

Probleme der Fermentforschung

VON ERNST LÜSCHER

Physiologisches Institut der Universität Bern

Die Proteine nehmen im Lebensgeschehen eine zentrale Stellung ein; ihre Erscheinungsformen und Funktionen im Organismus sind unerhört mannigfaltig. Proteine als solche oder in enger Bindung an andere Substanzen, wie Kohlehydrate, Lipide, aber auch an nieder-

molekulare Verbindungen, sind Inhalt und Strukturelement jeder einzelnen Zelle, wie auch obligater Bestandteil der extrazellulären Körperflüssigkeiten bei höheren Organismen. Diese unerhörte Vielfalt hat zwangsläufig zu einer Aufspaltung und Spezialisierung bei der Erfor-

schung der Biologie der Proteine geführt. Hormonforschung, Immunologie, Fermentforschung, Virusforschung sind nur einige solcher Spezialgebiete, deren Bearbeitung außerhalb des großen Rahmens der Proteinchemie heute undenkbar ist.

Die Fermentchemie stellt somit nur einen willkürlich gewählten Teil aus der großen Zahl biologisch interessierender proteinchemischer Arbeitsgebiete dar, allerdings dasjenige Gebiet, das heute als das am ausgedehntesten bearbeitete gelten kann. Die Tatsache, daß viele Fermente zu den am besten und längsten bekannten Eiweißen gehören, ist auf verschiedene Gründe zurückzuführen:

1. Viele Fermentreaktionen laufen *in vitro*, außerhalb des lebenden Organismus, ab. Sie sind dementsprechend dem Studium leicht zugänglich und daher zum Teil schon seit Jahrzehnten Gegenstand von Untersuchungen.

2. In vielen Fällen bereitet die Beschaffung genügender Mengen von Rohmaterial keine allzugroßen Schwierigkeiten.

3. Vielen Zweigen der Fermentforschung kommt beträchtliche praktische Bedeutung zu, was schon frühzeitig zu deren Förderung beitrug.

1. Definition des Fermentbegriffs

Unter einem Ferment oder Enzym wird ein makromolekularer Katalysator biologischer Herkunft verstanden. Unter den Hunderten bis heute bekannter Fermente findet sich keines, das nicht Eiweiß als integrierenden Bestandteil enthalten würde, so daß wir auf die Gefahr hin, daß es einer späteren Zukunft vielleicht einmal vorbehalten sein wird, ein proteinfreies Ferment aufzufinden, unsere Definition modifizieren können, um zu sagen: *Fermente sind katalytisch wirksame Proteine.*

Tab. 1. Verteilung von Fermenten in der Zelle *

Ferment	Zellkern	Mitochondrien	Mikrosomen	Zellplasma
Cytochromoxydase	0–5,4 %	über 70 %		
Cytochrom c	5 %	50 %	6 %	35–45 %
Cytochrom-c-Reduktase	fehlend	32–49 %	36–58 %	
Katalase	0–4,5 %	18–45 %	7 %	49–66 %
Bernsteinsäureoxydase	0–8 %	56–100 %		
Cholinoxydase	fehlend			
d-Aminosäureoxydase	+ / –	viel		
Xanthinoxydase	fehlend			
Prolinoxydase	fehlend			
Milchsäuredehydrase	0–28,7 %	53 %		18 %
Isocitronensäuredehydrase	wenig	12 %	wenig	80 %
Alkoholdehydrase	15 %	23 %		62 %
Glucosedehydrase	fehlend	fehlend		83 %
Glycerophosphat-Dehydrase	17 %	60 %		23 %
Oxalessigsäureoxydase	10 %	45 %	fehlend	5 %
Cyclophorase-System	fehlend	100 %		
Enolase	vorhanden			
Aldolase	vorhanden	1 %		96 %
Phosphorylase	vorhanden			
Coenzym A	24 %	53 %	3 %	20 %
Kohlensäureanhydrase	wenig			
Transaminasen		viel		
Rhodanase	15 %	62 %	2 %	5 %
Kathepsin	vorhanden			
Peptidasen	vorhanden			
Glutaminase		vorhanden		vorhanden
Desoxyribonuclease	100 %			
Arginase	34 % (Leber)	15 %	27 %	8 %
Esterasen	6,5–17 %	17 %	47–58 %	14–20 %
Lipasen	wenig	17 %	19 %	42 %
Alkalische Phosphatase	10–40 %	17–20 %	0–26 %	21–80 %
Saure Phosphatase	5–10 %	35–40 %	5–22 %	28–50 %
Glucose-6-Phosphat-Phosphatase	2–25 %	5–18 %	47–85 %	1–11 %
Adenylsäure-Phosphatase	40–45 %	40–45 %	5–10 %	10–15 %
Adenosin-Triphosphatase	10–31 %	48–75 %	2–5 %	0–15 %
Cholinesterase	vorhanden			
Hyaluronidase	vorhanden			

* Nach einer Zusammenstellung von K. LANG, 2. Colloquium der Deutschen Gesellschaft für physiologische Chemie, Springer-Verlag, 1952.

2. Verbreitung und Vorkommen von Fermenten

Es gibt wohl kaum eine Reaktion in der lebenden Zelle, die nicht direkt oder indirekt durch Fermente beeinflusst wird. Aus der Mannigfaltigkeit der im Organismus ablaufenden Reaktionen läßt sich leicht ermessen, wie komplex das steuernde Fermentsystem sein muß. Es muß dabei schon hier vorausgeschickt werden, daß in der Regel zu jedem Substrat, das in eine Reaktion in der Zelle eintritt, ein Ferment gehört, das spezifisch diese Reaktion katalysiert.

Tab. 1 enthält Angaben über den Bestand von Warmblüterzellen an Fermenten. Es muß dabei darauf hingewiesen werden, daß die Zusammenstellung schon deshalb unvollständig sein muß, weil wir heute für viele Fermente noch nicht über die Methoden des Nachweises und der Bestimmung verfügen. Wie aus der Tabelle hervorgeht, sind die Zellfermente zu einem hohen Prozentsatz nicht frei in Lösung, sondern vielmehr an die strukturierten Elemente – Kern, Mitochondrien, Mikrosomen – gebunden. Es gibt verschiedene Gründe, anzunehmen, daß die Einlagerung der Enzyme an diese Partikel nicht wahllos nach Art einer unspezifischen Adsorption erfolgt, sondern vielmehr durch einen hohen Ordnungsgrad gekennzeichnet ist, der das Durchlaufen von Reaktionsketten für ein Substrat erleichtert. Nicht nur in den Zellen, sondern auch in extrazellulären Flüssigkeiten finden sich Fermente, zum Teil sogar stark angereichert. Es sei hier nur darauf hingewiesen, daß z. B. die Sekrete der Bauchspeicheldrüse eine recht konzentrierte Lösung proteolytischer Fermente, wie Trypsin und Chymotrypsin, darstellen. Auch das Blutplasma enthält Fermente, für deren nähere Beschreibung auf die zusammenfassenden Arbeiten von SURGENOR und FRUTON¹ verwiesen sei.

Lyo- und Desmo-Fermente: Es ist ein glücklicher Umstand, daß sehr viele Fermente löslich sind (Lyo-Fermente). Diese leichte Extrahierbarkeit unter schonenden Bedingungen ist mit ein Grund dafür, daß derart komplexe Systeme, wie z. B. das Kohlehydrat-abbauende Fermentsystem des Muskels, heute schon in ihrer Funktion und Zusammensetzung überblickt werden können. Daneben sind jedoch auch fest mit den Strukturelementen des Organismus verknüpfte Fermente bekannt, die sogenannten Desmo-Fermente. Ihr Studium ist durch die Unmöglichkeit, in homogenen Lösungen arbeiten zu können, stark erschwert. Es besteht jedoch kein Zweifel, daß auch ihnen eine große Bedeutung im biologischen Geschehen zukommt, und ihre Erfassung und Beschreibung ist denn auch eines der wesentlichen Probleme der modernen Fermentforschung.

3. Isolierung und Reinigung

Da Fermente Proteine sind, ergibt sich von selbst, daß Isolierungsprobleme und Methoden zwangsläufig

dieselben sein müssen wie bei jedem komplexen Eiweißgemisch. Die Arbeit wird dabei erleichtert durch das Vorliegen eines Tests für die biologische Aktivität des gesuchten Produktes. Es kann so in der Regel gearbeitet werden auf der Grundlage Aktivität pro Stickstoffeinheit. Geben weitere Reinigungsprozeduren keine Verschiebung dieses Verhältnisses mehr und zeigen auch physikalisch-chemische Prüfungsmethoden ein einheitliches Bild, so ist man zum Schlusse berechtigt, daß man das gewünschte Ferment zumindest hochgradig angereichert in Händen hat. Diese relativ günstigen Isolierungsbedingungen haben dazu geführt, daß Fermente zu den ersten Proteinen von hohem Reinheitsgrad gehört haben. Heute sind um die vierzig Fermente in kristallisierter Form bekannt, wobei allerdings auch hier, wie generell bei Eiweißen, der kristalline Zustand nicht unbeschön als Kriterium absoluter Einheitlichkeit gewertet werden darf.

Fermentvorstufen (Profermente): Wird bei der Isolierung gewisser Fermente sehr schonend vorgegangen, so gelingt es, anstelle des aktiven Enzyms dessen biologisch inaktive Vorstufe zu erhalten, die sich unter geeigneten Bedingungen spontan oder unter der Mitwirkung gewisser Zusätze – Aktivatoren – in die aktive Form umwandelt. In einzelnen Fällen ist diese Umwandlung eine übersichtliche einstufige Reaktion, wie z. B. im Falle des Pepsinogens, der Vorstufe des Magenferments Pepsin, das unter der Wirkung von Salzsäure in die aktive Form und einen Inhibitor gespalten wird. Oft jedoch sind solche Aktivierungen komplizierte Prozesse, die, wie z. B. beim Chymotrypsin, erst über mehrere Zwischenstufen zum aktiven Produkt führen oder sogar der Mitwirkung eines besonderen Aktivatorsystems bedürfen. Ein solches Aktivierungsphänomen, das schon seit Jahrzehnten viele Forscher beschäftigt, ist z. B. die Blutgerinnung, wo bei der Aktivierung des Prothrombins zum aktiven Thrombin (Gerinnungsferment) die Verhältnisse dadurch besonders komplex werden, daß zum Teil der Aktivator selbst wieder in einer primär inaktiven Form vorliegt.

Der Begriff Aktivator sollte generell nur für solche Verbindungen Anwendung finden, die nicht selbst einen integrierenden Bestandteil des aktiven Fermentmoleküls ausmachen.

4. Cofermente

Eine der klassischen Entdeckungen auf dem Gebiete der Fermentchemie war die Beobachtung von HARDEN YOUNG (1904), daß das Fermentsystem in Hefepreßsaft durch Dialyse die Fähigkeit verliert, Traubenzucker zu vergären, sie jedoch wieder gewinnt, wenn das Dialysat dem nicht dialysierbaren Proteinanteil wieder zugefügt wird. Spätere Untersuchungen haben gezeigt, daß das für dieses Verhalten verantwortliche Ferment die Zymase ist, die offensichtlich in wässriger Lösung dissoziiert in einen für die Fermentwirkung essentiellen, niedermolekularen Anteil und einen hochmolekularen

¹ *The Enzymes of Plasma*, Abschnitt VII in *Blood Cells and Plasma Proteins*, Herausgeber JAMES L. TULLIS, Academic Press, Inc., New York 1953.

Proteinanteil. Nur der ganze Komplex hat jedoch die Eigenschaften des Fermentes. Für diese niedermolekularen «Wirkgruppen» hat sich die Bezeichnung Coferment eingebürgert, der Proteinanteil wird Apoferment und der aktive Komplex beider Holoferment oder Ferment schlechthin genannt. Abb. 1 zeigt das Cofermentmolekül der Zymase, die Co-Zymase, die sich nach Arbeiten von VON EULER als ein Diphospho-Pyridin-Nucleotid erwiesen hat.

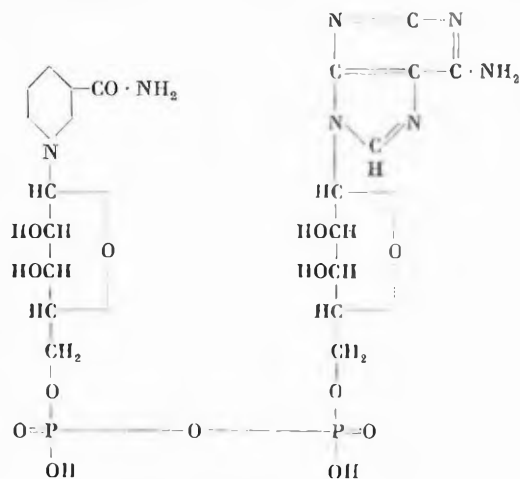


Abb. 1. Co-Zymase

Wir wissen heute, daß recht viele Fermente, besonders solche des Zellstoffwechsels, eine besondere Wirkgruppe enthalten. Die geringe Haftfestigkeit der Co-Zymase ist dabei als ein Spezialfall zu werten; zur Abtrennung der meisten Cofermente sind ungleich drastischere Methoden notwendig, die in vielen Fällen zur Denaturierung des Proteinträgers führen.

Die verschiedenartigsten Verbindungen sind seither als Cofermente festgestellt worden; zum Teil sind es so komplexe Moleküle wie die Co-Zymase, zum Teil jedoch auch erstaunlich einfache Gebilde, im Extremfall nur ein Metallion (Zn z. B. bei Kohlensäure-Anhydrase, Fe unter anderem bei Ascorbinsäure-Oxydase). Es verdient der Erwähnung, daß verschiedene Vitamine ihre Funktion im Organismus als Coferment erfüllen: so z. B. Vitamin B₁ in Form des Pyrophosphates als Cocarboxylase, Vitamin B₂ in Form des Phosphates als Wirkgruppe des gelben Fermentes, in Form des Adenindinucleotides dagegen als Coferment einer ganzen Reihe von Oxydasen.

In vielen Fällen ist der Typus der Reaktion, die sich an der Wirkgruppe abspielt, genau bekannt: Pyridin-Nucleotide sind deshalb wasserstoffübertragende Fermente, weil jedesmal, wenn ein Substratmolekül oxidiert wird, das Pyridinringsystem zum Dihydropyridin reduziert wird; das Fe-Ion tritt deshalb so häufig als prosthetische Gruppe von Oxydo-Reduktions-Systemen auf, weil es zwischen dem zwei- und dreiwertigen Zustand hin und her pendelt, usf.

Es wäre jedoch falsch, aus der Tatsache, daß sich offensichtlich die entscheidende Reaktion am Coferment

abspielt, den Schluß zu ziehen, daß damit dem Proteinanteil eine untergeordnete Bedeutung zukomme. Es ist vielmehr so, daß durch das richtige Trägerprotein die katalytische Wirksamkeit des Cofermentes erst ermöglicht, zumindest aber sehr stark gesteigert wird. Diese Verhältnisse seien an einem Beispiel illustriert (Tab. 2).

Tab. 2. Vergleich der Katalase-Aktivität verschiedener eisenhaltiger Verbindungen in wässriger Lösung

1 Mol Fe ⁺⁺⁺ bzw. Fe ⁺⁺ -Salz	setzt 10 ⁻⁵ Mole H ₂ O ₂ pro Sekunde um		
1 Mol Hämin	„	10 ⁻² Mole H ₂ O ₂	„
1 Mol Hämoglobin	„	10 ² Mole H ₂ O ₂	„
1 Mol Katalase	„	10 ⁵ Mole H ₂ O ₂	„

Hämin, das Coferment der Katalase, ist 10⁷mal weniger aktiv als das Holoferment. Auswechseln des Katalase-Apofermentes gegen Globin führt zu Hämoglobin, das immer noch um drei Zehnerpotenzen weniger wirksam erscheint als Katalase selbst.

Cofermentlose Fermente: Lange nicht bei allen Fermenten ist eine definierte prosthetische Gruppe in der Art eines Cofermentes nachweisbar. So erweisen sich z. B. die Proteinasen (eiweißabbauende Enzyme), die zu den am besten untersuchten Fermenten gehören, als ausschließlich aus Aminosäuren aufgebaut. Dies schließt die Möglichkeit keineswegs aus, daß eine bisher unbekannt gebliebene Aminosäurekonfiguration die Rolle der Wirkgruppe in derartigen Molekülen übernehmen könnte; aber auch dann stehen wir der Tatsache gegenüber, daß eine solche Wirkgruppe einen untrennbaren und nicht unterscheidbaren Teil des Trägers ausmacht.

5. Die Spezifität

Daß ein Ferment in der Regel nur ein Substrat optimal anzugreifen vermag, ist eines der Charakteristika der Fermentwirkung überhaupt und wohl allgemein bekannt. Es stellt sich die Frage, welcher Teil des Fermentes für dieses Verhalten, das wir als Spezifität bezeichnen, verantwortlich zu machen ist. Fermente, deren Wirkgruppe leicht abzuspalten ist, bieten ein geeignetes Material zum Studium dieses Problems, kann doch in solchen Fällen das Coferment willkürlich mit verschiedenen geeigneten Proteinen rekombiniert werden zu Holofermenten, die sich nur im Trägerprotein unterscheiden. Alle derartigen Versuche haben eindeutig den Beweis erbracht, daß es der Proteinanteil ist, der die Spezifität bestimmt. Ein besonders interessantes Beispiel dieser Art sind die leicht dissoziierbaren Fermente des Zymase-Typus (vgl. Abschnitt 4). Es ist gezeigt worden, daß im lebenden Gewebe dasselbe Diphospho-Pyridin-Nucleotid mit verschiedenen Proteinen kombiniert wird und dadurch seine Spezifität ändert.

Diese Treue der Fermente zum Substrat hat auch eine bequeme Grundlage gegeben zu ihrer Bezeichnung und Klassifizierung: Das Ferment wird gekennzeichnet durch Anhängen

Tab. 3. Spezifität der Proteinasen nach BERGMANN

Ferment	Substrat	R*
Pepsin	$\begin{array}{c} \text{R}^* \\ \\ \cdots \text{CO} \cdot \text{NH} \cdot \text{CHR} \cdot \text{CO} \cdot \text{NH} \cdot \text{CH} \cdots \\ \updownarrow \\ \cdots \text{CO} \cdot \text{NH} \cdot \text{CHR} \cdot \text{COOH} + \text{NH}_2\text{CH} \cdots \end{array}$	$\text{HO} \begin{array}{c} \diagup \diagdown \\ \text{C} \\ \diagdown \diagup \end{array} \text{CH}_2 \cdots$ Tyrosyl $\text{CH}_2 \cdots$ Phenylalanyl
Trypsin	$\begin{array}{c} \text{R}^* \\ \\ \cdots \text{CO} \cdot \text{NH} \cdot \text{CH} \cdot \text{CO} \cdot \text{NH} \cdot \text{CRH} \cdots \\ \updownarrow \\ \cdots \text{CO} \cdot \text{NH} \cdot \text{CH} \cdot \text{COOH} + \text{NH}_2\text{CRH} \cdots \end{array}$	$\text{NH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdots$ Lysyl NH_2 $\text{NH} \diagup \text{C} \diagdown \text{NH} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdots$ Arginyl
Chymotrypsin	$\begin{array}{c} \text{R}^* \\ \\ \cdots \text{CO} \cdot \text{NH} \cdot \text{CH} \cdot \text{CO} \cdot \text{NH} \cdot \text{CHR} \cdots \\ \updownarrow \\ \cdots \text{CO} \cdot \text{NH} \cdot \text{CH} \cdot \text{COOH} + \text{NH}_2 \cdot \text{CHR} \cdots \end{array}$	$\text{HO} \begin{array}{c} \diagup \diagdown \\ \text{C} \\ \diagdown \diagup \end{array} \text{CH}_2 \cdots$ Tyrosyl $\text{CH}_2 \cdots$ Phenylalanyl

der Endung -ase an den Namen des Substrates, wobei oft noch die Art der durch das Enzym bewirkten Veränderung zur Verdeutlichung dazwischengeschoben wird; z. B. Xanthinoxidase, das Ferment, das Xanthin oxydiert (zu Harnsäure); Nucleinsäure-Depolymerase, das die hochmolekulare Nucleinsäure depolymerisierende Ferment usw. Das Zusammenfassen in Gruppen gleicher Wirkungsweise ergibt sich dann zwanglos – z. B. Esterasen, die Ester-spaltenden Fermente, Oxydasen, Oxydationsfermente usw.

Schwierigkeiten erwachsen einzig dann, wenn die Bestimmung der Spezifität gewisser Fermente nicht oder nur schwer möglich ist. Dies ist der Fall bei den Proteinasen, der wichtigen Klasse der eiweißabbauenden Fermente, wo das Substrat selbst meist ein äußerst komplexes Gebilde nur mangelhaft bekannter Struktur darstellt. Die Einteilung der Proteinase erfolgte denn auch längere Zeit gestützt auf empirische Befunde: Trypsin und Pepsin unterscheiden sich im pH-Optimum ihrer Wirksamkeit, Chymotrypsin wirkt wie Chymosin milchgerinnend, wodurch es sich vom Trypsin, mit dem es vergesellschaftet vorkommt, unterscheidet, usw. In neuerer Zeit sind in zunehmendem Maße proteolytische Fermente aus Organen isoliert worden, für die diese Kriterien nicht mehr anwendbar waren, und die Frage ihrer Zuordnung zu schon bekannten Enzymklassen wurde zum Problem.

Es ist das Verdienst von BERGMANN und seiner Schule, diese Frage untersucht und konkrete Vorschläge zu ihrer Lösung unterbreitet zu haben. Ihr Vorgehen war so, daß die in Frage kommenden Fermente an synthetisch hergestellten Peptiden wechselnder, aber bekannter Aminosäurezusammensetzung geprüft wurden.

Tab. 3 gibt einen Ausschnitt aus den Ergebnissen dieser Arbeiten² wieder, nämlich die Spezifitäten von Pep-

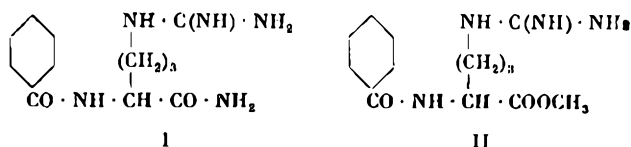
sin, Trypsin und Chymotrypsin gegenüber solchen Modellsubstanzen. Aus diesen Angaben geht hervor, daß Pepsin und Chymotrypsin spezifisch die dem Tyrosyl- oder Phenylalanylrest benachbarte Peptidbindung angreifen, wobei aber im Falle des Pepsins an der charakteristischen Aminosäure die Aminogruppe, im zweiten Falle dagegen die Carboxylgruppe freigesetzt wird. Für Trypsin sind die charakteristischen Aminosäuren, die die Spezifität dieses Fermentes bestimmen, Lysin und Arginin. Wie weit sich diese Verhältnisse bei den Proteinen als Substrate bestätigen lassen werden, bleibt abzuwarten.

Untersuchungen dieser Art, die heute in mehreren Laboratorien weitergeführt werden, sind sehr fruchtbar, besonders bei der Feststellung des Ausmaßes und der Grenzen der Spezifität. Durch Variieren der Modellsubstrate lassen sich so die Einflüsse anderer, in näherer oder weiterer Nachbarschaft zur gespaltenen Bindung stehender Aminosäuren abklären. Solche Einflüsse sind vorhanden und zeigen, daß mit dem Auffinden der in Tab. 3 aufgeführten «charakteristischen» Aminosäuren das Problem noch nicht völlig gelöst ist. Einzelne dieser Modellsubstanzen erweisen sich beim Abbauversuch nicht als Substrate, sondern als Hemmstoffe für das geprüfte Ferment; dies trifft u. a. zu für viele d-Formen von in Peptiden eingebauten Aminosäuren, während die gleiche Verbindung in der l-Form in normaler Weise abgebaut wird. Über einen Fall, bei dem die Grenzen der Spezifität recht weit gezogen erscheinen, haben NEURATH und Mitarbeiter³ vor einiger Zeit berichtet. Nach ihren Beobachtungen ist Trypsin befähigt, nicht nur die Peptidbindung, sondern auch Esterbindungen in geeigneten Substraten zu spalten. Ein solches Sub-

² M. BERGMANN, *Classification of Proteolytic Enzymes*, Adv. Enzymol. 2, 49 (1942).

³ G. W. SCHWERDT, H. NEURATH, S. KAUFMANN und J. E. SNOKE, J. Biol. Chem. 172, 221 (1948); J. E. SNOKE, G. W. SCHWERDT und H. NEURATH, *ibid.* 175, 893 (1948).

stanzpaar ist z. B. Benzoyl-Arginin-Amid (I) und Benzoyl-Arginin-Methylester (II). Aus I wird Ammoniak, aus II Methylalkohol mit gleicher Leichtigkeit durch Trypsin abgespalten.



Reaktionen dieser und ähnlicher Art, die die Grenzen der Spezifität aufzeigen, sind außerordentlich nützlich zur Vertiefung des theoretischen Verständnisses über Wesen und Ursachen der Spezifität.

6. Vorstellungen über den Ablauf von Fermentreaktionen

Praktisch alle Erörterungen hinsichtlich der Natur des Ablaufes von Fermentreaktionen gehen aus von der Annahme, daß an den Beginn der Reaktion die Kollision von Ferment und Substrat zu setzen ist. Zwei Eigenschaften müssen von einem derartigen Komplex gefordert werden. Erstens muß er instabil sein. Ist er stabil, so wird das Substrat das Ferment blockieren, und die Reaktion kann nicht ablaufen. Zweitens muß die Kombination so erfolgen, daß der Spezifität des Reaktionsablaufs Rechnung getragen wird. Aus den schon erwähnten Versuchen an Modellpeptiden geht hervor, daß mehrere Berührungspunkte mit Sicherheit existieren müssen: die zu spaltende Peptidbindung und daneben die «charakteristische» Seitenkette der an der Bindung beteiligten Aminosäure. Um allerdings allen Spezifitätsphänomenen gerecht zu werden, ist es vielleicht besser, von einer «Berührungszone» zu sprechen, in ähnlicher Weise, wie dies für die Antigen-Antikörper-Kombination bei serologischen Reaktionen vorgeschlagen worden ist⁴. Innerhalb dieser Zone sollen Ferment und Substrat sowohl in sterischer Hinsicht wie auch in bezug auf Verteilung und Sinn von geladenen Gruppen genau komplementär gebaut sein, so daß ein enger und hochspezifischer Kontakt, an dem auch VAN DER WAALSsche Kräfte teilhaftig werden, zustande kommen kann.

Die Grenzen der Spezifität wären dann gegeben durch die Ähnlichkeit im räumlichen Aufbau verschiedener Substrate, ein Schluß, der tatsächlich oft durch das Experiment bestätigt worden ist. So erklärt sich beispielsweise auch die «kompetitive» Hemmung von Fermenten durch Substanzen, deren Struktur der des Substrates sehr ähnlich ist.

Die Theorie der Kinetik von Fermentreaktionen, die besonders von MICHAELIS und MENTEN ausgebaut worden ist, basiert ebenfalls auf der Vorstellung eines primär gebildeten Komplexes aus Ferment (E) und Substrat (S), der im Gleichgewicht steht mit den Ausgangsprodukten einerseits und den Endprodukten (E + P) andererseits:

⁴ I. PAULING, J. Amer. Chem. Soc. 62, 2643 (1940); Endeavour 7, 43 (1948).



Die Ergebnisse aus der Anwendung dieser Theorie stehen in guter Übereinstimmung mit den experimentell ermittelten Daten.

Wenn auch gegenüber der Interpretation rein kinetischer Daten eine gewisse Vorsicht angezeigt erscheint, so waren die 1949 von CHANCE veröffentlichten Versuche eindeutig beweisend für die Bildung eines Ferment-Substrat-Komplexes. Durch eine geistreiche optische Registriermethode gelang es ihm, die kurzlebigen Komplexe aus Katalase und Peroxydasen mit den zugehörigen Substraten sichtbar zu machen und deren Bildung und Zerfall messend zu verfolgen⁵.

Andererseits ist die Notwendigkeit eines direkten Kontaktes von Enzym und Substrat in neuerer Zeit auch bestritten worden. ROTHEN⁶ beschrieb 1948 Versuche, bei denen er beobachtet zu haben glaubte, daß Proteine durch Schutzschichten aus Kunststoffen von bis zu 100 Å Dicke hindurch von proteolytischen Fermenten verdaut wurden. Er interpretierte diesen Effekt durch die Annahme von Fernkräften, die, über beträchtliche Distanzen vom Ferment ausgehend, das Substrat beeinflussen sollen. Die Beweiskraft der ROTHENSchen Versuche ist seither mehrfach bestritten worden⁷; auf jeden Fall haben sie bewirkt, daß die ganze Frage der Realität eines Ferment-Substrat-Komplexes erneut aufgerollt wurde.

Zerfall des Ferment-Substrat-Komplexes: Noch spekulativer sind die Vorstellungen hinsichtlich der Vorgänge, die im Ferment-Substrat-Komplex ablaufen müssen, um zum Produkt und neuerdings freigesetzten Ferment zu führen. Wahrscheinlich ist, daß durch die Kombination mit dem Ferment eine Bindung im Substratmolekül durch mechanische oder Ladungskräfte deformiert oder gedehnt wird, bis sie endlich bricht. Es sei dabei in Erinnerung gerufen, daß eine Bindung auch mit andern Mitteln, z. B. durch Erwärmung, in diesen angeregten oder aktivierten Zustand versetzt werden kann; fehlend ist dann jedoch das Element der Selektivität beim Vorliegen mehrerer, energetisch gleichwertiger Bindungen im Substrat.

Die Energie, die benötigt wird, um ein normales Molekül in ein aktiviertes Molekül überzuführen, ist die Aktivierungsenergie ΔH^* , die ihrerseits zusammengesetzt ist aus freier Aktivierungsenergie ΔF^* und den Produkt aus T und ΔS^* (S = Entropie). Es läßt sich zeigen, daß für unsern Fall einer rasch ablaufenden Reaktion ΔF^* , die freie Aktivierungsenergie, zum bestimmenden Faktor wird. Solche ΔF^* -Werte können berechnet werden und bewegen sich in folgenden Größenordnungen (cal/mol), z. B. für Esterhydrolysen: 10000–13000 ohne Ferment,

⁵ B. CHANCE, J. Biol. Chem. 179, 1299, 1311, 1331, 1341 (1949), *ibid.* 180, 865, 947 (1949).

⁶ A. ROTHEN, J. Amer. Chem. Soc. 70, 2732 (1948).

⁷ S. J. SINGER, J. Biol. Chem. 182, 189 (1950); F. KARUSH und B. SIEGEL, Science 108, 107 (1948).

dagegen 4000 als Fermentreaktion. Die entsprechenden Werte für die Hydrolyse von Peptidbindungen sind 20000 (ohne Ferment) und 12000–14000 (fermentativ).

Thermodynamisch ist das Ferment daher zu definieren als eine Substanz biologischer Herkunft, die durch Herabsetzung der freien Aktivierungsenergie eine Reaktion ermöglicht.

7. Fermentative Synthesen

Fermente beschleunigen die Einstellung von Gleichgewichten ungeachtet der Richtung, die die Reaktion dazu nehmen muß. (Auf die *Lage* des Gleichgewichts hat das Ferment dagegen gar keinen Einfluß.) Wir müssen daher erwarten, daß jedes abbauende Ferment dieselbe Reaktion auch aufbauend beschleunigen wird, sofern die äußeren Bedingungen dazu gegeben sind.

Es ist wohl unnötig, die kapitale Bedeutung der fermentativen Synthesen im lebenden Organismus besonders hervorzuheben, sind sie doch der Kernpunkt des ganzen stofflichen Geschehens in der Zelle. Die Tatsache, daß bei geeigneter Arbeitsweise sich häufig die Produkte fermentativer Zellreaktionen isolieren lassen, ist aber auch von großer praktischer Bedeutung. Auf der Fähigkeit der Fermentsysteme, in lebenden Mikroorganismen komplizierteste Synthesen auszuführen bei oft erstaunlicher Anspruchslosigkeit hinsichtlich des Nährmediums, baut sich schon seit jeher die Existenz verschiedener Industrien auf, die an Zahl und Mannigfaltigkeit ihrer Produkte immer mehr zunehmen⁸.

Seltener sind die Fälle, in denen Fermentsynthesen losgelöst vom lebenden Organismus, *in vitro*, ablaufen. Das größte wissenschaftliche Interesse konzentriert sich natürlich auf die Frage nach der *In-vitro*-Synthese von Proteinen unter der Mithilfe von proteolytischen Fermenten. An Modellpeptiden wurde beobachtet, daß Bedingungen existieren, unter denen Proteinasen tatsächlich synthetisch und nicht nur abbauend wirken können. Es ist dabei selbstverständlich, daß sich alle diese Synthe-

sen streng in dem Rahmen bewegen, der durch den Energiegehalt der in die Reaktion eintretenden Bindungen gegeben ist. So können wir im homogenen, isolierten System aus Ferment und reinen Aminosäuren keine Peptidbildung erwarten; häufig sind dagegen in Lösungen, die bereits Peptide enthalten, gekoppelte Reaktionen, bei denen die Energie zum Aufbau einer neuen Verbindung gewonnen wird durch gleichzeitiges Aufbrechen einer andern Peptidbindung. TAUBER⁹ hat denn auch über Versuche berichtet, bei denen aus konzentrierten Peptonlösungen unter Mitwirkung von Chymotrypsin hochmolekulare Gebilde mit Molekulargewichten bis 100000 synthetisiert wurden. Es besteht jedoch kein Zweifel darüber, daß zwischen derartigen, meist schwerlöslichen Polymeren und dem hochorganisierten Proteinmolekül, wie es in der lebenden Zelle entsteht, noch ein gewaltiger Unterschied besteht.

Die Forschungsergebnisse der letzten Jahrzehnte haben uns einen schon recht weitgehenden Einblick in das Wesen und die Gesetze des fermentativen Abbaus verschafft. Das Studium der fermentativen Synthese einerseits und des sinnvollen Zusammenwirkens zwischen Auf- und Abbau in der Zelle andererseits steht erst in den Anfängen und wird die Fermentforscher wohl noch auf Jahre beschäftigen.

Allgemeine Literatur über Fermente

- J. B. SUMNER und G. F. SOMERS, *Chemistry and Methods of Enzymes*, 2. Auflage, Academic Press, Inc., New York 1947.
 R. ABDEHJALDEN, *Vitamine, Hormone und Fermente*, 3. Auflage, B. Schwabe, Basel 1946.
 E. BALDWIN, *Dynamic Aspects of Biochemistry*, University Press, Cambridge 1948.
 J. H. NORTHROP, M. KUNITZ und R. M. HERRIOT, *Crystalline Enzymes*, 2. Auflage, Columbia University Press, New York 1948.
 H. TAUBER, *Chemistry and Technology of Enzymes*, Wiley & Sons, New York 1949.
 J. B. SUMNER und K. MYRBÄCK (Herausgeber), *The Enzymes, Chemistry and Mechanism of Action* (2 Bände zu 2 Büchern), Academic Press, Inc., New York 1950/52.
 TH. BERSIN, *Kurzes Lehrbuch der Enzymologie*, 3. Auflage, Gost & Portig, Leipzig 1951.

⁸ A. HESSER, *Industrial Biosynthesis*, Adv. Enzymol. 9, 653 (1949).

⁹ H. TAUBER, J. Amer. Chem. Soc. 71, 2952 (1949).