\text{O}_2} = 200$  — hat sich noch Herr Dr. F. Lorenz beteiligt, wofür ihm an dieser Stelle gedankt sei.

nach dem verwendeten Ausgangsmaterial — zwischen 250- und 600-fach. Gewichtige Gründe sprechen schon beim jetzt erreichten Reinheitsgrad mit einer sehr großen Wahrscheinlichkeit dafür, daß auch die Glucose-oxydase ein *gelbes Ferment* ist. Indessen glauben wir, daß wir vom *reinen Ferment* auch heute noch ziemlich weit entfernt sind; seine Gewinnung ist allerdings im jetzigen Stadium der Arbeit lediglich mehr eine Materialfrage. Wir veröffentlichen unsere Ergebnisse schon jetzt, weil der eine von uns (M. D.) aus äußeren Ursachen an einer weiteren Bearbeitung des Problems leider verhindert ist; die Versuche zur Reindarstellung des Ferments werden jedoch demnächst fortgesetzt werden.

### I. Das Ausgangsmaterial.

A. Vorkommen der Glucose-oxydase. Durch *Isolierung* ist das Ferment bisher nur in *Aspergillus niger* und *Penicillium glaucum* nachgewiesen worden. Wohl aber ist für eine Reihe anderer Pilze Gluconsäure-bildung durch wachsendes Mycel bekannt<sup>1)</sup>.

Nach D. Müller<sup>2)</sup> ist „außer in *Asp. niger* und *Pen. glaucum* Glucose-oxydase vielleicht in den folgenden Pilzgattungen, unter welchen einige Arten Gluconsäure im Substrat bilden, zu suchen: *Citromyces*, *Dematium*, *Fumago*, *Microanthomyces*, *Mucor*, *Polyporus*“. In *Asp. oryzae*, der für seine Fähigkeit zur Kojisäure-bildung bekannt ist, hat Müller bei Isolierungsversuchen keine Glucose-oxydase entdecken können.

Wir haben auf der Suche nach dem vorteilhaftesten Ausgangsmaterial für präparative Enzymdarstellung verschiedene Pilze vergleichend auf ihren Enzymgehalt untersucht, und zwar die Aspergillaceen *Asp. niger*, *Asp. fumigatus*, *Pen. glaucum* und *Citromyces*, die Mucoraceen *Mucor racemosus* und *Rhizopus nigricans* sowie schließlich *Dematium pullulans* [aus der Gruppe der Fungi imperfecti<sup>3)</sup>]. Das

<sup>1)</sup> Lit. bei K. Bernhauer, Die oxydativ. Gärungen, S. 15 (Berlin 1932); ferner Erg. Enzymforsch. 3, 185 (1934).

<sup>2)</sup> Erg. Enzymforsch. 5, 185 (1936).

<sup>3)</sup> Für die kostenlose Überlassung von Pilzkulturen sind wir Herrn Hauptkonservator Dr. Esenbeck und Herrn Prof. Dr. Gistl von den Botanischen Instituten der hiesigen Universität bzw. Techn. Hochschule zu großem Dank verpflichtet.

Ergebnis dieser Versuche war, daß sich lediglich aus *Asp. niger*, *Pen. glaucum* und *Citromyces* Glucose-oxydase einwandfrei isolieren ließ.

Die Züchtung der Pilze sowie die Aufbereitung des Mycelmaterials erfolgte nach dem in der 1. Mitteilung angegebenen Verfahren. (Um bei den beiden *Mucoraceen* ein gutes Wachstum zu erzielen, bleibt der Citronensäure-zusatz in der dort verwendeten Nährlösung weg.) Aktivitätsbestimmungen wurden sowohl an den dialysierten Preßsäften wie an den daraus gewonnenen Trockenpräparaten vorgenommen; dies geschah, um nicht durch eine bei der Alkohol-Ätherbehandlung möglicherweise eingetretene Enzym-inaktivierung zu falschen Schlüssen hinsichtlich des ursprünglichen Enzymgehalts im Preßsaft verleitet zu werden. Doch erfolgte nur beim *Citromyces*-Enzym in der erwähnten Phase eine Aktivitätsverminderung um etwa die Hälfte.

Auf die Mitteilung von Zahlenwerten für Enzymaktivitäten und -ausbeuten soll hier verzichtet werden, da zwischen den einzelnen Stämmen der gleichen Art nicht unerhebliche Unterschiede bestehen und auch die (öfters überimpften) Stammkulturen ursprünglich aktiver Stämme (auf Bierwürze-Agar) bisweilen im Verlauf längerer Zeiträume (z. B. 1 Jahr) aus unbekanntem Gründen die Fähigkeit zur Glucoseoxydasebildung — anscheinend im Zusammenhang mit der Fähigkeit zur Conidienbildung — in zunehmendem Maße einbüßen<sup>1)</sup>. In diesem Sinne sind auch unsere negativen Befunde mit gewissem Vorbehalt aufzunehmen, da wir über das Alter der einzelnen übernommenen Kulturen nicht unterrichtet waren.

Nach wie vor bleiben *Asp. niger* und *Pen. glaucum* die besten Ausgangsmaterialien für die Fermentdarstellung. Gute Stämme der beiden Spezies liefern Enzymlösungen und Trockenpräparate vergleichbarer Wirksamkeit. In der Praxis ist jedoch *Asp. niger* vorzuziehen, und zwar aus folgenden Gründen: 1. Er wächst wesentlich rascher als *Pen. glaucum*;

<sup>1)</sup> Vgl. ähnliche Beobachtungen von O. E. May, Herrick, Moyer u. Hellbach, Ind. Eng. Chem. 21, 1198 (1929).

2. bei gleicher Kulturoberfläche und jeweils optimalen Wachstumsbedingungen sind die Mycelausbeuten an *Asp. niger* 2—3-mal größer als die an *Pen. glaucum*; 3. bei *Aspergillus*-präparaten liegt die „Eigenatmung“ in der Nähe von 5 bis 10 Proc., bei *Penicillium*-präparaten selten unter 20 Proc. der „Glucoseatmung“. *Citromyces* — von dem wir allerdings nur *einen* Stamm untersucht haben — steht in der Wachstumsintensität zwischen *Aspergillus* und *Penicillium*, liefert aber erheblich (z. B. 2—3-mal) schwächere Enzymlösungen, aus denen sich zudem nur mit großem Verlust Trockenpräparate herstellen ließen.

Unsere negativen Ergebnisse mit *Asp. fumigatus*, der wie *Asp. oryzae* zu den Kojisäure-bildnern gehört, passen zu den vorerwähnten analogen Befunden Müllers und zeigen zusammen mit diesen, daß das Vorkommen der Glucose-oxydase keineswegs für die *Gesamtfamilie der Aspergillaceen* typisch ist. Auch in *Asp. niger* und *Pen. glaucum* wird sie übrigens nach den Untersuchungen Müllers nur bei Kultur der Organismen auf geeigneten Zuckern gebildet, sie stellt also kein *konstitutives*, sondern nur ein *adaptives* Enzym [im Sinne Karströms<sup>1)</sup>] dar; ersichtlich geht der Zuckerabbau auch in den beiden letztgenannten *Aspergillaceen* nicht *zwangsläufig* über Gluconsäure.

Bei den beiden *Mucoraceen* bewirkte Zusatz von Glucose zu den dialysierten Preßsäften nicht nur keine Steigerung, sondern sogar eine Hemmung der recht beträchtlichen „Leeratmung“. Bei *Dematium* haben wir unter den gleichen Bedingungen zwar deutliche O<sub>2</sub>-Mehraufnahmen nach Glucosezusatz beobachtet, doch ließ sich aus den relativ kleinen Differenzen gegenüber der — auch hier erheblichen — Eigenatmung nicht mit *Sicherheit* auf die Anwesenheit von Glucose-oxydase schließen.

Erwähnt soll noch werden, daß das Enzym außer in den vegetativen Zellen auch in den *Conidiosporen* von *Asp. niger* und *Pen. glaucum* nachgewiesen werden konnte. Die enzymatische Aktivität der Sporen betrug im letzteren Falle, wo sie besonders leicht und rein geerntet werden können, rund die Hälfte der Mycelaktivität. Eine Isolierung der Sporen-oxhydrase ist nicht versucht worden.

Im übrigen ist die Verbreitung der Glucose-oxydase nicht, wie es bisher den Anschein hatte, auf das *Pflanzenreich* beschränkt. A. Gauhe<sup>2)</sup> konnte kürzlich im hiesigen

<sup>1)</sup> H. Karström, Erg. Enzymforsch. 7, 350 (1938).

<sup>2)</sup> Vgl. A. Gauhe, Z. vgl. Physiol., erscheint 1940.



Institut zeigen, daß das Pharynxdrüsen-sekret der *Biene* ein glucose-oxydierendes Enzym enthält, das in allen wesentlichen Eigenschaften mit dem Pilzenzym übereinstimmt.

B. Mycelalter und -aktivität. Nach D. Müller<sup>1)</sup> ist es wichtig, möglichst junge Pilzdecken, bei denen die Conidienbildung noch nicht oder kaum begonnen hat, zur Enzymdarstellung zu verwenden, da andernfalls schon viel tote Zellen im Ausgangsmaterial vorhanden sind. Da sich diese Forderung bei dem raschen Wachstum der Schimmelpilze oft schwer (z. B. wenn der geeignete Zeitpunkt Nachts erreicht wird) erfüllen läßt, haben wir zur Orientierung den *Einfluß der Züchtungsdauer* auf die enzymatische Mycelaktivität untersucht<sup>2)</sup>.

Zu diesem Zwecke wurde Mycel von *Asp. niger* nach bestimmten Bebrütungsdauern bei 35° gemäß der Müllerschen Vorschrift „verarmt“, gewaschen und in der Reibschale zu einem möglichst homogenen Brei verarbeitet. Nach dem Verdünnen mit Wasser wurde die O<sub>2</sub>-Aufnahme von 2 ccm Mycelsuspension (von bekanntem bei 110° bestimmtem Trockengewicht) in Abwesenheit und Gegenwart von Glucose bei 30° unter Luft bestimmt. Die Zusammensetzung der Reaktionslösung — im folgenden stets als „Normalansatz“ bezeichnet — war die folgende:

- 2 ccm Mycelsuspension (bzw. Enzymlösung),
- 2 ccm m/5-Phosphatpuffer (p<sub>H</sub> 6,8),
- 1 ccm H<sub>2</sub>O bzw. m/1-Glucose.

Die Eigenatmung des Mycels betrug in diesen Versuchen höchstens 5 Proc. der Glucose-atmung; sie ist in den O<sub>2</sub>-Werten der nachstehenden Tabelle nicht abgezogen. Letztere enthält außerdem noch das eingesetzte *Myceltrockengewicht*, die aus cmm O<sub>2</sub>/mg Trockengewicht × Stunden berechnete *Atmungsgröße* Q<sub>O</sub>, sowie (am Kopf) Angaben über *Mycelalter* und *-aussehen*.

Wie Tab. 1 erkennen läßt, ist zwar die Mycelaktivität im „Flocken- und Insel-stadium“ erheblich größer als im „Decken-stadium“, erweist sich aber in letzterem als zeitlich recht konstant und ersichtlich nicht von der Conidienbildung abhängig. Für den praktischen Zweck der Enzymgewinnung

<sup>1)</sup> Bei Oppenheimer-Pincussen, Die Methodik d. Fermente, S. 486 ff. (Leipzig 1929).

<sup>2)</sup> Versuch von F. Lorenz.

ist jedoch noch zu berücksichtigen, daß die *Mycelgewichte* bis zur Deckenbildung sehr stark, dann langsamer zunehmen. (Sie standen z. B. für gleich große Petri-Schalen nach 2, 4, 6 und 10 Tagen im Verhältnis von etwa 1:7:8:9.) Wir haben uns daher zwar nach Möglichkeit an die Müllersche Vorschrift hinsichtlich des Mycelstadiums gehalten, haben aber des öfteren auch stärker conidienbedeckte Mycelien verwendet, ohne je einen nachteiligen Einfluß auf die Enzymausbeuten feststellen zu können.

Tabelle 1.

Mycel	a) Alter . . .	2 Tage	4 Tage	6 Tage	10 Tage
	b) Aussehen	Einzelne Flocken und „Inseln“	Zusammen- hängende dünne rein- weiße Decke	Mäßige Conidien- bildung	Starke Conidien- bildung, Mycel- oberfläche tief braunschwarz
cmm O <sub>2</sub> /Stunden . . .		94	47	97	36
mg Trockengewicht		2,4	3,3	7,5	2,4
Q <sub>O</sub> , . . . . .		39	14	13	15

Im Versuch der Tab. 1 war mit einem schon etwas „ermüdeten“ *Aspergillus*-stamm und mit relativ schwacher Beimpfung gearbeitet worden. Bei gut aktiven Stämmen und starker Sporenimpfung verkürzen sich die für die einzelnen Stadien angegebenen Zeiten auf etwa die Hälfte. Im allgemeinen lagen die von uns angewandten Bebrütungsdauern zwischen 2 und 4 Tagen. Die anschließende „Hungerperiode“ haben wir auf 12—14 Stunden ausgedehnt.

C. Nährboden. Wir haben unseren Pilzen ursprünglich, der Originalvorschrift entsprechend, technische *Glucose* als C-Quelle geboten. Da wir jedoch später fanden, daß mit dem *Rohrzucker* des Handels bei gleicher gewichtsmäßiger *Mycelausbeute* deutlich (20—30 Proc.) höhere *Mycelaktivitäten* erreicht wurden, haben wir weiterhin ausschließlich dieses Nährsubstrat verwendet<sup>1)</sup>.

<sup>1)</sup> Bernhauer (S. 121 a. a. O.) hat am *intakten Aspergillus-mycel* gleichfalls die überlegene Eignung der Saccharose für die Erzielung hoher Enzym-aktivitäten beobachtet und theoretische Erwägungen über ihre Ursachen angestellt.

II. Isolierung und Reinigung.

A. Isolierung durch Auspressen.

Die Untersuchungen wurden mit einer Bestimmung der beim ursprünglichen *Darstellungsverfahren* von D. Müller erzielbaren *Anreicherungsgrade* und *Enzymausbeuten* begonnen. Soweit in diesem und den folgenden Abschnitten nichts anderes angegeben ist, wurde durchweg mit *Asp. niger*, von dem mehrere Stämme zur Verfügung standen, gearbeitet.

Zunächst erfolgte, wie im vorausgehenden Abschnitt näher beschrieben, an einer zweckmäßig zerkleinerten Mycelprobe die Bestimmung der *Ausgangsaktivität*  $Q_{O_2}$ . (Zum Zerkleinern diente später eine Latapie-Mühle; die  $Q_{O_2}$ -Werte des Mycels lagen bei *Aspergillus* wie bei *Penicillium* im allgemeinen zwischen 5 und 15.) Das Produkt  $Q_{O_2} \times \text{mg Myceltrockengewicht}$  stellt die Zahl der insgesamt eingesetzten *Enzym-Einheiten* (E.E.<sup>o</sup>), also die *Ausgangs-enzymmenge* dar. Die gleichen Bestimmungen wurden mit dem nach Buchner dargestellten *Preßsaft* und dem daraus durch Alkohol-Ätherfällung in der üblichen Weise gewonnenen *Trockenpräparat* ausgeführt.

(Wenn im folgenden nichts besonderes vermerkt ist, beziehen sich die  $Q_{O_2}$ -Werte stets auf die Bedingungen des „Normalansatzes“ (S. 125) ohne Abzug der „Leeratmung“ des Enzymmaterials; nur wo letztere — ausnahmsweise — erheblichere Werte annahm, ist von diesem Verfahren abgegangen worden.)

Das Ergebnis eines derartigen an *Asp. niger* ausgeführten quantitativen Versuchs enthält Tab. 2. Die Quotienten  $Q_{O_2}/Q_{O_2}^o$  und E.E./E.E.<sup>o</sup> stellen den auf das Ausgangsmaterial bezogenen *Anreicherungsgrad* bzw. die *Enzymausbeute* dar.

Tabelle 2.

	Trockengewicht in mg	$Q_{O_2}$	$Q_{O_2}/Q_{O_2}^o$	E.E.	E.E./E.E. <sup>o</sup>
Mycel . . . . .	76000 <sup>1)</sup>	14	—	1062000	—
Preßsaft . . . . .	5860 <sup>2)</sup>	16	1,14	93800	0,09
Trockenpräparat . . . . .	1360	25,8	1,84	35000	0,03

<sup>1)</sup> = 252 g in der Handpresse vom anhaftenden Wasser befreites Mycel. Die späteren Textangaben über Mycelgewichte beziehen sich stets auf derartiges — noch 60–70 Proc. bei 110° flüchtiges Wasser enthaltendes — Material.

<sup>2)</sup> = 92 ccm Flüssigkeit.

Wie man aus den Zahlen ersieht, ist das Originalverfahren Müllers außerordentlich verlustreich: kaum  $\frac{1}{10}$  der Mycelaktivität wird in Lösung gebracht und auch hiervon erscheint nur  $\frac{1}{3}$  in der Alkohol-Ätherfällung. Letztere ist knapp 2-mal aktiver als das Mycel.

In der 1. Mitteilung war bereits angegeben worden, daß sich durch 18-stündige *Dialyse* wiedergelöster Trockenpräparate eine etwa doppelte Anreicherung erzielen läßt. Um nicht die — offenbar verlustreiche — Alkohol-Ätherfällung ein zweites Mal wiederholen zu müssen, haben wir in einem Parallelversuch zu dem der Tab. 1 den Preßsaft *direkt* einer 40-stündigen Dialyse — die halbe Zeit gegen strömendes Leitungswasser ( $10^{\circ}$ ), die andere Hälfte gegen destilliertes Wasser im Eisschrank ( $3^{\circ}$ ) — unterworfen und anschließend wieder die Alkohol-Ätherfällung vorgenommen. Das Resultat ist in Tab. 3 zur Anschauung gebracht.

Tabelle 3.

	Trocken- gewicht in mg	$Q_{O_2}$	$Q_{O_2}/Q_{O_2}^{\circ}$	E.E.	E.E./E.E. $^{\circ}$
Mycel . . . . .	76000	14	—	1062000	—
Preßsaft, dialysiert	830	95	6,8	78800	0,07
Trockenpräparat .	316	84	6,0	30200	0,03

Die *Enzymausbeuten* sind hier zwar ähnlich schlecht wie im vorausgehenden Versuch, doch ist das Endprodukt immerhin 6-mal reiner als das Ausgangsmaterial. Hauptbestreben mußte es daher sein, zunächst einmal mehr Enzym in Lösung zu bringen. Der erste — schon in der Arbeit von Franke und Lorenz angedeutete — Versuch dieser Art bestand darin, daß der Preßrückstand der ersten Behandlung noch wiederholte Male unter Wasser-, Quarz- und Kieselgur-Zusatz verrieben und ausgepreßt wurde.

So ergaben z. B. 450 g Pilzmycel nach 5-maligem Zusatz von je 90 cem Wasser insgesamt rund 600 cem Preßsaft, der nach 48-stündiger Dialyse gegen fließendes Leitungswasser in Portionen von 150 cem mit Alkohol-Äther gefällt wurde. Enzymanreicherung und -ausbeute, die bei diesem Versuch jedoch nur im Endprodukt bestimmt wurden, zeigt Tab. 4.

Tabelle 4.

	Trocken- gewicht in mg	Q <sub>O</sub>	Q <sub>O</sub> /Q <sub>O</sub> <sup>o</sup>	E.E.	E.E./E.E. <sup>o</sup>
Mycel . . . . .	150000	7,2	—	1080000	—
Trockenpräparat :	2750	106	14,7	292000	0,27

Der Fortschritt, den diese — als „verbessertes Preßverfahren“ bezeichnete — Methode gegenüber der ursprünglichen darstellt, ist unverkennbar: bei fast 15-facher Aktivitätssteigerung erscheint über 1/4 der Mycelaktivität im Trockenpräparat. Trotzdem läßt das Verfahren in praktischer Beziehung noch sehr zu wünschen übrig: das wiederholte Verreiben des Mycelbreis mit Quarzsand und Kieselgur ist mühsam und zum mindesten sehr zeitraubend, auch wenn wir uns später die körperliche Arbeit durch Verwendung einer Syenitwalzenmühle erleichtert haben.

B. Isolierung durch Extraktion.

Es wurde daher untersucht, ob nicht durch *Extraktion* des in einfacherer Weise vorbehandelten Ausgangsmaterials eine Ablösung des Ferments von der Pilzzelle zu erreichen war. Dabei war — nach bekannten Erfahrungen der Enzymchemie — zu prüfen, ob nicht die Anwendung von *Pufferlösungen bestimmten p<sub>H</sub>-Werts* Vorteile gegenüber der Extraktion mit Wasser böte.

a) *p<sub>H</sub>-Einfluß*. Diesen haben wir, um zunächst nur eine Versuchsbedingung zu ändern, in einer nach dem verbesserten Preßverfahren (Versuch der Tab. 4) angestellten orientierenden Versuchsreihe untersucht.

Hierzu wurden gleiche Anteile trockengepreßten *Aspergillus-mycels* (20 g) mit ihrem Eigengewicht

- |  |  |
|--|--|
| 1. H <sub>2</sub> O  | 2. m/15-Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> |
| 3. m/15-Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> + KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (1 : 2) | 4. m/15-KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  |

in der dort angegebenen Weise verrieben und ausgepreßt. Das p<sub>H</sub> der Preßsäfte war etwa

- |      |        |        |         |
|------|--------|--------|---------|
| 1. 6 | 2. 7,5 | 3. 6,3 | 4. 4,5. |
|------|--------|--------|---------|

In den 60 Stunden gegen Leitungswasser dialysierten und anschließend zentrifugierten Lösungen wurde die Enzymaktivität und -ausbeute ermittelt (Tab. 5).

Tabelle 5.

	Trocken- gewicht in mg	$Q_{O_2}$	$Q_{O_2} / Q_{O_2}^0$	E.E.	E.E./E.E. <sup>0</sup>
Mycel . . . . .	7550	12,8	—	96600	—
Preßsaft 1	232	95	7,4	22000	0,23
"   2	230	102	8,0	23500	0,23
"   3	163	110	8,6	17900	0,19
"   4	165	58	4,5	9600	0,10

Der Einfluß des  $p_H$  auf die Enzymaktivität in Lösung ist nach Tab. 5 in der Nähe des Neutralpunkts ersichtlich gering, desgleichen allgemein der Unterschied zwischen reinem Wasser und Pufferlösungen. In stärker saurer Lösung wird indes die Aktivität erheblich kleiner. Größer und schon bald unterhalb des Neutralpunkts erkenntlich ist die nachteilige Wirkung sauren Reaktionsmilieus auf die Enzymausbeute.

Es ist sehr unwahrscheinlich, daß die vergleichsweise geringe Aktivität und Ausbeute im Ansatz bei  $p_H$  4,5 auf eine *Fermentschädigung* zurückgeht. Denn in „Normalversuchen“ bei  $p_H$  6,8, in denen Ferment, das 2 $\frac{1}{2}$  Stunden unter Zimmertemperatur bei  $p_H$ -Werten zwischen 7,5 und 3,0 gehalten worden war, eingesetzt wurde, waren die  $O_2$ -Aufnahmen innerhalb der Fehlergrenze dieselben. (Allenfalls war bei  $p_H$  8,6 unter diesen Bedingungen eine geringe Aktivitätsminderung — 12 Proc. — festzustellen.) Viel wahrscheinlicher ist, daß das *Ferment-eiweiß* in sauren Lösungen *unlöslicher* ist als in neutralen.

Wir haben später, um von wechselndem Säuregehalt und Puffervermögen des Pilzmycels unabhängig zu sein, der Extraktion mit Wasser fast stets diejenige mit  $m/_{15}$ — $m/_{30}$ - $Na_2HPO_4$ -Lösung vorgezogen.

b) *Einfluß der Mycelaufbereitung.* Folgende Extraktionsversuche wurden an gleichen Mycelportionen nach 3-maligem Durchtreiben durch die Fleischmaschine ausgeführt:

1. Direkte Extraktion,
2. Extraktion in der Kugelmühle,
3. Extraktion nach dem Frieren mit flüssiger Luft,
4. Extraktion nach dem Verreiben mit Quarzsand und Kieselgur.

Es wurden jeweils 65 g Mycel verwendet, die mit der 4-fachen Menge  $m/_{15}$ - $Na_2HPO_4$  3 Stunden lang ausgezogen wurden. Dann wurde abzentrifugiert, das  $p_H$  der Lösung bestimmt — es lag in allen Fällen

zwischen 7,1 und 7,3 —, anschließend 40 Stunden in der üblichen Weise dialysiert und zuletzt Trockengewichts- und Aktivitätsbestimmung vorgenommen. Das Ergebnis enthält Tab. 6.

Tabelle 6.

Extrakt	ccm	Trocken- gewicht in mg	$Q_{O_2}$	E.E.
1	306	922	201	185 000
2	305	968	196	190 000
3	335	805	217	175 000
4	340	772	234	180 000

Das Resultat war für uns ebenso überraschend wie erfreulich: die einfache Vorbehandlung des Mycels in der Fleischmaschine ersetzt sowohl das bisher geübte mühsame und zeitraubende Verreiben mit Quarzsand und Kieselgur als auch die Anwendung der Kugelmühle oder die Behandlung mit flüssiger Luft, letzteres zwei Verfahren, die sich neuerdings bei der Abtrennung von an sich schwerisolierbaren Desmolasen aus Moosen<sup>1)</sup> bzw. aus Hefe<sup>2)</sup> gut bewährt haben. Die *Enzymausbeute* ist jedenfalls in allen Fällen die gleiche, der *Aktivitätsunterschied* zugunsten der komplizierteren Verfahren, wenn überhaupt reproduzierbar, so gering, daß er den erheblichen Mehraufwand an Arbeit in keiner Weise lohnt.

Der prozentische Anteil an Mycelaktivität, der bei diesen Extraktionen in Lösung gegangen war, ist versehentlich nicht bestimmt worden. Dies wurde bei anderer Gelegenheit nachgeholt in einem Versuch, der in Tab. 7 zur Anschauung gebracht ist und der zeigt, daß rund *die Hälfte* der Ausgangsenzymmenge sich im Extrakt wiederfindet.

Tabelle 7.

	Trockengew. in mg	$Q_{O_2}$	$Q_{O_2} / Q_{O_2}^0$	E.E.	E.E./E.E. <sup>0</sup>
Mycel (75 g) . . .	24 000	9,0	—	216 000	—
Extrakt, dialysiert (350 ccm) . . .	1 740	66,4	7,4	115 200	0,53

Später haben wir das Extraktionsverfahren noch weiter verbessert dadurch, daß wir den Mycelbrei zuerst mit der *3-fachen* Wasser- bzw. Phosphatmenge und nach dem Zentrifugieren nochmals mit dem *doppelten* Flüssigkeitsvolumen unter jeweils *mehrstündigem* Schütteln ausgezogen. (Setzt man — zur Vermeidung größerer Infektionen — etwas

<sup>1)</sup> W. Franke u. Hasse, H. 249, 231 (1937).

<sup>2)</sup> F. Lynen, A. 539, 1 (1939).

Octylalkohol zu, so kann — unter deutlicher weiterer Erhöhung der Enzymausbeute, wahrscheinlich durch Autolyse — auch *über Nacht* geschüttelt werden.) Die zweiten Extrakte ergeben im Durchschnitt nochmals die Hälfte der in den ersten enthaltenen Enzymmenge, so daß wir in beiden Operationen zusammen Enzymausbeuten von 75 bis 80 Proc., manchmal auch noch darüber, erzielen konnten.

Auf eine 3. Extraktion, die wahrscheinlich zu einer insgesamt fast quantitativen Fermentablösung geführt hätte, haben wir im Interesse der Volumbeschränkung verzichtet.

Es sei noch angefügt, daß von der ursprünglichen Extraktaktivität ein kleiner Teil — meist zwischen 10 und 20 Proc. — bei der 2—3-tägigen Dialyse gegen stömendes Leitungswasser verlorengeht. Wahrscheinlich ließe sich der Verlust durch Herabsetzung von Dialysendauer und -temperatur (z. B. im Schnelldialysator und Eisschrank) verringern.

### C. Anreicherung durch Eindampfen.

Eine anfängliche Schwierigkeit unserer Extraktionsmethode lag in der weiteren Verarbeitung des anfallenden großen Flüssigkeitsvolumens, das in den präparativen Normalchargen von etwa 500 g Mycel in der Nähe von 3 Litern lag. Die bisher geübte Fällung mit dem 12-fachen Volumen Alkohol-Äthergemisch (2:1) verbot sich schon wegen des jetzt enormen Verbrauchs an den organischen Lösungsmitteln und schien zudem nach früheren Erfahrungen (Tab. 2 und 3) gerade bei verdünnten Enzymlösungen recht verlustreich zu sein. Wir haben daher versuchsweise unsere dialysierten Extrakte i. V. bei 20—30° auf etwa  $\frac{1}{10}$  ihres ursprünglichen Volumens eingeengt und erst dann die Alkohol-Ätherfällung vorgenommen. Wir waren, da das Eindampfen pro Liter Extrakt ungefähr 1 Stunde dauerte und dabei erhebliche schmutzigbraune Niederschläge auftraten, die wir vor der Endfällung abzentrifugierten, auf größere Enzymverluste gefaßt. Zu unserem Erstaunen hielten sich diese innerhalb der bescheidenen Grenzen von 10—20 Proc., wie sie schon bei der vorausgehenden Dialyse aufgetreten waren; die Enzymaktivität jedoch hatte bei der Behandlung nicht nur keine Einbuße, sondern einen Anstieg auf etwa das  $1\frac{1}{2}$ —2-fache erfahren.

Nachstehend wird das Ergebnis eines orientierenden Doppelversuchs wiedergegeben, in dem je 100 ccm eines dialysierten



Preßsafts nach dem Eindampfen auf 10 ccm und Zentrifugieren 1. mit Alkohol-Äther gefällt wurden, 2. im Vakuumexsiccator vollends zur Trockne eingedunstet wurden. ( $Q_{O_2}$  und E.E.<sup>o</sup> beziehen sich hier und im folgenden auf die jeweilige Ausgangsstufe.)

Tabelle 8.

	Trocken- gewicht in mg	$Q_{O_2}$	$Q_{O_2} / Q_{O_2}^o$	E.E.	E.E./E.E. <sup>o</sup>
Extrakt, dialysiert (100 ccm) . . . . .	1125	56	—	58 000	—
Trockenpräparat (1) .	483	103,5	1,85	50 000	0,86
Eindampfrückstand (2)	607	89	1,6	54 000	0,93

Wie man sieht, wäre es durchaus möglich, die Alkohol-Ätherfällung durch einfaches Eindunsten zur Trockne zu ersetzen. Wir haben das erstere Verfahren trotzdem beibehalten, weil 1. rasches Eindunsten größerer Volumina im Vakuumexsiccator auf Schwierigkeiten stößt, 2. die Aktivität der Alkohol-Ätherfällung deutlich größer ist als die des Eindampfrückstands, 3. letzterer durch den bei der Extraktion in Lösung gegangenen Sporenfarbstoff *Aspergillin*<sup>1)</sup> braun gefärbt ist, während bei der Alkohol-Ätherfällung weiße bis weißgraue Präparate erhalten werden.

Wir haben, nachdem wir uns von der Unschädlichkeit und Zweckmäßigkeit der Eindampfoperation überzeugt hatten, diese weiterhin stets beibehalten und sind dabei teilweise auf noch wesentlich kleinere Volumina, z. B.  $\frac{1}{50}$  des ursprünglichen, heruntergegangen. Das Ergebnis war stets das gleiche: beim Eindampfen fallen  $\frac{1}{3}$  bis fast  $\frac{2}{3}$  des Trockengewichts in Form eines wenig aktiven, wesentlich aus hochmolekularen Verunreinigungen bestehenden Niederschlags aus, während sich aus dem Zentrifugat durch Alkohol-Ätherfällung ein weiteres Drittel oder darüber in weitgehend angereichertem Zustande erhalten ließ.

So standen in einem derartigen Versuch die Gewichte von Eindampfniederschlag und Alkohol-Ätherpräparat im Verhältnis 1 : 1, die Aktivitäten sowohl wie die Enzymmengen im Verhältnis 1 : 6,7, d. h. nur 13 Proc. der gefällten Gesamtaktivität gingen in die „Vorfällung“. Diese wurde — schon in Anbetracht ihrer mangelhaften Löslichkeit — in unseren Versuchen nicht weiter berücksichtigt.

<sup>1)</sup> A. Quilico u. di Capua, R. A. L. 17, 93 (1933).

Wir sind bei zunehmender Erfahrung zu dem Schluß gekommen, daß die *Temperatursteigerung* der aktivitäts-erhöhende Faktor beim Eindampfvorgang ist. Wir haben daher die Innentemperatur bei der Destillation auf 30—35° erhöht, haben aber andererseits Randüberhitzungen durch zu hohen Stand der Badflüssigkeit von 55—60° peinlich zu vermeiden gesucht. Unter diesen Bedingungen haben wir ziemlich regelmäßige Aktivitätssteigerungen auf etwa das *Dreifache* erhalten, wie dies der folgende Versuch belegt, der zugleich zeigt, daß zu *weitgehendes* Eindampfen (z. B. auf  $1/_{80}$ ) zu Aktivitätsverlusten führt.

Tabelle 9.

Extrakt	Trocken- gewicht in mg	$Q_{O_2}$	$Q_{O_2} / Q_{O_2}^0$	E.E.	E.E./E.E. <sup>0</sup>
Dialysiert (960 ccm) .	2070	194	—	401 000	—
Eingedampft auf 62 ccm (= $1/_{16}$ ) . .	610	610	3,1	373 000	0,93
Eingedampft auf 12 ccm (= $1/_{80}$ ) . .	562	472	2,4	265 000	0,66

In einem anderen Versuch wurde im Anschluß an das normale Eindampfen noch kurze Zeit auf Temperaturen von 60 bzw. 65° erhitzt und hierbei eine nochmalige, fast verlustfreie Aktivitätssteigerung um ungefähr  $1/3$  erzielt (Tab. 10).

Tabelle 10.

Extrakt	Trocken- gewicht in mg	$Q_{O_2}$	$Q_{O_2} / Q_{O_2}^0$	E.E.	E.E./E.E. <sup>0</sup>
Dialysiert (1720 ccm) .	9100	210	—	1 900 000	—
Eingedampft auf 350 ccm (= $1/_{13}$ ) . .	2360	643	3,1	1 520 000	0,80
350 ccm, 10 Min. er- hitzt auf 60° . . .	2010	732	3,5	1 470 000	0,78
350 ccm, 5 Min. erhitzt auf 65° . . . . .	1660	874	4,2	1 450 000	0,76

#### D. Fällung durch organische Lösungsmittel.

a) *Alkohol-Äther*. Das einfachste und von uns lange Zeit fast ausschließlich geübte Verfahren zur Gewinnung fester Fermentpräparate

aus Lösungen war die Fällung der letzteren mit dem 12-fachen Volumen eines Alkohol-Äthergemisches (2:1). Die Operation bringt, wenn sie auf *konzentrierte* Enzymlösungen angewandt und *rasch* — unter Benützung der Zentrifuge — ausgeführt wird, nur geringe Enzymverluste (etwa 10—15 Proc.) mit sich, die *Aktivität* der Trockenpräparate ist — mit einer Variation von  $\pm 10$  Proc. — die gleiche wie die des gelösten und dialysierten Enzyms.

b) *Aceton*. Bisweilen haben wir an Stelle der Alkohol-Äthermischung mit gleichem Erfolg *Aceton* verwendet, von dem bekannt ist, daß es ein für höher empfindliche Enzyme [z. B. *Ascorbino-oxydase*)] schonenderes Fällungsmittel ist als Alkohol-Äther. Geringe Enzymverluste traten auch hier auf, doch schien die Aktivität der Fällungen ziemlich regelmäßig gegenüber der der Lösungen etwas erhöht.

Wir haben uns gefragt, ob — zum wenigsten bei konz. Enzymlösungen — der große Überschuß des organischen Solvens notwendig ist und ob sich nicht durch *geringere*, eventuell *fraktioniert* erfolgende Zusätze desselben Enzymanreicherung bzw. Abtrennung von Verunreinigungen erzielen ließe.

Um nicht unseren geringen Vorrat an dem nach *C.* gereinigten Ferment, für dessen weitere Anreicherung das Verfahren vorwiegend in Aussicht genommen war, aufs Spiel zu setzen, haben wir zunächst einen orientierenden Versuch mit einem roheren Enzym ( $Q_{O_2} = 80,6$ ), wie es etwa in den Ansätzen der Tab. 3 und 4 gewonnen worden war, und zwar absichtlich in ziemlich konz. Lösung (100 mg in 5 ccm) anstellt.

Tabelle 11.

Aceton Wasser	Trocken- gewicht in mg	$Q_{O_2}$	$Q_{O_2}/Q_{O_2}$	E.E	E.E./E.E. <sup>o</sup>
a) <i>Stammlösung</i>					
0	100	80,6	—	8060	—
b) <i>Totalfällungen</i>					
0,5	14	82,9	1,03	1160	0,14
1	36	165	1,61	5950	0,74
2	74,5	99,5	1,23	7410	0,92
5	78	87,8	1,09	6850	0,85
c) <i>Fraktionierung</i>					
0 — 0,5	14	82,9	1,03	1160	0,14
0,5 — 0,75	12	372	4,62	4470	0,55
0,75 — 1	13	50	0,62	650	0,08
	39	160 <sup>2)</sup>	1,98 <sup>2)</sup>	6260	0,78

<sup>1)</sup> M. Srinivasan, *Biochemic. J.* **30**, 2077 (1936).

<sup>2)</sup> Diese Werte sind *indirekt* (aus E.E./mg Trockengewicht) rückberechnet worden.

Die Zugabe des Acetons erfolgte unter Eiskühlung bis zu dem in der Tab. 11 verzeichneten Volumverhältnis. Die Niederschläge wurden möglichst rasch abzentrifugiert und im Vakuumexsiccator über  $H_2SO_4$  getrocknet.

Wie man aus der Tabelle erkennt, ist von den „Totalfällungen“ (b) diejenige mit dem gleichen Volumen Aceton die für die Reinigung vorteilhafteste, da sie rund  $\frac{3}{4}$  der eingesetzten Enzymmenge in  $1\frac{1}{2}$ –2-fach angereicherter Form erfassen läßt. Führt man sie fraktioniert (c) durch, so gelingt es, in einer Mittelfraktion mit über 50-proc. Ausbeute sogar eine  $4\frac{1}{2}$ -fache Anreicherung zu erzielen.

Die günstigen Erfahrungen des Vorversuchs an Rohenzym ( $Q_{O_2}$  etwa 80) ließen uns das Verfahren der *fraktionierten Acetonfällung* auch auf die durch Dialyse und Eindampfen nach C. gewonnenen reineren Präparate ( $Q_{O_2}$  etwa 500) anwenden. Das Ergebnis war im Prinzip das gleiche: In einer Mittelfraktion, in welcher der Acetongehalt der Lösung vom 0,4- aufs 0,8-fache gesteigert wird, fällt die Hälfte bis  $\frac{2}{3}$  des Ferments mit einem Anreicherungsquotienten von 2 bis fast 4 aus (Tabb. 12 u. 13).

Wir haben den Anreicherungsgrad in dieser Stufe noch nicht ganz sicher in der Hand. Es scheint, daß die Acetonfraktionierung um so effektiver ist, je weiter vorher eingedampft worden war, was aber nach S. 134 wiederum wegen der Verluste nicht unbegrenzt durchführbar ist. Vgl. hierzu den Fällungsversuch der Tab. 13, der unmittelbar im Anschluß an das im Versuch der Tab. 9 durchgeführte starke Einengen (auf  $\frac{1}{80}$ ) angestellt wurde. Hingegen kam im Versuch 12<sup>1)</sup> eine in normaler Weise vorbehandelte Enzymlösung (eingedampft auf  $\frac{1}{15}$ ) zur Anwendung.

Tabelle 12.

Aceton Wasser	Trocken- gewicht in mg	$Q_{O_2}$	$Q_{O_2}/Q_{O_2}^0$	E.E.	E.E./E.E. <sup>0</sup>
0	1300 in 20 ccm)	521,5	—	680000	—
0—0,2	92	232	0,45	21300	0,03
0,2—0,4	91	448	0,86	40800	0,06
0,4—0,6	128	1120	2,15	143500	0,21
0,6—0,8	314	962,5	1,85	302000	0,44
0,8—1,5	310	272	0,52	84300	0,12
Anreiche- rungsfraktion					
0,4—0,8	442	1010	1,94	445500	0,66

<sup>1)</sup> Diese abgekürzte Bezeichnungsweise wird weiterhin für den Versuch der entsprechend numerierten Tabelle verwendet.

Tabelle 13.

Aceton Wasser	Trocken- gewicht in mg	$Q_{O_2}$	$Q_{O_2}/Q_{O_2}^0$	E.E.	E.E./E.E. <sup>0</sup>
0	562 (in 16 ccm)	472	—	265 000	—
0—0,45	140	573	1,21	80 500	0,30
0,45—0,8	79	1700	3,6	134 000	0,51
	219	975	2,06	214 500	0,81

c) *Dioxan*. *Fraktionierte Dioxanfällung*, die bei der Katalase un-  
längst zu kristallisierten Präparaten geführt hat<sup>1)</sup>, hat sich in unserem  
Fall, soweit ein orientierender Versuch ein Urteil erlaubt, als *ungeeignet*  
erwiesen. Wir arbeiteten unter ganz ähnlichen Bedingungen wie im  
Versuch 11 c, mit den Dioxan/Wasser-Verhältnissen 0,6, 1,0 und 1,5. Bei  
einem Enzymeinsatz von 11 700 E.E. ( $Q_{O_2} = 78$ ) waren die  $Q_{O_2}$ -Werte  
der 3 Fraktionen 6,7, 61,2 und 10,0, die E.E.-Werte 90, 1040 und 280.  
Nur 12 Proc. der eingesetzten Enzymmenge wurden in den Fällungen  
wiedergewonnen, in keinem Falle erreichte deren Aktivität auch nur  
die des Ausgangsmaterials. Möglicherweise hängt der Aktivitätsverlust  
mit dem langsamen Abdunsten des ziemlich schwerflüchtigen Lösungs-  
mittels zusammen.

#### E. Adsorption und Elution.

Ähnliche Anreicherungs-effekte wie durch die fraktionierte  
Acetonfällung haben wir bei Präparaten der Reinheitsstufe C  
( $Q_{O_2} \geq 500$ ) auch mit Hilfe des *Adsorptionsverfahrens* nach  
Willstätter<sup>2)</sup> erreicht. Wir haben allerdings nur 2 Ver-  
suche dieser Art, und zwar mit *Kaolin* und *Tonerde C<sub>7</sub>*, aus-  
geführt. Letztere erwies sich als das weitaus geeignetere  
Adsorbens für das Enzym, doch scheint sich Kaolin für eine  
*Vor-adsorption* von Begleitstoffen zu eignen. Tab. 14 ver-  
zeichnet Bedingungen und Ergebnis des *Tonerde-Versuchs*.

Beim Vergleich mit Tab. 13 zeigt sich eine auffallende Über-  
einstimmung: in beiden Fällen gelingt es mit einer Ausbeute von  
40—50 Proc. ein 3—3½-mal reineres Ferment zu erhalten. Da jedoch  
die Acetonfraktionierung — vor allem wegen des Fortfalls der Dialyse —  
*rascher* zum Ziel führt und zudem ein *festes* Dauerpräparat liefert, haben  
wir uns weiterhin ausschließlich ihrer bedient; es ist jedoch durchaus

<sup>1)</sup> J. B. Sumner u. Dounce, J. biol. Chem. **121**, 417 (1937); **127**,  
439 (1939).

<sup>2)</sup> Zur Methodik vgl. H. Kraut bei Oppenheimer-Pincussen,  
D. Methodik d. Fermente, S. 445 (Leipzig 1929).

möglich, daß in späteren Reinigungsphasen, wo u. U. die Acetonfällung versagt (vgl. S. 140), das Adsorptionsverfahren die geeignetere Methode ist.

Tabelle 14.

	Trocken- gewicht in mg	Q <sub>O</sub>	Q <sub>O</sub> /Q <sub>O</sub> <sup>0</sup>	E.E.	E.E./E.E. <sup>0</sup>
100 mg Enzym gelöst in 40 ccm <sup>m</sup> / <sub>20</sub> -Acetatpuffer (p <sub>H</sub> 4,7):					
<i>Ausgangs- enzymlösung</i>	100	533	—	53 300	—
2,5 ccm 3-proc. Tonerde-suspension zugesetzt und 15 Minuten stehen gelassen:					
<i>Adsorbat</i> . . .	—	—	—	43 400	0,81 (1,00)
<i>Restlösung</i> . .	—	—	—	9 900	0,19
Adsorbat mit 10 ccm <sup>m</sup> / <sub>15</sub> -Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 20 Minuten eluiert (1); Adsorbat nochmals mit 10 ccm <sup>m</sup> / <sub>15</sub> -Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 40 Minuten eluiert (2):					
<i>Eluat 1</i> . . .	—	—	—	21 900	26 800   0,51 (0,62) <sup>1)</sup>
<i>Eluat 2</i> . . .	—	—	—	4 900	
Vereinigte Eluate 40 Stunden bei 10° dialysiert:					
<i>End-enzym- lösung</i> . . .	12	1750	3,3	21 000	0,40 (0,49) <sup>1)</sup>

Bei Verwendung von *Kaolin* (nach Willstätter und Schneider) ließ sich zwar unter den obigen p<sub>H</sub>-Bedingungen die *Adsorption* ohne Schwierigkeit durchführen (obwohl dabei größere Mengen des Adsorbens notwendig waren), doch trat bei der *Elution* — trotz mehrfacher Wiederholung — nur etwa  $\frac{1}{3}$  der adsorbierten Fermentmenge wieder in Lösung auf.

Hingegen lieferte eine *Vor-adsorption bei neutraler Reaktion* (p<sub>H</sub> 7,3) eine um rund 25 Proc. angereicherte Restlösung.

### F. Fällung mit Ammonsulfat.

Die Ammonsulfatfällung ist neuerdings insbesondere von Warburg und seiner Schule zur Reinigung von Fermentproteinen<sup>2)</sup> [auch bei „gelben Fermenten“<sup>3)</sup>] in systematischer Weise herangezogen worden. Auch wir haben ihre Wirk-

<sup>1)</sup> Die eingeklammerten Ausbeutezahlen beziehen sich auf die *adsorbierte* Enzymmenge als Einheit; wir haben die Adsorption — dem üblichen Verfahren folgend — absichtlich nicht bis zur Vollständigkeit durchgeführt.

<sup>2)</sup> Lit. bei O. Warburg, *Erg. Enzymforsch.* 7, 210 (1938).

<sup>3)</sup> Vgl. Literaturangaben S. 119 sowie zu Tab. 18, S. 149.

samkeit sowohl an Rohpräparaten ( $Q_{O_2} \sim 100$ ) als auch an reineren ( $Q_{O_2} > 1000$ ) erprobt und haben dabei, schon ohne Fraktionierung, in beiden Fällen Aktivitätssteigerungen auf das 2—2 $\frac{1}{2}$ -fache beobachtet, in befriedigender Ausbeute allerdings erst bei hohen Sättigungsgraden ( $> 0,8$ -fach). Wir haben die Methode bei den Rohpräparaten nicht weiter ausgebaut, da uns seinerzeit noch wirksamere und rascher ausführbare Verfahren zur Verfügung standen, sind aber im Anschluß an letztere gegen Ende dieser Untersuchung darauf zurückgekommen und halten sie — neben der Adsorption — für die aussichtsreichste Operation der weiteren Fermentreinigung.

a) Die Verhältnisse bei der Fällung eines *Rohenzym*s ( $Q_{O_2} = 98$ ) gibt Tab. 15 wieder. Es wurden stets 100 mg Enzym (= 9800 E.E.) in 4 cm Wasser gelöst und unter Eiskühlung Ammonsulfatlösung bestimmten Sättigungsgrads (evtl. festes Ammonsulfat) bis zum Gesamtvolumen von 20 cm zugegeben. Nach raschem Zentrifugieren wurde die wieder in Wasser gelöste Fällung 2 Tage, das Zentrifugat 3 Tage, gegen fließendes Leitungswasser dialysiert.

Tabelle 15.

Sättigungsgrad d. Gesamtlösung	Trocken- gewicht in mg	$Q_{O_2}$	$Q_{O_2}/Q_{O_2}^0$	E.E.	E.E./E.E. <sup>0</sup>	
0	100	98	—	9800	—	
0,33	Fällung . Trübung	—	—	—	—	
	Lösung .	—	—	—	—	
0,5	Fällung . Lösung .	8,6 } 78,6 70	80 115	0,82 1,17	690 } 8740 8050	0,07 } 0,89 0,82
0,7	Fällung . Lösung .	16,4 } 78,9 62,5	175 96	1,79 0,98	2870 } 8870 6000	0,29 } 0,90 0,61
0,8	Fällung . Lösung .	26 } 79 53	186 55	1,90 0,56	4850 } 7660 2810	0,50 } 0,79 0,29

Die Versuche sind, vor allem wegen der kleinen eingesetzten Enzymmengen, sicherlich nicht sehr genau; im besonderen glauben wir nicht, daß dem Enzymverlust im letzten Ansatz eine reale Bedeutung zukommt.

b) Für den Versuch mit *reinerem Enzym* diene das Produkt einer fraktionierten Acetonfällung mit einem  $Q_{O_2}$  von 1215. 238 mg wurden in 10 cm Wasser gelöst und bei 0° mit festem Ammonsulfat bis zum Sättigungsgrad 0,9 versetzt. Die Fällung wird in wenig Wasser aufgenommen und im Eisschrank 36 Stunden gegen destilliertes Wasser

dialysiert. Das Ergebnis dieses Versuchs, bei dem eines unserer bisher reinsten Präparate erhalten wurde, zeigt Tab. 16.

Tabelle 16.

	Trocken- gewicht in mg	$Q_{O_2}$	$Q_{O_2} / Q_{O_2}^0$	E.E.	E.E./E.E. <sup>0</sup>
Ausgangslösung . . .	238	1215	—	290000	—
Ammonsulfatfällung .	100	2700	2,22	270000	0,93

Wie ersichtlich, gelingt bei vorgereinigtem Ferment durch einfache Ammonsulfatfällung eine fast verlustfreie Anreicherung auf über das Doppelte. Wahrscheinlich ließe sich der Effekt durch Einschaltung einer Vorfällung noch erhöhen.

Eine unerwartete Erscheinung trat auf, als wir aus der dialysierten Lösung des obigen Ammonsulfatniederschlags durch fraktionierte Acetonfällung (nach D, b) ein Trockenpräparat herzustellen versuchten.  $\frac{2}{3}$  der Enzymmenge gingen dabei verloren und das erhaltene Produkt zeigte nur mehr einen  $Q_{O_2}$ -Wert von  $\sim 1000$ . Wir nehmen an, daß in diesem Reinheitsstadium durch die Acetonbehandlung eine teilweise *Spaltung* des Ferments in Protein und prosthetische Gruppe bewirkt wird. Diese Erklärung stünde im Einklang mit Beobachtungen am „alten“ Flaviment von Warburg und Christian<sup>1)</sup>.

Womöglich ist es von hier ab zweckmäßig bzw. notwendig, die Reinigung der beiden Teilstücke nach absichtlicher Spaltung *getrennt* fortzuführen, ähnlich wie dies Warburg und Negelein (a. a. O., S. 119) bei der Aminosäure-oxydase getan haben.

### III. Einige Eigenschaften des gereinigten Enzyms.

*Systematische* Untersuchungen über das enzymchemische Verhalten der Glucose-oxydase im heutigen Reinheitszustand haben wir nicht angestellt, da derartige Untersuchungen zweckmäßigerweise erst nach erfolgter *Reindarstellung* des Ferments vorgenommen werden. Wir teilen heute nur das Ergebnis einiger Versuche mit, die z. T. noch in die 1. Mitteilung gehört hätten, z. T. auf Unterschiede in den Eigenschaften von rohem und gereinigtem Enzym hinweisen.

#### A. $O_2$ -Aufnahme und $H_2O_2$ -Bildung.

Wie schon früher (S. 120) erwähnt, sind die Bedingungen unserer Testversuche nicht optimal. Verwenden wir statt

<sup>1)</sup> H. Theorell, a. a. O., S. 121.



des „Normalansatzes“ (S. 125) den „Optimalansatz“, so steigen die  $Q_{O_2}$ -Werte aufs  $2\frac{1}{2}$ —3-fache und erreichen für unsere besten Präparate (z. B. des Versuchs 15) rund 8000. Die „Eigenatmung“ solcher Präparate ist minimal und liegt bei 1 Proc. der Glucoseatmung und darunter.

Der „Optimalansatz“, der stets bei  $30^\circ$  und unter reinem  $O_2$  läuft, hat folgende Zusammensetzung:

- 1 ccm Enzymlösung
- 2 ccm  $\frac{m}{5}$ -Phosphatpuffer ( $p_H$  6,0)
- 2 ccm 2 m-Glucose.

Franke u. Lorenz konnten seinerzeit bei Verwendung ihrer *Rohenzym*-präparate ( $Q_{O_2}$  20—40) das bei der aeroben Funktion der Glucose-oxydase auftretende *Hydroperoxyd* nur nach Vergiftung der gleichzeitig vorhandenen Katalase (z. B. mit  $H_2S$ ,  $NaN_3$ ,  $NH_2OH$  u. dergl.) nachweisen. Bei unseren *gereinigten* Präparaten gelingt dieser Nachweis mühelos — besonders unter den Bedingungen des „Optimalansatzes“ — schon *ohne* Vergiftung, allerdings auch hier noch bei weitem nicht quantitativ.

Es wurden zwei Versuche nebeneinander ausgeführt, 1. mit 1,5 mg Enzym vom (Normal-)  $Q_{O_2}$ -Wert 830, 2. mit 0,5 mg vom  $Q_{O_2}$ -Wert 2500. Nach 60 Minuten waren in beiden Fällen rund 3800 cmm  $O_2$  aufgenommen. Hiervon wurden jodometrisch als  $H_2O_2$  erfaßt

in 1. 4,1 Proc., in 2. 7,1 Proc. der theoretisch maximalen Ausbeute.

### B. Acceptor-spezifität.

Bei *Rohenzym* war es nicht geglückt, den Sauerstoff durch andere Acceptoren als *Chinon* und *Indophenole* zu ersetzen. Bei *gereinigtem* Enzym ist die Auswahl der Acceptoren erheblich größer, sie umfaßt außer verschiedenen *Redoxindikatoren* u. a. auch *Cytochrom c*.

a) *Chinoide Farbstoffe*. Thunberg-Versuche liefen bei  $30^\circ$  mit folgendem Ansatz:

- 0,5 ccm Enzymlösung (= 5 mg,  $Q_{O_2}$  = 830)
- 0,5 ccm  $\frac{m}{5}$ -Phosphatpuffer ( $p_H$  6,8)
- 1 ccm  $\frac{m}{1000}$ -Farbstofflösung
- 1 ccm  $H_2O$  bzw.  $\frac{m}{1}$ -Glucose.

In der folgenden Tabelle sind die Entfärbungszeiten der *Substratansätze* nebst den „Normalpotentialen“ der einzelnen Farbstoffe

bei  $p_H$  7 zusammengestellt. Die Kontrollen ohne Substratzusatz waren auch nach 24 Stunden noch nicht entfärbt.

Tabelle 17.

Farbstoff	$E'_0$	Entfärbungszeit (in Minuten)
Toluylenblau. . . .	0,115	11
Thionin . . . . .	0,062	16
Methylenblau. . . .	0,011	75
Pyocyanin . . . . .	-0,034	31
Safranin T. . . . .	-0,289	> 1400

Die Entfärbungszeiten folgen im großen ganzen den Redoxpotentialen. (Die trotz tieferen Potentials überlegene Reduktionsgeschwindigkeit des *Pyocyanins* gegenüber dem Methylenblau kehrt in verschiedenen anderen enzymatischen Systemen wieder<sup>1)</sup> und hängt höchstwahrscheinlich mit der *einstufigen Hydrierung* [*Semichinonbildung*<sup>2)</sup>] dieses Farbstoffes zusammen.

Die Frage, warum bei höherer Fermentkonzentration — sie ist im vorliegenden Fall etwa 30 mal größer als in den alten Versuchen von Franke u. Lorenz — Acceptoreffekte auftreten, die bei schwächeren Enzymlösungen nicht zu beobachten waren, findet eine befriedigende Beantwortung in dem Hinweis auf bekannte Eigenheiten der Thunberg-Methodik: in den früher negativ verlaufenen Versuchen waren die Zeiten, die zur Entfärbung notwendig gewesen wären, so groß, daß in ihnen — vermutlich unter der Wirkung des Farbstoffs — *Ferment-inaktivierung* eingetreten war.

Die erweiterte Acceptor-spezifität kehrt übrigens bei der *tierischen* Glucose-oxydase wieder, die im Pharynxdrüsensekret der Biene in beachtlich hoher Aktivität —  $Q_0$ , über 200 — vorkommt. (S. 124.)

b) *Cytochrom c*. Eine 5 ccm-Kuvette von 1 cm Durchmesser wurde vollständig mit einem Ansatz folgender Zusammensetzung:

<sup>1)</sup> Lit. hierzu bei Oppenheimer, D. Fermente und ihre Wirkungen, Suppl. S. 1145. (Den Haag 1938).

<sup>2)</sup> Vgl. z. B. L. Michaelis, Oxydations-Reduktionspotentiale (Berlin 1933); Chem. Rev. 16, 243 (1935).

1 ccm Enzymlösung (= 5 mg,  $Q_{O_2} = 830$ )  
 1 ccm  $m'_{1/2}$ -Phosphatpuffer ( $p_H$  6,8)  
 2,5 ccm Cytochrom c-lösung (oxydiert, 0,14-proc.)  
 0,5 ccm 2 m-Glucose

gefüllt und durch eine Deckplatte luftdicht verschlossen. Analog angesetzte Kontrollen ohne Enzym bzw. ohne Glucose liefen nebenher. Versuchstemperatur 25°. Nach verschiedenen langen Zeiten wurde im Strahlengang einer Zeiss-Punktlichtlampe auf das Auftreten der Linien des reduzierten Cytochroms (550 und 520  $m\mu$ ) geprüft, wobei ein Steinheil-Spektrograph zur Anwendung kam. Testlösungen bestimmten Gehalts an (mit  $Na_2S_2O_4$ ) reduziertem Cytochrom dienten zum Vergleich. Das Ergebnis des Hauptversuchs war, daß

nach	$3\frac{1}{2}$	Stunden	20	Proc.	Reduktion,
„	$5\frac{1}{2}$	„	30	„	„
„	$7\frac{1}{2}$	„	40	„	„

erfolgt war; in den beiden Kontrollen zeigten sich auch nach 24 Stunden noch keine Anzeichen beginnender Reduktion.

Das Acceptorvermögen des Cytochroms c im System der Glucose-oxydase steht demnach einwandfrei fest, ist aber quantitativ nur sehr schwach entwickelt. Die Erscheinung als solche ist *enzymtypisch* interessant, doch *physiologisch* wegen der enormen kinetischen Überlegenheit der *direkten*  $O_2$ -Reaktion sicher bedeutungslos; dies um so mehr, als auch die Bedeutung des Cytochromsystems selbst für die Schimmelpilzatmung keineswegs generell erwiesen ist.<sup>2)</sup>

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß der definitorische Wert der „betonten oder ausschließlichen Acceptor-spezifität zum molekularen Sauerstoff“ (Oppenheimer 1937) für die Gruppe der *Oxhydrasen* oder *Aero-dehydrasen* eine zunehmende Einschränkung erfährt. *Wesentlich* ist nur die Fähigkeit zur *direkten Reaktion mit  $O_2$*  (im Gegensatz zu den *Anaero-dehydrasen*); was die *Oxhydrasen* darüber hinaus noch in bezug auf Acceptorverwertung vermögen, ist — zum mindesten definitionsmäßig — belanglos.

<sup>1)</sup> Die Cytochromlösung war nach D. Keilin u. Hartree (Proc. Roy. Soc. [B] 122, 298 (1937) dargestellt; die Konzentrationsbestimmung erfolgte stufenphotometrisch nach A. Fujita und Mitarbeitern, Bio. Z. 301, 377 (1939).

<sup>2)</sup> Vgl. hierzu H. Tamiya u. Hida, Acta phytochim. 4, 215, 343 (1929). — W. Frei, Riedmüller u. Almasy, Bio. Z. 274, 253 (1934).

Wohl reagiert in den vorerwähnten Beispielen die Glucose-oxydase mit den *Farbstoffen* um 2—3 Größenordnungen langsamer als mit  $O_2$ ; andererseits erweist sich *Chinon* schon beim *rohen* Enzym von Franke u. Lorenz als ein dem  $O_2$  kinetisch ebenbürtiger, wenn nicht überlegener Acceptor.

Die Glucose-oxydase steht in der Acceptor-spezifität zwischen dem acceptor-*unspezifischen* Schardinger-Enzym und den ziemlich streng bis absolut acceptor-*spezifischen* Oxhydrasen vom Typus der Aminosäure-oxydase oder Oxal-oxydase. Wie durch die neueren Erkenntnisse der Warburg-Schule, daß sowohl Schardinger-Enzym als auch Aminosäure-oxydase *Flavinfermente* sind, *konstitutionschemisch* die Schranke zwischen den beiden Grenztypen gefallen ist, so erfolgt nunmehr auch durch die Ergebnisse an der Glucose-oxydase eine Überbrückung der Gegensätze.

Vielleicht ist es zweckmäßig, die Bezeichnung *Aero-dehydrasen* für die Gesamtgruppe zu wählen und die Benennung *Oxhydrasen* den betont acceptor-spezifischen Gliedern vorzubehalten.

### C. Donator-spezifität.

Über das Verhalten der Glucose-oxydase gegenüber verschiedenen *Zuckern* lagen bisher nur einige ältere Angaben D. Müllers (S. 117 u. 122 a. a. O.) vor, der die  $O_2$ -Aufnahme von ungepufferten 0,45—0,5 m-Zuckerlösungen, die sich — auf Filtrierpapier aufgesaugt — in einem Respirometer befanden, nach 24 Stunden bestimmte. Eindeutig *nicht* oxydiert wurden Dioxyaceton, l-Arabinose und d-Xylose sowie d-Fruktose; angegriffen wurden die *d-Formen* von *Glucose*, *Mannose* und *Galactose*, die unter den genannten Bedingungen bei 25° 12,4, 4,5 und 4,7 ccm  $O_2$  verbrauchten; zieht man die erhebliche — nahezu das Äquivalent  $CO_2$  liefernde — Eigenatmung der Präparate (1,9 ccm) ab, so resultiert — allerdings mit geringer Genauigkeit — für die Oxydation der 3 Hexosen das Geschwindigkeitsverhältnis 1:0,25:0,27.

Wir haben mit einem weitgehend gereinigten, nahezu leeratmungsfreien Enzympräparat ( $Q_{O_2} = 2000$ ) das Verhalten verschiedener Hexosen in „Normalansätzen“ (S. 125) unter einwandfreien Bedingungen geprüft. Das Ergebnis dieses Versuchs ist in Fig. 1 zur Anschauung gebracht.

Wie man sieht, tritt in unseren kurzdauernden Schüttelversuchen, wo der Substratverbrauch die Reaktionsgeschwindigkeit praktisch noch nicht beeinflußt, die Überlegenheit der *Glucose* noch stärker hervor als in den Versuchen

Müllers. Die 2 Stundenwerte der  $O_2$ -Aufnahmen von Glucose, Mannose und Galactose stehen im Verhältnis 1:0,07:0,14. Von Interesse ist der raschere Umsatz der *Galactose*, verglichen mit *Mannose*, der im Gegensatz zu anderen biochemischen Erfahrungen, z. B. bei der alkoholischen Gärung, steht. Das bekannte, über die gemeinsame Enolform erreichte

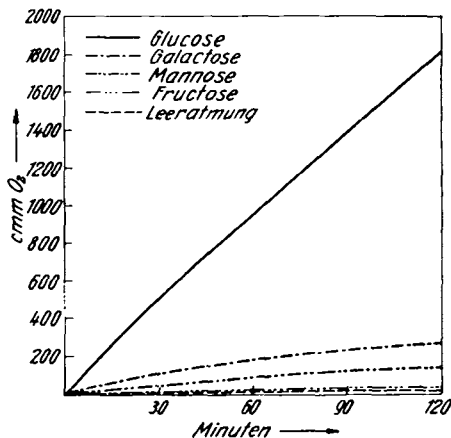


Fig. 1.

$O_2$ -Aufnahme verschiedener Hexosen in Gegenwart gereinigter *Glucose-oxydase* (0,5 mg,  $Q_{O_2} = 2000$ ).

Zymohexosen-gleichgewicht spielt aber in unseren Versuchen sicherlich keine Rolle, wie man schon an der Unangreifbarkeit der *Fructose* erkennt.

Mit einer innerhalb der Fehlergrenzen mit *Galactose* übereinstimmenden Geschwindigkeit wird auch *Maltose* von unserem gereinigten Ferment angegriffen. Das Umsatzverhältnis *Maltose*:*Glucose* ist also für unser Präparat mit  $Q_{O_2} = 2000$  ebenfalls 0,14, während sich in einem anderen Versuch mit einem Enzym von  $Q_{O_2} = 960$  ein Geschwindigkeitsquotient von 0,20 und in einem dritten Ansatz mit einem Rohpräparat ( $Q_{O_2} = 83$ ) ein Verhältnis von 0,41 ergeben hatte. Am einfachsten erklärt sich die mit der Enzymreinigung einhergehende Geschwindigkeitsabnahme der *Maltose*oxydation durch die allmähliche Entfernung der *Maltase* ( $\alpha$ -*Glucosidase*), deren Vorkommen in Rohpräparaten schon D. Müller nachgewiesen hatte. Die Existenz einer von der *Glucose-oxydase* verschiedenen *Maltose* direkt angreifenden „*Maltose-oxydase*“, wie sie von Müller im wesentlichen auf Grund eines

kinetischen Vergleichs von Maltose-spaltung und -oxydation postuliert wird, halten wir für unwahrscheinlich, vor allem schon deswegen, weil Müller für ihre Wirkung doch wieder den Verbrauch von zwei Atomen Sauerstoff — also den gleichen wie im Fall der primären Hydrolyse — annehmen muß. Doch wird erst die geplante kinetische und präparative Untersuchung der Verhältnisse eine endgültige Entscheidung treffen lassen.

#### IV. Zur Frage nach der aktiven Gruppe der Glucose-oxydase.

Schon einleitungsweise (S. 120) waren drei verschiedene Möglichkeiten in bezug auf die chemische Natur der in der Glucose-oxydase enthaltenen Wirkgruppe angeführt worden. Für die Möglichkeit 3 — festgebundenes Pyridin-nucleotid (Codehydrase) — hat sich, außer dem dort bereits erwähnten Analogieargument, kein weiterer Anhaltspunkt im Verlaufe dieser Untersuchung ergeben. Auch für die Möglichkeit 1 — aktives Schwermetall-atom wie Cu oder Mn — haben sich keine Hinweise von größerem Gewicht auffinden lassen.

In Modellansätzen [ $\frac{m}{\%}$ -Glucose gelöst in 2 m-(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> vom p<sub>H</sub> 8,2] ließen sich zwar durch Cu- und Mn-Zusätze von der Größenordnung eines Milligramms einwandfreie katalytische Effekte erzielen ( $Q_{O_2}$  für Cu ~ 100, für Mn ~ 10), doch hatten andererseits Metallzusätze zu einem Glucose-oxydasepräparat von  $Q_{O_2} = 160$  keinen aktivierenden Effekt; nur bei einem reineren Präparat ( $Q_{O_2} = 2200$ ) haben wir einmal bei Mn-Zugabe eine Aktivitätserhöhung um 20 Proc. beobachtet.

Gesteigertes Augenmerk haben wir der am leichtesten kontrollierbaren Möglichkeit 2 — Wirkgruppe von Farbstoffcharakter — geschenkt, im besonderen Maße natürlich, nachdem Warburg und Christian<sup>1,2)</sup> im Jahre 1938 für die unserem Ferment in ihren Eigenschaften nahestehende Aminosäure-oxydase eine flavinhaltige prosthetische Gruppe nachgewiesen hatten.

Die Rohextrakte aus *Asp. niger* zeigen im allgemeinen eine schmutzigbraune Farbe, besonders wenn von conidienhaltigem Mycel ausgegangen und mit schwach alkalischer Phosphatlösung extrahiert

<sup>1)</sup> Naturwiss. 26, 201, 235 (1938); Bio. Z. 295, 261; 296, 294; 297, 417 (1938).

<sup>2)</sup> O. Warburg u. Christian, Bio. Z. 298, 150 (1938); E. Haas, Bio. Z. 298, 378 (1938).

worden war (S. 130 u. 133). Bei der Dialyse und beim Eindampfen fällt ein Großteil der färbenden Verunreinigungen aus, und bei der Alkohol-Ätherfällung werden im allgemeinen grauweiße Produkte erhalten. Bei weiterer Reinigung durch fraktionierte Aceton- und Ammonsulfatlösung tritt in zunehmendem Maße eine warm gelbbraune Färbung der Trockenpräparate auf, die auch in konzentrierteren Enzymlösungen deutlich erkennbar ist.

Wir haben, unserer Vermutung folgend, daß auch die Glucose-oxydase ein *Flavinferment* sei, eine Reihe unserer gereinigten Präparate der *Luminoflavinreaktion* unterworfen.

Hierzu wurden — in Anlehnung an die neuesten Vorschriften der Warburg-Schule<sup>1)</sup> — je 50 mg Enzym in 5 cem n-NaOH gelöst und 1 Stunde lang in einem wassergekühlten Reagenzglas mit einer Osram-Nitralampe bestrahlt. Dann wurde mit 2 n-HCl angesäuert und 2 mal mit je 10 cem Chloroform extrahiert. Die Extrakte wurden auf 10 cem eingengt und unter der Quecksilberlampe auf Vorhandensein und gegebenenfalls Intensität einer gelbgrünen Fluorescenz geprüft. Zum Vergleich dienten Testlösungen bestimmten Luminoflavin-gehalts, die aus einer bestrahlten 5 mg-proc. Lactoflavinlösung<sup>2)</sup> durch Extraktion und entsprechendes Verdünnen mit Chloroform hergestellt waren.

Das Ergebnis dieser Versuchsreihe, das wir für das wichtigste der Untersuchung halten, ist in Fig. 2 zur Anschauung gebracht. Wie man sieht, besteht eine — in Anbetracht der ziemlich rohen Flavinbestimmungsmethode — ausgezeichnete *Proportionalität zwischen Flavin-gehalt und Atmungsgröße  $Q_0$* , der verwendeten Fermentpräparate. Wir halten es dadurch für äußerst wahrscheinlich gemacht, daß dieser Flavin-gehalt der Präparate kein zufälliger ist, sondern der prosthetischen Gruppe der Glucose-oxydase angehört, diese also gleichfalls ein „gelbes Ferment“ im Sinne Warburgs ist.

Nachdem in sämtliche heute bekannten „gelben Fermente“ (vgl. Tab. 18, der noch die *Fumarat-hydrase* F. G. Fischers<sup>3)</sup> anzufügen wäre) — ausgenommen das „alte“ Flavinferment — ein *Alloxazin-adenin-dinucleotid* eingeht, ist die Annahme sehr naheliegend, daß dies auch bei der Glucose-oxydase der Fall ist. Es mag immerhin — im

<sup>1)</sup> Vgl. Anmerkung 2, S. 146.

<sup>2)</sup> Herrn Prof. H. v. Euler, Stockholm, sind wir für die liebenswürdige Überlassung einer Probe reinen Lactoflavins zu Dank verpflichtet.

<sup>3)</sup> Naturwiss. 27, 197 (1939).

Hinblick auf die nahe Verwandtschaft von Glucose-dehydrase und -oxydase (S. 121) — darauf hingewiesen werden, daß man sich dieses Dinucleotid aus der Cozymase durch das Eintreten des Alloxazinrestes an Stelle des Nicotinsäureamids entstanden denken kann.

Über den heute erreichten *Reinheitsgrad* der Glucose-oxydase lassen sich einstweilen auf Grund von Analogieschlüssen nur Vermutungen äußern. Sicher ist, daß auch unsere aktivsten Präparate noch nicht annähernd rein sind.

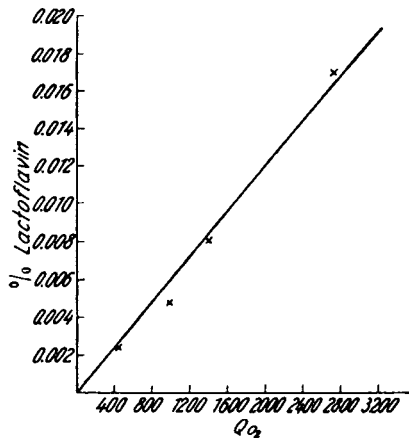


Fig. 2.

Flavin-gehalt von Enzympräparaten verschiedenen  $Q_0$ -Werts.

Um einen Überblick über die quantitativen Verhältnisse zu vermitteln, geben wir nachstehend für verschiedene im reinen oder annähernd reinen Zustand erhaltene „gelbe Fermente“ eine Zusammenstellung der prozentischen *Flavingehalte*, der hieraus unter der Annahme, daß im Fermentmolekül ein Molekül Flavin enthalten ist, berechneten *Molekulargewichte* sowie der — im allgemeinen unter optimalen oder diesen nahekommenden Bedingungen bestimmten — „spezifischen Aktivitäten“  $Q_0$ .

Man erkennt, daß der Flavingehalt der Reinstpräparate durchweg in der Nähe von 0,5 Proc., entsprechend einem Molekulargewicht von rund 70000, liegt — mit alleiniger Ausnahme der Aminosäure-oxydase, von deren Trägerprotein Negelein und Brömel (a. a. O.) daher annehmen, daß der



Tabelle 18.

Ferment	Flavin in %	Mol.-Gew.	Untersuchtes Substrat bzw. System	Q <sub>0</sub> .
1. Schardinger-Enzym <sup>1)</sup> (Xanthin-dehydrase)	0,5	74000	Hypoxanthin	270 (38%)
2. Flavinferment <sup>2)</sup> [Warburg u. Christian 1932 <sup>3)</sup> ]	0,50—0,53	70—75000	Hexose-monophosphat + Dehydrase + Co- dehydrase II	1060 (38%)
3. Aminosäure-oxydase <sup>4)</sup>	0,37 (0,53) <sup>5)</sup>	100000 (70000) <sup>5)</sup>	Alanin	26300 (38%) (37500) <sup>5)</sup>
4. (Muskel-)Diaphorase <sup>6)</sup>	0,54	70000	Lactat + Dehydrase + Codehydrase I + HCN + Methylenblau	160000 (38%)
5. (Hefe-)Diaphorase <sup>7)</sup>	0,57	65000	Hexose-monophosphat + Dehydrase + Co- dehydrase II + Methy- lenblau	> 2600 (25%)

heute erreichte Reinheitsgrad erst 0,7 sei. Der — auch sonst in der Eiweißchemie [Serumalbumin, Hämoglobin<sup>8)</sup>] wiederkehrende Wert von 70000 tritt in der Gruppe der Flavinfermente mit solcher Konstanz auf, daß auch die Glucose-oxydase — falls unsere Auffassung von ihrer Konstitution richtig ist — keine Ausnahme machen dürfte. Das würde aber bedeuten, daß unsere bisher besten Präparate mit einem Flavinegehalt von 0,017 Proc. nur zu rund  $\frac{1}{30}$  aus Glucose-oxydase beständen. Andererseits würde sich aus der optimalen Aktivität dieser Präparate (Q<sub>0</sub> = 8000) eine „spezifische Aktivität“ des reinen Ferments von 240000 errechnen, ein unwahrscheinlich hoher Wert, wenn man bedenkt, daß die „Atmungsgrößen“ der anderen *direkt* mit O<sub>2</sub>

<sup>1)</sup> E. G. Ball, J. biol. Chem. 128, 51 (1939).

<sup>2)</sup> H. Theorell, Bio. Z. 278, 263 (1935).

<sup>3)</sup> Naturwiss. 20, 980 (1932); Bio. Z. 254, 438 (1932).

<sup>4)</sup> E. Negelein u. Brömel, Bio. Z. 300, 225 (1939).

<sup>5)</sup> Eingeklammerte Werte beziehen sich auf das hypothetische Ferment vom Reinheitsgrad = 1.

<sup>6)</sup> F.B. Straub, Biochem. J. 33, 787 (1939); H.S. Corran, Green u. Straub, Biochem. J. 33, 793 (1939).

<sup>7)</sup> E. Haas, Bio. Z. 298, 378 (1938).

<sup>8)</sup> Vgl. z. B. T. Svedberg, Koll. Z. 85, 119 (1938); E. J. Cohn, Chem. Rev. 24, 203 (1939).

reagierenden Fermente (1—3 der Tab. 18) um 1—2 Größenordnungen tiefer liegen. (Die Diaphorase reagieren nicht oder äußerst langsam direkt mit  $O_2$ , weshalb in den Testversuchen Methylenblau als Überträger zugesetzt wurde.)

Wir halten es aus diesem und einem weiteren, gleich mitzuteilendem Grunde für sehr wohl möglich, daß unsere Präparate in Wirklichkeit schon erheblich reiner sind, als die Flavingehalte vermuten lassen. Warburg und Mitarbeiter haben nämlich für die gelöste Aminosäure-oxydase festgestellt, daß diese in sehr merklichem Umfang in aktive Gruppe und Trägerprotein dissoziiert, während allerdings das „alte“ Flavinferment und die Haassche Hefe-Diaphorase keine derartige Dissoziation erkennen lassen. Hätte nun die Glucose-oxydase die gleiche Dissoziationskonstante wie die Aminosäure-oxydase, nämlich  $2,5 \cdot 10^{-7}$  Mol/l, und wäre unser reinstes Präparat nicht 3,3-proc., sondern 10-proc., so würde unter den Bedingungen unseres üblichen Testversuchs — 0,5 mg Enzym/5 ccm — eine rund 70-proc. Dissoziation auftreten, d. h. wir würden in diesem Falle, da ja die Reaktionsgeschwindigkeit proportional der Konzentration des *undissoziierten* Symplexes ist, nur etwa  $\frac{1}{3}$  der total vorhandenen enzymatischen Aktivität erfassen. Ob die Verhältnisse tatsächlich so liegen, wird die Fortsetzung der Untersuchung, bei der vor allem auch die Aufspaltung des Ferments in seine beiden Komponenten versucht werden soll, lehren.

Es mag zuletzt noch die auffallende, doch schon jetzt durch das Material der Tab. 18 erwiesene Tatsache hervorgehoben werden, daß die „spezifischen Aktivitäten“ in der Gruppe der *Flavinfermente* um 2—3 Größenordnungen variieren, während in den *Häminfermenten* (Katalase, Peroxydase, Cytochrom-oxydase) nach R. Kuhn<sup>1)</sup> und J. B. S. Haldane<sup>2)</sup> die Reaktionsgeschwindigkeiten des *Eisens* gegenüber  $O_2$  bzw.  $H_2O_2$  in guter größenordnungsmäßiger Übereinstimmung stehen.

Wir danken der *Bayrischen Akademie der Wissenschaften* für den aus Mitteln der Brunck-Stiftung gewährten Forschungszuschuß. M. Deffner spricht außerdem der *Universität Athen* für das ihm verliehene Stipendium aus der Volto s-Stiftung seinen ergebenen Dank aus.

<sup>1)</sup> Naturwiss. **19**, 771 (1931); H. **201**, 255 (1931).

<sup>2)</sup> Proc. Roz. Soc. [B] **108**, 559 (1931).