



Springer Fachmedien Wiesbaden GmbH

Die Wissenschaft

Sammlung von Einzeldarstellungen aus den Gebieten der Naturwissenschaft und der Technik, herausgegeben von Prof. Dr. Eilhard Wiedemann

1. Curie, Mme. S., **Untersuchungen über die radioaktiven Substanzen.** Übersetzt und mit Literatur-Ergänzungen versehen von W. Kaufmann. 3. Auflage. Mit Abbildungen. Vergriffen.
2. Schmidt, Prof. Dr. G. C., **Die Kathodenstrahlen.** 2. verb. und verm. Auflage. Mit 50 Abbildungen. Geh. 3,— *M.*
3. Thomson, Prof. Dr. J. J., **Elektrizität und Materie.** 2. verb. Auflage. Übersetzt von G. Siebert. Mit 21 Abbildungen. Vergriffen.
4. Freiherr von und zu Aufsess, Dr. Otto, **Die physikalischen Eigenschaften der Seen.** Mit 36 Abbildungen. Geh. 3,— *M.*, geb. 4,50 *M.*
5. Frölich, Dr. O., **Die Entwicklung der elektrischen Messungen.** Mit 124 Abbildungen. Geh. 6,— *M.*
6. Ritter von Geitler, Prof. Dr. Josef, **Elektromagnetische Schwingungen und Wellen.** 2. verm. Aufl. Mit 113 Abbild. Geh. 7,50 *M.*, geb. 9,— *M.*
7. Baumhauer, Prof. Dr. H., **Die neuere Entwicklung der Kristallographie.** Mit 46 Abbildungen. Geh. 4,50 *M.*
8. Werner, Prof. Dr. A., **Neuere Anschauungen auf dem Gebiete der anorganischen Chemie.** 5. durchgesehene Auflage. Geh. 14,— *M.*, geb. 16,— *M.*
9. Faust, Dr. Edw. St., **Die tierischen Gifte.** Geh. 6,— *M.*
10. Lipps, Dr. G. F., **Die psychischen Maßmethoden.** Mit 6 Abbildungen. Geh. 3,50 *M.*
11. Kobold, Prof. Dr. Hermann, **Der Bau des Fixsternsystems mit besonderer Berücksichtigung der photometrischen Resultate.** Mit 19 Abbildungen und 3 Tafeln. Geh. 6,50 *M.*
12. Jäger, Prof. Dr. G., **Die Fortschritte der kinetischen Gastheorie.** 2. verb. und verm. Auflage. Mit 11 Abbildungen. Geh. 5,— *M.*, geb. 6,50 *M.*
13. Doelter, Prof. Dr. C., **Petrogenesis.** Mit 1 Lichtdrucktafel und 5 Abbildungen. Geh. 7,— *M.*
14. Donath, Dr. B., **Die Grundlagen der Farbenphotographie.** Mit 35 Abbildungen und einer farbigen Tafel. Vergriffen.
15. v. Knebel, Dr. phil. Walther, **Höhlenkunde, mit Berücksichtigung der Karstphänomene.** Mit 42 Abbildungen. Geh. 6,— *M.*
16. Geinitz, Prof. Dr. F. E., **Die Eiszeit.** Mit 25 Abbildungen im Text, 3 farbigen Tafeln und einer Tabelle. Geh. 7,— *M.*
17. Gehrcke, Dr. E., **Die Anwendung der Interferenzen in der Spektroskopie und Metrologie.** Mit 73 Abbildungen. Geh. 5,50 *M.*
18. Fischer, Prof. Dr. Otto, **Kinematik organischer Gelenke.** Mit 77 Abbildungen. Geh. 8,— *M.*, geb. 10,— *M.*
19. Wangerin, Prof. Dr. A., **Franz Neumann und sein Wirken als Forscher und Lehrer.** Mit einer Textfigur und dem Bildnis Neumanns in Heliogravüre. Geh. 5,50 *M.*, geb. 7,— *M.*
20. Kuenen, Prof. Dr. J. P., **Die Zustandsgleichung der Gase und Flüssigkeiten und die Kontinuitätstheorie.** Mit 9 Abbildungen. Geh. 6,50 *M.*
21. Rutherford, Prof. E., **Radioaktive Umwandlungen.** Übers. von M. Levin. Mit 53 Abbildungen. Vergriffen.
22. König, Prof. Dr. E., **Kant und die Naturwissenschaft.** Geh. 6,— *M.*
23. Schmidt, Prof. Dr. Julius, **Synthetisch-organische Chemie der Neuzeit.** 2. Auflage. Geh. 18,— *M.*, geb. 20,— *M.*
24. Sackur, Dr. Otto, **Die chemische Affinität und ihre Messung.** Mit 5 Abbildungen im Text. Geh. 4,— *M.*
25. Thomson, Prof. Dr. J. J., **Die Korpuskulartheorie der Materie.** Autoris. Übersetzung von G. Siebert. Mit 29 Abbildungen. Vergriffen.

DIE WISSENSCHAFT

Sammlung von Einzeldarstellungen aus den Gebieten der
Naturwissenschaft und der Technik

Herausgegeben von Prof. Dr. EILHARD WIEDEMANN

BAND 76

Die Enzyme

Wirkungen und Eigenschaften

Von

Ernst Waldschmidt-Leitz

Privatdozent an der Universität München



Springer Fachmedien Wiesbaden GmbH

Die Enzyme

Wirkungen und Eigenschaften

Von

Ernst Waldschmidt-Leitz

Privatdozent an der Universität München

Mit 13 Abbildungen



Springer Fachmedien Wiesbaden GmbH

ISBN 978-3-322-98339-8 ISBN 978-3-322-99074-7 (eBook)
DOI 10.1007/978-3-322-99074-7

A l l e R e c h t e v o r b e h a l t e n

Herrn Geheimrat
Professor Dr. R. Willstätter
in Verehrung und Dankbarkeit
gewidmet

Motto:

Das Studium der enzymatischen Prozesse scheint mir berufen zu sein, auch die Anschauungen über den molekularen Bau komplizierter Kohlenstoffverbindungen zu vertiefen [Zs. f. physiol. Chemie 26, S. 68 (1898)]

E. Fischer

Vorwort.

Der bedeutende Aufschwung, den die Entwicklung der Enzymchemie seit den klassischen Untersuchungen Eduard Buchners in den letzten Jahrzehnten genommen hat, ist in zweifacher Richtung von Bedeutung geworden, einmal für das Streben nach der Isolierung und Beschreibung der reinen enzymatischen Stoffe und ihrer besonderen Wirkungen, sodann für die Verwendung dieser fein abgestimmten Reagenzien zur Auslösung bestimmter chemischer Reaktionen, sei es für die Gewinnung leicht veränderlicher Stoffe der organischen Welt, sei es für die wichtige Aufgabe der Konstitutionsermittlung unerforschter Naturprodukte. Diese Richtlinien, die in den ausgedehnten Arbeiten vor allem von E. Fischer, R. Willstätter, H. v. Euler, L. Michaelis, C. Neuberg und vielen anderen Forschern entwickelt und befolgt worden sind, haben grundlegende neue Erkenntnisse über die Natur und über die Wirkungen der Enzyme zu gewinnen erlaubt. Die Bedeutung, die diese Untersuchungen für die angeführten Probleme erlangt haben, rechtfertigt es, ihre Ergebnisse einem weiteren Kreise naturwissenschaftlich Interessierter zu vermitteln, zumal sie bisher nur in einigen größeren Werken wie den Lehrbüchern von C. Oppenheimer und von H. v. Euler niedergelegt worden sind. So wird dieses Buch bestrebt sein, dem Leser weniger eine umfassende Übersicht über die vielen Einzelerfahrungen der Enzymforschung zu bieten, als ihn mit den wichtigsten allgemeineren Gesichtspunkten, die sich für die Kennzeichnung der Enzyme und ihrer Wirkungen ergeben haben, an anschaulichen Beispielen bekannt zu machen.

Herrn cand. chem. Gerhard Künstner, der mir beim Lesen der Korrekturen behilflich war, schulde ich besonderen Dank.

München, im Juni 1926.

E. Waldschmidt-Leitz.

Inhaltsverzeichnis.

Allgemeiner Teil.

	Seite
I. Zur Entwicklung des Fermentbegriffes	1—6
Fermentatio 1. — Zersetzungstheorie von Liebig 1. — Vitalistische Auffassung von Pasteur 2. — Geformte und ungeformte Fermente 2. — Moderne Fermentlehre seit Buchner 3. — Definition der Enzyme 3. — Stoffliche Natur 3. — Anschauungen von Fodor 4. — Untersuchungen von Willstätter 5.	
II. Die Enzyme als Kolloide	6—8
Merkmale kolloidaler Verteilung 6. — Teilchengröße 7. — Diffusionsgeschwindigkeit 7.	
III. Die Enzyme als Elektrolyte	9—22
Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration 9. — „Puffer“ 9. — p_H -Messung 10. — Aktivitäts- p_H -kurven 11. — Störungen der p_H -Abhängigkeit 12. — Theorie von Michaelis, Enzyme als amphotere Elektrolyte 13. — Anschauungen von Northrop, Ionisation der Substrate 15. — Wanderung im elektrischen Feld 15. — Einfluß der Begleitstoffe 16. — Elektrochemische Adsorption nach Michaelis 17. — Adsorptionsverhalten der Enzyme 18. — Einfluß des Reinheitsgrades 18. — Grundlagen der präparativen Adsorptionsmethoden nach Willstätter 19. — Adsorptionskurven 21. — Elution 21. — Koadsorbenzien, Koeluenzien 22.	
IV. Enzymatische Kinetik	22—57
Massenwirkungsgesetz 22. — Monomolekulare Reaktionen 23. — Wechselnde Kinetik der Saccharasewirkung 25. — Enzymmenge und Reaktionsgeschwindigkeit 26. — Schützische Regel 27. — Enzym-Substratverbindung 28. — Substratkonzentration und Reaktionsgeschwindigkeit 28. — Aktivitäts- p_S -kurven 30. — Dissoziationskonstante K_M 31. — Schwankungen der Affinität 32. — Bildung und Zerfall der Enzym-Substratverbindung 33. — Einfluß der Reaktionsprodukte, Affinitätsmessungen 34. — Verschiedene Arten der Hemmung 37. — Reaktionsgleichung der Saccharasewirkung nach Michaelis und Menten 38. — Wirkung der Wasser-	

stoffionen 40. — Temperaturabhängigkeit 41. — Temperaturinaktivierung 42. — Enzymatische und H-Ionenkatalyse 43. Mechanismus der Enzymwirkung 45. — Ionenreaktion 45. Adsorptionsvorgang 45. — Anwendbarkeit des Massenwirkungsgesetzes 46. — Spezielle Anschauungen v. Eulers 48. — Enzymatische Gleichgewichte und Synthesen 49. — Gleichgewichtslage enzymatischer Reaktionen nach v. Euler 55.

V. Enzymatische Reaktionssysteme (Aktivierung und Hemmung) 57—66

Zymogene 57. — Aktivierung durch anorganische Ionen 58. — Relative, spezifische Aktivierung 59. — Unspezifische Aktivierung und Hemmung 61. — Einfluß von Wasserstoffzahl und Substrat 62. — Spezifische Hemmung 64. — Inaktivierung durch Schwermetallionen 64. — Äquivalentgewichte 65. — Inaktivierung durch Amine 65. — Andere Giftwirkungen 66. — Antienzyme 66.

VI. Enzymatische Spezifität 67—70

Spezifität der Reaktionswege 67. — Spezifität der Reaktionsgeschwindigkeiten, absolute und relative Spezifität 69. — Stereochemische Spezifität 70. — Asymmetrische Synthesen 70.

VII. Richtlinien der präparativen Enzymchemie 71—99

1. Quantitative Bestimmung 71

Enzymausbeute und enzymatische Konzentration 72. — Maßeinheiten der Enzyme 72. — Reduzierte Maßeinheiten 74. — Beispiele 75.

2. Vorkommen und Bildung der Enzyme 76

Einteilung und Vorkommen 77. — Exo- und Endoenzyme 78. — Adsorptive Verankerung 79. — Abstufungen der Löslichkeit 80. — Unlösliche Enzyme 81. — Enzymbildung und Sekretion im tierischen Organismus 82. — Enzymbildung in einzelligen Organismen 83. — Invertinanreicherung in der Hefe 83. — Gewöhnung an bestimmte Substrate 85.

3. Leitlinien der Darstellung und Reinigung 86

Auflösung nach Zerstörung der Zellstruktur 86. — Autolyse 87. — Extraktion nach Trocknung 88. — Dialyse, Elektrodialyse 89. — Fällungsmittel 89. — Adsorptionsmittel 90. — Aufgaben der Adsorptionsmethoden 90. — Beispiel für die Trennung von Enzymen durch Adsorption 92. — Kennzeichnung und Unterscheidung von Adsorptionsmitteln 94. — Reinigung durch Wechsel im Adsorptionsmittel 96. — Leistungsfähigkeit der Adsorptionsmethoden 97. — Reinigung unlöslicher Enzyme 97.

Spezieller Teil.

	Seite
I. Esterasen	100—121
1. Tierische Esterasen	101—114
a) Pankreaslipase	101
Bestimmungsmethoden 101. — Präparative Reinigung 104. — Gewinnung der Drüsenauszüge 104. — Ad- sorptionsverhalten 105. — Reinheitsgrade 106.	
b) Magenlipase	107
p_H -Abhängigkeit 107. — Messung 108. — Steigerung des Reinheitsgrades 108.	
c) Leberesterase	109
Kinetik 109. — Vergleich mit Pankreaslipase 110. Reinigung 111.	
Zur Spezifität tierischer Esterasen	111
Relative Spezifität 111. — Stereochemische Spezi- fität 112. — Giftempfindlichkeit 113.	
2. Pflanzliche Esterasen	114—121
a) Ricinuslipase	114
Wirkungsbedingungen 114. — Masse 115. — Ver- fahren zur Anreicherung 115. — Veränderung bei der Keimung, „Blastolipase“ 117.	
b) Chlorophyllase	118
Wirkung 118. — Analytische Verfahren 119.	
c) Tannase	119
Vorkommen und Wirkungen 119. — Kinetik 120.	
d) Phosphatasen, Sulfatase	120
II. Proteasen	122—151
Zur Bestimmung des proteolytischen Abbaues	123
Vergleich der älteren und neueren Methoden 123.	
1. Eigentliche Proteasen	126—145
a) Pepsin, Lab	126
Sekretion 126. — p_H -Abhängigkeit 126. — Kinetik 127. — Spezifische Wirkungsweise 129. — Präparative Ergebnisse 130. — Milchgerinnung 131. — Zur Unter- scheidung von Pepsin und Lab 131.	
b) Trypsin	132
p_H -Abhängigkeit 132. — Kinetik 133. — Akti- vierung durch Enterokinase 134. — Spontane Akti- vierung 135. — Reinigung und Eigenschaften der Enterokinase 136. — Messung des Trypsins 136. — Verfahren der präparativen Reinigung 137. — Spezi-	

	Seite
fität von Trypsin und Erepsin 138. — Bedeutung der Enterokinase 138.	
c) Thrombin	139
d) Papain	141
Aktivierung durch Blausäure 141. — Spezifität 141. Präparatives Verhalten 143.	
e) Hefeproteasen	144
2. Peptidasen	145—149
Darmerepsin, Pankreaserepsin 145. — Spezifische Wirkungen 146. — Identität von Darm- und Pankreasenzym 147. — Stereochemische Spezifität 147. — p_H -Abhängigkeit 148. — Kinetik 148. — Masse 149. — Präparative Reinigung 149.	
Zur Einteilung der Proteasen	149
III. Aminoacylasen	152—161
1. Histozym	152
Vorkommen und Wirkungen 152. — Löslichkeit 153.	
2. Arginase	153
Vorkommen 154. — Bestimmung und Masse 154. — Spezifität 156.	
3. Urease	156
Vorkommen und Bedeutung 156. — p_H -Abhängigkeit 157. — Aktivierungserscheinungen 158. — Kinetik 159. — Wirkungsweise 160. — Eigenschaften 161.	
IV. Carbohydrasen	161—193
1. Hexosidasen	162—181
a) Fructosidasen: Saccharase	162
Masse 162. — Vorkommen 164. — Darmsaccharase 164. — Spezifität 164. — Freilegung der Hefesaccharase 165. — Verfahren der Autolyse 166. — Beispiele der Reinigung 167. — Abtrennung von Hefegummi 168. — Abtrennung von Phosphor 168. — Reinigung durch auswählende Adsorption 169. — Präparate aus invertinreicher Hefe 170. — Trennung von Maltase 170. — Abtrennung von Zersetzungsprodukten 171. — Zusammensetzung der Saccharasepräparate 171. — Wechselnde Natur des kolloiden Trägers 172.	
b) α -Glucosidasen: Maltase	173
Kinetik, Masse 173. — Spezifität 174. — Bestimmung in der Hefe 175. — Maltaselösungen aus Hefe 176. — Trennung von Saccharase 177.	
c) β -Glucosidasen: Emulsin	177
Reaktionsverlauf der Amygdalinspaltung 177. — Kinetik, Masse 179. — Präparative Isolierung 180.	
d) Galaktosidasen: Laktase, Melibiase	180

	Seite
2. Polyasen	182—193
Amylasen 182. — Vorkommen 182. — Bestimmungsweisen 182. — Aktivierung durch Salze 183. — p_{H} -Abhängigkeit 184. — Grenzabbau, Komplement 185. — Kinetik des Stärkeabbaues 186. — Masse 186. — Zweienzymtheorie der Amylasen 187. — α - und β -Amylasen 188. — Reinigung der Pankreasamylase 189. — Adsorptionsverhalten 190. — Reinigung von Malz- und Takadiastase 191. — Inulinase 192. — Lichenase 193. — Cellulase 193.	
V. Katalasen	193—198
Wirkung und Bedeutung 193. — p_{H} -Abhängigkeit 194. — Kinetik 195. — Wirkungsweise 196. — Aktivität 196. — Präparative Reinigung 197.	
VI. Peroxydasen	198—207
Vorkommen, Wirkungen 198. — Meßmethoden, Maße 199. — Präparative Reinigung 200. — Dialyse im Pflanzenmaterial 200. — Fällung mit Oxalsäure 201. — Fraktionierte Extraktion 201. — Fällung durch Quecksilber und Tannin 202. — Adsorption durch Tonerde und Kaolin 202. — Gang der Peroxydasewirkung, Abtrennung von Zersetzungsprodukt 204. — Peroxydasepräparate 204. — Farbe 205. — Eisengehalt 205. — Peroxydatische Wirkung des Oxyhämoglobins 206.	
VII. Oxydasen	207—213
Mechanismus der biologischen Oxydationen nach Bach, Wieland, Warburg 207. — Wirkungen und Einteilung 211. — Glutathion 211. — Purinoxidasen 212. — Urikase 212. — Tyrosinase 212.	
VIII. Gärungsenzyme	213—221
Alkoholische Gärung 213. — Ko-Zymase, Phosphate 213. — Induktion 214. — p_{H} -Abhängigkeit 215. — Kinetik 215. — Auswählende Gärung, Gewöhnung an Gärsubstrate 215. — Vergärung von Disacchariden 217. — Mechanismus der alkoholischen Gärung 217. — Bedeutung der Phosphorsäureester 217. — Bildung von Milchsäure 218. — Gärung und Kohlehydratabbau im Muskel 218. — Neubergsches Gärungsschema 218. — Carboxylase 219. — Verschiedene Vergärungsformen 219. — Mechanismus der Essigsäuregärung 220. — Carboligase 221.	
Autorenregister	222—228
Sachregister	229—233

Abkürzungen.

A.	Liebigs Annalen der Chemie.
A. ch.	Annales de chimie et de physique.
Am.	American Chemical Journal.
Am. Soc.	Journal of the American Chemical Society.
Ann. d. Physik	Annalen der Physik.
Ann. Inst. Pasteur	Annales de l'Institut Pasteur.
Arch. de Physiol.	Archive de Physiologie.
Arch. exp. Pathol. u. Pharmakol.	Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie.
Arch. int. de Physiol.	Archives internationales de Physiologie.
B.	Berichte der Deutschen Chemischen Gesell- schaft.
Ber. d. Deutsch. Pharm. Ges.	Berichte der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft.
Biochem. Jl.	Biochemical Journal.
Bio. Z.	Biochemische Zeitschrift.
Bl.	Bulletin de la Société Chimique de France.
C.	Chemisches Zentralblatt.
Chem. Weekbl.	Chemisches Weekblad.
C. r.	Comptes rendus de l'Académie des Sciences.
D. Arch. klin. Med.	Deutsches Archiv für klinische Medizin.
Ergebn. d. Physiol.	Ergebnisse der Physiologie.
Fermentf.	Fermentforschung.
H.	Hoppe-Seylers Zeitschrift für Physiologische Chemie.
Helv.	Helvetica chimica acta.
Hofm. Beitr.	Beiträge zur chemischen Physiologie (Hof- meisters Beiträge).
Jahr. wiss. Botanik	Jahrbuch für wissenschaftliche Botanik.
J. of Physiol.	Journal of Physiology.
J. pr.	Journal für praktische Chemie.
Jl. Biol. Chem.	Journal of Biological Chemistry.
Jl. de l'Anat. et Physiol.	Journal de l'Anatomie et Physiologie.
Jl. de Pharm. Chim.	Journal de Pharmacie et de Chimie.
Jl. of gen. Physiol.	Journal of general Physiology.
Klin. Wo.	Klinische Wochenschrift.
Kolloidchem. Beih.	Kolloidchemische Beihefte.
Kolloidz.	Kolloidzeitschrift.

Münchener med. Wochenschr.	Münchener medizinische Wochenschrift.
Naturw.	Die Naturwissenschaften.
Pflüg. Arch.	Archiv für die gesamte Physiologie (Pflügers Archiv).
Pogg. Ann.	Annalen der Physik (Poggendorffs Annalen).
Proc. Am. Soc. Biol. Chem.	Proceedings of the American Society of Biological Chemistry.
Proc. Chem. Soc.	Proceedings of the Chemical Society of London.
Proc. Roy. Soc.	Proceedings of the Royal Society of London
R. Acc. Linc.	Atti della Reale Accademia dei Lincei (Rendiconti).
Rec. trav. chim.	Recueil des travaux chimiques des Pays-Bas.
Skand. Arch. f. Physiol.	Skandinavisches Archiv für Physiologie.
Soc.	Journal of the Chemical Society of London.
Soc. Biol.	Comptes rendus de la Société Biologique.
Virch. Arch.	Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie (Virchows Archiv).
Z. a. Ch.	Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie.
Z. Ang.	Zeitschrift für angewandte Chemie.
Z. Biol.	Zeitschrift für Biologie.
Zbl. f. Bakt.	Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten.
Zbl. f. Physiol.	Zentralblatt für Physiologie.
Z. El. Ch.	Zeitschrift für Elektrochemie.
Zs. exp. Med.	Zeitschrift für experimentelle Medizin.
Zs. f. ges. Brauw.	Zeitschrift für das gesamte Brauwesen.
Zs. f. klin. Med.	Zeitschrift für klinische Medizin.
Zs. rat. Med.	Zeitschrift für rationelle Medizin.

Allgemeiner Teil.

I. Zur Entwicklung des Fermentbegriffes.

Die Kenntnis und die praktische Anwendung gewisser fermentativer Prozesse, so vor allem der alkoholischen Gärung, reicht bis in die vorgeschichtliche Zeit zurück. Allein der Begriff der „fermentatio“, unter dem man in der älteren Zeit die verschiedenartigsten Erscheinungen, insbesondere alle unter Gasentwicklung verlaufenden Prozesse, zusammenfaßte, war noch sehr unklar und äußerlich. Es würde zu weit führen, alle Wandlungen in den Anschauungen über die Natur der verschiedenen bekannten Gärungserscheinungen hier zu erörtern; sie konnten ja auch so lange keine Bedeutung erlangen, wie die chemischen Grundlagen der betreffenden Fermentreaktionen nicht sicher erkannt waren. Erst in der Liebig'schen Ära begann man sich exaktere Vorstellungen vom Verlauf fermentativer Prozesse zu bilden. Zu jener Zeit hatte man auch neben den bis dahin allein bekannten Gärungsvorgängen eine Reihe anderer enzymatischer Reaktionen kennengelernt; dazu gehört die Beschreibung der Amygdalinspaltung durch das Emulsin der bitteren Mandeln von Liebig und Wöhler¹⁾, ferner die Entdeckung eiweißspaltender Fermente, des Pepsins durch Schwann²⁾, des Trypsins durch Corvisart³⁾, endlich die Auffindung der Malzamyrase durch Payen und Persoz⁴⁾.

Die Zersetzungstheorie von J. v. Liebig⁵⁾, die die Fermentprozesse beschrieb als eine Störung des molekularen Gleichgewichtes der Substrate infolge eines chemischen Zerfalls der Fermente selbst, faßte diese Reaktionen zum ersten Male unter einem einheitlichen

¹⁾ A. **22**, 1 (1837); Pogg. Ann. **41**, 345 (1837).

²⁾ Müllers Archiv 1836, S. 90.

³⁾ Zs. rat. Med. **7**, 119 (1858).

⁴⁾ A. ch. **53**, 73 (1833); **56**, 337 (1834).

⁵⁾ A. **41**, 357 (1842); **153**, 1137 (1870); J. pr. N. F. **1**, 35, 312 (1870).

Gesichtspunkt zusammen. Die Liebigsche Erklärungsweise konnte sich indessen nicht lange behaupten und sie wurde bald durch die von L. Pasteur¹⁾ entwickelten Vorstellungen verdrängt, durch dessen klassische Untersuchungen die engen Beziehungen mancher Fermentprozesse wie der alkoholischen Gärung zur Lebenstätigkeit gewisser niederer Organismen aufgedeckt wurden. Solche Prozesse wie die Gärungs- und Fäulnisvorgänge ordnete Pasteur lediglich dem Stoffwechsel von Mikroorganismen zu, und er vertrat die Auffassung, daß sie nur innerhalb der lebenden Zellen vor sich gehen könnten; danach verstand man die alkoholische Gärung als ein Leben der Hefe ohne Sauerstoff. Diese Vorstellungen führten dazu, daß man von diesen geformten Fermenten, deren Funktion an das Leben der Mikroorganismen gebunden war, diejenigen Fermente zu unterscheiden hatte, deren Wirkungen man außerhalb der Zelle wahrnahm, also z. B. die der tierischen Verdauungssekrete; man nannte sie ungeformte Fermente oder Enzyme.

Die vitalistische Auffassung Pasteurs und damit die Unterscheidung zwischen geformten Fermenten und Enzymen ist bis zu Anfang dieses Jahrhunderts in Geltung geblieben. Sie konnte auch nicht erschüttert werden, als man erkannte, daß in manchen Fällen, beispielsweise beim rohrzuckerspaltenden Ferment der Hefe, der Zusammenhang mit der Zelle von wechselnder Festigkeit sein konnte, Beobachtungen, die geeignet gewesen wären, die Unterscheidungsmerkmale zwischen geformten und ungeformten Fermenten zu verwischen; und die insbesondere von M. Berthelot²⁾, von M. Traube³⁾ und von F. Hoppe-Seyler⁴⁾ vertretene Anschauung, daß man auch innerhalb der lebenden Zellen wirkliche Enzyme anzunehmen habe, wurde lange nicht anerkannt. E. Buchner⁵⁾ gebührt das große Verdienst, die Einheitlichkeit des Fermentbegriffs wiederhergestellt und den Bann der vitalistischen Anschauungsweise gebrochen zu haben. Er führte den Nachweis, daß auch der wichtigste Vertreter der geformten Fermente, das Ferment der alkoholischen Gärung, sich unter geeigneten Bedingungen von der lebenden Zelle trennen läßt, daß seine Wirkung in den Preßsäften

1) Die Alkoholgärung, 2. Aufl., Stuttgart 1878.

2) C. r. **51**, 980 (1856).

3) Ges. Abhandl., Berlin 1899.

4) Pflüg. Arch. **12**, 1 (1876).

5) B. **30**, 117 (1897); E. Buchner, H. Buchner und M. Hahn, Die Zymasegärung, München 1903.

der Hefe, unabhängig von der Gegenwart der Zellen selbst, demonstriert werden kann, ein Nachweis, der vordem lediglich an der Unbeständigkeit des Ferments gescheitert war, das unter den gewöhnlichen Bedingungen des Zelltodes ebenfalls der Zerstörung anheimfällt. Auf ähnlichem Wege gelang dann in der Folgezeit die Isolierung anderer Gärungsfermente, wie der der Milchsäure- und Essigsäuregärung.

Mit E. Buchner beginnt die moderne Entwicklung der Fermentlehre, die „Ferment“ und „Enzym“ als identische Begriffe gleichsetzt; nun konnte die Forschung daran gehen, die Untersuchungen über das Wesen und über die Wirkungsweise der Fermente, von neuen und vereinfachten Gesichtspunkten geleitet, wieder aufzunehmen. Die Wirkungsweise der Enzyme, mit der sich spätere Kapitel eingehender befassen werden, ist heute als in großen Umrissen klargelegt zu betrachten; den Untersuchungen über den Verlauf enzymatischer Vorgänge verdanken wir die Erkenntnis, daß die Vermittler dieser Reaktionen, die Enzyme, als reine Katalysatoren aufzufassen sind, ein Gedanke, der schon von E. Mitscherlich¹⁾ und von J. J. Berzelius²⁾ geäußert worden ist; sie sind also zu definieren als bestimmte stoffliche Katalysatoren der organischen Natur mit spezifischem Reaktionsvermögen, gebildet zwar von lebenden Zellen, aber in ihrer Wirkung unabhängig von deren Gegenwart. Ihre Wirkung als Katalysatoren besteht also nur in der Beschleunigung an sich von selbst verlaufender Reaktionen, ohne daß sie durch die Reaktion selbst verbraucht oder verändert werden.

Während heute über die Wirkungsweise der Enzyme nur noch in speziellen Fragen Meinungsverschiedenheiten bestehen, sind unsere Unterlagen für einen anderen wichtigen Teil der gegebenen Definition viel weniger gesichert, nämlich hinsichtlich der Annahme einer bestimmten stofflichen Natur dieser Katalysatoren. Es ist bis heute trotz der in den Arbeiten der Willstätterschen Schule erreichten, in vielen Fällen weitgehenden Reinigung noch nicht gelungen, eines der bekannten Enzyme als chemisches Individuum zu charakterisieren; so hat sich in keinem der untersuchten Fälle die Möglichkeit ergeben, ein Enzym in eine bestimmte Gruppe chemischer Stoffe einzuordnen, und es ist sogar für mehrere von ihnen nachgewiesen worden, daß sie keiner der bekannten Körperklassen an-

¹⁾ Pogg. Ann. **31**, 273 (1834).

²⁾ Lehrbuch der Chemie **6**, 20 (1837).

gehören können. Alle Angaben der älteren und neueren Literatur über die spezielle chemische Natur enzymatischer Stoffe haben sich als irrig erwiesen, und so kennen wir heute außer ihrer spezifischen Wirkung kein charakteristisches Merkmal dieser Körper. Es ist auf Grund solcher Erfahrungen verständlich, daß verschiedentlich, und gerade in neuerer Zeit Einwände gegen die Annahme einer bestimmten stofflichen Struktur dieser Körper ausgesprochen worden sind, obwohl die an deren Stelle gesetzten anderweitigen Vorstellungen den Erfahrungen der präparativen Enzymchemie weit weniger entsprechen. So hat A. Fodor¹⁾ die Ansicht geäußert und verfochten, daß die Enzyme nicht als besondere chemische Individuen von eigenartiger chemischer Struktur, sondern als an sich bekannte Protoplasmabestandteile nur von besonderer kolloider Verteilung, von bestimmter Dispersität, aufzufassen seien. Nach Fodor ist als wesentliche Vorbedingung für den Eintritt der Enzymwirkung die Aufrechterhaltung eines bestimmten Verteilungsgrades anzusehen, mit dessen Verlust der betreffende Stoff auch seine Eigenschaften als Enzym einbüßt; in spezieller Anwendung dieser Anschauung ist dann das rohrzuckerspaltende Enzym der Hefe mit dem Hefegummi, das eiweißspaltende Enzym dieses Pilzes mit einem phosphorhaltigen Protoplasmabestandteil, dem Hefephosphorprotein, gleichgesetzt worden, also mit bekannten Inhaltsstoffen der Hefe, die ihre enzymatische Aktivität nur einem bestimmten Kolloidzustand verdanken sollen.

Noch schärfer als in diesen Betrachtungen drückt sich der Gegensatz zwischen der stofflichen Auffassung der Enzyme und der Aberkennung ihrer chemischen Eigenart in den Untersuchungen von E. Baur²⁾, von E. Herzfeld³⁾ und von R. Ehrenberg⁴⁾ aus, wonach die Enzymwirkung mehr auf eine geeignete Mischung chemisch wohlbekannter Stoffe zurückzuführen ist; in diesem Sinne berichten die Autoren über eine künstliche Bereitung von Fermenten, so über eine Milchsäuregärung durch Pepton oder über die Hydrolyse von Proteinen durch ein Gemisch von Eiweißspaltprodukten.

Die erwähnten Vorstellungen haben in den präparativen Untersuchungen R. Willstätters⁵⁾ indessen keine Stütze gefunden.

¹⁾ Das Fermentproblem. Dresden und Leipzig 1922.

²⁾ Bio. Z. **117**, 96 (1921); G. Schlatter, ebenda **131**, 362 (1922).

³⁾ Ebenda **64**, 103 (1914); **68**, 402 (1915); **88**, 260 (1918).

⁴⁾ Ebenda **128**, 431 (1922).

⁵⁾ Siehe dazu B. **55**, 3601 (1922).

Einmal hat es sich gezeigt, daß im speziellen Falle der Hefesaccharase das Enzym sich vollständig und ohne Einbuße an Aktivität von Hefegummi trennen läßt, mit dem es von Fodor identifiziert worden war; und ganz allgemein hat es sich erwiesen, daß die Abhängigkeit dieses und anderer Enzyme von der Dispersität und der Verteilung nicht so bedeutend ist, wie es der rein kolloidchemischen Anschauungsweise entsprechen würde: die Wirksamkeit des Enzyms wird auch durch grobe dispersoidchemische Veränderungen, beispielsweise durch Adsorption an anorganische Stoffe, gar nicht beeinflußt. Nimmt man dazu die Erfahrungen, die die präparativen Untersuchungen hinsichtlich des spezifischen Adsorptionsverhaltens der Enzyme vermittelt haben und die eine leichte und glatte Trennung auch in ihrer Spezifität nahe verwandter enzymatischer Stoffe, wie der proteolytischen Enzyme der Pankreasdrüse ¹⁾ allein auf Grund spezifischer Adsorptionsaffinitäten erlauben, so dürfte es keinem Zweifel mehr unterliegen, daß die Enzyme nicht als mehr oder weniger spezifische Protoplasmabestandteile nur von besonderer Dispersität, sondern vielmehr als bestimmte und unterscheidbare chemische Individuen reagieren. Nur so läßt sich auch die fein abgestimmte strukturelle Spezifität dieser Stoffe ungezwungen erklären. Es kommt hinzu, daß die präparative Reinigung, wie schon erwähnt, für mehrere wichtige Enzyme ergeben hat, daß sie sich chemisch mit keinem der bekannten Bestandteile des Protoplasmas identifizieren lassen und daß die speziellen Angaben, die Baur, Herzfeld und Schlatter über die Synthese von Fermenten aus Mischungen bekannter Stoffe veröffentlicht haben, alsbald als irrig widerlegt werden konnten ²⁾.

Immerhin haben auch die bei der präparativen Reinigung gesammelten Beobachtungen über die Beständigkeit der Enzyme vor allem in reinerer Form zu dem Ergebnis geführt, daß auch in einfacheren Fällen, wie bei der Hefesaccharase, eine gewisse Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität vom Kolloidzustand besteht, und daß die Veränderungen der enzymatischen Affinität nicht allein mit einer Beeinflussung der spezifischen chemischen Gruppe des

¹⁾ Vgl. E. Waldschmidt-Leitz und A. Harteneck, H. 147, 286 (1925).

²⁾ Chr. Barthel und H. v. Euler, H. 128, 257 (1923); O. Acklin, Bio. Z. 139, 457; 141, 70; 142, 117, 351 (1923).

Enzymmoleküls gedeutet werden können. R. Willstätter¹⁾ vertritt daher die Auffassung, daß die Enzyme sich zusammensetzen aus einem kolloiden Träger und einer spezifischen aktiven Gruppe, welche ihre Bindung an das Substrat vermittelt und deren Aufladung zugleich die Kolloidnatur des ganzen Komplexes bedingt, eine Auffassung, die dem physikalisch-chemischen und dem strukturell-chemischen Verhalten der Enzyme in gleichem Maße Rechnung trägt. Die Aufgabe, nach den spezifischen stofflichen Trägern der enzymatischen Wirkungen zu suchen, verliert damit um so weniger an Berechtigung und Bedeutung, als sie nach wie vor berufen sein wird, zwischen den verschiedenen Anschauungen über die Natur der Enzyme endgültig zu entscheiden.

II. Die Enzyme als Kolloide.

Der kolloidale Charakter der Enzyme und ihrer Lösungen ist bereits im vorhergehenden Kapitel gestreift, und es sind dort die zum Teil zu weit gehenden Schlußfolgerungen behandelt worden, die man mit diesen Eigenschaften verknüpft hat. In der Tat zeigen alle bisher in der Literatur beschriebenen Enzympräparate die Merkmale kolloidaler Verteilung, wengleich man zu berücksichtigen hat, daß sie in vielen Fällen durch beigemischte hochmolekulare Zellinhaltsstoffe vorgetäuscht sein können; allein auch die am weitgehendsten gereinigten Lösungen der Hefesaccharase in den Arbeiten von R. Willstätter und von H. v. Euler zeigen noch den für kolloide Lösungen charakteristischen Tyndalleffekt. Ein weiteres Merkmal, das die Enzyme im Sinne der üblichen Definition in das Reich der Kolloide einzureihen erlaubt, bildet ihr Verhalten gegenüber semipermeablen Membranen wie Pergament, Kollodium oder tierischer Membran, die sich für Enzyme als undurchlässig erwiesen haben; und nicht zuletzt weisen ihre ausgeprägten Adsorptionsaffinitäten, die in folgenden Abschnitten eingehender zu besprechen sind, sie in die Reihe oberflächenaktiver Stoffe.

Am stärksten ausgeprägt erscheint der kolloidale Charakter bei den wasserunlöslichen, wahren intrazellulären Enzymen, als deren charakteristischer Vertreter zufolge R. Willstätter und

¹⁾ Vgl. R. Willstätter, J. Graser und R. Kuhn, H. **123**, 1, und zwar S. 45 und 59 (1922).

E. Waldschmidt-Leitz¹⁾ das fettspaltende Ferment des Ricinusamens angesehen werden darf. Diese Lipase erweist sich sogar als höchst unbeständig gegen Wasser und Elektrolytlösungen; sie „ist entweder durch Adsorption an einen unlöslichen Träger aus der Proteingruppe verankert ... oder aber die Proteinsubstanz ist der kolloide Träger der lipatisch-aktiven Gruppe als ein Bestandteil des Lipasemoleküls selbst“.

Das hauptsächlichste und bestimmende Merkmal des kolloiden Zustandes ist durch die Teilchengröße gegeben, d. h. den Grad des Zusammenschlusses der Moleküle eines Stoffes zu höheren Aggregaten; zufolge der Abgrenzung der kolloiden Stoffe bewegt sie sich für diese zwischen Durchmessern von 1 bis 100 $\mu\mu$. Eine Anzahl von Methoden zur Bestimmung dieser Größe, wie das Verfahren der Ultrafiltration oder die Bestimmung von Gefrierpunktniedrigung und Siedepunktserhöhung, sind für die Messung von Enzymlösungen nicht anwendbar, sei es wegen der durch die Anwesenheit von Begleitstoffen bedingten Störungen, sei es wegen ihrer geringfügigen Ausschläge. Dagegen hat die Methode der Molekulargewichtsbestimmung auf Grund der Diffusionsgeschwindigkeit einige Anhaltspunkte für die Größe von Fermentteilchen gegeben; sie hat den Vorteil, daß sie die Enzyme unabhängig von den neben ihnen in Lösung befindlichen Stoffen zu untersuchen erlaubt, sofern nicht, wie zu berücksichtigen bleibt, Assoziationen des Enzyms mit Begleitstoffen vorliegen. Man mißt die Geschwindigkeit, mit der das Enzym aus seiner Lösung gegen das reine Lösungsmittel diffundiert; der hieraus zu berechnende Diffusionskoeffizient D ²⁾ steht zu dem gesuchten Molekulargewicht M in der einfachen Beziehung:

$$D \sqrt{M} = \text{const},$$

wobei nach L. W. Oeholm³⁾ für Wasser von 20° $k = 7,0$ zu setzen ist.

Die Messungen des Molekulargewichts, die nach diesem Verfahren R. O. Herzog⁴⁾ an einer Reihe von Enzymlösungen und

1) H. **134**, 131 (1923/24).

2) Vgl. W. Kawalki, Wied. Ann. **52**, 166, und zwar S. 185 (1894); A. Einstein, Ann. d. Phys. **19**, 303 (1906); Z. El. Ch. **14**, 237 (1908).

3) Ph. Ch. **50**, 309 (1904/05); **70**, 378 (1910).

4) Z. El. Ch. **13**, 533 (1907); Bio. Z. **11**, 172 (1908).

nach ihm H. v. Euler¹⁾ an Hefesaccharase ausgeführt hat, sind in den Tabellen 1 und 2 wiedergegeben.

Tabelle 1²⁾.

Enzym	D (18°)	M	Mittlerer Durchmesser r ($\mu\mu$)
Pepsin	0,070	10 000	4,2
Lab	0,066	11 200	4,4
Emulsin	0,036	37 700	8,2
Invertin	0,033	44 900	9,0

Tabelle 2¹⁾.

Reinheitsgrad (I_p)	D (20°)	M
4,6 — 3,8	0,0425	28 000
11,5 — 7,7	0,047	22 000
84,0 — 32,2	0,0488	20 600
220 — 200	0,0500	19 600

Wie die Tabellen zeigen, schwanken die ermittelten Werte des Molekulargewichts zwischen 10 000 und 45 000, während der nach dem nämlichen Verfahren für Eieralbumin ermittelte Wert 14 000 beträgt. Aus den Eulerschen Messungen erhellt des weiteren, daß von einem gewissen Reinheitsgrade an das Diffusionsvermögen ziemlich konstant gefunden wird, also keine deutliche Beeinflussung durch Begleitstoffe mehr zeigt. Es ist jedoch zu bemerken, daß abgesehen von dem nicht bestimmbareren Einfluß einer Assoziation des Enzyms mit Begleitstoffen die hier wiedergegebenen Zahlen nur Mindestwerte des Molekulargewichts darstellen, da die Oeholmsche Konstante $D\sqrt{M} = 7,0$ nach den bei Proteinen erhaltenen Ergebnissen zu niedrige Werte liefert. Immerhin zeigen diese Messungen, daß der Durchmesser der Enzymteilchen in der Größenordnung mit den für höhere Proteine ermittelten Werten übereinstimmt.

¹⁾ H. 73, 335 (1911); 110, 190 (1920); 113, 59 (1920); Kolloidz. 31, 3 (1922).

²⁾ Z. El. Ch. 13, 533 (1907); Bio. Z. 11, 172 (1908).

III. Die Enzyme als Elektrolyte.

Die Anschauung, daß die Wirksamkeit der Enzyme von ihrer elektrischen Ladung abhängt, hat zuerst J. Loeb¹⁾ im Jahre 1909 geäußert; sie knüpfte an die schon lange bekannte Abhängigkeit der Pepsinwirkung von der Gegenwart starker Säuren. Dieser Abhängigkeit der Enzymwirkung von der Acidität bzw. Alkalinität der Lösung, die man auch bei anderen Enzymen wahrgenommen, hatte man lange Zeit nicht genügende Beachtung geschenkt; meist begnügte man sich für die Messung von Enzympräparaten mit der Einstellung bestimmter Titrationsaciditäten. Es ist das Verdienst von S. P. L. Sørensen²⁾ und von L. Michaelis³⁾, die große Bedeutung der Wasserstoff- bzw. Hydroxylionenkonzentration für die Aktivität der Enzyme erkannt und hervorgehoben zu haben. Die Einhaltung konstanter Wasserstoffionenkonzentration, wie sie von diesen Forschern für die Messung enzymatischer Präparate eingeführt wurde, hat dazu beigetragen, die Unsicherheiten, mit denen viele dieser Messungen behaftet waren, zu vermindern und ihre Vergleichbarkeit zu fördern. Die Bedeutung, die die Beachtung der H-Ionenkonzentration für die Entwicklung der Enzymchemie gewonnen hat, rechtfertigt es, kurz die zur Einstellung und Messung bestimmter Aciditäten dienenden Verfahren zu beschreiben.

Als Regulatoren für die Herstellung und Innehaltung bestimmter H-Ionenkonzentrationen dienen die von Sørensen und Michaelis empfohlenen sogenannten „Puffer“, das sind geeignete Salzmischungen, deren Acidität durch den Hinzutritt von Säure, Lauge oder amphoteren Stoffen in gewissen Grenzen keine erhebliche Änderung erfährt, die also eine Aciditätsänderung durch schon vorhandene oder im Verlauf der Enzymwirkung gebildete Produkte hintanzuhalten vermögen; in besonderem Maße eignen sich hierzu Salze dreibasischer Säuren wie der Phosphor- oder Zitronensäure und ganz allgemein die Salze schwacher Säuren oder Basen bzw. amphotere Stoffe selbst. Nachstehende Tabelle 3 verzeichnet eine Anzahl solcher Pufferlösungen neben ihrem speziellen Geltungsbereich; die Konzentration der Wasserstoffionen ist daneben

¹⁾ Bio. Z. **19**, 534 (1909).

²⁾ Bio. Z. **21**, 131, und zwar S. 255 (1909); *Ergebn. d. Physiol.* **12**, 393 (1912).

³⁾ Siehe dazu „Die Wasserstoffionenkonzentration“, 1. Aufl., Berlin 1914; 2. Aufl., 1. Teil, Berlin 1922.

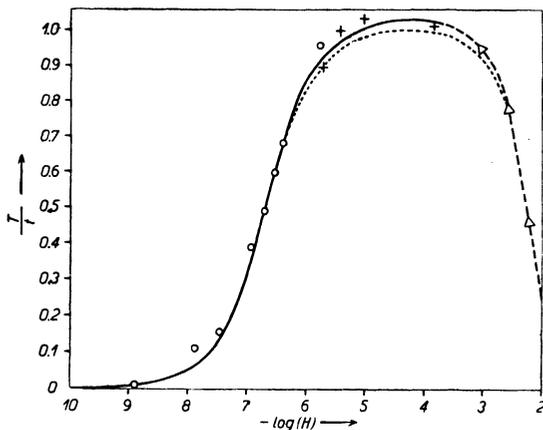
durch das nach dem Vorschlag von Sørensen gebräuchliche, vereinfachte Maß $p_H =$ Wasserstoffionenexponent oder Wasserstoffexponent veranschaulicht, das den negativen dekadischen Logarithmus der H-Ionenkonzentration darstellt.

Tabelle 3.
Puffermischungen nach Sørensen und Michaelis.

Puffermischung	Geltungsbereich (18°)	
	(H')	p_H
Glykoll—Salzsäure	$7,08 \cdot 10^{-2} - 2,09 \cdot 10^{-4}$	1,15 — 3,68
Essigsäure—Acetat	$5,76 \cdot 10^{-4} - 0,28 \cdot 10^{-6}$	3,24 — 6,55
Primäres—sekundäres Phosphat .	$0,64 \cdot 10^{-5} - 0,61 \cdot 10^{-8}$	5,19 — 8,21
Ammoniak—Ammonchlorid	$1,02 \cdot 10^{-8} - 1,0 \cdot 10^{-11}$	7,99 — 11,00
Glykoll—Natronlauge	$2,63 \cdot 10^{-9} - 1,07 \cdot 10^{-13}$	8,58 — 12,97

Die Messung der H-Ionenkonzentration oder des p_H einer Lösung erfolgt nach dem Vorschlag von Michaelis entweder durch direkte Bestimmung ihres Potentialgefälles gegen eine Wasser-

Abb. 1.

Aktivitäts- p_H -kurve des Invertins.

stoffelektrode oder aber rascher, wenn auch weniger sicher, durch den kolorimetrischen Vergleich der Färbung bestimmter Indikatoren mit der einer Lösung von bekanntem p_H ¹⁾.

¹⁾ Bezüglich der Einzelheiten dieser Methoden muß auf die Monographie von Michaelis „Die Wasserstoffionenkonzentration“ verwiesen werden.

Mit Hilfe dieser Methoden ist zuerst von Sørensen und von Michaelis, später von anderen Forschern die Abhängigkeit der Aktivität vom p_{H} für eine große Anzahl von Enzymen gemessen worden; dabei ergab sich für jedes der untersuchten Enzympräparate ein charakteristischer optimaler Wirkungsbereich. Die gewonnenen Beziehungen werden gewöhnlich durch die sogenannten Aktivitäts- p_{H} -kurven wiedergegeben, die die relative Aktivität mit dem p_{H} vergleichen. So erhielten L. Michaelis und H. Davidsohn¹⁾ beispielsweise für die Aktivität des rohrzuckerspaltenden Enzyms der Hefe, des Invertins, die nachstehend wiedergegebene p_{H} -Kurve, die eine breite optimale Wirkungszone des Enzyms zwischen p_{H} 3,5 und 5,5 erkennen läßt.

In der folgenden Tabelle 4 sind die für die wichtigsten Enzyme ermittelten Aciditätsoptima zusammengestellt, soweit sie bekannt sind.

Die Tabelle berücksichtigt nur die exaktesten und einwandfreiesten Messungen der Literatur; auch gelten ihre Angaben fast ausschließlich für die rohen Enzympräparate.

Tabelle 4.
 p_{H} -Optimum einiger Enzyme.

Enzym	p_{H} -Optimum	Autor
Pankreaslipase .	8	Davidsohn ²⁾
Magenlipase . .	4—5	"
Ricinuslipase . .	4,7	Haley und Lyman ³⁾
Pepsin	1,5—1,6	Sørensen ⁴⁾
Trypsin	7,8—8,7	Waldschmidt-Leitz ⁵⁾
Erepsin	7,8	Waldschmidt-Leitz und Harteneck ⁶⁾
Urease	7,0	van Slyke und Zacharias ⁷⁾
Saccharase . . .	4,2	Michaelis und Davidsohn ⁸⁾
Maltase	6,1—6,8	Michaelis und Rona ⁹⁾
β -Glucosidase . .	5	E. Fischer ¹⁰⁾
Pankreasamylase	6,7—7,0	Sherman, Thomas und Baldwin ¹¹⁾
Malzamylase . .	4,6—5,2	Lüers und Wasmund ¹²⁾
Katalase	7	Sørensen ¹³⁾

¹⁾ Bio. Z. **35**, 386 (1911). — ²⁾ Bio. Z. **49**, 249 (1913). — ³⁾ Am. Soc. **43**, 2664 (1921). — ⁴⁾ Bio. Z. **21**, 131 (1909). — ⁵⁾ H. **132**, 181 (1923/24). — ⁶⁾ H. **147**, 286 (1925). — ⁷⁾ Jl. Biol. Chem. **19**, 181 (1914). — ⁸⁾ Bio. Z. **35**, 386 (1911). — ⁹⁾ Ebenda **57**, 70; **58**, 148 (1913). — ¹⁰⁾ H. **107**, 176 (1919). — ¹¹⁾ Am. Soc. **41**, 231 (1918/19). — ¹²⁾ Fermentf. **5**, 169 (1920/21). — ¹³⁾ l. c. 4.

In vielen Fällen hat man nicht genügend darauf geachtet, Störungen und Fehler zu vermeiden, die die Meßresultate beeinträchtigen oder entstellen. So hat man zu berücksichtigen, daß die Beständigkeit der Enzyme sich mit der Acidität in wechselndem Maße verändert; zwar fällt für einige von ihnen, wie für die Hefesaccharase, das Optimum der Stabilität mit dem Wirkungsoptimum zusammen, andere Enzyme dagegen, beispielsweise das Trypsin der Pankreasdrüse, sind im Bereich ihres Reaktionsoptimums in den rohen Präparaten nicht am beständigsten. In solchen Fällen kann daher die Form der Aktivitäts- p_H -kurve und die Lage ihres Scheitelpunktes willkürlich entstellt sein, sofern man nicht Sorge trägt, beispielsweise durch Anwendung niedriger Versuchstemperaturen und kurzer Bestimmungsdauer, den Einfluß der Enzymzerstörung auszuschalten. Andere Störungen, die nicht immer berücksichtigt worden sind, betreffen eine Wirkung der Wasserstoff- bzw. Hydroxylionen auf das Substrat selbst, die in manchen Fällen, so bei proteolytischen Messungen, Kontrollversuche erforderlich macht; und es gibt endlich Fälle, zu denen die Spaltung echter Fette durch tierische Lipasen zu rechnen ist, bei welchen die exakte Messung des Reaktionsoptimums an der Unmöglichkeit scheitert, den Einfluß stark p_H -ändernder Spaltprodukte hinreichend auszuschalten.

Die Abhängigkeit der Enzymwirkung von der Wasserstoffzahl und insbesondere die Lage des Reaktionsoptimums wurden in den Untersuchungen der Michaelisschen Schule als ein charakteristisches Merkmal der einzelnen Enzyme angesehen. So ist die Bestimmung des p_H -Optimums in vielen Fällen zur Unterscheidung enzymatischer Individuen herangezogen worden; man glaubte beispielsweise bei tierischer Amylase zwischen verschiedenen Amylase-Salzkomplexen unterscheiden zu sollen, nachdem sich für den Zusatz verschiedener Neutralsalze wechselnde Aciditätsoptima der Stärkespaltung ergeben hatten ¹⁾. Die Untersuchungen R. Willstätters ²⁾ haben indessen gezeigt, daß bei manchen Enzymen, so bei tierischen Lipasen, die Abhängigkeit von der Wasserstoffzahl, so wie sie gefunden wird, durch ganz andere, kompliziertere Faktoren vorgetäuscht oder entstellt werden kann; „der Einfluß der Wasserstoffzahl wird von der Aktivierung und Hemmung durch

¹⁾ Siehe dazu L. Michaelis und H. Pechstein, *Bio. Z.* **59**, 77 (1914).

²⁾ R. Willstätter, E. Waldschmidt-Leitz und Fr. Memmen, *H.* **125**, 93, und zwar S. 97 (1922/23).

Begleitstoffe und Reaktionsprodukte überdeckt“. So hat es sich ergeben, daß die Lipase des Magens, die, wie aus Tabelle 4 ersichtlich, auf Grund ihres in rohem Zustand, nämlich im Magensaft selbst ermittelten sauren Reaktionsoptimums von der Pankreaslipase unterschieden wurde, in reinerem Zustand hinsichtlich dieser Eigenschaft mit dem pankreatischen Enzym identifiziert werden kann. Sie findet sich nämlich in ihrem natürlichen Sekret zusammen mit einem Stoffe, der ihre Wirkung bei alkalischer Reaktion hemmt; mit der Abtrennung dieses Stoffes verschiebt sich die Lage ihres Reaktionsoptimums schrittweise, um schließlich mit der des Pankreasenzyms zusammenzufallen, sie wandert also vom sauren ins alkalische Gebiet. Die nachstehende Tabelle 5, die dieses Verhalten an der Lipase des Hundemagens veranschaulicht, ist einer Untersuchung von R. Willstätter, F. Haurowitz und Fr. Memmen¹⁾ entnommen.

Tabelle 5.
 p_{H} -Abhängigkeit der Hundemaglipase.

Enzympräparat	Optimum bei p_{H}	Minimum bei p_{H}
Lipaselösung aus Mucosa	5,5—6,3	8,6
Essigsäurefällung	5,5—6,3	8,6
Elektrodialysat	6,3—7,1	4,7
Nach Reinigung mit Kaolin	7,1—7,9	4,7

Die theoretische Deutung, die L. Michaelis²⁾ den beobachteten p_{H} -Aktivitätskurven der Enzyme gegeben hat, beruht auf der Annahme, daß die Enzyme selbst als amphotere Elektrolyte aufzufassen seien, als Stoffe von zugleich basischem und saurem Charakter, die je nach dem p_{H} in wechselndem Verhältnis als Anionen, Kationen oder in undissoziierter Form auftreten. Die in Abb. 1 wiedergegebene Aktivitäts- p_{H} -kurve der Saccharase entspricht nun beispielsweise nach Michaelis, wenigstens in ihrem alkalischen Ast, der Form einer sogenannten Dissoziationsrestkurve, das ist der des undissoziierten Anteils der Saccharase, der sich als Funktion der H-ionenkonzentration durch die Beziehung ausdrücken läßt:

$$\varrho = 1 - \gamma = 1 - \frac{K}{K + (\text{H}')} = \frac{(\text{H}')}{K + (\text{H}')},$$

¹⁾ H. 140, 203 (1924).

²⁾ L. Michaelis und H. Davidsohn, Bio. Z. 35, 386 (1911).

wenn ϱ den Dissoziationsrest, γ den Dissoziationsgrad und K die Dissoziationskonstante der Saccharasesäure bedeutet; diese selbst entspricht, da für den speziellen Fall $(H^+) = K$ in obiger Gleichung sich ϱ zu 0,5 ergibt, derjenigen H-Ionenkonzentration, für die die Aktivitäts- p_H -kurve die Hälfte der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit anzeigt; so ergibt sich im angeführten Beispiel für die Saccharase $K = 10^{-6,7}$.

Diese Ergebnisse besagen nach Michaelis, daß als der wirksame Anteil der Hefesaccharase ihre undissoziierten Moleküle anzusehen sind und daß bei verschiedener H-Ionenkonzentration jeweils nur ein gewisser Bruchteil des Enzyms in undissoziierter, also katalytisch wirksamer Form vorhanden ist; daß die Form der Kurve hier den Dissoziationsrest einer Säure und nicht, wie gleichfalls möglich, den dissoziierten Anteil einer Base anzeigt, folgert Michaelis aus den Untersuchungen über das Adsorptionsverhalten und die Wanderung des Enzyms im elektrischen Felde, die auf seinen sauren Charakter hinweisen. In ähnlicher Weise sind die Aktivitäts- p_H -kurven anderer untersuchter Enzyme von Michaelis gedeutet worden; so ergab die Analyse für das Trypsin, daß seine wirksamen Anteile durch die Fermentanionen dargestellt werden.

Die ursprünglichen Schlußfolgerungen von Michaelis, wonach für den Fall der Saccharase nur ihren undissoziierten Anteilen enzymatische Aktivität zukomme, diese demnach nur auf den elektrochemischen Charakter des Enzyms selbst zurückzuführen sei, sind indessen durch Untersuchungen von L. Michaelis und M. Rothstein¹⁾ und von R. Kuhn²⁾ in Frage gestellt worden, in denen sich nachweisen ließ, daß entgegen der theoretischen Folgerung die Aktivitäts- p_H -kurve des Enzyms bei wechselnder Rohrzuckerkonzentration sich nicht ändert, und daß andererseits das Gleichgewicht zwischen Enzym und Zucker sich als unabhängig von der Wasserstoffzahl erweist. Diese Beobachtungen sprechen nicht für die Auffassung der Vereinigung von Enzym und Rohrzucker als einer Ionenreaktion; aus der Tatsache, daß trotz der Konstanz des an das Substrat gebundenen Enzymanteils und seiner Unabhängigkeit von der Wasserstoffzahl mit dieser sich die Reaktionsgeschwindigkeit ändert, ist vielmehr von R. Kuhn die Vorstellung abgeleitet worden,

¹⁾ Bio. Z. **110**, 217 (1920).

²⁾ Naturw. **11**, 732 (1923).

daß die Wasserstoffionen die Zerfallsgeschwindigkeit der Enzym-Substratverbindung beeinflussen.

Während in diesen Untersuchungen die Abhängigkeit der Aktivität von der Wasserstoffzahl hauptsächlich auf den elektrochemischen Charakter des Enzyms selbst zurückzuführen versucht wird, hat in neuerer Zeit J. H. Northrop¹⁾ für den speziellen Fall der proteolytischen Enzyme die Auffassung vertreten und experimentell behandelt, daß die Reaktionsgeschwindigkeit nicht von der Dissoziation der Enzyme, sondern von der der Substrate abhängt; diese Ansicht wird gestützt durch den Befund, daß in einer Reihe von Fällen die Aktivitäts- p_H -kurven von Pepsin und Trypsin eine gewisse Übereinstimmung mit den Dissoziationskurven der angewandten Substrate aufweisen. Nach Northrop soll Pepsin, dessen Aktivitätsoptimum stark saurer Reaktion entspricht, nur mit den Eiweißkationen, das bei alkalischer Reaktion optimale Trypsin nur mit den Proteinanionen reagieren; nach den Untersuchungen von R. Willstätter und W. Grassmann²⁾ und von A. B. Hertzmann und H. C. Bradley³⁾ ergäbe sich die Möglichkeit, hiervon eine dritte Gruppe proteolytischer Enzyme zu unterscheiden, welche nur die undissoziierten Proteinmoleküle angreifen, deren p_H -Optimum nämlich der isoelektrischen Reaktion der Substrate entspricht. Die untersuchten Fälle sind indessen nicht zahlreich und nicht verschieden genug gewählt worden, um ein abschließendes Urteil über die entwickelten Vorstellungen zu erlauben; nach noch unveröffentlichten Versuchen des Verfassers entspricht die Northrop'sche Theorie in mehreren untersuchten Beispielen nicht dem experimentellen Ergebnis, es wird vorzuziehen sein, allgemein nicht nur die Dissoziation der Substrate, sondern auch die der Enzyme in Betracht zu ziehen.

Zur Kennzeichnung der elektrochemischen Natur der Enzyme ist von Michaelis ihr Verhalten im elektrischen Felde herangezogen worden. Bekanntlich wandern unter der Wirkung des elektrischen Stromes die elektronegativen Anionen zur Anode, die elektropositiven Kationen zur Kathode, während der Wanderungssinn amphoterer Elektrolyte wie der Aminosäuren und Proteine durch die Acidität der Lösung bestimmt wird: in alkalischem Medium bewegen sie sich zur Kathode, in saurem zur Anode, während

¹⁾ Naturw. **11**, 713 (1923).

²⁾ H. **138**, 184, und zwar S. 198 (1924).

³⁾ Proc. Am. Soc. Biol. Chem. **18**, 19 (1923).

in einem dazwischenliegenden p_H -Gebiet, das ihrer isoelektrischen Reaktion entspricht, gar keine Wanderung beobachtet wird.

Die Untersuchungen der Michaelisschen Schule ¹⁾ haben nun zusammen mit älteren Beobachtungen von H. Bierry, V. Henri und G. Schaeffer ²⁾ sowie von H. Iscovesco ³⁾ das Überführungsverhalten einer Reihe von rohen Enzympräparaten eingehend behandelt; dabei ergab sich beispielsweise für die Hefesaccharase auch in stark saurer Lösung eine rein anodische Wanderung, während sich für andere Enzyme wie Malzamylase, Trypsin und Katalase eine Abhängigkeit ihrer Wanderungsrichtung von der Acidität feststellen ließ; Michaelis schrieb danach der Saccharase rein oder doch überwiegend sauren Charakter zu. Die Nachprüfung dieser Beobachtungen an reineren Enzympräparaten durch R. Willstätter, J. Graser und R. Kuhn ⁴⁾ hat indessen zu der Erkenntnis geführt, daß sie nicht auf das Verhalten des Enzyms selbst zu beziehen sind; mit steigendem Reinheitsgrad tritt, wie Tabelle 6 erweist, der elektronegative Charakter der Saccharase mehr und mehr zurück. „Die elektrische Überführung sagt“ also, „sofern sie mit sehr unreinen Enzymlösungen ausgeführt wird, über die Natur eines Ferments nichts aus, sondern sie läßt nur erkennen, ob in dem aus einem Ferment und seinem jeweiligen Begleitstoff gebildeten Additions- oder Adsorptionsprodukt die Säure- oder Basennatur überwiegt“ ⁵⁾. So ist der elektrische Ladungssinn weder der Saccharase selbst noch der anderer Enzyme bisher mit Sicherheit erkannt worden.

Tabelle 6.
Wanderungssinn und Reinheitsgrad der Saccharase.

Enzympräparat	Reinheits- grad Zeitwert	Versuchs- dauer Std.	Wanderung in Proz.	
			anodisch	kathodisch
Hefeautolysat	200	18	0,64	0,00
Nach Adsorption an Tonerde . .	8,45	23	0,61	0,18
Nach Ads. an Tonerde u. Kaolin	1,0	22	0,54	1,93

¹⁾ Bio. Z. **16**, 81; **17**, 231 (1909); **25**, 1 (1910); **30**, 481 (1911); **57**, 70; **83**, 320 (1913); **59**, 100; **64**, 13 (1914).

²⁾ Soc. Biol. **1**, 226 (1907); V. Henri, Bio. Z. **16**, 473 (1909).

³⁾ Soc. Biol. **1**, 770, 861 (1907); Bio. Z. **24**, 53 (1909/10).

⁴⁾ H. **123**, 1, und zwar S. 73 (1922).

⁵⁾ R. Willstätter, B. **55**, 3601, und zwar S. 3614 (1922).

L. Michaelis¹⁾ hat auch zuerst die Adsorptionsaffinitäten der Enzyme zur Aufklärung ihrer elektrochemischen Natur analysiert. Unter der Adsorption versteht man die Anreicherung gelöster Stoffe an der Grenzfläche starrer Körper; man unterscheidet sie von der Absorption, bei welcher eine Lösung in dem aufnehmenden Stoffe selbst eintritt. Die Erscheinungen der Adsorption, die man früher teilweise auf reine Kapillarkräfte, nämlich auf eine Verminderung der Oberflächenspannung an der Grenzfläche der Phasen, zurückzuführen versuchte²⁾, sind mehr und mehr unter chemischen Gesichtspunkten verstanden worden; viele Erfahrungen haben dahin geführt, zur Deutung der Adsorptionserscheinungen außer den Einflüssen der Kapillarität die Wirkung chemischer und elektrischer Kräfte heranzuziehen, deren Bedeutung in vielen Fällen ausschlaggebend ist. Michaelis gebührt das Verdienst, die chemische Natur vieler Adsorptionsvorgänge betont zu haben; seine Untersuchungen, welche allgemein zwischen mechanischer und elektrochemischer Adsorption unterscheiden, führen zu dem Ergebnis, daß die erstere nur in vereinzelten Fällen, so bei der Adsorption durch Kohle oder Zellulose, in Betracht zu ziehen ist.

Die Erscheinungen der elektrochemischen Adsorption, die am Beispiel der Adsorption organischer Farbstoffe eingehend untersucht wurden, teilten L. Michaelis und P. Rona³⁾ nach folgenden Gesichtspunkten ein:

1. Äquivalente Adsorption — Aufnahme der Anionen und Kationen des Salzes in äquivalenten Mengen;
2. Hydrolytische Adsorption — Aufnahme nur einer einzelnen Ionenart;
3. Austauschadsorption — Austausch zwischen einem Ion des Adsorbens und einem solchen des gelösten Stoffes, und
4. Aufladungsadsorption — Aufnahme der Anionen und Kationen in verschiedenem Verhältnis, begleitet von einer Ladungsänderung des Adsorbens.

Während bei unlöslichen, salzartigen Adsorbentien nur Austauschadsorption beobachtet werden konnte, verlief auch die Adsorption durch Oxyde basischer oder saurer Natur ganz entsprechend

¹⁾ Bio. Z. **7**, 488 (1907/08); L. Michaelis und M. Ehrenreich, Bio. Z. **10**, 283 (1908); **25**, 359 (1910).

²⁾ Vgl. H. Bechhold, Die Kolloide in Biologie und Medizin, 2. Aufl., Leipzig 1919, S. 25.

³⁾ Bio. Z. **97**, 57 (1919); **102**, 268 (1920).

einer chemischen Umsetzung. „Bei elektrolytartigen Adsorbentien ist die Adsorption also identisch mit denjenigen Reaktionen, welche auf Grund der gewöhnlichen chemischen Affinitäten vorhergesagt werden können.“ Diese Befunde entsprechen den Vorstellungen von J. Langmuir¹⁾, nach denen die Adsorption durch Absättigung der freien, nach außen gerichteten chemischen Valenzen an der Grenzfläche des Adsorbens erfolgt. Der elektrochemische Charakter der Adsorption gestattet eine Einteilung der Adsorbentien nach ihrer elektrischen Ladung, in elektropositive und elektronegative, deren Affinität zu enzymatischen Stoffen zu bedeutsamen Aussagen über die elektrochemische Natur der letzteren Veranlassung gegeben hat.

Die ältesten Beobachtungen über die Adsorption eines Enzyms, nämlich des Pepsins, finden sich schon bei E. Brücke²⁾, der auch bereits Verfahren zur Freilegung des Enzyms aus den Adsorbaten beschrieben hat, sowie in den Untersuchungen von A. Danilewsky³⁾ und von J. Cohnheim⁴⁾ aus demselben Jahrzehnt; aber es hat fast 50 Jahre gedauert, bis die Erscheinung der Enzymadsorption von Michaelis und Ehrenreich wieder aufgenommen und ihre Beschreibung vertieft wurde. Mit Hilfe des Leitsatzes, daß alle durch das elektronegative Adsorbens Kaolin adsorbierbaren Substanzen als Basen, alle durch die elektropositive Tonerde adsorbierbaren aber als Säuren anzusehen seien, versuchten sie die elektrochemische Natur einer Anzahl von Enzymen ohne quantitative Bestimmung, allein auf Grund von Schätzungen festzustellen. Invertin, bei jeder Reaktion durch Tonerde adsorbierbar, nicht im geringsten dagegen durch Kaolin, zeigte danach den Charakter einer Säure, im Einklang mit den Ergebnissen der Überführung; Speichelamylase und Trypsin, die bei jeder Reaktion von Tonerde wie von Kaolin aufgenommen wurden, betrachtete man dagegen als amphotere Körper.

Diese Befunde, die an rohen Enzymlösungen erhoben wurden, gelten indessen, wie R. Willstätter⁵⁾ gezeigt hat, nicht für die

¹⁾ Am. Soc. **38**, 2221 (1916); **39**, 1848 (1917).

²⁾ Sitzungsber. Akad. d. Wiss. Wien **43**, 601 (1861).

³⁾ Virchows Arch. **25**, 279 (1862).

⁴⁾ Ebenda **28**, 241 (1863).

⁵⁾ R. Willstätter u. F. Racke, A. **425**, 57 (1920/21); R. Willstätter und W. Wassermann, H. **123**, 181 (1922); R. Willstätter und E. Waldschmidt-Leitz, H. **125**, 132, und zwar S. 139 (1922/23).

Enzyme selbst, sondern nur für ihre Aggregate mit begleitenden Stoffen. So hat es sich gezeigt, daß das Invertin aus reineren Lösungen von Kaolin adsorbiert wird, auch schon aus rohen Hefeautolysaten unter bestimmten Bedingungen; es besitzt also sowohl saure wie basische Eigenschaften. Trypsin wird schon nach unvollkommener Reinigung durch Tonerde gar nicht mehr aufgenommen, dagegen quantitativ durch Kaolin; seine basische Natur tritt hervor. Tierische Amylase endlich büßt mit steigendem Reinheitsgrade ihre Adsorbierbarkeit sowohl an basische wie an saure Stoffe mehr und mehr ein. Das wahre Adsorptionsverhalten der Enzyme wird also erst in höherem Reinheitsgrade erkennbar.

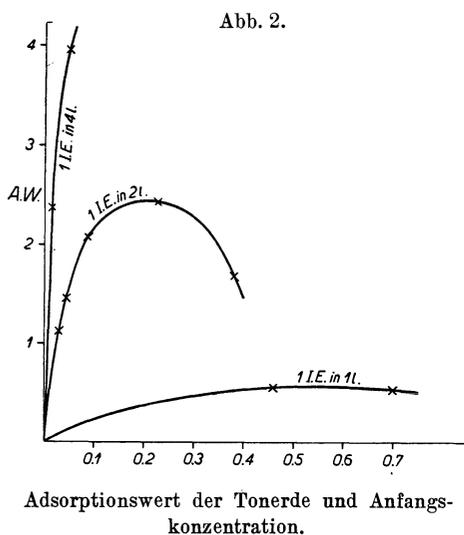
Die Ausgestaltung und systematische Anwendung der Adsorptionsmethoden hat durch die zahlreichen Untersuchungen R. Willstätters und seiner Mitarbeiter für die präparative Enzymchemie entscheidende Bedeutung erlangt; nicht nur, daß sie dazu gedient hat, den Reinheitsgrad vieler Enzyme und anderer hochmolekularer Stoffe weitgehend zu steigern, die Auswertung spezifischer und fein abgestimmter Adsorptionsaffinitäten hat es auch in mehreren Fällen ermöglicht, Enzyme in ihren natürlichen Gemischen voneinander zu trennen und enzymatische Reaktionssysteme in ihre Komponenten zu zerlegen. Die speziellen Adsorptionsverfahren, die diese Untersuchungen geleitet haben, sollen im 7. Kapitel an charakteristischen Beispielen erläutert werden; ihre allgemeinen Richtlinien und ihre theoretischen Grundlagen und Ergebnisse werden im folgenden behandelt.

Die Adsorption der Enzyme aus ihren Lösungen beschränkt sich erfahrungsgemäß nicht auf diese selbst, es werden vielmehr zusammen mit den Enzymen wechselnde Mengen anderer hochmolekularer Begleitstoffe durch das Adsorbens aufgenommen; der Erfolg der präparativen Reinigung der Enzyme durch Adsorption hängt also nach R. Willstätter¹⁾ davon ab, ob es gelingt, die Adsorption auswählend genug zu gestalten. Als Maß für die auswählende Wirkung eines Adsorbens ist von R. Willstätter und W. Wassermann²⁾ der „Adsorptionswert (A.-W.)“ eingeführt worden; er ist gleich der Anzahl der Enzymeinheiten, die von 1 g des Adsorbens unter den Versuchsbedingungen aufgenommen werden. Je höher der Adsorptionswert in einem Versuchsansatz gefunden wird, um so größer ist die unter diesen Bedingungen zu

¹⁾ B. 55, 3601, und zwar S. 3610 (1922).

²⁾ H. 123, 181 (1922).

erwartende Konzentrationssteigerung des Enzyms. So findet man den Adsorptionswert außer von der Acidität der Lösung in hohem Maße abhängig von der Anfangskonzentration des Enzyms, und zwar für die einzelnen Enzyme in verschiedenem Sinne. Aus den Untersuchungen von Willstätter und Wassermann und von H. Kraut und E. Wenzel¹⁾ hat es sich ergeben, daß die von dem Adsorbens Tonerde aufgenommene Menge des Invertins der Hefe mit steigender Verdünnung beträchtlich zunimmt, so stieg in einem Beispiel bei 50facher Verdünnung der von der nämlichen Menge Tonerde adsorbierte Enzymanteil von 19 auf 93 Proz.; diese Erscheinung wird auf eine weitgehende Dissoziation eines die Ad-



sorption störenden Assoziationsproduktes aus Enzym und Begleitstoff bei großer Verdünnung zurückgeführt. Andererseits hat sich für tierische Lipase²⁾, deren Adsorptionsverhalten viel unspezifischer ist, ein Einfluß der Anfangskonzentration nicht sicher erkennen lassen, und die pflanzliche Peroxydase³⁾ scheint durch Tonerde aus verdünnterer Lösung sogar schlechter adsorbierbar zu sein.

Den Einfluß der Verdünnung auf die Adsorption des Invertins durch Tonerde veranschaulichen Kraut und Wenzel durch die vorstehende Abbildung, die die Abhängigkeit des Adsorptionswertes von der Konzentration des Enzyms in der Adsorptionsrestlösung graphisch wiedergibt.

¹⁾ H. **133**, 1 (1923/24); **142**, 71 (1924/25).

²⁾ R. Willstätter und E. Waldschmidt-Leitz, H. **125**, 132, und zwar S. 165 (1922/23).

³⁾ R. Willstätter u. A. Pollinger, A. **430**, 269, und zwar S. 276 (1922/23).

Die Form der für ein beliebiges Enzympräparat erhaltenen Adsorptionskurven, die gemäß der von H. Freundlich¹⁾ aufgestellten Beziehung

$$\text{A.-W.} = \alpha \cdot c^{\frac{1}{n}}$$

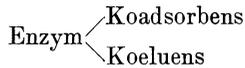
(c = Konzentration in der Restlösung, α und n = Konstanten) für das Adsorptionsverhalten eines reinen Stoffes der von logarithmischen entsprechen sollten, und ihre Abhängigkeit von der Anfangskonzentration des Enzyms in der Lösung läßt nach Kraut und Wenzel erkennen, ob das Enzym mechanisch beigemengte Stoffe begleiten, die die Oberfläche des Adsorbens teilweise in Beschlag nehmen; sie ist von großer Bedeutung für die Beurteilung des geeignetsten präparativen Verfahrens, das eine Abtrennung der die Adsorption des Enzyms störenden Begleitstoffe entweder durch ihre Voradsorption oder durch eine selektivere Adsorption des Enzyms selbst zu erreichen sucht. Die Analyse und Auswertung der für eine Enzymlösung charakteristischen Adsorptionskurven gestattet indessen nicht, das Enzym von solchen Beimengungen zu unterscheiden und zu trennen, die ihm im Adsorptionsverhalten sehr nahe stehen, z. B. von seinen Zersetzungsprodukten; und ferner gibt es Fälle, in denen das Enzym seine Adsorbierbarkeit nur der Assoziation mit einem Begleiter verdankt [pankreatische Amylase]²⁾, in denen die Adsorptionskurve also nur über das Verhalten dieses Komplexes aussagt, während in anderen Fällen die Bindung des Enzyms an begleitende Stoffe, die nicht adsorbiert werden, seine Adsorption ganz zu verhindern vermag (vgl. das Adsorptionsverhalten des rohen Invertins gegenüber Kaolin nach L. Michaelis).

Der Einfluß einer Assoziation mit Begleitstoffen auf das Verhalten der Enzyme macht sich auch bei ihrer Loslösung aus den Adsorbaten, der Elution, in bemerkenswertem Maße geltend, die, wie R. Willstätter gezeigt hat, sich im allgemeinen durch eine Änderung des Reaktionsmilieus bewerkstelligen läßt: man eluiert ein bei saurer Reaktion adsorbiertes Enzym z. B. durch verdünnte Alkalien; in anderen Fällen scheint die Elution dagegen auf einer reinen Verdrängung des Enzyms von der Oberfläche des Adsorbens zu beruhen, so bei der Anwendung von Phosphat als Eluens für Tonerdeadsorbate durch die Bildung schwer löslichen Aluminiumphosphats; diese ist viel unspezifischer.

¹⁾ Kapillarchemie, 2. Aufl., Leipzig 1922, S. 232 ff.

²⁾ H. 142, 14 (1924/25).

Die zahlreichen Erscheinungen, die das Adsorptions- und Elutionsverhalten der Enzyme aufweist, sind von R. Willstätter und F. Racke¹⁾ mit der Annahme gedeutet worden, daß die Gegenwart bestimmter Begleitstoffe, der „Koadsorbenzien“ und der „Koeluentien“, für die leichte Adsorbierbarkeit oder Eluierbarkeit des Enzyms verantwortlich zu machen ist: der Komplex



wird nach dieser Vorstellung gleichwie das Enzym allein adsorbierbar und eluierbar sein, die Assoziation des Enzyms mit einem Koadsorbens allein dagegen in den Adsorbaten festgehalten werden.

Bemerkenswert ist die eluierende Wirkung von Substraten auf Enzymadsorbate, die zuerst von S. G. Hedin²⁾ für Adsorbate des Trypsins an Tierkohle festgestellt und die später auch bei kohlehydratspaltenden Enzymen beobachtet wurde³⁾; ihre theoretische Bedeutung ist indessen noch nicht zu übersehen.

IV. Enzymatische Kinetik.

Die Gesetzmäßigkeiten, welche sich auf Grund der chemischen Dynamik für die enzymatischen Reaktionen als katalytische Prozesse ableiten lassen, finden sich nur in einfachen Fällen mit einiger Genauigkeit verwirklicht. Die komplizierte und ungenügend bekannte Zusammensetzung enzymatischer Reaktionssysteme hat neben unserer Unkenntnis der chemischen Natur der wirksamen Katalysatoren und des Einflusses begleitender Stoffe auf ihre Affinität zur Folge, daß sich oft auch in einfacheren Fällen, bei der Umsetzung von Substraten bekannter Konstitution, der Verlauf einer enzymatischen Reaktion bestimmten gesetzmäßigen Beziehungen nicht unterordnen läßt. Wenn daher in den älteren reaktionskinetischen Untersuchungen die Anwendung des Massenwirkungs-

¹⁾ A. **425**, 1, und zwar S. 59 (1920/21).

²⁾ Biochem. J. **1**, 484 (1906); **2**, 81 (1907); H. **50**, 497 (1907); siehe dazu auch E. Waldschmidt-Leitz, A. Schäffner u. W. Grassmann, H., im Druck.

³⁾ R. Willstätter u. R. Kuhn, H. **116**, 53 (1921); L. Michaelis. Bio. Z. **115**, 269 (1921).

gesetzes in irgend einer Form durch Aufstellung von monomolekularen, bimolekularen oder anderweitigen Reaktionsgleichungen ihren Ausdruck gefunden hat, so ist der Gültigkeit solcher Beziehungen bei der Nichtbeachtung zahlreicher, die Reaktion bestimmender Faktoren in vielen Fällen nur ein sehr beschränkter Wert beizumessen. Es ist daher geboten, im Rahmen dieses Buches nur die am besten gestützten Ergebnisse an anschaulichen Beispielen zu erörtern.

Für die Umwandlung einer einzigen Molekülart in andere fordert das Massenwirkungsgesetz, nach welchem die aktive Masse eines Stoffes seiner Konzentration proportional ist, daß ihre Geschwindigkeit der jeweils vorhandenen Konzentration der reagierenden Moleküle proportional gefunden wird; diese Beziehung für den Verlauf monomolekularer Reaktionen findet ihren Ausdruck in der Gleichung

$$v = \frac{dx}{dt} = k(a - x),$$

in welcher a die Anfangskonzentration des Stoffes, x die zur Zeit t bereits umgesetzte Menge desselben und k eine Konstante, die sogenannte monomolekulare Reaktionskonstante, bedeutet. Durch Integration dieser Gleichung ergibt sich

$$k = \frac{1}{t} \ln \frac{a}{a - x}.$$

Diese Beziehung monomolekularen Reaktionsverlaufs gilt z. B. nach den klassischen Untersuchungen von L. F. Wilhelmy¹⁾, wie Tabelle 7 veranschaulicht, für die katalytische Inversion des Rohrzuckers durch Säuren, eine Reaktion, welche in reinem Wasser unmeßbar langsam verläuft, und zwar in verdünnten Lösungen, in welchen eben infolge der praktisch unveränderten Menge der einen Reaktionskomponente, des Wassers, die in Wirklichkeit bimolekulare Reaktion sich einer monomolekularen nähert; die Konstante der Reaktionsgeschwindigkeit findet man in diesem Falle der Konzentration des Katalysators, der Wasserstoffionen, proportional, während sie sich von der Rohrzuckerkonzentration als unabhängig erweist, es werden also in der Zeiteinheit gleiche Bruchteile des Substrats umgesetzt.

¹⁾ Pogg. Ann. **81**, 413, 499 (1850).

Tabelle 7.

Reaktionsverlauf der Rohrzuckerspaltung durch H-Ionen.

t Min.	Drehungswinkel o	$k = \frac{1}{t} \log_{10} \frac{a}{a-x}$
0	+ 46,75	—
45	+ 38,25	0,001 34
120	+ 26,00	0,001 38
240	+ 11,50	0,001 40
450	— 4,50	0,001 47
630	— 10,00	0,001 39
∞	— 18,70	—

Die Gültigkeit der monomolekularen Reaktionsgleichung trifft auch für gewisse einfache enzymatische Reaktionen zu, sofern dafür Sorge getragen wird, daß die Reaktionsbedingungen während der Dauer des Versuches unverändert bleiben, und daß die Menge des aktiven Enzyms keine Abnahme durch Zerstörung erfährt. Dies haben, um nur einige Beispiele herauszugreifen, H. v. Euler¹⁾ sowie K. G. Dernby²⁾ für die Hydrolyse einfacher Peptide durch Erepsin oder W. Issajew³⁾ für die Zersetzung des Wasserstoff-superoxyds durch Hefekatalase erwiesen, dessen Untersuchung die folgende Tabelle 8 entnommen ist.

Tabelle 8.

Reaktionsverlauf für Hefekatalase.

t Min.	Spaltung Proz.	$10^4 \cdot k = \frac{1}{t} \log_{10} \frac{a}{a-x}$
5	24,6	245,7
10	43,3	246,4
15	57,2	245,5
20	67,7	245,4
25	75,6	245,0
30	81,9	246,9

Auch die enzymatische Hydrolyse des Rohrzuckers durch Hefesaccharase ist von C. S. Hudson⁴⁾ als monomolekulare Reaktion

¹⁾ H. **51**, 213 (1907).

²⁾ Bio. Z. **81**, 107 (1916/17).

³⁾ H. **42**, 102 (1904); **44**, 546 (1905).

⁴⁾ Am. Soc. **30**, 1160 (1908).

beschrieben worden. Dem stehen jedoch die Beobachtungen anderer Forscher entgegen, denen zufolge die Reaktionskonstante erster Ordnung hier deutlich ansteige; so sind die Ergebnisse Hudsons von L. Michaelis und H. Davidsohn¹⁾, welche den letzteren Fall als den normalen ansehen, mit der Annahme einer Enzymzerstörung gedeutet worden.

Das Ansteigen der Reaktionskonstanten, wie es in den Versuchen von Michaelis und Davidsohn zum Ausdruck kommt, ist in Tabelle 9 veranschaulicht; L. Michaelis und M. L. Menten²⁾ haben nach dem Vorbild von V. Henri³⁾ für diesen Fall auf theoretischem Wege eine Reaktionsgleichung der enzymatischen Rohrzuckerhydrolyse abgeleitet, welche mit den experimentellen Ergebnissen in Übereinstimmung steht und nach welcher die Reaktionsgeschwindigkeit durch die Summe einer linearen und einer logarithmischen Funktion dargestellt wird.

Tabelle 9.
Reaktionsverlauf der Saccharasewirkung
nach Michaelis und Davidsohn.

t Min.	$k = \frac{1}{t} \log_{10} \frac{a}{a-x}$
21,0	0,001 45
60,0	0,001 51
130,0	0,001 64
190,2	0,001 71
246,0	0,001 76

Die Untersuchungen von R. Willstätter, J. Graser und R. Kuhn⁴⁾ haben indessen gezeigt, daß die Erscheinungen wechselnder Kinetik, wie sie in den abweichenden Beobachtungen beispielsweise von Hudson und von Michaelis und Davidsohn zutage treten, nicht mit einer verschiedenen Beständigkeit der Saccharase zu deuten sind; sie wiederholen sich bei reineren Enzympräparaten und auch unter Bedingungen, unter denen eine Zerstörung des Enzyms nicht eintritt, und es erweist sich der zeitliche Verlauf der Rohrzuckerhydrolyse zudem in hohem Maße abhängig von der

¹⁾ Bio. Z. **35**, 401 (1911).

²⁾ Ebenda **49**, 333 (1913).

³⁾ H. **39**, 194 (1902); C. r. **135**, 916 (1902).

⁴⁾ H. **123**, 1, und zwar S. 63 (1922).

Wasserstoffzahl. Nach diesen Untersuchungen werden der genau monomolekulare Verlauf bei Hudson wie das Beispiel von Michaelis und Davidsohn zu Spezialfällen, wenn man die Wasserstoffzahl variiert; die Ursache der beobachteten Abweichungen ist jedoch noch nicht erkannt.

Die Forderung des Massenwirkungsgesetzes, der die H-Ionenkatalyse gehorcht, nämlich die Proportionalität von Katalysatorkonzentration und Reaktionsgeschwindigkeit, ist auch bei der enzymatischen Katalyse erfüllt. Wie die gründlichen Untersuchungen von C. O'Sullivan und F. W. Tompson¹⁾, von C. S. Hudson²⁾ und von H. v. Euler und O. Svanberg³⁾ gezeigt haben, gilt diese Beziehung, nach welcher der Umsatz dem Produkt aus Enzymmenge und Einwirkungszeit proportional gefunden wird, mit ziemlicher Genauigkeit, z. B. in einem Bereich der Enzymmengen wie 1:8; dies veranschaulicht die nachstehende, der Hudsonschen Untersuchung entnommene Tabelle 10.

Tabelle 10.
Saccharasemenge und Reaktionsgeschwindigkeit nach Hudson.

Relative Saccharasekonzentration	Zeit Min.	Umsatz (Proz.) bei Anfangskonzentration des Zuckers von		
		4,55 Proz.	9,09 Proz.	27,3 Proz.
2,00	15	73,2	45,3	11,2
1,50	20	73,2	44,8	11,2
1,00	30	72,9	45,3	11,5
0,50	60	72,9	45,2	11,4
0,25	120	73,1	45,2	10,9

Die Tabelle läßt indessen zugleich erkennen, daß eine andere, für eine reine Katalyse zu erwartende Gesetzmäßigkeit, nämlich die Unabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Konzentration des Substrats, hier nicht zu gelten scheint. Diese Abweichung, die die enzymatische von der H-Ionenkatalyse unterscheidet und die für die Untersuchung des Reaktionsmechanismus der enzymatischen Rohrzuckerhydrolyse von großer Bedeutung geworden ist, ist durch eine große Reihe älterer Arbeiten sicher gestellt und besonders eingehend von L. Michaelis und M. L.

¹⁾ Soc. **57**, 834, und zwar S. 848 (1890).

²⁾ Am. Soc. **30**, 1564, und zwar S. 1575 (1908).

³⁾ H. **107**, 269, und zwar S. 275 (1919).

Menten¹⁾ geprüft worden; die theoretischen Folgerungen, die die Autoren mit dieser Erscheinung verknüpft haben, werden noch ausführlicher behandelt werden.

Es soll hier noch kurz auf eine andere gesetzmäßige Beziehung eingegangen werden, die für den Verlauf gewisser enzymatischer Reaktionen zu gelten scheint. E. Schütz²⁾ hat im Jahre 1885 die Regel aufgestellt, daß die von verschiedenen Mengen Pepsin in der gleichen Zeit hydrolysierten Eiweißmengen den Quadratwurzeln der Fermentmengen proportional seien, also der Umsatz

$$x = k\sqrt{F} \quad (F = \text{Fermentmenge}).$$

Diese Schützsche Regel läßt sich bei bestehender Proportionalität zwischen Enzymmenge und Reaktionsgeschwindigkeit auch durch die Beziehung ausdrücken:

$$x = k\sqrt{t}.$$

Sie bringt nach Sv. Arrhenius³⁾ zum Ausdruck, daß die Reaktionsgeschwindigkeit nicht nur der jeweils noch vorhandenen Substratkonzentration proportional, sondern außerdem der bereits umgesetzten Menge umgekehrt proportional ist; ein einfaches Beispiel für ihre Gültigkeit bietet die Esterverseifung durch geringe Mengen von Hydroxylionen, z. B. durch Ammoniak, sofern das Substrat in großem Überschuß vorhanden ist; das Reaktionsprodukt, in diesem Falle die entstehenden NH_4 -Ionen, wirkt nämlich entsprechend seiner Konzentration hemmend, nämlich dissoziationsvermindernd, auf die Geschwindigkeit der Katalyse ein.

Tabelle 11.

Reaktionsverlauf der Essigesterhydrolyse durch Ammoniak nach Arrhenius.

Zeit (t)	x	x (berechnet) = 17,3 \sqrt{t}
	(beobachtet) Proz.	Proz.
1	17,5	17,3
2	25,5	24,5
5	38,5	38,7
10	51,2	54,2
18	63,1	73,4
26	71,4	88,2

¹⁾ Bio. Z. 49, 333 (1913).

²⁾ H. 9, 577 (1885).

³⁾ Medd. från K. Vetenskapsak. Nobelinst. 1, Nr. 9 (1908).

Die Übereinstimmung zwischen Theorie und Beobachtung, wenigstens bis zu einem Umsatz von 50 Proz., geht für die Hydrolyse von Essigester durch Ammoniak aus der vorstehenden Tabelle 11 hervor.

Die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration, wie sie oben für das Beispiel der Rohrzuckerspaltung durch Saccharase beschrieben wurde und wie sie sich auch für die Wirkung anderer Enzyme ergeben hat, und die Erkenntnis von dem großen Einfluß der Spaltprodukte auf den Verlauf enzymatischer Reaktionen hat die Forschung schon früh zu der Annahme geführt, daß man eine Bindung zwischen Enzym und Substrat einerseits und zwischen Enzym und den Spaltprodukten andererseits anzunehmen habe. Danach wird die Geschwindigkeit enzymatischer Reaktionen bestimmt durch die Konzentration der Enzym-Substratverbindung, nur diese nämlich liefert die reaktionsvermittelnden Moleküle. So mußten die älteren Untersuchungen, die die Reaktionsgeschwindigkeit als Maß der Enzymmengen beschrieben, allein ohne Berücksichtigung des Einflusses der Substratkonzentration und der Spaltprodukte, unzureichend bleiben. L. Michaelis und M. L. Menten¹⁾ haben nun im Jahre 1913 grundlegende neue Versuche speziell über die Kinetik der enzymatischen Rohrzuckerspaltung veröffentlicht, deren Bedingungen so gewählt waren, daß der störende Einfluß der Reaktionsprodukte ausgeschaltet blieb; sie bestimmten nämlich die Anfangsgeschwindigkeit der Inversion, und zwar bei wechselnder Konzentration des Rohrzuckers.

Die Versuche dieser Autoren, die im Gegensatz zu älteren Untersuchungen auch die Einhaltung konstanter, und zwar optimaler Wasserstoffzahl sowie die Ausschaltung der Mutarotation der gebildeten Glucose beobachteten, führten zu dem Ergebnis, daß die absoluten Beträge an invertiertem Zucker mit steigender Konzentration eine bedeutende Zunahme erfuhren, um bei einer bestimmten Konzentration — in dem in Abb. 3 wiedergegebenen Beispiel entsprechend einer Normalität des Substrats von 0,192 — einen maximalen Wert zu erreichen.

Die wichtigen und bemerkenswerten theoretischen Schlußfolgerungen, mit denen Michaelis und Menten zu einer Deutung ihrer experimentellen Ergebnisse gelangt sind, sollen im folgenden

¹⁾ Bio. Z. **49**, 333 (1913).

eingehender behandelt werden, da ihre Grundlagen für das Verständnis der neueren Vorstellungen über den Mechanismus enzymatischer Reaktionen und für die Beurteilung vieler wichtiger, die enzymatische Reaktionsgeschwindigkeit betreffender Einflüsse unentbehrlich erscheinen.

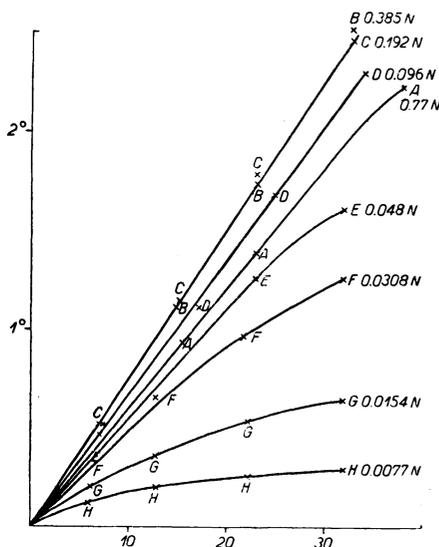
Michaelis und Menten gehen von der Annahme aus, daß die Saccharase mit dem Rohrzucker zunächst eine labile Verbindung bildet, welche dann in freies Enzym und die Spaltprodukte, Glucose und Fructose, zerfällt; sie nehmen weiterhin an, daß die Geschwindigkeit der Rohrzuckerinversion bedingt ist durch die jeweilige Konzentration der Enzym - Rohrzuckerbindung, ihr also proportional gefunden wird.

Die Anwendung des Massenwirkungsgesetzes auf die Vereinigung von Enzym und Rohrzucker ergibt nun nach Michaelis und Menten, daß für die Bildung einer Verbindung aus 1 Mol Enzym und 1 Mol des Zuckers die Gleichung zutrifft:

$$\frac{(R) \cdot (\Phi - \varphi)}{\varphi} = K_M,$$

in welcher (R) die Gesamtkonzentration des Rohrzuckers, Φ die Gesamtkonzentration des Enzyms und φ die Konzentration des gebundenen Enzyms bzw. der Enzym-Rohrzuckerbindung bedeutet, während K_M eine Konstante, und zwar, wie ersichtlich, die Dissoziationskonstante der Enzym-Rohrzuckerbindung darstellt. Da zufolge der gemachten Voraussetzung die Anfangsgeschwindigkeit v der Konzentration der Enzym-Substratverbindung proportional

Abb. 3.



Reaktionsgeschwindigkeit und Rohrzuckerkonzentration
nach Michaelis und Menten.

ist, so läßt sich für die obige, etwas veränderte Gleichung, wonach

$$\varphi = \Phi \cdot \frac{(R)}{(R) + K_M} \text{ ist, der Ausdruck setzen:}$$

$$v = k \cdot \Phi \frac{(R)}{(R) + K_M},$$

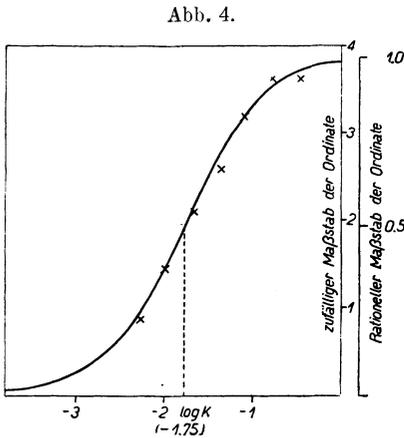
oder, bei eingehaltener Konstanz von Φ in einer Versuchsreihe:

$$V = \frac{v}{k \cdot \Phi} \quad \text{und} \quad V = \frac{(R)}{(R) + K_M}.$$

Der erhaltene Ausdruck für V stimmt rein formell mit dem für den Dissoziationsrest einer Säure berechneten, nämlich

$$\varrho = \frac{(H)}{(H) + K}$$

(vgl. 3. Kapitel), überein, die graphische Auswertung der Versuchsergebnisse muß also für die Beziehungen zwischen der Anfangsgeschwindigkeit und dem negativen Logarithmus der Anfangskonzentration des Rohrzuckers die Form einer Dissoziationsrestkurve ergeben. Dieser Forderung genügen in der Tat die sämtlichen, in der Untersuchung von Michaelis und Menten beobachteten Beziehungen, die theoretischen Voraussetzungen ihres Verfahrens erhielten damit eine gewisse Bestätigung.



Aktivitäts- p_S -kurve der Saccharase nach Michaelis und Menten.

Der Ausdruck, den die aus den Michaelisschen Versuchsergebnissen abgeleiteten Beziehungen in Form einer Kurve gefunden haben, ist in Abb. 4 wiedergegeben. Man bezeichnet eine solche Kurve, um ihre formelle Analogie zur Aktivitäts- p_H -kurve zu betonen, als „Aktivitäts- p_S -kurve“, da sie die Abhängigkeit der Aktivität von der Substratkonzentration (S) darstellt, und man erhält sie analog jener, indem man als Einheit der Ordinate die maximal mögliche Reaktionsgeschwindigkeit wählt

und auf der Abszisse die negativen Logarithmen der angewandten Substratkonzentrationen aufträgt; gesondert zu ermitteln bleibt hierbei nur der rationelle Maßstab der Ordinate, der die Neigung der erhaltenen Kurve bestimmt und der ja infolge des unbekanntes absoluten Wertes von V nicht ohne weiteres gegeben ist; auf seine Bestimmung, die auf der Messung des Neigungswinkels des mittleren, fast geradlinigen Teiles der Kurve beruht, braucht hier nicht näher eingegangen zu werden.

Aus der Aktivitäts- p_S -kurve läßt sich auf Grund der nämlichen Beziehungen, wie sie für die Aktivitäts- p_H -kurve entwickelt worden sind (3. Kapitel), die gesuchte Dissoziationskonstante der Enzym-Substratverbindung K_M entnehmen, es wird nämlich in der Gleichung $V = \frac{(R)}{(R) + K_M}$ für $K_M = (R) V = 1/2$; die Dissoziationskonstante K_M entspricht also in der Kurve derjenigen Substratkonzentration, für die die Hälfte der maximalen Anfangsgeschwindigkeit gefunden wird. So haben Michaelis und Menten nach diesem graphischen Verfahren für die Dissoziationskonstante der Saccharase-Rohrzucker Verbindung auf Grund von vier Versuchsreihen, die mit verschiedenen Enzymmengen ausgeführt waren, die nachstehend verzeichneten, unter sich gut übereinstimmenden Werte gefunden:

Relative Enzymmenge	$-\log \cdot K_M$	K_M
0,5	1,80	0,0160
1	1,78	0,0167
1	1,78	0,0167
2	1,78	0,0167

Diese Ergebnisse haben zum ersten Male eine Anschauung von der Größe der zwischen einem Enzym und seinem Substrat bestehenden Affinität vermittelt und ihr einen zahlenmäßigen Ausdruck verliehen. Der zu 0,0167 ermittelte Wert der Dissoziationskonstanten K_M besagt nämlich, daß, wenn es möglich wäre, die Saccharase-Rohrzucker Verbindung in reiner Form zu erhalten und sie in so viel Wasser zu lösen, daß ihr undissoziierter Anteil in molarer Lösung vorläge, also sein Molekulargewicht im Liter enthielte, dann die Lösung daneben noch $\sqrt{0,0167}$ oder 0,133 Mol

freie Saccharase und dieselbe molare Menge an freiem Rohrzucker aufweisen würde.

Die von Michaelis und Menten geforderte und experimentell begründete Beziehung, wonach

$$K_M = \frac{(\text{Saccharase}) \cdot (\text{Rohrzucker})}{(\text{Saccharase-Rohrzuckerbindung})}$$

konstant gefunden wird, ist zuerst im Jahre 1919 durch H. v. Euler und J. Laurin¹⁾ an einem Saccharasepräparat aus schwedischer Brauereihefe nachgeprüft und dahingehend bestätigt worden, daß sich wiederum eine befriedigende Konstanz der für K_M ermittelten Werte ergab; allein die Versuche dieser Autoren führten zu dem auffallenden Ergebnis, daß der absolute Wert der Dissoziationskonstanten von dem früher durch Michaelis und Menten erhaltenen recht erheblich abwich, sie fanden nämlich als Mittelwert ihrer sämtlichen Versuche die viel größere Konstante $K_M = 0,026$.

Tabelle 12.

Affinität der Hefesaccharase nach Kuhn.

Enzympräparat	Zeitwert	K_M	Affinitätskonstante $= \frac{1}{K_M}$
	Min.		
Brennereihefe, Rasse XII, Autolysat . .	—	0,016	63
Präparat aus amerik. Brauereihefe . . .	6,3	0,020	50
Löwenbrauereihefe, München, Autolysat .	180	0,029	35
Präparat daraus	0,85	0,029	35
Präparat aus anderer Löwenbräuhefe . .	0,20	0,040	25

Die Frage, die sich aus dieser Abweichung ergab, ob nämlich einem bestimmten Enzym eine ganz bestimmte und konstante Affinität zu seinem Substrat zukomme, ist von R. Kuhn²⁾ nach zwei Richtungen hin geprüft worden, und zwar durch den Affinitätsvergleich der Saccharase verschiedener Heferasen und durch den Vergleich der Affinität in verschiedenem Reinheitsgrad. Die Versuche ergaben, daß die Saccharase einer bestimmten Heferasse bei der Durchführung einer Reinigung, die viele ihrer anderen Eigenschaften, beispielsweise ihr Verhalten gegenüber Adsorptionsmitteln oder bei der elektrischen Überführung, wesentlich beeinflusst, in

¹⁾ H. 108, 64 (1919).

²⁾ H. 125, 28 (1922/23).

ihrer Affinität zum Rohrzucker keine nachweisbare Veränderung erleidet. Dagegen waren sehr beträchtliche Schwankungen dieser Größe bei der vergleichenden Untersuchung der Saccharase aus verschiedenen Heferassen zu bemerken, die Konstante K_M bewegte sich, wie aus der vorstehenden Zusammenstellung hervorgeht, hier zwischen 0,016 und 0,040.

Die beobachtete Erscheinung wechselnder Affinität eines Enzyms zu seinem Substrat, die in einer wechselnden Abhängigkeit seiner Aktivität von der Substratkonzentration zum Ausdruck kommt, ist nach Kuhn von großem Einfluß auf die Sicherheit der analytischen Bestimmung der Enzyme und auf die Brauchbarkeit der für Menge und Konzentration derselben aufgestellten, später näher zu erörternden Masse, da sich hier bei gleicher Substratkonzentration, unter den nämlichen Bedingungen der Bestimmung, jeweils unbekannte und wechselnde Bruchteile der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit ergeben können; sie macht es daher erforderlich, für die direkte Vergleichbarkeit der Enzyme in verschiedenem Ausgangsmaterial die gefundenen Werte mit einem Index zu versehen, der ihre Affinität bzw. die Dissoziationskonstante der Enzym-Substratverbindung angibt; die alleinige Messung der Reaktionsgeschwindigkeit genügt in solchen Fällen nicht.

Als Ursache der beobachteten Affinitätsunterschiede verschiedener Enzymlösungen kommen nach Kuhn Assoziationen des kolloiden Enzymträgers mit an sich unwirksamen und kochbeständigen, aber dem Enzym in chemischer Hinsicht nahestehenden Körpern in Betracht, deren Gegenwart auch die Aktivität der spezifischen Gruppe des Enzyms merklich beeinflußt; es war nämlich gelungen, die Affinität einer bestimmten Saccharaselösung durch den Zusatz eines enzymatisch unwirksamen Kochsaftes aus einer anderen Lösung des Enzyms merklich zu verringern, und zwar bis zu einem konstanten, niedrigeren Wert; dieses Minimum wird erklärt durch eine Absättigung des Enzyms mit den hemmenden Stoffen.

Die schon eingangs erwähnte Grundannahme von Michaelis, wonach die Wirkung eines Enzyms zunächst auf der Bildung einer labilen Verbindung des Enzyms mit seinem Substrat und sodann auf deren Zerfall in das freie Enzym und in die Reaktionsprodukte beruht, läßt erwarten, daß die unter irgendwelchen Bedingungen gemessene Reaktionsgeschwindigkeit für einen enzymatischen Vorgang sich zusammensetzt aus der Geschwindigkeit der

Bildung der Enzym-Substratverbindung, welche in der Affinitätskonstante des Enzyms zu seinem Substrat ihren Ausdruck findet, einerseits, und aus der Zerfallsgeschwindigkeit der Enzym-Substratverbindung andererseits. Es ist demnach zu erwarten, daß die Geschwindigkeit einer enzymatischen Reaktion auch durch die zweite Komponente des beschriebenen Vorgangs, die Zerfallstendenz des Enzym-Substratkomplexes, beeinflußt wird, sofern diese nicht der ersten Komponente, der Bildungsgeschwindigkeit, in der Größenordnung überlegen ist. Eine Veränderung der Versuchsbedingungen, sei es, daß sie sich in einer Beschleunigung, sei es, daß sie sich in einer Hemmung der Reaktionsgeschwindigkeit äußert, wird sich also entweder gegenüber dem ersten oder gegenüber dem zweiten Vorgang oder aber gegenüber beiden geltend machen. Es wird daher in den folgenden Ausführungen, die einige besondere Einflüsse auf die enzymatische Kinetik, insbesondere die bestuntersuchte Kinetik der Rohrzuckerhydrolyse behandeln werden, der Frage besondere Beachtung zu schenken sein, auf welchen Teilvorgang der Gesamtreaktion die einzelnen Einflüsse zu beziehen sind.

Die Erscheinung, daß die Geschwindigkeit vieler enzymatischer Reaktionen durch die Gegenwart der Reaktionsprodukte beeinflußt wird, entspricht der Forderung des Massenwirkungsgesetzes, wonach jeder an der Reaktion beteiligte Stoff den Reaktionsverlauf seiner Konzentration gemäß bestimmt. Diese Tatsache ist für enzymatische Spaltungen schon lange bekannt, und sie ist oft beobachtet worden. Aber erst die Untersuchungen von L. Michaelis und M. L. Menten¹⁾ haben es unternommen, diesem Einfluß der Spaltprodukte für den speziellen Fall der Rohrzuckerhydrolyse durch Saccharase einen zahlenmäßig exakten Ausdruck zu verleihen. Das experimentelle Verfahren, mit Hilfe dessen diese Forscher die Größe der Affinität des Enzyms zu den Spaltprodukten des Rohrzuckers zu ermitteln vermochten, bestand in dem Versuch, den Einfluß der zugesetzten Spaltprodukte auf die Anfangsgeschwindigkeit der Rohrzuckerhydrolyse unter vergleichbaren Bedingungen zu bestimmen.

Die Ergebnisse ihrer Messungen, die die Wirkung des Zusatzes von Glucose bzw. Fructose auf die Geschwindigkeit der Spaltung zu vergleichen gestatten, sind in der folgenden, der Untersuchung

¹⁾ Bio. Z. **49**, 333 (1913).

von Michaelis und Menten entnommenen, im Auszug wiedergegebenen Tabelle 13 zusammengestellt, sie zeigen, daß die Anfangsgeschwindigkeit bei Gegenwart der Reaktionsprodukte, und zwar in beiden Fällen, deutlich herabgesetzt ist.

Tabelle 13.
Einfluß der Spaltprodukte auf die Rohrzuckerhydrolyse.

Zeit · Min.	Drehungsänderung (°) bei Anwendung von		
	0,1 n Rohrzucker	0,1 n Rohrzucker + 0,1 n Glucose	0,1 n Rohrzucker + 0,1 n Fructose
0,5	0,011	0,010	0,009
30	0,703	0,610	0,554
46	0,935	0,855	0,785

Michaelis und Menten folgern aus diesen Befunden, daß die Konzentration der Enzym-Rohrzuckerbindung durch Zusatz der Spaltprodukte vermindert wird, da sie ja nach ihrer Voraussetzung der Anfangsgeschwindigkeit proportional zu setzen ist; es tritt also in diesem Falle eine Verteilung des Enzyms zwischen dem Substrat und den Spaltprodukten ein. Das Verhältnis der gemessenen Anfangsgeschwindigkeiten entspricht dann dem der vorhandenen Konzentrationen an Enzym-Substratverbindung:

$$v : v_0 = \varphi : \varphi_0,$$

wobei v_0 bzw. φ_0 auf den mit Rohrzucker allein angestellten Versuch zu beziehen sind.

Nach dem Massenwirkungsgesetz gelten nun für die Verteilung des Enzyms an die beiden Stoffe, Rohrzucker und beispielsweise Fructose, die Beziehungen:

$$(R) \cdot (\Phi - \varphi - \psi) = K_M \cdot \varphi$$

und

$$(F) \cdot (\Phi - \varphi - \psi) = K_{M_1} \cdot \psi,$$

wenn Φ , wie früher, die Gesamtkonzentration des Enzyms und ψ die Konzentration der Enzym-Fructoseverbindung bedeuten. Für die Dissoziationskonstante der Enzym-Fructoseverbindung K_{M_1} ergibt sich aus diesen beiden Gleichungen durch Eliminierung von ψ :

$$K_{M_1} = \frac{(F) \cdot K_M}{(R) \cdot \left(\frac{\Phi}{\varphi} - 1 \right) - K_M};$$

mit Hilfe der Beziehung $\varphi = \frac{v}{v_0} \cdot \varphi_0$ und der früher angeführten,

wonach $\frac{\varphi}{\Phi} = \frac{(R)}{(R) + K_M}$, erhält man durch Einsetzen von

$$\frac{\Phi}{\varphi} = \frac{v_0}{v} \cdot \frac{(R) + K_M}{(R)}$$

in die obige Gleichung:

$$K_{M_1} = \frac{(F) \cdot K_M}{((R) + K_M) \cdot \left(\frac{v_0}{v} - 1\right)}$$

Mit Hilfe dieser Gleichung berechneten Michaelis und Menten unter Zugrundelegung des für K_M ermittelten Wertes von 0,0167 aus den oben angeführten Versuchsdaten für die Dissoziationskonstanten der Verbindung von Saccharase und Fructose bzw. Glucose die Werte 0,058 bzw. 0,089, die jedoch infolge der beträchtlichen Fehlerquellen des angewandten Berechnungsverfahrens nur als orientierende anzusehen sind. Die Zahlen, die die Autoren auf ähnliche Weise durch die Untersuchung des Einflusses anderer Stoffe, von Zuckern und von Glycerin, für die Dissoziationskonstanten ihrer Saccharaseverbindungen bzw. für deren reziproke Werte, die die Affinität zu dem Enzym angeben, erhielten, sind mit den oben angegebenen in der Tabelle 14 zusammengestellt.

Tabelle 14.
Affinität der Saccharase zu Zuckern.

Beispiel	Dissoziationskonstante K_M	Affinitätskonstante $\frac{1}{K_M}$
Rohrzucker	0,0167	60
Fructose	0,058	17
Glucose	0,089	11
Mannose	etwa 0,083	12
Glycerin	„ 0,075	13
Mannit	„ 0,22	4,5
Lactose	> 0,5	gg. 0

In einer späteren Untersuchung sind L. Michaelis und H. Pechstein¹⁾ indessen zu der Feststellung gelangt, daß dem in der Tabelle angeführten Glycerin, vielleicht auch den übrigen

¹⁾ Bio. Z. **60**, 79 (1914).

Zuckern, die nicht als Spaltprodukte des Rohrzuckers auftreten, keine Affinität zu der Saccharase selbst zuzuerkennen sei. Die Autoren unterscheiden nämlich zwischen zwei möglichen Arten der Hemmung, je nachdem, ob der hemmende Stoff infolge seiner Affinität zu dem Enzym selbst die Konzentration der Enzym-Substratverbindung herabzusetzen vermag oder ob er die Zerfallsgeschwindigkeit dieser Verbindung beeinflusst.

In der Gleichung

$$v = k \cdot \varphi,$$

welche die zwischen Reaktionsgeschwindigkeit und Konzentration der Enzym-Substratverbindung angenommene Proportionalität wiedergibt, drücken sich die beiden möglichen Arten der Hemmung durch eine Verminderung entweder der Größe von φ oder aber von k aus. Zwischen diesen beiden Möglichkeiten läßt sich nun im gegebenen Falle insofern entscheiden, als der Hemmkoeffizient

$h = \frac{v - v_1}{v}$ im ersteren Falle, also bei einer Verteilung des

Enzyms zwischen Substrat und Hemmungskörper, mit der Konzentration des Substrates variieren wird, während sein Wert im zweiten Falle unabhängig von der Substratkonzentration gefunden wird¹⁾.

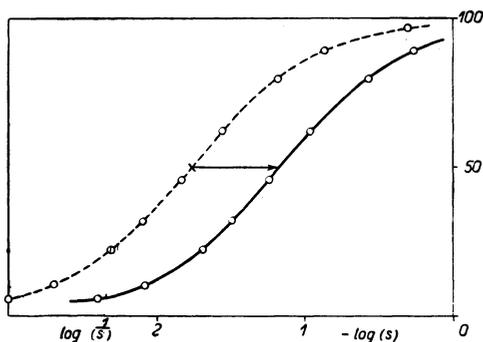
Das experimentelle Verfahren, das Michaelis und Pechstein einschlugen, bestand also in der Untersuchung des Hemmkoeffizienten verschiedener Zusatzstoffe bei wechselnder Substratkonzentration. Im Falle einer Affinitätsbeanspruchung des Enzyms ergab sich dabei lediglich eine Parallelverschiebung der erhaltenen Aktivitäts- p_s -kurve, aber damit eine Veränderung des Parameters der Kurve, der ja die Dissoziationskonstante angibt (ermittelt aus der Hälfte der maximalen Geschwindigkeit); diesem Hemmtypus gehörte beispielsweise die Wirkung der Spaltprodukte des Rohrzuckers, Glucose und Fructose, an²⁾. Im anderen Falle einer Herabsetzung der Zerfallsgeschwindigkeit der Enzym-Substratverbindung erlitt die Aktivitäts- p_s -kurve eine Veränderung in dem Sinne, daß alle ihre Ordinaten verhältnismäßig dieselbe Verkleinerung erfuhren; in dieser Weise hemmten beispielsweise Glycerin und α -Methylglucosid, sie besaßen also keine Affinität zu der Saccharase selbst.

¹⁾ Vgl. L. Michaelis und P. Rona, Bio. Z. **60**, 62 (1914).

²⁾ Nach unseren Untersuchungen von R. Kuhn und H. Münch (H., im Druck) besitzt indessen gerade die im Rohrzucker enthaltene α -Glucose keine Affinität zur Saccharase, ihr Einfluß betrifft nur den Zerfall der Enzym-Substratverbindung.

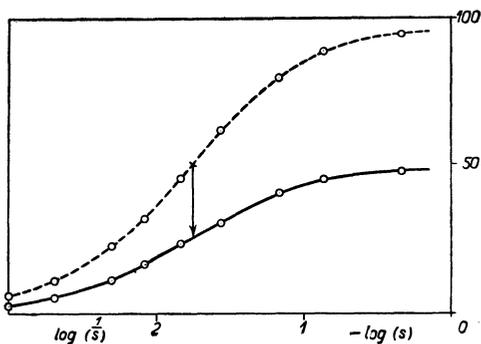
Die folgenden Abb. 5a und 5b sind den Versuchsergebnissen von Michaelis und Pechstein entnommen¹⁾; sie veranschaulichen die charakteristischen Unterschiede in der Verschiebung der Aktivitäts- p_S -kurve bei beiden Arten der Hemmung, Abb. 5a den Einfluß von Fructose, Abb. 5b den des α -Methylglucosids auf die Rohrzuckerspaltung durch Saccharase.

Abb. 5a.



Hemmung durch Affinitätsbeanspruchung (Fructose).

Abb. 5b.

Hemmung der Zerfallsgeschwindigkeit (α -Methylglucosid).

Die für die Größe der einzelnen Affinitäten der Saccharase zu Rohrzucker, zu Fructose und zu Glucose ermittelten Werte haben L. Michaelis und M. L. Menten²⁾ erlaubt, den Reaktionsverlauf der enzymatischen Rohrzuckerhydrolyse allein

¹⁾ Siehe dazu R. Kuhn in C. Oppenheimer, Die Fermente und ihre Wirkungen 1, 192, 5. Aufl., Leipzig, 1925.

²⁾ Bio. Z. 49, 333 (1913).

auf Grund des Massenwirkungsgesetzes mit Hilfe nur einer willkürlich gewählten Konstanten, die der jeweiligen Enzymmenge entspricht, vorauszusagen und zu beschreiben. Sie gehen dabei von der Annahme aus, daß sämtliche vorhandenen Gleichgewichte sich sehr rasch einstellen und auf Grund des Massenwirkungsgesetzes behandelt werden können und daß die Zerfallsgeschwindigkeit der Saccharase-Rohrzuckerbindung jeweils ihrer Konzentration proportional gefunden wird. Wenn

Φ die gesamte Enzymkonzentration,

φ die Konzentration der Enzym-Rohrzuckerbindung,

ψ_1 die Konzentration der Enzym-Fructoseverbindung,

ψ_2 die Konzentration der Enzym-Glucoseverbindung,

(R) die Konzentration des freien Rohrzuckers,

(F) die Konzentration der freien Fructose,

(G) die Konzentration der freien Glucose,

a die Anfangskonzentration des Rohrzuckers und

x die zur Zeit t umgesetzte Menge des Rohrzuckers bedeuten,

so ergibt das Massenwirkungsgesetz, daß sich verhalten:

$$(R) \cdot (\Phi - \varphi - \psi_1 - \psi_2) = K_M \cdot \varphi,$$

$$(F) \cdot (\Phi - \varphi - \psi_1 - \psi_2) = K_F \cdot \psi_1,$$

$$(G) \cdot (\Phi - \varphi - \psi_1 - \psi_2) = K_G \cdot \psi_2.$$

Unter Zuhilfenahme der durch die Gleichung $v = \frac{dx}{dt}$ für die Zerfallsgeschwindigkeit zur Zeit t gegebenen Definition und der für diese Zeit geltenden Beziehungen

$$(R) = a - x \quad \text{und} \quad (F) = (G) = x$$

ergibt sich durch Kombination der obigen drei Gleichungen und Integration auf einem hier nicht näher auszuführenden Wege die Beziehung:

$$k = \frac{1}{t} \cdot \left(\frac{1}{a} + \frac{1}{K_F} + \frac{1}{K_G} \right) \cdot a \cdot \ln \frac{a}{a-x} + \frac{x}{t} \cdot \left(\frac{1}{K_M} - \frac{1}{K_F} - \frac{1}{K_G} \right).$$

Sie stellt nach dem Vorbild von V. Henri¹⁾ die Reaktionsgeschwindigkeit als die Summe einer logarithmischen und einer linearen Funktion des Umsatzes dar. Setzt man in der Gleichung die Affinität des Enzyms zu seinem Substrat gleich der zu seinen Spaltprodukten, also $K_M = K_F = K_G$, so resultiert die Gleichung

¹⁾ Lois générales de l'action des diastases, Thèse. Paris, Hermann, 1903.

einer monomolekularen Reaktion; wird andererseits K_M im Verhältnis zu K_F und K_G sehr groß gedacht, so ergibt sich direkte Proportionalität zwischen Umsatz und Zeit.

Durch Einsetzung der von Michaelis und Menten für ihre Saccharaselösung ermittelten Werte von $K_M = 0,0167$, $K_F = 0,058$ und $K_G = 0,089$ erhält man aus der obigen Gleichung:

$$k = \frac{1}{t} \cdot (1 + 28 a) \cdot 2,303 \cdot \log \frac{a}{a - x} + \frac{32 \cdot x}{t}.$$

Die experimentelle Prüfung der errechneten Beziehungen ergab, daß sie in der Tat den Reaktionsverlauf der Rohrzuckerspaltung mit einiger Genauigkeit wiederzugeben scheinen; die Konstanz der Werte für k erwies sich innerhalb der einzelnen Versuchsreihen und unabhängig von der Rohrzuckerkonzentration als hinreichend. Zu dem nämlichen Ergebnis gelangten in späteren Untersuchungen R. Willstätter, J. Graser und R. Kuhn¹⁾ sowie H. v. Euler. Die Michaelissche Gleichung ist also als der derzeit beste Ausdruck für die Kinetik der Rohrzuckerhydrolyse anzusehen; Einwände, die von Sv. Arrhenius²⁾ dagegen erhoben worden sind, lassen sich noch nicht sicher beurteilen, die von diesem Forscher hervorgehobenen Unstimmigkeiten in den Versuchsergebnissen mit ganz verdünnten Rohrzuckerlösungen lassen sich auch auf Bestimmungsfehler zurückführen.

Die Vorstellungen von Michaelis und Menten, nach welchen die Geschwindigkeit der Rohrzuckerhydrolyse nur durch die Konzentration der Saccharase-Rohrzuckerbindung, also durch die Menge des an Rohrzucker gebundenen Enzyms bestimmt wird und der Zerfallsgeschwindigkeit dieser Verbindung nur untergeordnete Bedeutung beizumessen ist, wird indessen nur für den Vergleich der Reaktionsgeschwindigkeiten bei der nämlichen Wasserstoffzahl Geltung besitzen. Nach den Untersuchungen von R. Kuhn³⁾ ist der an Rohrzucker gebundene Bruchteil der Saccharase unabhängig von der Wasserstoffzahl⁴⁾; wenn trotzdem die Geschwindigkeit der Hydrolyse, wie im 3. Kapitel eingehend erörtert wurde, in hohem Maße von der Wasserstoffzahl abhängig gefunden wird, so wäre

¹⁾ H. **123**, 1, und zwar S. 69 (1922).

²⁾ Z. Ang. **36**, 455 (1923).

³⁾ Naturw. **11**, 732 (1923).

⁴⁾ Diese Feststellung gilt indessen nach H. v. Euler u. R. Josephson nur für den alkalischen Ast der Aktivitäts- p_H -kurve [H. **134**, 50 (1924); **155**, 1 (1926)].

diese Erscheinung damit zu deuten, daß die Wasserstoffionen die Zerfallsgeschwindigkeit der Enzym-Substratverbindung beeinflussen. Zuzufolge der Gleichheit der Affinitätskonstanten des Enzyms bei wechselndem p_H würde man also allein auf Grund der Michaelisschen Voraussetzungen bei einer anderen als der angewandten optimalen Wasserstoffzahl abweichende Reaktionskonstanten, mithin verschiedene Enzymmengen finden.

Ein weiterer Umstand, durch den die Geschwindigkeit enzymatischer Reaktionen bestimmt wird, beruht auf ihrer Temperaturabhängigkeit. Der Einfluß der Temperatur betrifft fast ausschließlich die Geschwindigkeit, mit der sich das Gleichgewicht enzymatischer Prozesse einstellt, nicht dagegen seine Lage selbst, und zwar steigen die Geschwindigkeiten ungefähr in gleichem Grade,

Tabelle 15.
Temperaturkoeffizienten enzymatischer Reaktionen.

Enzym	Substrat	Temperaturintervall (° C)	$k_t + 10 : k_t$	Autoren
Pankreaslipase .	Äthylbutyrat	20—30	1,26	Kastle u. Loevenhart ¹⁾
Ricinuslipase . .	Olivenöl	20—30	1,23	Nicloux ²⁾
Pepsin	Gelatine	25—30	1,95	Arrhenius ³⁾
Trypsin	Casein	20—30	5,30	Bayliss ⁴⁾
Erepsin	Leucylglycin	25—35	1,67	Abderhalden ⁵⁾
Hefesaccharase .	Rohrzucker	30—40	1,50	Kjeldahl ⁶⁾
Maltase	Maltose	20—30	1,44	Lintner und Kröber ⁷⁾
Emulsin	Salicin	20—30	2,62	Tammann ⁸⁾
Pankreasamylase	Stärke	30—40	2,0	Kendall und Sherman ⁹⁾
Malzamylase . .	Stärke	20—30	1,96	Lüers und Was- mund ¹⁰⁾

¹⁾ Am. **24**, 491 (1900).

²⁾ Soc. Biol. **56**, I, 701, 839, 868 (1904).

³⁾ Medd. frå Carlsberg Labor. 1881, S. 335.

⁴⁾ Arch. sciences biol. Pétersbourg **11**, 261 (1904).

⁵⁾ H. **59**, 293 (1909).

⁶⁾ Immunochemie, S. 46. Leipzig 1907.

⁷⁾ B. **28**, 1050 (1895).

⁸⁾ H. **16**, 271, und zwar S. 321 (1891/92).

⁹⁾ Amer. Soc. **32**, 1087 (1910).

¹⁰⁾ Fermentf. **5**, 169 (1921/22).

wie es für nichtenzymatische Prozesse gefunden wurde, nämlich bei einer Temperaturerhöhung um 10^0 im allgemeinen auf etwa das Zwei- bis Dreifache.

Die am sichersten ermittelten Temperaturkoeffizienten der wichtigsten Enzymreaktionen, welche das Verhältnis der Reaktionsgeschwindigkeiten bei der Ausgangs- und bei der um 10^0 höheren Temperatur angeben, nämlich $\frac{k_t + 10}{k_t}$, sind in der vorstehenden Tabelle 15 zusammengestellt.

Die hier mitgeteilten Werte, die zum Teil noch nicht mit ausreichender Berücksichtigung des Einflusses der Wasserstoffzahl gewonnen worden sind, haben nicht durchweg Anspruch auf Genauigkeit; es kommt hinzu, daß in vielen Fällen die bei höheren Temperaturen verstärkte Zerstörung des Enzyms nicht genügend beachtet worden ist, ein Vorgang, der mit der Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit in Wettbewerb tritt; dies gilt insbesondere für den Bereich höherer Temperaturen, da hier die Zunahme der Enzymzerstörung mit der Temperatur viel bedeutender ist als die Erhöhung des Umsatzes. So haben die zahlreichen Angaben der Literatur über die für die einzelnen enzymatischen Reaktionen geltenden Optimaltemperaturen nur problematischen Wert; sie verändern sich gewöhnlich mit der Versuchsdauer und mit der Wasserstoffzahl.

Der Vorgang der Enzyminaktivierung mit steigender Temperatur, der hier noch kurz zu behandeln ist, ist öfter untersucht worden; die Annahme, daß er einem monomolekularen Reaktionsverlauf folge, hat sich für manche Enzyme als richtig erwiesen. Dahin gehört beispielsweise nach G. Tammann¹⁾ die Hitzeinaktivierung des Emulsins der bitteren Mandeln, ferner zufolge der Versuche von Th. Madsen und L. E. Walbum²⁾ die Hitzezerstörung proteolytischer Enzyme, von Pepsin, Lab und Trypsin. Die nachstehend angeführte Tabelle 16 veranschaulicht die Ergebnisse von Tammann für die Zerstörung des Mandel-emulsins bei 60^0 ; die in der letzten Spalte der Tabelle angeführten Inaktivierungskonstanten sind nach der Gleichung

$$k_c = \frac{1}{t} \cdot \ln \frac{k_a}{k_t}$$

¹⁾ Ph. Ch. **18**, 426 (1895); H. **16**, 271, und zwar S. 324 (1891/92).

²⁾ Siehe bei Sv. Arrhenius, *Immunochemie*, S. 57—59. Leipzig 1907.

berechnet, in welcher k_a die anfängliche, k_t die nach der Erhitzungsdauer t gemessene Reaktionsgeschwindigkeit bedeutet.

Tabelle 16.
Hitzeinaktivierung des Emulsins bei 60° nach Tammann.

t Stunden	Relative Wirksamkeit Proz.	$k_c = \frac{1}{t} \cdot \ln \frac{k_a}{k_t}$
0,25	64,6	0,76
0,50	36,3	0,88
0,75	23,9	0,83
1,00	17,7	0,75

In anderen Fällen dagegen, so für die Inaktivierung der Saccharase oder für die der Blutkatalase, scheint der Verlauf nicht so einfach zu liegen; insbesondere erweist sich zufolge der Angaben von R. Willstätter, J. Graser und R. Kuhn¹⁾ die Temperaturempfindlichkeit in hohem Maße abhängig vom Reinheitsgrad des untersuchten Enzyms, man hat also bei allen Aussagen über den Verlauf der Inaktivierung den Einfluß vorhandener Begleitstoffe zu berücksichtigen.

Den speziellen Einfluß der Temperatursteigerung auf die enzymatische Rohrzuckerhydrolyse haben H. v. Euler und J. Laurin²⁾ eingehender analysiert. Auf Grund ihres Befundes, wonach die Dissoziationskonstante der Saccharase-Rohrzucker Verbindung durch Temperaturerhöhung keine wesentliche Steigerung erfährt — sie nahm zwischen 1 und 39° nur um etwa 50 Proz. zu —, ergibt sich die Schlußfolgerung, daß die Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit in diesem Falle auf eine erhöhte Zerfallsneigung der Enzym-Substratverbindung zurückzuführen ist.

Es ist in diesem Zusammenhang von Interesse, die Erscheinungen der enzymatischen und der H-Ionenkatalyse der Zucker und Glucoside zu vergleichen. H. v. Euler hat darauf hingewiesen, daß die nämliche Geschwindigkeit der durch H-Ionen und der durch Saccharase bewirkten Hydrolyse des Rohrzuckers auf ganz verschiedene Weise erreicht wird. In einem angeführten Beispiel gleicher Reaktionsgeschwindigkeit betrug die

¹⁾ H. **123**, 1, und zwar S. 72 (1922).

²⁾ H. **108**, 64 (1919).

Affinitätskonstante der Katalysator-Substratverbindung für das Enzym 50, für die H-Ionenkatalyse dagegen nur 10^{-6} ; es bedurfte also zur Erzielung des nämlichen Umsatzes im zweiten Falle etwa der zehnmillionenfachen Konzentration an Katalysator. Ferner haben die Untersuchungen von R. Kuhn und H. Sobotka¹⁾, die sich mit dem Vergleich der H-Ionen- und Fermentkatalyse befassen, zu dem bemerkenswerten Ergebnis geführt, daß für eine gleiche Konzentration der Katalysator-Substratverbindungen, also unter Berücksichtigung der wechselnden Affinitätskonstanten, das Verhältnis der Reaktionsgeschwindigkeiten für die Hydrolyse von Sacchariden und α -Glucosiden, sei es durch Enzyme, sei es durch Wasserstoffionen, jeweils konstant gefunden wird; es erweist sich also, wie aus der nachstehenden Tabelle 17 ersichtlich, als unabhängig von der Natur des wirksamen Katalysators.

Tabelle 17.

H-Ionen- und Fermentkatalyse nach Kuhn und Sobotka.

Angewandte Substrate	Verhältnis der Reaktionsgeschwindigkeiten für	
	H-Ionen	Enzym
Rohrzucker : Raffinose	1,6	2 ± 1
α -Phenyl- : α -Methylglucosid . . .	25	28
α -Phenylglucosid : Maltose	0,14	0,20

Nun haben die Untersuchungen von Euler und Laurin²⁾ darauf aufmerksam gemacht, daß die Temperaturkoeffizienten der Hydrolysegeschwindigkeiten für die Säure- und für die enzymatische Rohrzuckerkatalyse beträchtlich differieren, der Temperaturkoeffizient der durch die Wasserstoffionen katalysierten Reaktion ist mehr als $2\frac{1}{9}$ mal so hoch. Die umsatzsteigernde Wirkung der Temperaturerhöhung, die für den Fall der Saccharasewirkung nur die Zerfallsgeschwindigkeit des Enzym-Substratkomplexes betrifft, muß also bei der Hydrolyse durch H-Ionen sich außerdem in einer Konzentrationssteigerung der Reaktionszwischenprodukte, vermutlich infolge einer Zunahme der Rohrzuckeranionen, äußern; eine solche Zunahme würde ja eine Konzentrationssteigerung der Katalysator-Substratverbindung in diesem Falle zur Folge haben, trotz einer unverändert gehaltenen Konzentration der Wasserstoffionen selbst.

¹⁾ Ph. Ch. **109**, 65 (1924).

²⁾ l. c.

Die Erfahrungen, die die Forschung vor allem in den letzten Jahrzehnten über den Verlauf enzymatischer Reaktionen gesammelt hat, führen dazu, die speziellen Ansichten, die über den Mechanismus dieser Vorgänge ausgesprochen worden sind, etwas eingehender zu behandeln und ihre Berechtigung zu prüfen. Während die meisten geäußerten Ansichten darin übereinstimmen, daß man für enzymatische Reaktionen wie auch für andere Katalysen die Bildung einer Zwischenverbindung von Katalysator und Substrat anzunehmen habe, betreffen die Gegensätze, die die entwickelten Vorstellungen kennzeichnen, die abweichenden Erklärungen, die von den einzelnen Forschern für das Zustandekommen und für das Wesen der Verbindung von Enzym und Substrat gegeben worden sind.

Die Vereinigung von Enzym und Substrat wird, wie die vorangehenden Ausführungen dargetan haben, in den Untersuchungen vor allem der Michaelisschen Schule, zum mindesten für den speziellen, bestuntersuchten Fall der Rohrzuckerhydrolyse, im Sinne einer Ionenreaktion gedeutet, also als eine Reaktion zwischen chemischen Gruppen auf Grund ihrer spezifischen elektrischen Ladung; die Anwendung des Massenwirkungsgesetzes auf die zwischen Enzym und Substrat bestehenden Beziehungen, wie sie in den grundlegenden Arbeiten von Michaelis ihren Ausdruck findet, hat ferner zur Voraussetzung, daß die an der Reaktion beteiligten Stoffe in homogener Lösung vorliegen und daß das Maß ihrer Vereinigung ausschließlich durch ihre Konzentration in der Lösung bestimmt wird.

In einem gewissen Gegensatz zu diesen elektrochemisch gerichteten Vorstellungen stehen die Betrachtungen, mit denen W. M. Bayliss¹⁾ das Wesen enzymatischer Prozesse zu veranschaulichen gesucht hat, Betrachtungen, die von überwiegend kolloidchemischen Gesichtspunkten ausgehen. Die von Bayliss vertretene Anschauung erblickt das Wesen der Enzymwirkung in einem mehr oder weniger spezifischen Adsorptionsvorgang, der die Voraussetzung bildet für die nachfolgende chemische Reaktion an der Grenzfläche der adsorbierten Teilchen. Die primäre Vereinigung von Enzym und Substrat wird demnach weniger auf eine bestimmte chemische Affinität derselben zurückgeführt, die durch das Enzym hervor-

¹⁾ The nature of enzyme action, 3. Aufl., London 1914, S. 107 ff.; Biochem. Journ. 1, 175, und zwar S. 222 (1906); Journ. of Physiol. 46, 236, und zwar S. 251 (1913).

gerufene Reaktionsbeschleunigung beruht vielmehr in erster Linie auf einer durch Adsorption bedingten Konzentrationserhöhung der beteiligten Stoffe, bei hydrolytischen Prozessen beispielsweise von Substrat und Wasser, an der Grenzfläche der Enzymteilchen. An dieser Grenzfläche soll sich dann die eigentliche Umsetzung vollziehen, welche zwar ebenfalls der Gültigkeit des Massenwirkungsgesetzes unterliegt, für deren Ausmaß jedoch der jeweils adsorbierte Anteil der beteiligten Stoffe als entscheidend angesehen wird. Wenn in gewissen Fällen, beispielsweise bei der Hydrolyse stereoisomerer Glucoside, eine ausgesprochene optische Spezifität der Enzymwirkung beobachtet wird, so erklärt sich diese Erscheinung nach Bayliss zwar auch aus einer spezifisch aufeinander eingestellten räumlichen Anordnung der reagierenden Gruppen von Enzym und Substrat; aber für die Bevorzugung nur des einen Isomeren wird nicht die chemische Affinität, sondern die mit der besonderen sterischen Anordnung gegebene Möglichkeit einer innigeren Berührung von Enzym und adsorbiertem Substrat verantwortlich gemacht.

Noch weniger in chemischem Sinne wird die Vereinigung von Enzym und Substrat in den Untersuchungen von A. Fodor¹⁾ und von E. Abderhalden und A. Fodor²⁾ behandelt, die im 1. Kapitel bereits besprochen worden sind; während die von Bayliss entwickelten Vorstellungen die auswählende Wirkung der Enzyme mit der Annahme einer spezifischen Adsorption der Substrate zu deuten gestatten, gehen diese Forscher von der Anschauung einer allgemeinen Adsorption von Substrat an das Enzym aus; nicht die Kombination von Enzym und Substrat wird als spezifisch angesehen, sondern die Spaltung als solche.

Diese Vorstellungen sind indessen durch die experimentellen Ergebnisse der neueren Enzymforschung nicht bestätigt worden; allgemein läßt sich sagen, daß sie für sich allein nicht instande sind, das Wesen enzymatischer Vorgänge ausreichend zu erklären. Die in den vorausgehenden Abschnitten dieses Kapitels besprochenen Untersuchungen haben erwiesen, daß man in einer Reihe von Fällen, insbesondere für die Wirkung kohlehydratspaltender Enzyme, den Verlauf enzymatischer Reaktionen mit ziemlicher Genauigkeit auf Grund des Massenwirkungsgesetzes

¹⁾ Das Fermentproblem. Dresden und Leipzig 1922.

²⁾ Fermentf. **1**, 533 (1916); **2**, 74 (1917).

beschreiben kann¹⁾, daß also für die Geschwindigkeit der Reaktionen nicht nur ein bestimmter adsorbierter Bruchteil des Substrats, sondern seine gesamte Konzentration maßgebend ist; das Gleichgewicht zwischen Enzym und Substrat ist in diesen Fällen wie in homogener Lösung durch die Dissoziationskonstante der Enzym-Substratverbindung bestimmt. Andererseits haben die Erfahrungen, die sich aus den Untersuchungen von R. Willstätter²⁾ bei der präparativen Reinigung vieler enzymatischer Stoffe ergeben haben, auch für die Enzyme selbst die Tatsache erwiesen, daß ihre aktive Masse nur durch ihre Konzentration bestimmt und daß sie durch Änderungen des Dispersitätsgrades und der Oberflächenentwicklung nicht, oder nicht wesentlich beeinflusst wird.

Die Ansicht, daß eine bestimmte Oberflächenentwicklung als eine wesentliche Voraussetzung für die Aktivität der Enzyme anzusehen sei, scheint zwar bei komplizierteren Reaktionssystemen, als sie bei zuckerspaltenden Enzymen vorliegen, z. B. bei den fettspaltenden Enzymen, durch gewisse Eigenschaften gestützt zu sein. So findet man pankreatische Lipase in einigen ihrer Adsorbate, wie in den Tonerde- und Kaolinadsorbaten, nur noch teilweise, in anderen, wie den Adsorbaten an Tristearin und Cholesterin, gar nicht mehr wirksam. Allein diese Erscheinungen sind nicht auf eine Beeinträchtigung der Adsorptionstüchtigkeit dieses Enzyms zurückzuführen, sondern vielmehr auf eine Beeinflussung seiner spezifischen, reaktionsfähigen Gruppe, das Enzym läßt sich nämlich aus den angeführten Adsorbaten in unverminderter Aktivität wieder eluieren.

Immerhin läßt gerade die Kinetik enzymatischer Fettspaltungen eine bemerkenswerte Abhängigkeit von der Einstellung eines bestimmten Adsorptionszustandes erkennen: das wasserlösliche Enzym, die tierische Lipase, benötigt für den Kontakt mit dem wasserunlöslichen Fett, für den die Herstellung einer guten Emulsion, also einer mechanischen Suspension des Substrats in der Enzymlösung, nicht ausreicht, der Vermittlung gewisser Begleit- oder Zusatzstoffe mit ausgeprägten adsorptiven Eigenschaften, die sich gegenüber beiden, dem Enzym und dem Substrat, geltend zu machen vermögen; aber es ist nicht die Oberflächenentwicklung des Enzyms selbst oder seiner Substrate, die man für die jeweilige Aktivität maßgebend findet, es sind die Adsorptionsaffinitäten von an der

¹⁾ Siehe dagegen die Ausführungen von S. G. Hedin, H. **146**, 122 (1925); **154**, 252 (1926).

²⁾ Vgl. B. **55**, 3601, und zwar S. 3605 (1922).

Reaktion selbst unbeteiligten, sie nur erleichternden, unspezifischen Stoffen. Bei der wasserunlöslichen pflanzlichen Lipase andererseits ist die adsorptive Verkettung an einen unlöslichen Reaktionsvermittler schon intrazellulär verwirklicht und so ausgeprägt, daß die Wirksamkeit des Enzyms mit der Oberflächenbeschaffenheit dieses Trägers eng verbunden bleibt. Auch in diesen besonderen Fällen wird die Aktivität des Enzyms nicht von dem Grade seiner eigenen Dispersität, sondern von der Adsorptionstauglichkeit mit ihm mehr oder weniger eng vergesellschafteter Vermittler abhängen, die entweder, nämlich bei pflanzlicher, schon adsorbierter Lipase, gegenüber dem Substrat allein oder, nämlich bei tierischer Lipase, gegenüber Enzym und Substrat zugleich zur Geltung kommt. Die Anwendung des Massenwirkungsgesetzes allein wird keine ausreichende Handhabe zum Verständnis und zur Beschreibung solcher inhomogener Reaktionssysteme darstellen, wenn man auch annehmen muß, daß der Verlauf und das Wesen der eigentlichen fermentativen Umsetzung in homogenen und in nichthomogenen Systemen sich grundsätzlich nicht unterscheiden wird. Für seine Erkenntnis wird indessen die Untersuchung einfacher, homogener Reaktionssysteme förderlicher sein.

Am ausgesprochensten in chemischem Sinne ist der Mechanismus der Enzymwirkung in den Untersuchungen von H. v. Euler¹⁾ aufgefaßt worden; dies gibt sich insbesondere zu erkennen in seinen zahlreichen Arbeiten über die Inaktivierung von Enzymen durch Schwermetallsalze oder Amine, in welchen die chemische Affinität beispielsweise eines Amins zu einem Aldehyd mit der vergiftenden Wirkung dieses Amins gegenüber der Hefesaccharase verglichen wird, um so auf indirektem Wege Aufschluß über die chemische Natur der spezifischen aktiven Gruppe des Enzyms zu erlangen²⁾. H. v. Euler und K. Josephson³⁾ haben auch für den speziellen Fall der Rohrzuckerhydrolyse durch Saccharase eine genauer präzisierete Vorstellung ausgesprochen, die den chemischen Vorgang der Bildung und Spaltung des Saccharids verständlich zu machen sucht. Die Saccharase wird auf Grund ihrer amphoterer Natur und ihres Verhaltens zu proteolytischen Enzymen sowie zufolge der Ergebnisse präparativer Untersuchungen als amphoterer

¹⁾ Chemie der Enzyme, 2. Aufl., 1. Teil, München u. Wiesbaden 1920.

²⁾ H. v. Euler u. O. Svanberg, Fermentf. **3**, 330 (1920); **4**, 29, 90, 142 (1920/21).

³⁾ H. **133**, 279 (1923/24).

Proteinderivat angesehen, ausgestattet mit einer spezifischen, rohrzuckerbindenden Gruppe. Die Grundannahme, die die Eulersche Vorstellung kennzeichnet, läßt sich nun dahin zusammenfassen, daß die Spaltung des Rohrzuckers nicht an der gleichen Stelle des Enzymmoleküls erfolgt, an welcher die Bindung des Substrats stattgefunden hat; für die Spaltung wird vielmehr, in Analogie zur Wirkung der Wasserstoffionen, eine bestimmte Aufladung durch eine dissoziierte Gruppe des Proteinteils der Saccharase verantwortlich gemacht, und der zwischen Wasserstoffionen und Enzym bestehende bedeutende Affinitätsunterschied wird darauf zurückgeführt, daß infolge der anderwärts erfolgten Bindung des Rohrzuckers an das Enzym in diesem Falle die Wahrscheinlichkeit einer Aufladung des Substrats viel größer sein muß. Diese theoretisch bemerkenswerte Anschauung ist indessen noch nicht hinreichend gesichert; auch haben die Ergebnisse der Untersuchungen Willstätters die spezielle Annahme einer proteinartigen Natur des Enzyms zum mindesten unwahrscheinlich gemacht.

Die Kinetik enzymatischer Reaktionen ist in den bisherigen Ausführungen ausschließlich unter dem Gesichtspunkt betrachtet worden, als ob sie einseitig in der Richtung der Hydrolyse verliefen und die synthetischen Gegenreaktionen nicht zu berücksichtigen seien. Bekanntlich lehrt jedoch das Massenwirkungsgesetz, daß nicht nur die Geschwindigkeit, sondern auch die Richtung umkehrbarer Prozesse durch die Konzentration der beteiligten Stoffe bestimmt wird, es gilt nicht nur für die Geschwindigkeit der einen, auch für die der Gegenreaktion. Die Gleichgewichtslage einer reversiblen Reaktion wird danach bestimmt durch die Konzentration aller beteiligten Stoffe und damit durch das Verhältnis der Geschwindigkeiten, mit der die Reaktion in den beiden Richtungen verläuft; nach der dynamischen Auffassung geht in der Gleichgewichtslage der Umsatz in beiden Richtungen mit der nämlichen Geschwindigkeit vor sich, die Gleichgewichtskonstante ist also gegeben durch das Verhältnis der beiden Konstanten der Reaktionsgeschwindigkeit, beispielsweise der hydrolytischen und der synthetischen:

$$K = \frac{k_1}{k_2}.$$

Wenn die Geschwindigkeit einer Esterspaltung gegeben ist durch die Beziehung

$$v_1 = k_1 \cdot (\text{Ester}) \cdot (\text{Wasser})$$

und die der Esterbildung durch den analogen Ausdruck

$$v_2 = k_2 \cdot (\text{Alkohol}) \cdot (\text{Säure}),$$

so ergibt sich daraus für die Gleichgewichtslage, bei welcher $v_1 = v_2$, die Gleichgewichtskonstante

$$K = \frac{k_1}{k_2} = \frac{(\text{Säure}) \cdot (\text{Alkohol})}{(\text{Ester}) \cdot (\text{Wasser})};$$

die Gleichung lehrt, daß beispielsweise eine Konzentrationserhöhung der Spaltprodukte, von Säure oder Alkohol im vorliegenden Falle, in einer Hemmung der Esterverseifung zur Geltung kommen muß, und zwar in einer Hemmung, welche man prinzipiell von der schon besprochenen, auf Affinitätsbeanspruchung des Katalysators beruhenden zu unterscheiden hat. Die Gleichgewichtslage einer solchen umkehrbaren Reaktion ist nämlich nach der gegebenen Gleichung, wie auch experimentell bestätigt wurde, unabhängig von der Geschwindigkeit, mit welcher sie erreicht wird, und sie wird auch durch die Gegenwart eines idealen Katalysators, der nur einen zu vernachlässigenden Bruchteil der reagierenden Komponenten des Systems bindet, und durch die Konzentration dieses Katalysators nicht beeinflusst.

Auf die theoretisch gegebene Möglichkeit, daß auch die Enzyme die von ihnen katalysierten Reaktionen nicht nur in der Richtung der Hydrolyse, sondern auch in der der Synthese zu beschleunigen vermögen, ist zuerst durch J. H. van't Hoff¹⁾ im Jahre 1898 hingewiesen worden und seine Überlegungen sind bald darauf durch die erste enzymatische Synthese eines Disaccharids durch A. Croft Hill²⁾ experimentell bestätigt worden.

Mit der Erkenntnis der synthetisierenden Eigenschaften der Enzyme gewann auch die Frage Interesse, ob sie imstande seien, Verschiebungen in der gewöhnlichen Gleichgewichtslage chemischer Reaktionssysteme zu bewirken, d. h. ob die enzymatischen Gleichgewichte mit den für die Wirkung anderer Katalysatoren beobachteten identisch seien. Nach den Gesetzen der Thermodynamik war zu erwarten, daß ein enzymatischer Katalysator, der nicht wesentliche Anteile der reagierenden Komponenten eines Systems zu binden vermag, keine Störung der gewöhnlichen Gleichgewichtslage verursachen sollte; die Erfahrungen, die bei enzymatischen

¹⁾ Z. a. Ch. 18, 1 (1898).

²⁾ Soc. 73, 634 (1898).

Gleichgewichten gewonnen worden sind, haben indessen erwiesen, daß diese Forderung nicht für alle enzymatischen Reaktionen zutreffen scheint, wenn auch in vielen Fällen die Lage des nicht-enzymatischen Gleichgewichts nicht sicher bestimmbar ist.

Die ersten eingehenden Untersuchungen über die Lage enzymatischer Gleichgewichte stammen aus den Jahren 1903 und 1906, sie beziehen sich auf die Spaltung und Synthese von Estern. So hat H. Pottevin¹⁾ zuerst die enzymatische Synthese eines Ölsäureesters, des Methyloleats, aus Ölsäure und Methylalkohol mit Hilfe pankreatischer Lipase beschrieben, und zwar speziell mit Bezug auf den Einfluß verschiedener Enzymmengen auf den Grad der erreichbaren Synthese. Es ergab sich, wie aus der folgenden Tabelle 18 hervorgeht, keine deutliche Abhängigkeit der Lage des erreichten Gleichgewichts von der Menge des angewandten Katalysators.

Tabelle 18.

Synthese von Methyloleat nach Pottevin.
(Äquimolekulare Mengen Ölsäure und Methylalkohol, 33°.)

Relative Enzymmenge	Prozent Synthese nach Tagen		
	1	3	20
1	8	56	84
2	12	66	82
5	21	66	84
10	43	74	85

Auch die Synthese des Trioleins, des Ölsäure-Triglycerids, durch Pankreaslipase ist von Pottevin in ihrer Abhängigkeit von der Glycerinkonzentration untersucht worden. Später hat Y. W. Jalander²⁾ für die Bildung dieses Fettes gezeigt, daß die mit einer pflanzlichen Lipase, aus Ricinussamen, erreichte Gleichgewichtslage mit dem hydrolytischen Gleichgewicht innerhalb der Versuchsfehler übereinstimmte. A. E. Taylor³⁾ hat ferner das hydrolytische Gleichgewicht des Triacetins durch Ricinuslipase mit dem durch Schwefelsäure sich ergebenden bei verschiedenen Substratkonzentrationen verglichen, mit dem Ergebnis, daß sich nur für höhere

¹⁾ C. r. **138**, 378 (1904); Ann. Inst. Pasteur **20**, 901 (1906).

²⁾ Bio. Z. **36**, 435 (1911).

³⁾ Jl. Biol. Chem. **2**, 87 (1906).

Konzentrationen des Glycerids eine Verschiebung in der Richtung geringerer Hydrolyse für den enzymatischen Prozeß bemerken ließ; indessen ist die Vergleichbarkeit der beschriebenen Experimente nicht ganz gesichert. Tabelle 19 veranschaulicht die bei größeren Estermengen gefundenen Abweichungen.

Tabelle 19.

Gleichgewicht der Säure- und Fermenthydrolyse des Triacetins nach Taylor.

Substrat- konzentration Proz.	Gleichgewicht in Proz. Hydrolyse bei	
	0,5 n H ₂ SO ₄	Ricinulipase
0,5	88	86
1,0	82	79
2,0	78	70

Die eingehendste Untersuchung über Gleichgewichte bei enzymatischen Esterhydrolysen verdankt man M. Bodenstein und W. Dietz¹⁾; diese Forscher untersuchten die Hydrolyse und Synthese von Amylbutyrat unter der Einwirkung pankreatischer Lipase. Nach ihren Versuchen stellt sich bei einer bestimmten Konzentration der beteiligten Stoffe ein von beiden Seiten erreichbares Gleichgewicht ein, dessen Lage unabhängig von der Enzymmenge gefunden wird. Mit steigender Substratkonzentration verändert sich dagegen entgegen der Forderung des Massenwirkungsgesetzes das Verhältnis der Reaktionsgeschwindigkeiten, der hydrolytischen und der synthetischen, das gegeben ist durch den Ausdruck

$$K \text{ (Gleichgewichtskonstante)} = \frac{k_2 \text{ (Hydrolyse)}}{k_1 \text{ (Synthese)'}}$$

es nimmt nämlich zu; die Veränderung der Gleichgewichtskonstanten in ihrer Abhängigkeit von der Substratkonzentration nach Bodenstein und Dietz zeigt die nachfolgende Zusammenstellung:

Substratkonzentration normal	Gleichgewichtskonstante <i>K</i>
0,05	0,45
0,10	0,74
0,20	1,12

¹⁾ Z. El. Ch. **12**, 605 (1906).

Sodann ergab der Vergleich mit der Säurekatalyse, daß im Falle der enzymatischen Reaktion das Gleichgewicht beträchtlich zugunsten der Hydrolyse verschoben ist, es lag z. B. in dem untersuchten Beispiel bei einer Esterbildung von 75 Proz. für das Enzym gegenüber 85,5 Proz. für die Wirkung der Wasserstoffionen, und die Gleichgewichtskonstante der Säurekatalyse fand man zu 1,12. Die beobachtete Gleichgewichtsverschiebung unter der Einwirkung des Enzyms ist von F. Haber¹⁾ mit der Annahme der Wirkung besonderer Oberflächenkräfte in dem vorliegenden makroheterogenen System, von H. Freundlich²⁾ mit einer Konzentrationsverschiebung an der Grenzfläche der Enzymteilchen gedeutet worden.

Auf Grund der Angaben von O. Emmerling³⁾, wonach das von Croft Hill bei der Einwirkung von Hefeauszug auf Traubenzucker erhaltene Disaccharid mit Isomaltose zu identifizieren sei, also einem Körper, der durch die Maltase der Hefe selbst nicht gespalten wird, sowie ähnlicher Beobachtungen von E. Fischer und E. F. Armstrong⁴⁾ hat E. F. Armstrong⁵⁾ die Ansicht geäußert, daß die Enzyme nur diejenigen Stoffe zu synthetisieren vermöchten, die von ihnen selbst nicht hydrolysiert würden, daß man also zwischen hydrolysierenden und synthetisierenden Enzymen zu unterscheiden habe. Allein diese Annahme hat auch speziell bei den kohlehydratspaltenden Enzymen, für die sie in erster Linie zu gelten hatte, in den eingehenden Untersuchungen von E. Bourquelot⁶⁾ und seiner Schule keine Bestätigung erfahren; so hat es sich gezeigt, daß entgegen den speziellen Ansichten Armstrongs die Glucosidase der bitteren Mandeln die nämlichen Glucoside aufzubauen vermag, die ihrer Hydrolyse anheimfallen. Auch bei der Wirkung glucosidspaltender Enzyme kommt es nach Bourquelot zur Ausbildung echter Gleichgewichte, die von beiden Seiten her, sowohl auf hydrolytischem wie auf synthetischem Wege, erreicht werden können. So wurde in einem Beispiel der Hydrolyse bzw. Synthese von β -Methylglucosid durch Emulsin in 30 Proz. Methyl-

¹⁾ Siehe C. Oppenheimer, Die Fermente und ihre Wirkungen, 4. Aufl., Leipzig 1913, 2, 937.

²⁾ Kapillarchemie, 2. Aufl., Leipzig 1922, S. 1054.

³⁾ B. 34, 600, 3810 (1901).

⁴⁾ B. 35, 3144 (1902).

⁵⁾ Proc. Roy. Soc. B 76, 592 (1905).

⁶⁾ Siehe A. ch. (9) 7, 153 (1917).

alkohol gefunden, daß die Geschwindigkeit der beiden Prozesse nahezu übereinstimmt, man erhielt also für die Gleichgewichtskonstante $K = \frac{k_2}{k_1}$ den Wert 1, entsprechend einer Hydrolyse bzw. Synthese von 50 Proz.

In der folgenden Tabelle 20 sind die Ergebnisse einer Versuchsreihe zusammengestellt.

Tabelle 20.

Hydrolyse bzw. Synthese von β -Methylglucosid nach Bourquelot.

Zeit Tage	Synthese		Hydrolyse	
	Beob. Drehung Min.	Abnahme	Beob. Drehung Min.	Zunahme
0	+ 64	0	— 42	0
1	+ 58	6	— 36	6
2	+ 48	16	— 26	16
4	+ 40	24	— 18	24
8	+ 28	36	— 6	36
13	+ 16	48	+ 6	48
18	+ 12	52	+ 10	52
—	Endwert	—	Endwert	—

Die angegebene Gleichgewichtskonstante gilt jedoch nur für das β -Glucosid, während die Geschwindigkeit der Umsetzung des α -Glucosids stark davon abweicht; so wurde beispielsweise für die Einwirkung von Maltase auf α -Äthylglucosid bei einem Alkoholgehalt von 20 Proz. K_α zu 0,484, für Emulsin und β -Äthylglucosid K_β zu 0,308 gefunden. Dieser Unterschied ließ sich auch bei gleichzeitiger Einwirkung der beiden Enzyme auf das Gemisch der Substrate bestätigen, das Ergebnis stand mit dem auf Grund des Massenwirkungsgesetzes aus den gegebenen Konstanten berechneten in Übereinstimmung.

Der erwähnte Befund von E. Bourquelot¹⁾, wonach die Synthese wie die Hydrolyse des β -Methylglucosids durch Emulsin unter den angewandten Bedingungen mit derselben Geschwindigkeit verlaufen, gilt indessen nur für die enzymatische Wirkung; das beispielsweise bei der Säurekatalyse sich einstellende Gleichgewicht ist von dem enzymatischen verschieden. So haben H. v. Euler

¹⁾ Siehe speziell Jl. de Pharm. Chim. (7) 10, 361, 393 (1914).

und K. Josephson¹⁾ die Versuchsergebnisse Bourquelots einer Berechnung unterzogen und für die Gleichgewichtskonstante

$$K_{(H)} = \frac{(\text{Alkohol}) \cdot (\text{Glucose})}{(\text{Wasser}) \cdot (\text{Glucosid})}$$

daraus den Wert 0,25 ermittelt. Nach H. v. Euler²⁾ wird die Gleichgewichtslage enzymatischer Reaktionen nicht wie bei der idealen Katalyse durch die Konzentration der beteiligten Stoffe, sondern durch das Verhältnis ihrer Affinitäten zu dem Enzym selbst bestimmt. Wenn z. B. die Affinität des Enzyms zum Glucosid ausgedrückt wird durch

$$K_1 = \frac{(\text{Glucosid} - \text{Enzym})}{(\text{Glucosid}) \cdot (\text{Enzym})}$$

und die zu dem Spaltprodukt durch

$$K_2 = \frac{(\text{Glucose} - \text{Enzym})}{(\text{Glucose}) \cdot (\text{Enzym})},$$

so errechnet sich für die Gleichgewichtslage, bei welcher die Geschwindigkeiten der hydrolytischen wie der synthetischen Reaktion übereinstimmen, also

$$k_1 \cdot (\text{Glucosid} - \text{Enzym}) \cdot (\text{Wasser}) = k_2 \cdot (\text{Glucose} - \text{Enzym}) \cdot (\text{Alkohol})$$

zu setzen ist, folgende Beziehung:

$$k_1 \cdot K_1 \cdot (\text{Glucosid}) \cdot (\text{Wasser}) = k_2 \cdot K_2 \cdot (\text{Glucose}) \cdot (\text{Alkohol}),$$

worin k_1 und k_2 die Geschwindigkeitskonstanten der beiden konkurrierenden Reaktionen darstellen. Das Gleichgewicht der enzymatischen Reaktion, das gegeben ist durch

$$\frac{k_1}{k_2} = \frac{K_2 \cdot (\text{Glucose}) \cdot (\text{Alkohol})}{K_1 \cdot (\text{Glucosid}) \cdot (\text{Wasser})},$$

fällt danach nur dann mit dem Gleichgewicht bei idealer Katalyse, entsprechend

$$\frac{(\text{Glucose}) \cdot (\text{Alkohol})}{(\text{Glucosid}) \cdot (\text{Wasser})},$$

zusammen, wenn die Affinität des Enzyms zu seinem Substrat der Summe seiner Affinitäten zu den Spaltprodukten gleichkommt, also wenn $K_1 = K_2$. Nur für diesen Fall folgt ja auch, wie früher

¹⁾ Arkiv f. Kemi 9, Nr. 7 (1924).

²⁾ H. 52, 146 (1907).

auseinandergesetzt worden ist, der Verlauf der enzymatischen Reaktion der Gleichung erster Ordnung.

Unter Bezugnahme auf die eben entwickelten Vorstellungen haben v. Euler und Josephson für den speziellen Fall der von Bourquelot bestimmten Gleichgewichtslage des β -Methylglucosids die Folgerung erhoben, daß die Affinität des Emulsins zur Glucose etwa viermal so groß sein müsse als die zum β -Methylglucosid, da ja $\frac{K(\text{synthetisch})}{K(\text{hydrolytisch})} = \frac{1}{0,25}$ gefunden wurde; in der Tat ergaben die unter Verwertung anderer Untersuchungen durchgeführten Berechnungen für das Verhältnis der Affinitätskonstanten des Enzyms zu Glucose und β -Methylglucosid den Wert 3,3.

Die bemerkenswerten Untersuchungen von L. Rosenthaler¹⁾ sowie von E. Nordefeldt²⁾ über die asymmetrische Synthese von Mandelsäurenitril durch Emulsin sollen erst im 6. Kapitel besprochen werden. Nach den Beobachtungen von W. M. Bayliss³⁾ und von E. Nordefeldt ist die Lage des Gleichgewichts für die enzymatische, wie für die nichtenzymatische, nämlich die durch OH-Ionen katalysierte Synthese des Mandelsäurenitrils aus Benzaldehyd und Blausäure ungefähr die gleiche.

Die Angaben der Literatur über enzymatische Synthesen beschränken sich indessen nicht auf den Aufbau von Estern oder von einfachen Kohlehydraten und Glucosiden; es ist gelegentlich auch über die Rückbildung höherer Kohlehydrate aus einfachen Zuckern⁴⁾ und über die Einstellung bestimmter Gleichgewichte, beispielsweise bei der Hydrolyse von Stärke⁵⁾, unter der Wirkung von Enzymen berichtet worden, allein die Deutung dieser Befunde als synthetische Vorgänge dürfte in Anbetracht der vorliegenden komplizierten Reaktionssysteme nicht zutreffen. Der gleiche Einwand läßt sich gegenüber zahlreichen Beobachtungen über Synthesen von Eiweiß oder Eiweißabbauprodukten⁶⁾ erheben, eine synthetische Ver-

¹⁾ Bio. Z. **14**, 238 (1908); **17**, 257 (1909).

²⁾ Ebenda **118**, 15 (1921); **131**, 390 (1922).

³⁾ J. of Physiol. **46**, 236 (1913).

⁴⁾ Vgl. M. Cremer, B. **32**, 2062 (1899).

⁵⁾ Vgl. J. Wolff und A. Fernbach, C. r. **137**, 718 (1903); L. Maquenne, Bl. **35**, S. I (1906); E. C. Kendall und H. C. Sherman, Am. Soc. **32**, 1087 (1910).

⁶⁾ Vgl. V. Henriques und J. K. Gjaldbaek, H. **71**, 485 (1911); **81**, 439 (1912); **83**, 83 (1913); E. Abderhalden, Fermentf. **1**, 47 (1914).

knüpfung von Proteinbausteinen mit Hilfe von Enzymen ist bis heute nicht mit Sicherheit nachgewiesen worden; die unbefriedigenden experimentellen Unterlagen, mit denen die Literatur diesen Nachweis belegt, lassen sich auch in anderem Sinne deuten.

V. Enzymatische Reaktionssysteme (Aktivierung und Hemmung).

Die viel vertretene Anschauung, daß ein Teil der Enzyme, insbesondere solche des tierischen Organismus, nicht in aktivem Zustand von den Zellen abgegeben würden, sondern in Form unwirksamer Vorstufen, als „Proenzyme“ oder „Zymogene“, ist schon sehr alt; einige der frühesten Beobachtungen dieser Art finden sich in den Untersuchungen von O. Hammarsten¹⁾, von J. N. Langley²⁾ sowie von W. Ebstein und P. Grützner³⁾, nach deren Angaben Pepsin wie Lab von der Magenschleimhaut zunächst in inaktiver Form sezerniert würden; die Salzsäure des Magens sollte sie dann in wirksame Form überführen. Es hat sich indessen gezeigt, daß diese Aktivierungserscheinung ganz unspezifisch ist und daß sie nur auf der Einstellung einer für die Pepsin- oder Labwirkung günstigen Acidität beruht; so sind wie diese viele andere Angaben der älteren Literatur über die Aktivierung enzymatischer Reaktionen auf die Nichtbeachtung des Einflusses der Wasserstoffzahl zurückgeführt worden oder sie werden sich darauf zurückführen lassen.

Abgesehen von diesem durchweg beobachteten Einfluß der Wasserstoff- bzw. Hydroxylionen auf die Aktivität der Enzyme, der schon behandelt worden ist, ist jedoch die Existenz einer gewissen Anzahl typischer Aktivierungen, die durch den Zusatz besonderer Aktivatoren hervorgerufen werden, mit Sicherheit erwiesen; allein alle Annahmen, nach welchen Enzyme in Form von Zymogenen, unfertigen Enzymen, in den Zellen gebildet würden, haben sich bisher als unzutreffend erwiesen. Die Erscheinungen der Enzymaktivierung, der spezifischen und der unspezifischen, durch zusätzliche Stoffe sollen nachfolgend an einigen charakteristischen Beispielen beschrieben werden.

¹⁾ R. Malys Jahresbericht über die Fortschritte der Tierchemie **2**, 118 (1872).

²⁾ J. of Physiol. **3**, 269 (1882).

³⁾ Pflüg. Arch. **8**, 122, 613 (1874).

Ein typisches Beispiel einer einfachen Aktivierung durch anorganische Ionen findet sich bei den tierischen stärke-spaltenden Enzymen. Ältere Angaben über die Existenz eines Amylasezymogens, an welchen auch teilweise der Mangel quantitativer Bestimmungsmethoden schuld haben mag, sind durch die exakten Untersuchungen vor allem von H. Bierry, J. Giaja und V. Henri¹⁾ überholt und richtiggestellt worden, aus welchen hervorging, daß tierische Amylase, z. B. die des pankreatischen Sekrets, zu ihrer Wirkung der Gegenwart bestimmter anorganischer Ionen, vor allem der Chlorionen bedarf und daß salzfrei dialysierte Enzymlösungen sich als unwirksam erweisen. Diese Erscheinung, die daraufhin oft und eingehend untersucht worden ist, unterscheidet zufolge H. Bierry²⁾ die tierische von der pflanzlichen Amylase; man hat nämlich bei letzterer, z. B. bei Enzym aus keimender Gerste, bisher keine Aktivierung durch Salzionen feststellen können. Dagegen haben H. Haehn und H. Schweigart³⁾ für die Amylase der Kartoffel erwiesen, daß dieses Enzym in seinem Verhalten gegenüber Neutralsalzen mit tierischer Amylase identisch ist.

Die wirksamen Komplexe aus Amylase und Anionen sind nach L. Michaelis und H. Pechstein⁴⁾ gekennzeichnet durch stark abweichende Dissoziationskonstanten; die Festigkeit der Verbindung von Enzym und Ion scheint z. B. in der Reihenfolge der Ionen von $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{Cl}^- \rightarrow \text{Br}^- \rightarrow \text{SO}_4^{2-}$ abzunehmen. Diese Reihenfolge wird abgeleitet aus der verschiedenen Stärke der Hemmung, die die betreffenden Ionen gegenüber dem durch Cl-Ionen maximal aktivierten Enzym ausüben, unter der Annahme, daß eine Verteilung des Enzyms zwischen den verschiedenen Ionen eintritt und daß die „Chlorid-Amylase“ zwar die wirksamste, aber nicht die festeste Ionenverbindung des Enzyms darstellt. Auch sollen den einzelnen Amylasekomplexen verschiedene Aciditätsoptima der Wirkung entsprechen, sie sind mit der Annahme verschiedener Amylasearten gedeutet worden. Die beobachteten Unterschiede sind jedoch nach A. Hahn und K. Harpuder⁵⁾ sowie nach R. Willstätter, E. Waldschmidt-Leitz und A. R. F. Hesse⁶⁾ als eine

1) C. r. **143**, 300 (1906); Soc. Biol. **60**, 479 (1906); **62**, 432 (1907).

2) Bio. Z. **40**, 357 (1912).

3) Ebenda **143**, 516 (1923).

4) Ebenda **59**, 77 (1914).

5) Z. Biol. **71**, 287 (1920).

6) H. **126**, 143, und zwar S. 150 (1922/23).

Folge der kombinierten Salz-Pufferaktivierung zu verstehen; der Einfluß der Aktivatoren ist nämlich bei verschiedener Wasserstoffzahl von wechselnder Größe.

Die Aktivierung der Amylase durch anorganische Ionen, beispielsweise durch Kochsalz, läßt sich mit der allgemein für Enzyme geltenden Beeinflussung durch Wasserstoff- oder Hydroxylionen nicht sicher vergleichen; wenn beispielsweise für die Saccharase, wie im 4. Kapitel erörtert, sich nachweisen ließ, daß die Affinität des Enzyms zu seinem Substrat durch die Wasserstoffzahl in gewissen Grenzen nicht beeinflußt zu werden scheint, und wenn für die Wirkung anderer Enzyme, z. B. der proteolytischen, ihre Abhängigkeit von der Reaktion des Mediums mit einer verschiedenen Ionisierung der Substrate gedeutet wird, so läßt es sich noch nicht beurteilen, ob die aktivierenden Ionen einen Einfluß auf die Affinitätsverhältnisse der Amylase selbst besitzen oder ob sie nicht auch, wie aus den noch nicht einwandfrei bestätigten Beobachtungen von W. Biedermann ¹⁾ über eine Salzhydrolyse der Stärke zu folgern wäre, die Zerfallstendenz des Substrats zu beeinflussen vermögen; exakte Affinitätsvergleiche werden diese Frage zu entscheiden erlauben.

Von dem Typus der Amylaseaktivierung, welche durch verschiedene Arten von Ionen bewirkt zu werden, also unspezifisch zu sein scheint, die aber die ganze Leistung des Enzyms betrifft, also absolut zu verstehen ist, ist eine zweite Art der Enzymaktivierung zu unterscheiden, welche sich dadurch kennzeichnen läßt, daß sie sich nur gegenüber bestimmten, besonderen Affinitäten eines Enzyms oder gegenüber einer bestimmten Stufe der von ihm beschleunigten Reaktion zu äußern vermag; sie ist nur als relativ zu verstehen und sie wird viel spezifischer gefunden, sie ist nämlich bedingt durch die Gegenwart spezifischer Aktivatoren. Eines ihrer bestuntersuchten Beispiele ist die Aktivierung des Trypsins, des wichtigsten proteolytischen Enzyms der Pankreasdrüse, durch die Enterokinase aus der Darmschleimhaut; man verdankt ihre Entdeckung einer Untersuchung aus dem Pawlowschen Laboratorium von N. P. Schepowalnikow ²⁾. Sie konnte zeigen, daß reiner pankreatischer Fistelsaft in bezug auf die Hydrolyse beispielsweise genuiner Proteine völlig unwirksam war und daß er erst im Darm durch den Zutritt eines von der Schleim-

¹⁾ Bio. Z. **129**, 282; **137**, 35 (1923).

²⁾ Inaugur.-Diss. St. Petersburg 1899; Referat in R. Malys Jahresbericht über die Fortschritte der Tierchemie **29**, 378 (1899).

haut abgegebenen Stoffes, der Enterokinase, Aktivität erlangte; man verstand diese Erscheinung als einen enzymatischen Prozeß, als eine Umwandlung des Trypsins aus seinem Zymogen in aktive Form. Es ist indessen erst in neuerer Zeit möglich gewesen, das wahre Wesen dieses Aktivierungsvorgangs mit Sicherheit zu erkennen. In einer Untersuchung von E. Waldschmidt-Leitz¹⁾ hat es sich nämlich erwiesen, daß die Reaktion des Trypsins mit der Enterokinase auf stöchiometrischer Grundlage erfolgt; eine enzymatische Umwandlung des „Trypsinogens“, wie sie angenommen wurde, tritt nicht ein, es entsteht vielmehr eine in beträchtlichem Maße dissoziierte Verbindung von Enzym und Aktivator, deren Bildung eine gewisse Zeit beansprucht; es war nämlich gelungen, auf adsorptivem Wege Enzym und Aktivator nach erfolgter Aktivierung wieder zu trennen.

Die Enterokinase, deren Eigenschaften denen enzymatischer Stoffe nahezukommen scheinen²⁾, ist als ein spezifischer Aktivator des Trypsins anzusehen, die Angaben der Literatur über Aktivierungen dieses Enzyms durch andere Stoffe, wie Kalk- oder Gallensalze, haben sich als unzutreffend erwiesen. Allein der Einfluß der Enterokinase betrifft nur gewisse Fälle der Enzymwirkung, es kommt nämlich dem Aktivator lediglich die Bedeutung eines Hilfsstoffes für die Spaltung gewisser besonderer struktureller Bindungen zu, wie sie beispielsweise in genuinen Proteinen vorliegen; wie E. Waldschmidt-Leitz und A. Harteneck³⁾ gezeigt haben, vermag das Trypsin auch ohne Aktivierung durch Enterokinase eine Reihe von Substraten, wie Protamin oder Pepton, mit beträchtlicher Geschwindigkeit zu hydrolysieren, wenn auch seine Wirkung in diesen Fällen infolge der Ungleichartigkeit der in den Substraten vorliegenden strukturellen Gruppierungen durch den Zusatz von Aktivator eine Verstärkung erfährt. Diese Aktivierung des Trypsins durch Enterokinase, die nur relativ und die spezifisch ist, ist also von der für tierische Amylase beschriebenen zu unterscheiden, wenn auch künftige Untersuchungen ergeben sollten, daß auch bei der enzymatischen Hydrolyse der Stärke sich der Einfluß der Aktivatoren nur gegenüber bestimmten Stufen der Reaktion geltend machte.

¹⁾ H. **132**, 181 (1923/24).

²⁾ E. Waldschmidt-Leitz, H. **142**, 217 (1924/25).

³⁾ H. **149**, 203 (1925).

Die Erscheinung der Trypsinaktivierung findet ihr Gegenstück in der Aktivierung einer pflanzlichen Protease, des Papains im Milchsaff des Melonenbaumes, durch Blausäure; hier haben R. Willstätter und W. Grassmann ¹⁾ gezeigt, daß die Enzym-Blausäureverbindung, deren Bildung gleichfalls eine bestimmte Zeit beansprucht, für die Hydrolyse einfacher gebauter Substrate spezifisch ist, z. B. für Pepton, während das Papain für die Spaltung anderer, höhermolekularer Proteine der Vermittlung des Aktivators nicht bedarf. Es ist indes nicht wahrscheinlich, daß die Wirkung von Papain-Blausäure und Trypsin einerseits und von Trypsin-Enterokinase und Papain andererseits auf die nämlichen spezifischen Strukturen zu beziehen sein wird.

Ähnliche Verhältnisse scheinen bei der Aktivierung eines anderen wichtigen enzymatischen Vorganges vorzuliegen, nämlich der alkoholischen Gärung. A. Harden und W. J. Young ²⁾ haben für diesen Fall gezeigt, daß die zuckervergärende Wirkung der Zymase in der Hefe abhängt von der Gegenwart eines spezifischen, kochbeständigen Aktivators, der „Ko-Zymase“, die sich z. B. dem getrockneten Pilzmaterial durch Auswaschen mit Wasser entziehen läßt; die zurückbleibende Zellmasse besitzt keine Gärfähigkeit mehr. Aus einer neueren Untersuchung von H. v. Euler und K. Myrbäck ³⁾ hat sich nun die Schlußfolgerung ergeben, daß die Mitwirkung der „Ko-Zymase“ für eine ganz bestimmte Reaktionsstufe der alkoholischen Gärung erforderlich zu sein scheint, nämlich für die intermediär erfolgende Bildung von Zucker-Phosphorsäureestern, wenn nicht für eine noch frühere Stufe der Reaktion.

Eine dritte, ganz andere Art enzymatischer Aktivierung beobachtet man bei tierischen Lipasen; sie ist weitgehend unspezifisch und nur relativ. Die älteren Angaben der Literatur, wonach die Lipase z. B. der Pankreasdrüse in Zymogenform sezerniert und erst im Darm durch die Einwirkung der Galle in aktives Enzym umgewandelt würde, sind durch die Untersuchungen von R. Willstätter, E. Waldschmidt-Leitz und Fr. Memmen ⁴⁾ berichtigt worden. Es hat sich gezeigt, daß die Aktivierungserscheinungen, die für die Lösungen der Pankreaslipase als charakteristisch gelten, ganz unspezifisch sind und daß sie nur auf der Einstellung eines

¹⁾ H. 138, 184 (1924).

²⁾ Proc. Roy. Soc. B 77, 405; 78, 368 (1906).

³⁾ H. 139, 15 (1924).

⁴⁾ H. 125, 93 (1922/23).

für den Kontakt des wasserlöslichen Enzyms mit seinem unlöslichen Substrat besonders günstigen Adsorptionszustandes beruhen. „Die Wirkung der Aktivatoren besteht nicht in der Umwandlung eines Lipase-Zymogens in wahre Lipase, denn ohne Aktivierung vollziehen die Pankreasdrüsen und ihre Auszüge die Fettspaltung in saurem Medium mit einer Geschwindigkeit von derselben Größenordnung, wie sie bei der Spaltung unter Aktivierung im alkalischen Gebiet erzielt wird.“ Als Aktivatoren für die Spaltung echter Fette durch pankreatische Lipase wirken z. B. bei alkalischer Reaktion Proteine wie Eiereiweiß, Gallensalze oder auch Kalkseifen, die auf Zusatz von löslichen Calciumsalzen aus der entstehenden Fettsäure sich bilden. Ihre aktivierende Wirkung beruht auf der Erzeugung von Kolloidteilchen, welche gegenüber dem Enzym wie gegenüber dem Substrat adsorbierend wirken und dadurch ihre Reaktion erleichtern. Die entstehenden Adsorbate, beispielsweise

das Adsorbat Albumin $\begin{matrix} \text{Fett} \\ \swarrow \\ \text{Lipase} \end{matrix}$, deren Bildung sich an den Einzeladsorbaten, z. B. von Albumin und Fett oder von Albumin und Lipase auch experimentell nachweisen läßt, sind von Willstätter als „komplexe Adsorbate“ bezeichnet worden. Von diesen werden die sogenannten „gekoppelten Adsorbentien“ unterschieden, die aus dem Zusammenwirken mehrerer Einzelaktivatoren entstehen, z. B. in der Adsorptionsverbindung von Calciumoleat—Albumin; sie zeich-



nen sich nämlich durch eine besonders günstige aktivierende Wirkung aus; der Kombination geringer Mengen solcher Einzelaktivatoren, wie Kalkseife oder Albumin, kommt nämlich eine weit größere Aktivierungsleistung zu als selbst großen Mengen der Komponenten allein. Die nachstehende Tabelle 21, die im Auszug der Untersuchung von Willstätter, Waldschmidt-Leitz und Memmen entnommen ist, veranschaulicht die aktivierende Wirkung solcher Zusatzstoffe allein, wie auch in ihrem Zusammenwirken auf Auszüge der Pankreasdrüse, und zwar bei alkalischer Reaktion.

Größe und Sinn der Aktivierung findet man jedoch in hohem Maße abhängig von der Wasserstoffzahl und von der Natur des angewandten Substrats. Proteine, Gallensalze oder Kalksalze, bei alkalischer Reaktion gute Aktivatoren, hemmen im sauren Gebiet; andererseits gilt beispielsweise die aktivierende Wirkung der Gallensalze nur für die Hydrolyse gewisser Substrate, vor allem

der natürlichen Fette, während sie für die Spaltung anderer Substrate, wie die niederer Ester, ohne Einfluß gefunden werden oder sogar hemmend zu wirken vermögen. Offenbar kommt in diesen Fällen die adsorbierende Wirkung der Zusatzstoffe nicht gegenüber Enzym und Substrat zugleich, sondern nur gegenüber einem von ihnen zur Geltung und äußert sich so in reaktionsstörendem Sinne. Der verschiedene Einfluß der Aktivatoren kann auch, wie schon im 3. Kapitel auseinandergesetzt, die Abhängigkeit der Enzymwirkung von der Wasserstoffzahl, z. B. in den natürlichen Enzymlösungen, entscheidend beeinflussen; so haben sich die vermeintlichen Unterschiede in der p_H -Abhängigkeit der Magen- und der Pankreaslipase darauf zurückführen lassen, daß sich nur die erstere in ihrem natürlichen Sekret mit einem Begleitstoff vergesellschaftet findet, der ihre Wirkung im alkalischen Milieu beeinträchtigt und im sauren begünstigt.

Tabelle 21.

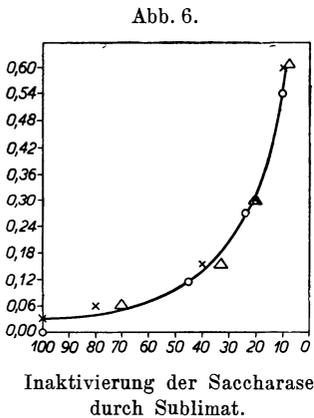
Aktivierung von Pankreaslipase bei $p_H = 8,9$.

Ca Cl ₂ mg	Natrium- glykocholat mg	Albumin mg	Ölspaltung Proz.
—	—	—	4,0
10	—	—	19,4
—	10	—	10,9
—	80	—	19,5
—	—	90	17,4
10	10	—	13,6
10	—	15	23,6
20	—	30	27,2
—	10	15	20,8
—	20	30	22,8
10	10	15	23,4

Es würde den Rahmen dieses Buches überschreiten, auf die mannigfaltigen Erscheinungen der Aktivierung und Hemmung, wie sie bei den fettsplattend Enzymen beobachtet werden, an dieser Stelle näher einzugehen; es ist ihnen allen gemeinsam, daß sie sich auf Adsorptionswirkungen zurückführen lassen, die die enzymatische Reaktion zu beschleunigen oder zu beeinträchtigen vermögen, während die zuerst besprochenen Aktivierungserscheinungen, beispielsweise der Amylase oder des Trypsins, mit einer spezifischen chemischen

Beeinflussung der Affinität von Enzym und Substrat zu deuten sind. Andererseits hat man von solchen unspezifischen Hemmungserscheinungen, wie sie sich gegenüber der Lipasewirkung geltend machen, andere, spezifischere Hemmungseinflüsse zu unterscheiden, die die chemisch-aktiven Gruppen der Enzyme zu betreffen scheinen. Diese Hemmungen, die im folgenden noch zu besprechen sind, sind reversibel und damit unterschieden von der irreversiblen Zerstörung der Enzyme, wie sie unter der Wirkung von Wasserstoff- oder Hydroxylionen oder der Temperaturerhöhung eintritt.

Die vergiftende Wirkung von Schwermetallsalzen auf Hefesaccharase ist durch H. v. Euler und seine Mitarbeiter eingehend untersucht worden. So haben H. v. Euler und O. Svanberg¹⁾ zunächst die Inaktivierung eines Saccharasepräparats durch Sublimat gemessen und dabei für steigende Mengen des Quecksilbersalzes eine typische, asymptotisch verlaufende Dissoziationskurve für die Inaktivierung des Enzyms erhalten, die in der nebenstehenden Abb. 6 wiedergegeben ist.



Die Form der Kurve besagt nach v. Euler, daß sich ein Gleichgewicht zwischen Enzym und Metallsalz in der Lösung ausbildet; auch gelang es nachzuweisen, daß die Vergiftung des Enzyms von einer entsprechenden Abnahme der analytisch bestimmbaren Schwermetallionen begleitet war. Sodann erwies sich die Inaktivierung als vollständig reversibel;

durch Einleiten von Schwefelwasserstoff in die vergiftete Enzymlösung wurden 96 Proz. der ursprünglichen enzymatischen Aktivität wieder erhalten. Es ist sehr bemerkenswert, daß, wie v. Euler und Svanberg feststellten, der Rohrzucker eine sehr beträchtliche Schutzwirkung gegenüber der Vergiftung des Enzyms durch Quecksilbersalze auszuüben vermag, während seine Gegenwart für die Inaktivierung der Saccharase durch Ag-Ionen, die viel stärker ist, ohne Einfluß bleibt; dieser Unterschied in der Schutzwirkung des Substrats ist von K. Myrbäck²⁾ mit der Annahme

¹⁾ Fermentf. **3**, 330 (1920).

²⁾ Arkiv f. Kemi **8**, 1, Nr. 29 (1923); C. **1924**, I, 207.

gedeutet worden, daß bei der Wirkung der Silberionen nicht, wie es bei der Quecksilbervergiftung beobachtet wird, eine Verteilung der Ionen zwischen Enzym und Substrat erfolge, sondern daß das Silber mit der Enzym-Substratverbindung reagiere.

Die Inaktivierung der Saccharase durch Silbersalze ist ferner von H. v. Euler und K. Myrbäck¹⁾ zur Bestimmung des Äquivalentgewichts des Enzyms herangezogen worden; unter der Voraussetzung, daß der reinen Saccharase die Inversionsfähigkeit (If) 230 zukomme, einer Annahme, die durch die präparativen Ergebnisse von R. Willstätter und K. Schneider²⁾ indessen bald überholt wurde, berechneten sie das Silberäquivalent des Enzyms, d. h. diejenige Saccharasemenge, welche 1 Mol Ag zur Inaktivierung benötigt, zu 4000 bis 5000, während Myrbäck andererseits auf Grund der errechneten Dissoziationskonstante der Ag-Saccharase-Rohrzuckerbindung zu dem niedrigeren Werte von 2600 gelangt ist.

Unsere heutigen Kenntnisse erlauben indessen noch keine sichere Beurteilung dieser Größe; nicht nur, daß die den Eulerschen Berechnungen zugrunde liegenden Werte für die Konzentration des reinen Enzyms sich nicht bestätigt haben, es hat sich auch gezeigt, daß die Silberempfindlichkeit der Saccharase mit steigendem Reinheitsgrad beträchtlich zunimmt, die angegebenen Werte für das Ag-Äquivalent des Enzyms dürften also als zu niedrig befunden werden.

Beobachtungen über eine Inaktivierung der Saccharase durch organische Basen, vor allem durch Anilin und p-Toluidin, sind ferner von H. v. Euler und O. Svanberg³⁾ zu einer Kennzeichnung der Natur der spezifischen aktiven Gruppe des Enzyms herangezogen worden. Der Befund, wonach diese Inaktivierung sich durch Zusatz von Aldehyden wieder aufheben läßt, hat die Forscher zu der Annahme geführt, daß Anilin und Saccharase unter Bildung einer Aldehyd-Aminverbindung, einer Schiffschenschen Base, miteinander reagieren. Die analytisch bestimmte Dissoziationskonstante der Saccharase-Anilinverbindung, die von der Gegenwart des Rohrzuckers nicht beeinflußt wurde, betrug $2,5 \cdot 10^{-4}$

¹⁾ Zs. exp. Med. **33**, 483 (1923).

²⁾ H. **133**, 193 (1923/24).

³⁾ Fermentf. **4**, 29 (1920/21); siehe auch H. v. Euler und K. Myrbäck, H. **125**, 297 (1922/23); K. Myrbäck, Arkiv f. Kemi **8**, 1, Nr. 32 (1924); C. **1924**, I, 208.

und die der Formaldehyd-Anilinverbindung ermittelten sie zu $18 \pm 3 \cdot 10^{-2}$, die Anilinverbindung des Enzyms war also weniger dissoziiert.

Es würde zu weit führen, alle speziellen Angaben der Literatur über Hemmungen enzymatischer Reaktionen durch bestimmte anorganische Salze oder durch organische Zusatzstoffe hier zu erörtern, zumal viele von ihnen nicht mehr genügend sichergestellt erscheinen.

Hervorzuheben ist die ausgesprochen hemmende Wirkung von Natriumfluorid auf tierische Lipase, die zuerst von J. H. Kastle und A. S. Loevenhart¹⁾ beobachtet wurde, sowie die starke Hemmung der Wirkung von Katalase²⁾ und von Oxydasen durch Blausäure, die von O. Warburg³⁾ mit der Giftwirkung der Blausäure gegenüber dem Oxydationsvermögen einfacher eisenhaltiger Kohlemodelle verglichen worden ist. Und nicht zuletzt bedürfen die eingehenden Untersuchungen von P. Rona⁴⁾ und seinen Mitarbeitern über die Vergiftung lipatischer Enzyme durch Alkaloide der Erwähnung, denen zufolge die Empfindlichkeit z. B. gegenüber Chinin als ein charakteristisches Merkmal für eine bestimmte Lipase zu gelten hat; so wird die Leberlipase resistent gefunden, während pankreatische Lipase durch Chinin stark gehemmt wird. Der Einfluß von Begleitstoffen auf diese Giftempfindlichkeit, auf den R. Willstätter und Fr. Memmen⁵⁾ aufmerksam gemacht haben, ist indessen noch nicht genügend berücksichtigt und geprüft worden.

Die Bedeutung endlich der zahlreichen Beobachtungen der Literatur über die immunisatorische Bildung von Anti-Enzymen durch den tierischen Organismus nach der Einführung art- oder blutfremder Enzympräparate läßt sich nicht sicher beurteilen; sie dürfte wohl in vielen Fällen auf eine adsorptive Bindung des Enzyms durch entstandene Hemmungskörper zurückzuführen sein.

¹⁾ Am. **24**, 491 (1900); A. S. Loevenhart und G. Peirce, Jl. Biol. Chem. **2**, 391 (1907); siehe auch H. Davidsohn, Bio. Z. **49**, 249 (1913).

²⁾ Vgl. G. Senter, Ph. Ch. **44**, 257 (1903); **51**, 673 (1905).

³⁾ B. **58**, 1001, und zwar S. 1004 (1925).

⁴⁾ Bio. Z. **111**, 156; **118**, 185, 214, 232; **130**, 225; **134**, 108, 118; **141**, 222 (1923).

⁵⁾ H. **138**, 216, und zwar S. 241 (1924).

VI. Enzymatische Spezifität.

Die Erscheinungen der enzymatischen Spezifität lassen sich zwei besonderen Gesichtspunkten unterordnen, je nachdem ob sie den allgemeinen Verlauf der durch das Enzym beschleunigten Umsetzung eines Stoffes, den Reaktionsweg, oder aber ob sie die Angreifbarkeit bzw. die Geschwindigkeit der Spaltung verschiedener Stoffe durch das Enzym, seine absolute und seine relative Spezifität, betreffen.

Wenn man eine Verschiedenheit der Reaktionswege, auf welchen die enzymatische Umsetzung eines bestimmten Substrats sich vollzieht, in Betracht zieht, so hat man zwischen zwei verschiedenen möglichen Fällen zu unterscheiden; es kann nämlich die Spaltung eines Substrats durch mehrere Enzyme zu verschiedenen Reaktionsprodukten führen, oder aber sie kann, wenn auch über verschiedene Reaktionszwischenprodukte, doch die nämlichen Endprodukte der Reaktion liefern. Für den ersteren Fall bietet die Hydrolyse des Trisaccharids Raffinose ein charakteristisches Beispiel, die nach C. Neuberger¹⁾ unter der Wirkung der Hefesaccharase zur Abspaltung von Fructose und zu Melibiose, unter der Einwirkung von Emulsin dagegen zu Rohrzucker und Galaktose führt. Auf ähnliche Erscheinungen der Reaktionsauslese bei peptidspaltenden Enzymen haben die Untersuchungen von E. Abderhalden²⁾ hingewiesen; auch die verschiedenen Arten der Gärung einfacher Zucker, wie die alkoholische oder die Milchsäuregärung, sind hier zu nennen.

Für den zweiten Fall spezifischer Reaktionswege, aber identischer Reaktionsprodukte, ist der Vergleich der Hydrolyse des Rohrzuckers durch die Saccharase der Hefe und durch die aus *Aspergillus oryzae* kennzeichnend; nach R. Kuhn³⁾ lagert sich nämlich das Enzym der Hefe an die Fructose-, das des Schimmelpilzes dagegen an die Glucosekomponente des Rohrzuckers an, die Inversion des Rohrzuckers nimmt also in beiden Fällen ihren Weg über verschiedene Reaktionszwischenprodukte, und die beiden Enzyme sind danach als verschiedene, spezifische Katalysatoren zu

¹⁾ Bio. Z. **3**, 519 (1907).

²⁾ E. Abderhalden und A. H. Koelker, H. **54**, 363 (1908); **55**, 416 (1908); E. Abderhalden und C. Brahm, H. **57**, 342 (1908); E. Abderhalden, G. Caemmerer und L. Pincussohn, H. **59**, 293 (1909).

³⁾ H. **129**, 57 (1923).

betrachten¹⁾. Ein weiteres Beispiel für die Existenz verschiedener Reaktionswege bei gleichartigen Endprodukten der Hydrolyse ergibt sich aus den wichtigen Untersuchungen von R. Kuhn²⁾ über die Stärkespaltung durch tierische bzw. pflanzliche Amylase, die zu einer Unterscheidung zwischen α - und β -Amylasen geführt hat.

Die meisten über enzymatische Spezifität vorliegenden Untersuchungen sind der Frage gewidmet, welche Substrate überhaupt von ein und demselben Enzym angreifbar sind. Man hat hier zu unterscheiden zwischen einer absoluten und zwischen einer relativen Spezifität, je nachdem ob die Untersuchung ergibt, daß ein enzymatischer Katalysator von zwei Substraten nur das eine oder aber beide, nur mit verschiedener Geschwindigkeit, umzusetzen vermag.

Die Erscheinungen der Gruppenspezifität zunächst, die beispielsweise zwischen eiweiß- und zwischen fettspaltenden Enzymen zu unterscheiden erlauben, sind einfach und in absolutem Sinne zu verstehen. Aber auch für die Hydrolyse von Substraten aus der nämlichen Körperklasse sind die Fälle absoluter enzymatischer Spezifität zahlreich genug. So hat, um nur einige Beispiele zu nennen, die Unterscheidung zwischen den spezifischen Wirkungen des malzzucker- und zwischen denen des rohrzuckerspaltenden Enzyms der Hefe als absolut zu gelten; auch ist es gelungen, die beiden Enzyme auf präparativem Wege zu trennen³⁾. Auch unsere Kenntnis von der Spezifität proteolytischer Enzyme, die schwer zu übersehen war, hat durch neuere Untersuchungen eine einfache Grundlage erhalten; so haben E. Waldschmidt-Leitz und A. Harteneck⁴⁾ gezeigt, daß die spezifischen Wirkungen von Trypsin und von Erepsin scharf voneinander zu trennen sind; während das erstere für Proteine selbst und ihre höheren Abbauprodukte spezifisch gefunden wird, bezieht sich die Wirkung des letzteren lediglich auf Körper vom Typus einfacher Peptide. Auch

¹⁾ Siehe dazu jedoch H. v. Euler und K. Josephson, H. **132**, 301; **134**, 50; **136**, 62 (1924); **143**, 79; **149**, 71 (1925); R. Kuhn und H. Münch, H. **150**, 220 (1925). Die entgegenstehenden Anschauungen von Euler und Josephson, die in der Annahme zweier verschiedener Affinitäten der Saccharasen zum Rohrzucker gipfeln, sind durch neuere Untersuchungen von R. Kuhn und H. Münch (H., im Druck) und von R. Kuhn und G. E. v. Grundherr (B., im Druck), nämlich durch exakte Affinitätsmessungen und durch die Spezifitätsprüfung an verschiedenen Rohrzuckerderivaten widerlegt worden. — ²⁾ A. **443**, 1 (1925). — ³⁾ R. Willstätter und E. Bamann, H., **51**, 273 (1925/26). — ⁴⁾ H. **149**, 203 (1925).

hat sich die auf Grund der Untersuchungen von E. Fischer und E. Abderhalden¹⁾ abgeleitete Unterscheidung von Pankreas- und Darmerepsin nicht aufrechterhalten lassen; die Wirkung des Erepsins gilt spezifisch für die Hydrolyse aller einfachen Peptide und nur für diese.

Die spezifische Einstellung eines Enzyms für Substrate aus der nämlichen Körperklasse ist indessen viel häufiger nur in relativem Sinne zu verstehen, sie kommt nur in dem mehr oder weniger ausgeprägten Geschwindigkeitsunterschied zur Geltung, welcher die Umsetzung der Substrate betrifft. Die Erscheinungen relativer Spezifität sind besonders deutlich und vielseitig entwickelt bei den fett- und esterspaltenden Enzymen; so ist beispielsweise die Leberlipase nach den Untersuchungen von R. Willstätter und Fr. Memmen²⁾ als eine Esterase zu bezeichnen, die nur in geringem Maße befähigt ist, eigentliche Fette, Glycerinester höherer Fettsäuren, zu zerlegen, während die Pankreaslipase dagegen, die von ihr zu unterscheiden ist, eine Lipase darstellt, die auch einfache Ester gut zu hydrolysieren vermag; die Mannigfaltigkeit der spezifischen Einstellung lipatischer Enzyme, insbesondere der tierischen, wird zudem durch die Tatsache noch erhöht, daß die Wirkung von Begleit- oder Zusatzstoffen je nach der vorliegenden Kombination von Enzym und Substrat sich in anderem Sinne äußern kann.

Besonders eingehend untersuchte Beispiele relativer Spezifität, die sich auf exakte Affinitätsmessungen stützen, liegen bei kohlehydratspaltenden Enzymen vor. So haben die Untersuchungen von R. Kuhn³⁾ erwiesen, daß das Trisaccharid Raffinose wie der Rohrzucker von ein und demselben Enzym, der Hefesaccharase, hydrolysiert wird; diese Folgerung ergab sich aus dem für alle untersuchten Enzympräparate übereinstimmenden Verhältnis der Dissoziationskonstanten der Verbindung des Enzyms mit Rohrzucker bzw. Raffinose. Ähnlich haben R. Willstätter, R. Kuhn und H. Sobotka⁴⁾ gefunden, daß aliphatische wie aromatische Derivate der α - bzw. β -Glucose jeweils durch die nämlichen Enzyme, nämlich durch die Maltase der Hefe bzw. das Emulsin der bitteren Mandeln, gespalten werden.

¹⁾ H. **46**, 52 (1905).

²⁾ H. **138**, 216 (1924).

³⁾ H. **125**, 28, und zwar S. 71 (1922/23).

⁴⁾ H. **129**, 33 (1923); **134**, 224 (1923/24).

Auch die stereochemische Spezifität der Enzyme, die schon lange bekannt ist, weist Beispiele auf für alle möglichen Fälle von Geschwindigkeitsunterschieden, von absoluter und relativer Spezifität. Sie ist bedingt durch eine Asymmetrie des Katalysators selbst, dessen Reaktionsverhalten gegenüber den spiegelbildlich isomeren Substraten E. Fischer mit dem treffenden Vergleiche von Schloß und Schlüssel gekennzeichnet hat; sie hat in den nicht-enzymatischen Modellversuchen von G. Bredig¹⁾ und seiner Schule, beispielsweise der asymmetrischen Spaltung racemischer Säuren durch optisch inaktive Basen bei Gegenwart optisch aktiver Katalysatoren, ein Gegenstück gefunden.

In vielen Beispielen asymmetrischer enzymatischer Hydrolyse findet sich der Grenzfall unendlich großer Geschwindigkeitsunterschiede, also unmeßbar kleiner Reaktionsgeschwindigkeit bei dem einen Isomeren, verwirklicht; dies trifft z. B. zu für die Spezifität der Maltase oder des Emulsins, also ausschließlich α - bzw. β -glucosidsplattender Enzyme, oder auch für die Zerlegung racemischer oder optisch aktiver Peptide durch Erepsin, die nur die aus natürlich vorkommenden optischen Isomeren aufgebauten Substrate betrifft. Charakteristische Beispiele relativer optischer Spezifität bietet dagegen das Studium der enzymatischen Esterspaltungen, deren asymmetrischer Verlauf von R. Willstätter²⁾ in einer Reihe von Fällen verglichen worden ist.

Auch für den asymmetrischen Verlauf enzymatischer Synthesen sind Fälle relativer Spezifität beschrieben worden; so hat L. Rosenthaler³⁾ gezeigt, daß man bei der durch Emulsin beschleunigten Synthese des Mandelsäurenitrils vorwiegend den rechtsdrehenden Antipoden, V. K. Kriehle⁴⁾ dagegen, daß man mit Enzym aus Pfirsichblättern und aus Kirsche überwiegend linksdrehendes Oxynitril erhält. Die Schlußfolgerung spiegelbildlich isomerer Enzyme, die von Kriehle erhoben worden ist, ist jedoch nach den Erfahrungen, die man beispielsweise über die optische Spezifität lipatischer Enzyme gewonnen hat, keineswegs als gesichert zu betrachten.

¹⁾ B. **41**, 752 (1909); Ph. Ch. **73**, 25 (1910); Bio. Z. **46**, 7 (1912).

²⁾ H. **138**, 216, und zwar S. 245 (1924); **140**, 203, und zwar S. 221 (1924); **146**, 151, und zwar S. 156 (1925).

³⁾ Bio. Z. **14**, 238 (1908); **17**, 257 (1909).

⁴⁾ Am. Soc. **35**, 1643 (1913).

VII. Richtlinien der präparativen Enzymchemie.

1. Quantitative Bestimmung.

Für eine quantitative Messung der Enzymmengen verfügen wir bis heute nur über ein einziges charakteristisches Kennzeichen, nämlich ihre katalytische Wirksamkeit. Auch aus den präparativen Arbeiten R. Willstätters und seiner Schule, die in vielen Fällen zu einer sehr weitgehenden Reinigung enzymatischer Individuen geführt haben, hat sich noch keine sichere Handhabe ergeben, ein Enzym auf Grund anderer, z. B. chemischer oder physikalischer Merkmale zu beschreiben; nur in einem besonderen Falle, bei pflanzlicher Peroxydase, hat die präparative Reinigung zur Erkenntnis einer anderen charakteristischen Eigenschaft des Enzyms selbst geführt, es scheint nämlich gefärbt zu sein. Aber auch hier wird die Eigenfarbe des Enzyms erst in höherem Reinheitsgrad erkennbar und bestimmbar, in dem pflanzlichen Ausgangsmaterial, aus dem seine Isolierung erfolgt, wird sie durch gleichfalls gefärbte Begleitstoffe überdeckt; erst von einer höheren enzymatischen Konzentration an geht die Farbe der Lösung mit ihrem Leistungsvermögen parallel. Auch die zahlreichen Versuche von H. v. Euler, das rohrzuckerspaltende Enzym der Hefe durch andere als durch seine katalytischen Eigenschaften zu kennzeichnen, beispielsweise mit der Bestimmung des Phosphor- oder Stickstoffgehaltes enzymatischer Präparate oder durch die analytische Messung besonderer Abbauprodukte wie des Tryptophans, haben noch nicht zu sicheren Ergebnissen geführt.

Der Gedanke, Enzyme quantitativ auf Grund ihrer katalytischen Aktivität zu messen, ist zwar alt, aber seine konsequente Durchführung und insbesondere seine Übertragung auf die präparative Methodik hat man merkwürdig lange nicht in Angriff genommen. Die älteren Messungen enzymatischer Präparate, die vielfach unter ungleichmäßigen Versuchsbedingungen angestellt waren und die daher unvergleichbare Ergebnisse lieferten, haben daher nur in wenigen Fällen einigermaßen zutreffende Aussagen über die Menge und über das Verhalten von Enzymen zu machen erlaubt. Es kam hinzu, daß grundlegende neuere Erkenntnisse wie die Abhängigkeit der enzymatischen Reaktionsgeschwindigkeit von der Konzentration der Wasserstoffionen oder von der des Substrats oder wie die

Einflüsse nichtenzymatischer Begleitstoffe, welche aktivierend oder hemmend wirken, noch nicht berücksichtigt werden konnten. Es ist das große Verdienst R. Willstätters, die Bedeutung der quantitativen Analyse für die präparative wie für die beschreibende Enzymchemie erkannt und die Grundlage für eine rationelle Beschreibung der Enzyme ausgearbeitet zu haben. Die Durchführung der quantitativen Methoden ist durch Willstätter, vergleichbar etwa der Bestimmung von Farbstoffausbeute und Farbstärke bei der Isolierung eines natürlichen Farbstoffes, nach zwei Richtungen hin vervollständigt worden, nämlich durch die quantitative Kontrolle der präparativen Arbeit hinsichtlich der Ausbeute im Verhältnis zum Ausgangsmaterial und hinsichtlich der enzymatischen Konzentration oder des Reinheitsgrades in den erhaltenen Lösungen und Präparaten. Die Beachtung und quantitative Bestimmung enzymatischer Ausbeuten, die selbstverständlich hätte sein sollen, hat in vielen Fällen zu bedeutsamen Erkenntnissen geführt sowohl über die Brauchbarkeit der in der älteren Literatur empfohlenen Verfahren zur Gewinnung roher Enzympräparate aus pflanzlichem und tierischem Ausgangsmaterial, wie auch über die Löslichkeitsverhältnisse der Enzyme und über ihre Fixierung in den Zellen selbst. Sie hat ferner erlaubt, den Erfolg der Trennungs- und Reinigungsprozesse, der sich in der Steigerung des Reinheitsgrades ausdrückt, d. h. in dem Verhältnis von Trockengewicht und enzymatischer Wirksamkeit, exakt zu beurteilen. Das Ziel der präparativen Enzymchemie, die Reinigung der Enzyme so lange durchzuführen, bis eine weitere Steigerung des Reinheitsgrades sich nicht mehr erreichen läßt, hat mit der Einführung einer quantitativen Kontrolle erst die sichere Grundlage gefunden.

Als allgemeines Maß für die Menge eines Enzyms ist von R. Willstätter und R. Kuhn¹⁾ die Bezeichnung „Enzymeinheit“ vorgeschlagen worden, ein Ausdruck, der zuerst von R. Willstätter, E. Waldschmidt-Leitz und Fr. Memmen²⁾ an einem besonderen Beispiel, der Pankreaslipase, nämlich durch die „Lipaseeinheit“, angewandt worden war. Die Definition einer solchen „Enzymeinheit“ beruht jeweils auf der Reaktionsgeschwindigkeit, mit der das Enzym unter bestimmten, zwar für die einzelnen Fermente verschiedenen, aber unter sich stets gleichen äußeren

¹⁾ B. 56, 509 (1922/23).

²⁾ H. 125, 93, und zwar S.115 (1922/23).

Bedingungen die Umsetzung des Substrats vollzieht; sie kann sich also z. B. auf die Geschwindigkeitskonstante einer monomolekularen Reaktion beziehen. Als Maß für die enzymatische Konzentration eines Präparats, seinen Reinheitsgrad, dienen die „Enzymwerte“, z. B. der „Lipasewert“, die bestimmt sind durch die Anzahl der „Enzymeinheiten“ in einer bestimmten Gewichtsmenge des Präparats; sie nehmen also mit steigendem Reinheitsgrad zu. Diese Bezeichnungen, welche anschaulich und einfach sind, werden zweckmäßig an die Stelle älterer, auf umständlichere Weise aufgestellter Maße zu setzen sein. Die von Willstätter und Kuhn allgemein empfohlene Bezeichnungsweise für die Konzentration enzymatischer Präparate dürfte auch einem von H. v. Euler und K. Josephson¹⁾ vorgeschlagenen Ausdruck für die Aktivität der Präparate überlegen sein; dieser Ausdruck, wonach

$$X(\text{enzymatische Aktivität}) = \frac{k \cdot g \text{ Substrat}}{g \text{ Enzympräparat}},$$

wird sich nämlich nicht allgemein anwenden lassen. Einmal entspricht der Verlauf nur einer beschränkten Anzahl enzymatischer Reaktionen einer Reaktionsgleichung erster Ordnung, die Proportionalität zwischen Enzymmenge und monomolekularer Reaktionskonstante trifft also in vielen Fällen nicht zu. Auch die der aufgestellten Beziehung zugrunde liegende Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration, wonach $k \cdot g$ Substrat als konstant zu betrachten wäre, gilt nicht allgemein. Diese Nachteile der Eulerscher Definition vermeidet der von Willstätter und Kuhn gebrauchte Ausdruck, da der für jedes Enzym besonders aufgestellte Begriff einer „Einheit“ die Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität von allen als maßgebend erkannten Faktoren berücksichtigt und die Bedingungen für die Messung eines Enzyms eindeutig festzulegen gestattet.

Die Definitionen für die Maßeinheiten der Enzyme, so wie sie in den Untersuchungen R. Willstätters und seiner Schüler an zahlreichen Beispielen gegeben worden sind, beruhen auf der Beachtung der für die enzymatische Reaktionsgeschwindigkeit maßgebenden Wasserstoffzahl des Mediums, die gewöhnlich optimal gewählt, und die, wenn möglich, während der Dauer der Messung konstant gehalten wird. Ihr Einfluß, auf den die Untersuchungen von S. P. L. Sørensen erstmals nachdrücklich hingewiesen haben

¹⁾ B. 56, 1749 (1923).

und der die Vergleichbarkeit der Messungen in der älteren Enzym-literatur weitgehend beeinträchtigt hat, wird durch die Anwendung von Regulatoren des p_H gleichmäßig gehalten. Die Definition der Enzymeinheiten fußt ferner auf der Erkenntnis des enzymatischen Reaktionsverlaufs unter den gegebenen Bedingungen und auf der Untersuchung der zwischen Enzymmenge und Umsatz bestehenden Beziehungen. In einfachen Fällen, nämlich für die Gültigkeit einer Gleichung erster Ordnung für die durch das Enzym beschleunigte Reaktion, steht die für die Einheit des Enzyms gewählte Größe in einer unmittelbaren Beziehung zur Geschwindigkeitskonstanten der Reaktion, sie ist ihr beispielsweise gleichgesetzt; in anderen Fällen bezieht sich ihr Maß auf die für einen bestimmten Umsatz des Substrats erforderliche Zeit oder auf einen bestimmten, in einer gegebenen Zeit gemessenen Umsatz, aus empirisch ermittelten Zeit-Umsatzkurven abgeleitet.

Ein wichtiger Umstand, der die Geschwindigkeit enzymatischer Reaktionen zu beeinflussen vermag und der bei quantitativen Messungen meist ungenügend berücksichtigt worden ist, betrifft die für viele Enzyme kennzeichnende Abhängigkeit ihrer Aktivität von der Gegenwart aktivierender oder hemmender Begleit- oder Zusatzstoffe, sei es, daß es sich um spezifische, chemische, oder um unspezifische, z. B. auf Adsorptionswirkung beruhende Erscheinungen handelt. Ihr Einfluß wird ausgeschaltet durch die Einführung ausgleichender Aktivierung oder ausgleichender Hemmung, das heißt durch den Zusatz aktivierender oder hemmender Stoffe in einer solchen Menge, daß sie den Einfluß der in den einzelnen Präparaten, aber in wechselnder Menge, bereits vorhandenen Stoffe auszuschalten erlaubt und eine vergleichbare Aktivität des Enzyms gewährleistet. So ist für die exakte Messung des pankreatischen Trypsins z. B. durch die Hydrolyse höhermolekularer Proteine seine volle Aktivierung durch Enterokinase, für die Bestimmung tierischer Amylase die Gegenwart einer bestimmten Cl-Ionenkonzentration oder für die Prüfung gewisser lipatischer Enzyme ein Ausgleich des wechselnden Aktivierungszustandes durch den Zusatz bestimmter, durch Adsorptionstüchtigkeit ausgezeichnete Stoffe, beispielsweise von Proteinen und Kalkseife, erforderlich; aus einigen Beispielen, die weiter unten gegeben werden, wird dies anschaulich hervorgehen.

Die Maße für Menge und Konzentration mancher Enzyme, beispielsweise der Hefesaccharase, haben indessen, so wie sie auf-

gestellt sind, noch keine strenge Allgemeingültigkeit, sie gelten nämlich zufolge R. Willstätter und R. Kuhn¹⁾ nur für den Vergleich der Enzymmengen, die in Präparaten aus dem nämlichen Ausgangsmaterial, z. B. ein und derselben Heferasse, gemessen werden. Die Untersuchungen von R. Willstätter und R. Kuhn²⁾ haben erwiesen, daß akzessorische und noch nicht abtrennbare Stoffe, vielleicht Zersetzungsprodukte des Enzyms selbst, die in wechselnder Menge mit ihm vergesellschaftet sind, seine Affinität zu dem Substrat zu beeinflussen vermögen, daß also gleichen Reaktionsgeschwindigkeiten, die unter denselben äußeren Bedingungen gemessen werden, nicht in allen Fällen gleiche Enzymmengen zugrunde liegen. Um daher Enzympräparate verschiedener Herkunft mit größerer Genauigkeit definieren und vergleichen zu können, sind die „Enzymeinheiten“ und die „Enzymwerte“ mit dem jeweiligen Index der Dissoziationskonstanten der Enzymsubstratverbindung zu versehen, der ihrer Affinität zu dem Substrat entspricht. Der Vergleich beispielsweise von Hefesaccharase mit ungleicher Affinität ergibt sich dann durch Umrechnung der in üblicher Weise ermittelten Enzymmenge auf eine Saccharase von mittlerer Affinitätskonstante. Für den Vergleich gewöhnlicher präparativ-analytischer Messungen ist eine solche Reduktion indessen entbehrlich.

Die für die Einheit der Enzymmengen gewählten Maße sollen nachstehend an zwei charakteristischen Beispielen veranschaulicht werden.

So ist als die Einheit pankreatischer Amylase [Am.-E.]³⁾ das Hundertfache derjenigen Enzymmenge bezeichnet worden, für die sich unter den Bedingungen des Versuches, nämlich bei der Einwirkung auf 0,25 g löslicher Stärke bei 37° und $p_H = 6,8$ im Volumen von 37 ccm und nach optimaler und ausgleichender Aktivierung durch 1,0 ccm 0,2 n NaCl, die Konstante der monomolekularen Reaktion von 0,01 ergibt; die Reaktionskonstante einer Bestimmung drückt daher zugleich den Gehalt der Analysenprobe an Amylaseeinheiten aus. Als Maß des enzymatischen Reinheitsgrades dient der Amylasewert (Am.-W.), nämlich die Anzahl Amylaseeinheiten in 1 cg der Substanz.

¹⁾ H. 125, 1 (1922/23).

²⁾ H. 125, 28 (1922/23).

³⁾ R. Willstätter, E. Waldschmidt-Leitz und A. R. F. Hesse, H. 126, 143, und zwar S. 156 (1922/23).

Als zweites Beispiel mag die Bestimmung der Menge tierischer Lipase dienen, deren Aktivität durch den Zusatz unspezifischer Aktivatoren reguliert wird; für die Bestimmung der Lipasemenge bilden, da der Verlauf der Fetthydrolyse keiner einfachen Gesetzmäßigkeit sich unterordnen läßt, die empirisch ermittelten Beziehungen zwischen Enzymmenge und Verseifungsgrad bei einer bestimmten Einwirkungsdauer die Grundlage. Als „Lipaseeinheit“ [L.-E.]¹⁾ ist nämlich diejenige Menge definiert, die unter den bestimmten Bedingungen, nämlich nach ausgleichender Aktivierung mittels CaCl_2 und Albumin und bei einem anfänglichen p_{H} von 8,9 und 30°, in einer Stunde 24 Proz. von 2,5 g Olivenöl zu hydrolysieren vermag. Diese Bezeichnungsweise für Menge und Reinheitsgrad unbekannter Naturstoffe, die bisher nur auf Grund ihrer Wirkung gemessen werden können, läßt sich auch auf nichtenzymatische Stoffe übertragen. So bedient sich die Bestimmung des spezifischen Trypsinaktivators, der Enterokinase, nach E. Waldschmidt-Leitz²⁾ ähnlicher Maße, der „Kinaseeinheit“ und des „Kinaserwertes“, denen die aktivierende Wirkung gegenüber einer bestimmten Menge Trypsin zugrunde liegt.

Die aufgestellten Maße, die willkürlich gewählt sind, und die nur für den Vergleich der Mengen des nämlichen Enzyms Bedeutung besitzen, erlauben indessen keine Beurteilung des Mengenverhältnisses verschiedener Enzyme; zeigt doch die Veränderlichkeit der Affinität ein und desselben Enzyms durch akzessorische Stoffe, daß schon hier der exakte Vergleich verschiedener Enzymmengen auf Schwierigkeiten stößt. Eine sichere Grundlage für den Mengenvergleich verschiedener Enzyme, etwa in ihrem natürlichen Vorkommen, wird man erst durch ihre präparative Isolierung in reiner Form gewinnen.

2. Vorkommen und Bildung der Enzyme.

Enzyme sind als die Produkte lebender Zellen und als die Katalysatoren der wichtigsten chemischen Umsetzungen, die die Lebensprozesse begleiten oder bedingen, in allen Zellen des Tier- und Pflanzenreiches verbreitet; dies gilt für einzellige und für wirbellose Organismen ebenso wie für die höheren Lebewesen der

¹⁾ R. Willstätter, E. Waldschmidt-Leitz und Fr. Memmen, H. **125**, 93, und zwar S. 115 (1922/23).

²⁾ H. **132**, 181, und zwar S. 226 (1923/24).

Tier- und Pflanzenwelt, wenn auch ihr Vorkommen in den letzteren deutlicher und erkennbarer lokalisiert, d. h. für bestimmte enzymatische Individuen an bestimmte Organe oder Sekrete derselben gebunden ist, eine Unterscheidung, die sich bei niederen Lebewesen,

Tabelle 22.

Einteilung und Vorkommen der wichtigsten Enzyme.

Gruppe	Vertreter	Vorkommen (z. B.)	Substrat (z. B.)
Esterasen	Phytolipase	Ölhaltige Samen z. B. Ricinussamen	Fette
	Tier. Esterase	Leber	Einfachere Ester
	„ Lipase	Pankreas, Magen	Fette
	Chlorophyllase	Grüne Blätter	Chlorophyll
	Tannase	Aspergillus niger	Gerbstoffe
	Phosphatase	Hefe	Phosphorsäureester
Proteasen	Sulfatase	Aspergillus oryzae	Schwefelsäureester
	Pepsin (Lab)	Magen	Gen. Proteine (Casein)
	Trypsin	Pankreas	Genuine Proteine
	Erepsin	Pankreas, Darm, Hefe, tier. Gewebe	Peptide
Amino-acylasen	Papain	Melonenbaum	Genuine Proteine
	Urease	Sojabohne	Harnstoff
	Histozym	Niere	Acyl-Aminosäuren
Carbohydrasen	Arginase	Leber	Arginin
	Amylase	Speichel, Pankreas Malz, Asperg. oryzae	Stärke
	Saccharase	Hefe, Asperg. oryzae, Darm	Rohrzucker
	Maltase (α -Glucosidase)	Hefe	Maltose, α -Glucoside
	β -Glucosidase	Bittere Mandeln	β -Glucoside
Oxydationsenzyme	Lactase	Hefe	Lactose
	Nuklease	Darm	Nukleinsäuren
	Peroxydase	Wurzeln, Keimlinge	Phenole + H_2O_2
Katalasen	Tyrosinase	Kartoffel	Tyrosin
	Urikase	Niere	Harnsäure
Gärungsenzyme	Katalase	Hefe, Leber	Wasserstoffsuperoxyd
	Zymasekomplex	Hefe	Traubenzucker
	Carboxylase	Hefe	Carbonsäuren
	Carboligase	Hefe	Aldehyde

beispielsweise bei einzelligen Individuen, infolge der geringeren Differenzierung ihrer einzelnen Organe analytisch weniger leicht durchführen läßt.

Es ist in einer einleitenden Übersicht, wie sie hier gegeben werden soll, nicht möglich und auch nicht erforderlich, eine irgendwie vollständige Zusammenstellung aller bisher bekannten Angaben über Vorkommen und Nachweis enzymatischer Wirkungen in den einzelnen untersuchten Organismen, bzw. in deren Organen und Sekreten zu vermitteln, zumal die Unterscheidung oder die Identifizierung vieler Enzyme von ähnlichen Wirkungen, aber von verschiedenem Vorkommen nur in wenigen Fällen exakt durchgeführt worden ist. Es soll daher in der Tabelle 22, in der eine Anzahl Enzyme nach Vorkommen und Wirkung beschrieben werden und die damit zugleich einen allgemeinen Überblick über die betreffenden enzymatischen Umsetzungen geben soll, nur eine Auswahl der wichtigsten und am besten untersuchten Enzyme angeführt werden.

Die für wesentlich gehaltene Unterscheidung, die die ältere Enzymforschung zwischen den sogenannten Exo-Enzymen, den frei gelösten oder in Lösung sezernierten Enzymen, und den Endo-Enzymen hervorhob, welche letztere man als unlöslich innerhalb der Zelle verankert und als vom lebenden Protoplasma untrennbar ansah, hat sich nach den Ergebnissen der neueren präparativen Enzymchemie im alten Sinne nicht aufrechterhalten lassen. Es hat sich gezeigt, daß eine feste Grenze zwischen extrazellulären und intrazellulären Enzymen, welche auf ihrem Löslichkeitsverhalten in ihrem natürlichen Milieu aufgebaut wäre, nicht gezogen werden darf, wenn auch manche Enzyme, deren Wirkung sich innerhalb der Zelle selbst vollzieht, in diesen nicht frei in Lösung enthalten sind, sondern etwa durch adsorptive Bindung an unlösliche Träger festgehalten werden und sich der Zelle nicht ohne weiteres mit Lösungsmitteln entziehen lassen.

Auf diese Erscheinungen haben zuerst die klassischen Untersuchungen von E. Buchner¹⁾ über die Freilegung des Komplexes der Gärungsenzyme nach der mechanischen Zertrümmerung der Hefezellstruktur aufmerksam gemacht. Die Kenntnisse über die Löslichkeit oder über die Bindungsart der Enzyme in ihrem natür-

¹⁾ B. **30**, 117 (1897); E. Buchner, H. Buchner und M. Hahn, Die Zymasegärung. München 1903.

lichen Vorkommen sind durch spätere Untersuchungen, vor allem der Willstätterschen Schule, erheblich erweitert und vertieft worden; sie haben insbesondere auch für die Zwecke der präparativen Isolierung praktische Bedeutung erlangt. So hat es sich beispielsweise in Untersuchungen von R. Willstätter und F. Racke¹⁾ ergeben, daß man eine Lösung des rohrzuckerspaltenden Enzyms aus der Hefe nicht einfach durch Zerreiben und Abpressen oder durch Auslaugen der Zellsubstanz herstellen darf; ein solches Verfahren würde nur einen geringen Bruchteil des gesamten Enzymgehaltes als Extraktausbeute ergeben. Obwohl zwar die Saccharase der Hefe, wie festgestellt worden ist, frei, wasserlöslich und nicht an unlösliche Bestandteile gebunden in der Hefezelle vorhanden ist, läßt sich das Enzym aus ihr doch nicht einfach durch Lösungsmittel extrahieren; seine Extraktion gelingt erst nach vollkommener mechanischer Zerstörung der Zellstruktur, die durch Zerkleinerung und durch Aufreißung der Zellmembran allein nicht erreicht werden kann. Das Enzym findet sich nämlich in der Zelle abgeschlossen von einer schützenden Schicht, deren Zerstörung auch durch enzymatischen Abbau erfolgen kann, ein Vorgang, welchen man von der Autolyse, der allgemeinen Auflösung der Zelle, unterscheiden konnte; denn es war gelungen, aus Hefezellen nach ihrer Abtötung und erst nach erfolgter Entleerung von Eiweißstoffen mit Hilfe proteolytischer Enzyme die Saccharase durch die Einwirkung von diastatischem Ferment in Lösung überzuführen. In anderen Fällen wieder hat die quantitative Analyse der Ausbeuten in enzymatischen Auszügen gelehrt, daß die Enzyme in den Zellen in Form von Adsorptionsverbindungen festgehalten werden, die von chemischen Bindungen nicht leicht zu unterscheiden sind; es ist in diesen Fällen gelungen, die Adsorptionsaffinitäten mit gelinden chemischen Mitteln zu überwinden und die Ausbeute dadurch wesentlich zu steigern. So wird das Emulsin²⁾ aus den bitteren Mandeln, die Peroxydase³⁾ aus den Getreidekeimlingen durch Wasser nur in geringer, durch sehr verdünnte Alkalien dagegen in hoher Ausbeute in Lösung übergeführt. Diese Beobachtungen an Enzymen können nach R. Willstätter⁴⁾ auch zur Erklärung der Bindungsweise anderer hochmolekularer Stoffe beitragen.

1) A. **425**, 1 (1920/21); **427**, 111 (1921/22).

2) R. Willstätter und W. Csanyi, H. **117**, 172 (1921).

3) R. Willstätter und A. Pollinger, unveröffentlicht.

4) B. **55**, 3601 (1922).

So sprechen die Befunde über das Löslichkeitsverhalten des Chlorophylls in den Blättern oder das des Blutfarbstoffs dafür, daß diese Körper, z. B. das Chlorophyll in den Chloroplasten, nicht frei gelöst, sondern hauptsächlich in adsorptiver Bindung an unlösliche Träger vorliegen, durch welche ihr Löslichkeitsverhalten entstellt wird; die Zerlegung dieser Adsorptionsverbindungen gelingt nämlich schon durch verhältnismäßig geringe Mengen alkalischer oder saurer Agenzien.

In der Festigkeit der Bindung von Enzymen an andere Zellbestandteile, in ihrem Löslichkeitsverhalten innerhalb ihres natürlichen Milieus und damit in ihrer Extrahierbarkeit kennen wir alle möglichen Abstufungen. So sind die Enzyme, die in den Sekreten der tierischen und pflanzlichen Organismen, z. B. in den Verdauungssäften sich finden, die typischen extrazellulären Enzyme nach der älteren Anschauung, in diesen Sekreten frei gelöst; auch vor ihrer Sekretion, so aus dem frischen oder getrockneten Zellmaterial, lassen sie sich vielfach glatt in Lösung überführen, wie beispielsweise die Versuche über die Extraktion der drei wichtigsten Enzyme der Pankreasdrüse, von Lipase, Trypsin und Amylase erwiesen haben. Für die Beeinflussung der Löslichkeit eines Enzyms, sei es durch mechanische Einhüllung, sei es durch adsorptive Bindung an unlösliche Zellsubstanz, können die schon angeführten Beispiele der Hefesaccharase einerseits, des Emulsins oder der Peroxydase andererseits als charakteristisch gelten. Auch die Befunde über das Löslichkeitsverhalten des stärke-spaltenden Enzyms aus dem ungekeimten Getreidesamen, die von J. L. Baker und H. F. E. Hulton¹⁾ beschrieben worden sind, werden wohl dieser Gruppe von Erscheinungen zuzuordnen sein. Das gleiche gilt für die Löslichkeit eines interessanten, von O. Schmiedeberg²⁾ in der Niere aufgefundenen, aber noch wenig untersuchten Enzyms, des Histozyms, dessen Wirkung in der Synthese und Hydrolyse acylierter Aminosäuren, z. B. des Benzoylglykokolls besteht. Hier haben R. Willstätter, E. Waldschmidt-Leitz und J. Waldschmidt-Graser³⁾ zeigen können, daß die Extrahierbarkeit des Enzyms aus der rohen wie aus der getrockneten Drüse mit der untersuchten Tierart wechselt; das Histozym der Hundeniere wird von wässrigen Mitteln leicht, das der Schweineniere nur unvoll-

¹⁾ Soc. **121**, 1929 (1922).

²⁾ Virch. Arch. **14**, 288 (1881).

³⁾ Noch unveröffentlicht.

ständig, das der Pferdeniere gar nicht gelöst. Dieses ungleiche Löslichkeitsverhalten des Enzyms wird man auf eine adsorptive Bindung an unlösliche Drüsensubstanz von wechselnder Festigkeit zurückführen müssen, nicht auf eine Verschiedenheit der enzymatischen Individuen selbst, wenn auch eine Zerlegung der Adsorptionsverbindung noch nicht durchgeführt ist. Die einzigen Enzyme, für die eine völlige Unlöslichkeit mit Sicherheit als nachgewiesen anzusehen ist, gehören der Gruppe pflanzlicher Lipasen an, sie finden sich beispielsweise in ölhaltigen Pflanzensamen. So geht aus einer Untersuchung von R. Willstätter und E. Waldschmidt-Leitz¹⁾ über Ricinuslipase hervor, daß dieses Enzym in Wasser wie in Glycerin unlöslich, ja sogar höchst unbeständig gefunden wird gegenüber der Einwirkung von Glycerin, Wasser oder Elektrolytlösungen. Auch bei der Keimung der Pflanzensamen, bei welcher seine Wirkung einsetzt, wird das Enzym nicht mobilisiert und in lösliche Form übergeführt, sondern in der Zelle selbst werden ihm die Glyceride, im Cytoplasma des Samens suspendiert, zur Verseifung dargeboten. Dieser Löslichkeitsunterschied zwischen den fettspaltenden Enzymen im Pflanzensamen und der Lipase beispielsweise des tierischen Verdauungstraktes entspricht den örtlichen Bedingungen für die Fettspaltung. Die lösliche Pankreaslipase ist, um in Funktion zu treten, auf die Einstellung eines gewissen, den Kontakt mit dem unlöslichen Substrat vermittelnden Adsorptionszustandes angewiesen (vgl. 5. Kap.); die hierzu benötigten Aktivatoren, wie Proteine und Gallensalze, findet sie am Reaktionsort, im Darme; sie wird von ihnen unter Bildung komplexer Adsorbate zur Reaktion mit den Fetten gebracht. Die pflanzliche Lipase hingegen, welche nur innerhalb der Samenzelle in Reaktion tritt und für die sich eine Aktivierbarkeit nicht mehr beobachten läßt, ist entweder durch Adsorption an einen unlöslichen Träger aus der Proteingruppe verankert, oder aber die Proteinsubstanz ist als ein Bestandteil des Lipasemoleküls selbst der kolloide Träger der enzymatisch-aktiven Gruppe; sie unterliegt bei der Keimung einer Veränderung, durch welche sie die Fähigkeit erlangt, unter den in der Zelle gegebenen Bedingungen, bei neutraler Reaktion, ihre Wirkung auszuüben. Diese Veränderung, die unter der Einwirkung proteolytischer Enzyme auch künstlich hervorgerufen werden kann, betrifft den Proteinteil

¹⁾ H. 134, 161 (1924).

des Enzymmoleküls; aber nicht seine Löslichkeit wird dadurch beeinflusst, sondern nur die Affinitätsverhältnisse seiner chemisch-aktiven Gruppe.

Die geringen Kenntnisse und die ungenügende Beachtung des Löslichkeitszustandes der Enzyme haben zur Folge gehabt, daß viele Angaben der älteren Literatur über die Bildung von Enzymen in lebenden und in toten Zellen heute keine Geltung mehr besitzen. Nur wenige ältere Beobachtungen, die über die Bildung löslicher, frei sezernierter Enzyme angestellt worden sind, wird man noch als einigermaßen einwandfrei ansehen dürfen. Dazu gehören z. B. die bemerkenswerten Befunde von J. P. Pawlow¹⁾ über die Anpassung der Fermentbildung und Sekretion in tierischen Organismen an die durch die Art der zugeführten Nahrung bedingten Erfordernisse. Aus der folgenden Tabelle 23, die einer Untersuchung von Pawlow entnommen ist, ist zu ersehen, daß der relative Gehalt des pankreatischen Sekrets an den drei wichtigsten Verdauungsenzymen, dem eiweiß-, dem fett- und dem stärke-spaltenden, der Zusammensetzung der verabreichten Nahrung nach ihrem Eiweiß-, Fett- und Stärkegehalt in ausgeprägtem Maße entspricht; die Drüse antwortet also auf die gesteigerte Zufuhr eines bestimmten Nahrungsbestandteiles mit einer vermehrten Bildung und Absonderung des für seinen Umsatz erforderlichen Enzyms. Den Angaben der Tabelle, die zwar den modernen Anforderungen einer exakten Bestimmung der Enzymmengen nicht mehr genügen und die in einer Untersuchung von J. Wohlgemuth²⁾ bestritten worden sind, wird, wenn auch keine streng quantitative, so doch eine qualitative Bedeutung zukommen, zumal ihre Aussagen den neueren Beobachtungen über vermehrte Enzymbildung bei einzelligen Organismen entsprechen.

Tabelle 23.

Enzymgehalt des Pankreassaftes und Nahrung nach Pawlow.

Nahrung	Saftmenge ccm	Trypsin	Amylase	Lipase
600 ccm Milch .	48	1085	432	4334
250 g Brot . . .	151	1978	1601	800
160 g Fleisch .	144	1502	648	3600

¹⁾ Die Arbeit der Verdauungsdrüsen, S. 48 ff. Wiesbaden 1898.

²⁾ II. Berliner klin. Wochenschrift 1907, S. 47.

Über die Abhängigkeit der Enzymbildung vom Nährsubstrat bei einzelligen Lebewesen hat J. Wortmann¹⁾ im Jahre 1882 bemerkenswerte Beobachtungen veröffentlicht. Es ging daraus hervor, daß Bakterien nur dann stärkespaltendes Enzym zu bilden vermögen, wenn ihnen außer Stärke keine andere benutzbare Kohlenstoffquelle zur Verfügung steht. Indessen haben die Bemühungen Wortmanns, auf ähnliche Weise einen Einfluß der Nahrungszusammensetzung auf die Fähigkeit der Hefe zur Bildung des rohrzuckerspaltenden Enzyms nachzuweisen, zu keinem eindeutigen Ergebnis geführt; die quantitativen Grundlagen der enzymatischen Methodik waren noch nicht genügend ausgebildet. Derselbe Einwand ist gegenüber einer späteren Untersuchung von A. Fernbach²⁾ zu erheben, in welcher der Enzymgehalt nicht in der Hefe selbst, sondern erst nach einer umständlichen und unkontrollierbaren Autolyse gemessen wurde; auch einer älteren Arbeit von F. A. F. C. Went³⁾ über den Einfluß der Nahrung auf die Enzymbildung in *monilia sitophila* lassen sich keine zuverlässigen Schlußfolgerungen entnehmen. Erst vom Jahre 1910 an sind von H. v. Euler⁴⁾ und seinen Mitarbeitern systematische Untersuchungen über die Bildung der Saccharase in der Hefe wieder aufgenommen worden; sie werden ergänzt durch wertvolle Beobachtungen, die J. Meisenheimer, St. Gambarjan und L. Semper⁵⁾ beigetragen haben.

Die Untersuchungen des Eulerschen Laboratoriums beruhen auf der exakten Definition des Inversionsvermögens lebender Hefezellen, das gegeben ist durch die Beziehung

$$\text{Inversion} = \frac{k \cdot g \text{ Zucker}}{\text{Zellenzahl}}$$

oder, bei Unkenntnis der Anzahl der Hefezellen, durch den entsprechenden Ausdruck

$$If(\text{Inversionsfähigkeit}) = \frac{k \cdot g \text{ Zucker}}{g \text{ Trockensubstanz}},$$

¹⁾ H. **6**, 287 (1882).

²⁾ Ann. Inst. Pasteur **4**, 641 (1890).

³⁾ Jahrb. wiss. Botanik **36**, 611 (1901).

⁴⁾ Arkiv f. Kemi **3**, Nr. 34 (1910); H. **70**, 279 (1910/11); **76**, 388; **78**, 246; **79**, 274 (1912); **84**, 97 (1913); **88**, 430; **89**, 272 (1914); Bio. Z. **58**, 467; **67**, 203 (1914); H. **97**, 286 (1916); Bio. Z. **85**, 406 (1917/18); H. **106**, 201 (1919); **109**, 65 (1920).

⁵⁾ Bio. Z. **54**, 122 (1913); **67**, 364 (1914).

der die katalytische Aktivität auf die Menge der vorhandenen Trockensubstanz bezieht; diese Größe ist innerhalb der eingehaltenen Grenzen nur wenig abhängig von den angewandten Hefe- und Rohrzuckermengen. Es hat sich ergeben, daß der Saccharasegehalt zweier untersuchter Heferassen, nämlich einer Stockholmer Unterhefe und einer Oberhefe, während neun bzw. drei Jahren eine bemerkenswerte Konstanz aufwies; er entsprach einem Mittelwert für I_f von 16 bzw. 9-². Eine Steigerung des Enzymgehaltes ließ sich nun erzielen entweder, wenn auch keine sehr erhebliche, durch Darbietung eines stickstoffreichen Nährmediums, z. B. von Pepton, oder aber, und in viel stärkerem Maße, durch Züchtung des Pilzes auf einer Nährlösung von hoher Rohrzuckerkonzentration. In diesem Falle nahm das Inversionsvermögen der Hefe mit der Dauer der Züchtung erheblich zu, und zwar bis zu einem maximalen Werte; durch Überführung einer auf solche Weise angereicherten Hefe auf frische, der ersten gleichwertige Nährlösungen erreichte man noch weitere Steigerungen des Enzymgehaltes, deren absolute Beträge indessen stetig geringer wurden. Durch dieses Verfahren der Hefezüchtung bei hoher Zuckerkonzentration ist in den Untersuchungen von Euler und von Meisenheimer eine Anreicherung der Saccharase im Pilze auf etwa den zehnfachen Betrag in den besten Beispielen erzielt worden, der Zeitwert des Zellmaterials, der der enzymatischen Konzentration umgekehrt proportional ist, fiel z. B. von 480 auf 42.

Die in diesen Beispielen beobachtete Enzymvermehrung ist indessen in Versuchen von R. Willstätter, Ch. D. Lowry jr. und K. Schneider¹⁾ weit überholt worden; sie haben zu der Erkenntnis geführt, daß der für die günstigste Saccharasebildung in der Hefe entscheidende Umstand die Art und Weise der Gärführung ist. Die Züchtung durch Gärung in starker Zuckerlösung wird ersetzt durch eine Gärführung mit minimaler Zuckerkonzentration; die Tatsache, daß bei geringer Zuckerzufuhr mehr Saccharase neugebildet wird als bei reichlicher, ist auf den Erregungszustand der Hefe bei der limitierten Gärung zurückzuführen, welcher der Enzymneubildung zugute kommt; die Darbietung vergärbaren Zucker scheint auf den Pilz einen Reiz auszuüben, der diese in einen Zustand der Gärbereitschaft versetzt. Die Produktion der normalen Enzyme durch den Pilz findet man also weniger von

¹⁾ H. 146, 158 (1925).

seinem Ernährungszustand im ganzen abhängig, als vielmehr von der Auslösung bestimmter, spezifischer Reize. Das von Willstätter eingeschlagene Verfahren der ständigen Darbietung ganz geringer Zuckermengen, beispielsweise durch langsames Eintropfen einer Zuckerlösung in das gut gerührte Gärgut, liefert reproduzierbare Werte der Enzymvermehrung, wenn sich auch der lebende Pilz je nach seinem physiologischen Zustand, z. B. seiner Vorgeschichte, von Fall zu Fall etwas verschieden verhält. So sind schon in wenigen Stunden der Gärführung die besten enzymatischen Konzentrationen erhalten worden, nämlich Zeitwerte zwischen 15 und 22, 16fach bessere als bei dem Ausgangsmaterial. Es ist bemerkenswert, daß eine solche Zunahme des Saccharasegehaltes auch bei der gewöhnlichen Autolyse des Pilzes beobachtet wird; die Saccharasebildung ist in diesem Falle nicht, wie man früher annahm, eine postmortale, sondern sie geht, verkoppelt mit der Gärung der Inhaltskohlenhydrate, der Abtötung der Zelle voraus.

Der Vergleich zwischen dem Anwachsen des Saccharasegehaltes in der Hefe und der Änderung anderer enzymatischer Leistungen hat zu wertvollen Aufschlüssen über die Enzyymbildung im lebenden Pilz geführt; die Saccharase scheint nämlich im enzymatischen Apparat der Hefe eine Ausnahmestellung einzunehmen. Es hat sich gezeigt, daß mit dem Zuwachs an Saccharase keine Steigerung des Gärvermögens der Hefe erfolgt und daß auch die anderen, der Messung zugänglichen Enzyme, beispielsweise Maltase oder die Hefeproteasen, in ihrer Menge unverändert bleiben; „das Verhältnis der Saccharase zu den sie begleitenden Enzymen wird also fast in dem Maße ihrer Anreicherung verbessert“. Ihre Bildung beruht auf dem spezifischen physiologischen Erregungszustand des Pilzes.

Es ist in diesem Zusammenhang von Interesse, auch die Beobachtungen über die Gewöhnung der Hefe an die Vergärung bestimmter, unter gewöhnlichen Verhältnissen nicht vergärbare Zucker kurz zu streifen. Es finden sich in der Literatur zahlreiche Angaben, daß die meisten Hefen, die unvermögend sind, Galaktose zu vergären, durch Züchtung in Lösungen dieses Substrates die Fähigkeit der Galaktosegärung erlangen; die Gärfähigkeit für Galaktose kann sogar im Verlauf der Gewöhnung die für Glucose gemessene übertreffen, wenn man die Gärgeschwindigkeit der beiden Substrate für sich allein in Betracht zieht, während sich

nach den Beobachtungen von R. Willstätter und H. Sobotka¹⁾ das Verhältnis der Gärgeschwindigkeiten im Gemenge der Substrate wesentlich zugunsten schnellerer Glucosegärung von dem Geschwindigkeitsverhältnis der Einzelgärungen unterscheidet. Dieser Erwerb der Gärfähigkeit für Galaktose ist früher auf eine an das Leben der Hefezellen gebundene biologische Anpassung zurückgeführt worden. H. v. Euler und R. Nilsson²⁾ haben indessen gezeigt, daß auch sterile Trockenhefe, in dem nämlichen Maße wie der frische Pilz, durch Vorbehandlung mit Galaktose die Fähigkeit zur Vergärung dieser Zuckerart erwirbt; und aus einer weiteren Untersuchung von H. v. Euler und Th. Lövgren³⁾ hat es sich ergeben, daß das neuerworbene Gärvermögen der Hefe nach ihrer Zurückführung auf ihr natürliches Nährmedium Glucose auch in längeren Zeiten keinen Rückgang erfährt. Die Anpassung der Hefe an ihr Gärsubstrat ist daher nicht mit der für die Saccharase beobachteten Enzymvermehrung zu vergleichen, sie wird vielmehr auf eine rein chemische oder enzymatische Umwandlung des Zymasekomplexes zurückgeführt.

3. Leitlinien der Darstellung und Reinigung.

Die Methoden zur Isolierung der Enzyme aus der pflanzlichen oder tierischen Zellsubstanz, sofern sie nicht in Form von Sekreten in frei gelöstem Zustand gewonnen werden, richten sich nach ihrer jeweiligen Löslichkeit. Vollkommen unlösliche Enzyme, wie die Lipase des Pflanzensamens, erfordern zu ihrer Reinigung eine wesentlich andere präparative Methodik, als sie für die gelösten enzymatischen Individuen an vielen Beispielen ausgearbeitet wurde; sie soll daher am Schlusse dieses Abschnittes getrennt behandelt werden.

Wenn man vor der Aufgabe steht, ein Enzym aus pflanzlichem oder tierischem Ausgangsmaterial, z. B. aus der Pflanzenwurzel, aus einer Pilzkultur oder aus einem tierischen Drüsengewebe in Form eines wässrigen Infuses überzuführen, so ergeben sich hierfür aus den Erfahrungen, die die Forschung gesammelt hat, je nach dem Material eine Reihe von Möglichkeiten. Man kann die Auflösung der Zellstruktur durch grob mechanische Zertrümmerung

¹⁾ H. 123, 176 (1922).

²⁾ H. 143, 89 (1925).

³⁾ H. 146, 44 (1925).

der Zellmembran herbeiführen, um dann die löslichen Zellinhaltsstoffe und mit ihnen das Enzym in Form eines Preßsaftes von den unlöslichen Zellbestandteilen abzutrennen, so wie E. Buchner in seiner bekannten Untersuchung die Isolierung des Zymasekomplexes aus der Hefe bewirkt hat. Es ist am Beispiel der Hefesaccharase schon darauf hingewiesen worden, daß man bei einem solchen Verfahren, je nach dem Zustand des Enzyms in der Zelle, nur einen mehr oder weniger großen Bruchteil desselben in dem Preßsaft wiederfinden wird. Zuweilen erweist es sich als zweckdienlich, der Auspressung des zerkleinerten Zellmaterials eine Ausspülung enzymatisch unwirksamer Bestandteile unter Fixierung des Enzyms selbst an unlösliche Zellsubstanz vorzuschicken. So wird beispielsweise die Peroxydase in der Pflanzenwurzel durch gelinde Einwirkung von Säure auf der Pflanzenfaser niedergeschlagen und diese läßt sich dann durch Dialyse von einem Teil des Ballastes befreien, ohne daß sie dabei an Enzym verliert; dieses geht erst nach der Abstumpfung der Säure durch verdünntes Alkali in den Preßsaft über.

Ein anderes Verfahren, welches häufig angewandt wird und das bei Einhaltung gewisser Vorsichtsmaßregeln die Enzyme in befriedigender Ausbeute zu isolieren gestattet, beruht auf der Selbstauflösung der Zelle, der Autolyse, die nach deren Abtötung, etwa durch Zellgifte, unter der Wirkung der nun ungehemmt einsetzenden enzymatischen Abbauvorgänge einen großen Teil der Zellinhaltsstoffe in Lösung und extrahierbare Form überführt. Die enzymatische Konzentration solcher Autolysate wird man infolge ihres größeren Gehaltes an den enzymatisch löslichgemachten Begleitstoffen ungünstiger als in den Preßsäften finden, der tiefergreifende Abbau der Zellsubstanz kann indessen in manchen Fällen für die weitere Reinigung des Enzyms, für seine Abtrennung von Nichtenzymatischem, beispielsweise mit Fällungs- oder Adsorptionsmitteln, von Vorteil sein. Auch eine fraktionierte Entleerung der abgetöteten Zellsubstanz durch Einschaltung bestimmter enzymatischer Abbauvorgänge ist durchgeführt worden; so läßt sich die Saccharase der Hefe, die beim Abbau des größten Teiles der Hefeeiweißstoffe durch Trypsin nicht mit diesen entleert wird, durch die nachfolgende Einwirkung diastatischen Enzyms in größerer Reinheit freilegen¹⁾. Bei der Freilegung der Enzyme mittels auto-

¹⁾ R. Willstätter und F. Racke, A. **427**, 111 (1921).

lytischer Prozesse ist indessen darauf zu achten, daß die Enzyme nicht selbst durch eintretende Veränderungen des Milieus der Zerstörung unterliegen. So haben R. Willstätter, Tr. Oppenheimer und W. Steibelt¹⁾ gezeigt, daß die Maltase der Hefe, die gegen Säure sehr empfindlich ist, bei der gewöhnlichen Autolyse des Pilzes durch die entstehende Säure zum größten Teil zerstört wird und daß man sie nur dann in guter Ausbeute von der Zellsubstanz abzutrennen vermag, wenn man dafür Sorge trägt, die jeweils gebildete Säure zu neutralisieren.

In anderen Fällen — dies gilt vor allem für die Verarbeitung tierischen Ausgangsmaterials — ist es zweckmäßiger, die zerkleinerte Zellsubstanz vor ihrer Auslaugung zu trocknen. Dieses Verfahren bietet den Vorteil, daß ein Teil der Zellproteine eine Denaturierung erleidet und daß daher in den Extrakten, die man durch die Behandlung des getrockneten Materials mit Lösungsmitteln gewinnt, die Enzyme in der Regel in größerer Konzentration vorliegen als in den Auszügen aus den frischen Geweben; man hat dabei nur zu beachten, daß durch die Einwirkung der wasserentziehenden Mittel keine Schädigung der enzymatischen Aktivität eintritt. So hat es sich beispielsweise gezeigt, daß die Pankreaslipase bei der Trocknung des Drüsengewebes mittels Alkohols in erheblichem Maße der Zerstörung einheimfällt²⁾; dagegen hat die Entwässerung und Entfettung der Drüse mit Aceton und mit Äther, die allgemein brauchbar gefunden wurde, sich für die Lipase wie für die anderen in ihr enthaltenen Enzyme als unschädlich erwiesen. Die Extraktion der Enzyme aus dem getrockneten Material bewirkt man durch wässrige Mittel oder durch Glycerin, auf dessen Eignung als Lösungsmittel für tierische Enzyme zuerst v. Wittich aufmerksam gemacht hat; man findet diese nämlich zumeist in glycerinhaltiger Lösung viel beständiger als in rein wässrigem Medium. In besonderen Fällen wird die Extraktion erreicht durch Einwirkung verdünnter Säure oder verdünnten Alkalis, nämlich dann, wenn eine adsorptive Bindung des Enzyms seine Lösung verhindert; dies trifft z. B. für das Emulsin der bitteren Mandeln zu, dessen Lösung aus den getrockneten Kernen erst nach gelinder Einwirkung von Alkali erfolgt.

Unter den Methoden, die die ältere Forschung vor allem zur weiteren Reinigung der Enzyme aus ihren rohen Lösungen empfohlen

¹⁾ H. **110**, 232; **111**, 157 (1920).

²⁾ R. Willstätter und E. Waldschmidt-Leitz, H. **125**, 132, und zwar S. 148 (1922/23).

hat, ist die Anwendung der Dialyse zu nennen, die eine Abtrennung der Elektrolyte und der niedrigmolekularen Begleitstoffe erlaubt, während die Enzyme selbst von tierischer Membran nicht durchgelassen werden; die durch Dialyse erreichbare Steigerung des Reinheitsgrades ist indessen in der Regel nicht beträchtlich, ihre Bedeutung für die präparative Enzymchemie beruht vielmehr auf ihrer Anwendung für weitgehender vorgereinigte Enzymlösungen, welche sie, insbesondere in Form der Elektrodialyse, von begleitenden oder adsorbierten Ionen oder auch von organischen Mitteln, wie dem Glycerin, vollständig zu befreien vermag. Andere Mittel dienen dazu, die Enzyme aus ihren Lösungen niederzuschlagen; hierzu haben vor allem die Ausfällung mit organischen Lösungsmitteln, Alkohol oder Aceton, die Aussalzung beispielsweise mit Ammonsulfat und insbesondere die Einwirkung von Schwermetallsalzlösungen und von Eiweißfällungsmitteln Verwendung gefunden, unter denen Quecksilber-, Blei- oder Uransalze sowie Gerbsäure besonders häufig angewandt worden sind. Diese Niederschlagsbildungen sind jedoch, wenn sie beobachtet werden, in den meisten Fällen nicht dem Enzym selbst, sondern seinen Begleitstoffen zuzuschreiben, sie hängen von der wechselnden, mehr zufälligen Zusammensetzung der Enzymlösungen in hohem Maße ab. Zwar wird z. B. die Saccharase, wie es sich gezeigt hat, aus einigen ihrer Lösungen durch essigsäures Blei oder durch Uranylacetat in Fällungsreaktionen abgeschieden, allein das Enzym wird von diesen Fällungen, die auf begleitende Proteinsubstanz zurückzuführen sind, nur adsorbiert; nur die Fällung pflanzlicher Peroxydase durch Tannin, die R. Willstätter und A. Pollinger¹⁾ beschrieben haben, scheint bisher eine Reaktion des Enzyms selbst zu sein. Es kommt hinzu, daß die Empfindlichkeit mancher Enzyme, vor allem des tierischen Organismus, gegenüber Zustandsänderungen bei ihrer Ausfällung aus wässriger Lösung vielfach beträchtliche Einbuße an enzymatischer Aktivität zur Folge hat. So wird Pankreaslipase, in wässrigem, glycerinhaltigem Medium gelöst, bei der Einwirkung von Alkohol oder Äther, bereits in Mengen, die zu ihrer Ausfällung nicht einmal genügen, fast völlig zerstört; und auch bei der Fällung ihrer Lösungen mit Schwermetallsalzen treten beträchtliche Aktivitätsverluste ein.

Für die Isolierung der Enzyme aus ihren natürlichen Mischungen mit großen Mengen fremder Begleitstoffe, vor allem

¹⁾ A. 430, 369 (1922/23).

Proteinen und Kohlenhydraten, bieten sich, soviel man bis heute erfahren hat, keine Angriffspunkte für chemische Mittel; abgesehen vom Reaktionsvermögen ihrer spezifischen aktiven Gruppe, haben sie als chemisch indifferente Stoffe zu gelten. Auch die Beobachtungen über ihre Fällbarkeit beziehen sich, wie eben auseinandergesetzt, nicht auf die enzymatischen Individuen selbst, sondern auf ihre Assoziationen mit begleitenden Stoffen. Die Isolierung der Enzyme wird weiter erschwert durch ihr ungünstiges Löslichkeitsverhalten; ihre Unlöslichkeit in vielen organischen Solvenzien, namentlich in den mit Wasser nicht mischbaren, beeinträchtigt ihre Abtrennung von Fremdstoffen. Daher ist eine Methodik, wie sie bei der Isolierung und Reindarstellung beispielsweise von tierischen oder pflanzlichen Farbstoffen zum Ziel geführt hat, für die Reinigung von Enzymen wenig geeignet. „Es gibt nur eine einzige, vielfältige, anpassungs- und entwicklungsfähige Methodik für die Isolierung der Enzyme, die Anwendung der auf kleinen Affinitätsbeträgen, auf Affinitätsresten beruhenden Adsorptionsvorgänge“¹⁾. Mit ihrer Hilfe ist es erst gelungen, eine Anzahl von Enzymen auf höheren Reinheitsgrad zu bringen.

Die Reinigung der Enzyme durch Adsorption stellt nach den Erfahrungen, die sich aus den Untersuchungen R. Willstätters und seiner Mitarbeiter ergeben haben, die präparative Methodik vor drei besonders wichtige Aufgaben. Eine solche Aufgabe besteht darin, die Adsorption eines Enzyms möglichst auswählend zu gestalten. Das Adsorbens, das unter gewöhnlichen Bedingungen mit dem Enzym zugleich eine nicht unerhebliche Menge von Begleitstoffen aufnimmt, sei es, daß sie ihm einfach beigemischt, sei es, daß sie enger mit ihm assoziiert sind, wird nur unter solchen Bedingungen für die Reinigung eines Enzyms von wesentlicher Bedeutung sein, unter denen seine Adsorption möglichst spezifisch gefunden wird. Je geringer die zur Aufnahme des Enzyms erforderliche Menge an Adsorbens, um so höher ist die zu erwartende Steigerung der enzymatischen Konzentration. Für die Beurteilung der auswählenden Wirkung eines Adsorbens hat sich die Bestimmung von „Adsorptionskurven“ als wertvoll erwiesen, welche nach H. Kraut und E. Wenzel²⁾ die Beziehungen zwischen der Konzentration des Enzyms im Adsorbat und der in der Adsorp-

¹⁾ R. Willstätter und E. Waldschmidt-Leitz, H. **125**, 132 (1922/23).

²⁾ H. **133**, 1 (1923/24); **142**, 71 (1924/25).

tionsmutterlauge wiedergeben. Sie lassen erkennen, unter welchen Bedingungen ein Enzym in dem jeweils vorliegenden Reinheitsgrade am spezifischsten mit dem Adsorbens reagiert, sei es bei wechselnder Acidität, sei es nach einer Veränderung seiner Anfangskonzentration, z. B. durch Verdünnen seiner Lösung, oder nach einer Voradsorption von enzymatisch Unwirksamem, wie im 3. Kapitel auseinandergesetzt wurde; und sie vermitteln insbesondere eine Anschauung vom jeweiligen Reinheitsgrad des Enzyms, je nachdem ob sie das Bild eines sich adsorptiv einheitlich verhaltenden Systems einander im Adsorptionsverhalten nahestehender Stoffe, oder aber eines Gemenges von Körpern mit sehr ungleichen Adsorptionsaffinitäten ergeben.

Eine zweite Aufgabe der Adsorptionsmethode, die bereits an einigen Beispielen durchgeführt wurde, besteht in der Trennung der Enzyme von ihren natürlich mit ihnen vergesellschafteten enzymatischen Begleitern. So liefern die Sekrete und Auszüge der Pankreasdrüse ein Gemisch von vier besonders wichtigen enzymatischen Stoffen, von fett-, stärke-, protein- und peptidspaltendem Enzym; als Vorbedingung für die Untersuchung eines dieser pankreatischen Enzyme hat man die Abtrennung der begleitenden, nach ihrer Wirkung unterschiedenen Enzyme anzusehen und die Adsorptionsmethoden dafür auszubilden.

Eine dritte, noch wenig gelöste Aufgabe bietet sich in der Abtrennung der enzymatisch unwirksamen Vorstufen und Zersetzungsprodukte des Enzyms, welche ihm im Adsorptionsverhalten am nächsten stehen. Es ist noch nicht sicher erkennbar, wieweit die Adsorptionsmittel zwischen den Enzymen und solchen Stoffen, welche sich nur durch das Fehlen der spezifischen aktiven Gruppe von ihnen unterscheiden, auszuwählen vermögen. Nur am Beispiel eines nicht enzymatischen, aber in seinem sonstigen Verhalten mit dem Enzym nahe verwandten Stoffes, nämlich der Enterokinase, des spezifischen Trypsinaktivators in der Darmschleimhaut, hat es sich mit Sicherheit zeigen lassen, daß sein Adsorptionsverhalten gegenüber dem Adsorbens Tonerde mit dem seiner Vorstufe, der „Pro-Kinase“, welche in der Pankreasdrüse ausgebildet wird, übereinstimmt.¹⁾

Die ersten Untersuchungen über die Adsorption von Enzymen und über ihre Abtrennung aus den natürlichen Gemengen durch

¹⁾ E. Waldschmidt-Leitz und A. Harteneck, H. **149**, 221 (1925).

Adsorption stammen aus den Jahren 1861 und 1863. E. Brücke¹⁾ gelang es, das Pepsin „mechanisch an kleine feste Körper zu binden“, z. B. an Calciumphosphat, Schwefel oder Cholesterin, und das Enzym aus seinem Adsorbat wieder freizulegen, nämlich durch eine Veränderung der Reaktion oder auch durch Weglösen des Adsorbens selbst. A. Danilewsky²⁾ hat dann bald darauf die Trennung der drei wichtigsten enzymatischen Funktionen des Pankreassaftes, die er auf spezifische Träger zurückführte, mit Adsorptionsmitteln unternommen. Aus dem lipatisch unwirksamen Sekret konnte er durch Adsorption an Kollodium das Trypsin frei von Amylase erhalten, während diese letztere, allerdings noch mit einem Teil des Trypsins vergesellschaftet, in der Adsorptionsmutterlauge verblieb, und J. Cohnheim³⁾ konnte in demselben Jahre über die Abtrennung des stärkespaltenden Enzyms durch Adsorption an Calciumphosphat berichten. An einem anderen Beispiel versuchte O. Hammarsten⁴⁾ eine Trennung von Enzymen durch Adsorption; er beschrieb ein Verfahren, aus den Infusen der Magenschleimhaut durch fraktionierte Fällung mit Magnesiumcarbonat oder Bleizuckerlösung pepsinfreie Lösungen des labenden Enzyms zu gewinnen. Allein diese Angaben haben sich nicht bestätigt; nach späteren Untersuchungen von J. P. Pawlow und S. W. Parastschuk⁵⁾ und von O. Hammarsten⁶⁾ gelingt es auf diese Weise nicht, pepsinfreie Lösungen von Lab zu erhalten, sie enthalten vielmehr inaktives Pepsin.

Die Aufgabe, eine Trennung von Enzymen durch Adsorption zu erreichen, ist erst in den Untersuchungen R. Willstätters wieder aufgenommen worden; sie gründet sich auf die feinen Abstufungen, die die Enzyme z. B. in ihren sauren und basischen Eigenschaften aufweisen. So haben R. Willstätter und E. Waldschmidt-Leitz⁷⁾ die sauren und die basischen Eigenschaften der drei wichtigsten pankreatischen Enzyme, von Lipase, Amylase und Trypsin, ihrer Trennung durch Adsorption mit einem basischen und einem sauren Adsorbens, mit Tonerde und mit Kaolin, zugrunde

¹⁾ Sitzungsber. math.-naturw. Klasse d. k. Akademie der Wissensch. Wien **43**, 601 (1861).

²⁾ Virch. Arch. **25**, 279 (1862).

³⁾ Ebenda **28**, 241 (1863).

⁴⁾ R. Malys Jahresberichte über die Fortschritte der Tierchemie, 2. Band für 1872, S. 118 (1874).

⁵⁾ H. **42**, 415 (1904).

⁶⁾ H. **56**, 18 (1908).

⁷⁾ H. **125**, 132, und zwar S. 142 (1922/23).

gelegt. Die Pankreaslipase ist entsprechend der Erscheinung, daß sie in ihrem Reaktionssystem von unspezifischen Adsorptionsverhältnissen stark beeinflußt wird, sehr leicht adsorbierbar und in dieser Hinsicht sehr wenig von Begleitstoffen abhängig. So wird sie von basischen wie von sauren Adsorbentien, von Tonerde oder Kaolin, leicht adsorbiert, aber ihre sauren Eigenschaften sind doch stärker ausgeprägt als die von Amylase und Trypsin; sie läßt sich daher durch Adsorption mit Tonerde von den begleitenden Enzymen vollständig trennen. Wenn auch die Gegenwart gewisser Begleitstoffe, die als „Koadsorbentien“ wirken, einen Teil von Amylase und Trypsin in die Tonerdeadsorbate mit überführt, so genügt doch eine einfache Wiederholung der Adsorptionsvornahme, um die Trennung zu vervollständigen. Trypsin und Amylase bleiben in den Mutterlaugen der Tonerdeadsorption zurück, während die Elution der Adsorbate die lipatische Komponente ergibt.

Die Pankreasamylase ist basischen wie sauren Adsorptionsmitteln gegenüber indifferent; wenn man ihre Adsorption beobachtet, so ist diese lediglich auf den Einfluß von Begleitstoffen zurückzuführen. In reinerem Zustand wird sie aus wässriger Lösung weder von Aluminiumhydroxyd noch von Kaolin aufgenommen, es fehlen ihr also auch die basischen Eigenschaften. Auf diesem Umstand beruht ihre Trennung von Trypsin, das von elektronegativen Mitteln verhältnismäßig leicht adsorbiert wird: es gelingt, die Amylase durch wiederholte Behandlung mit Kaolin in saurer, in manchen Fällen auch in neutraler Lösung völlig von Trypsin zu befreien, das man in den Elutionen der Kaolinadsorbate, z. B. mit verdünntem Alkali, wiederfindet. So ist durch aufeinanderfolgende Adsorption mit Tonerde und mit Kaolin die Zerlegung des enzymatischen Gemenges, das sich in den Auszügen der Pankreasdrüse findet, nach diesen drei wichtigsten Enzymen durchgeführt worden.

Die Trennung der drei pankreatischen Enzyme, so wie sie hier beschrieben wurde, wird ergänzt und erweitert durch die Untersuchung und Abtrennung des Pankreaserepsins, des peptidspaltenden Enzyms der Drüse, das E. Waldschmidt-Leitz und A. Harteneck¹⁾ auf Grund seiner spezifischen Wirkungen von dem tryptischen Drüsenenzym unterschieden haben; es ist auch in seinen Adsorptionsaffinitäten von diesem verschieden, seine sauren Eigenschaften sind stärker ausgeprägt. So führt die Adsorption durch Tonerde und

¹⁾ H. 147, 286; 149, 203 (1925).

die Elution der gewonnenen Adsorbate, z. B. in den rohen, angesäuerten Auszügen, bei mehrmaliger Anwendung zu einer vollständigen Trennung der beiden Proteasen; in der Restlösung der letzten Adsorptionsvornahme verbleibt das Trypsin in guter Ausbeute, frei von ereptischer Wirkung, und die Elution der Tonerdeadsorbate liefert die einheitliche ereptische Komponente. Es ist sehr beachtenswert, daß diese beiden Enzyme, die der nämlichen Klasse enzymatischer Stoffe angehören, so deutliche Unterschiede in den Adsorptionseigenschaften aufweisen; ihr qualitativ verschiedenes Verhalten gegenüber der Tonerde ist auf eine Reaktion der Enzyme selbst zurückzuführen, nicht auf zufällige Assoziationen mit begleitenden Stoffen; es kommt nämlich in gleicher Weise bei ihrer Trennung aus einem ganz anderen Ausgangsmaterial, den Auszügen der Darm-schleimhaut, zur Geltung¹⁾.

Die Erfahrungen über die Trennung zweier in ihrer Spezifität nahe verwandter Enzyme durch Adsorption sind in jüngster Zeit noch durch ein weiteres Beispiel bereichert worden. R. Willstätter und E. Bamann²⁾ haben gezeigt, daß man in den rohen Autolysaten der Hefe durch die selektive Adsorptionswirkung eines Tonerdegels die beiden in ihm enthaltenen Carbohydrasen, das rohrzuckerspaltende und das malzzuckerspaltende Enzym, quantitativ zu trennen vermag. Es hat sich hierbei ergeben, daß die einfache Anschauung, derzufolge die auswählende Wirkung eines Adsorbens auf die Entwicklung seiner sauren oder basischen Eigenschaften zurückgeführt wird, nicht mehr genügt; die günstigste Selektivität beobachtete man nämlich an einem Tonerdegel, das mit verdünnten Säuren oder Alkalien nicht mehr merklich reagierte³⁾. Es scheinen demnach für die Eignung eines Adsorbens zur Trennung enzymatischer Individuen Affinitätsverhältnisse maßgebend zu sein, die sich in elektrochemischem und in kolloidchemischem Sinne noch nicht genauer definieren lassen; die Angaben über die Trennung von Enzymen werden in jedem Falle mit der näheren Kennzeichnung der dafür besonders tauglichen Adsorptionsmittel zu vertiefen sein.

In der chemischen Charakterisierung wichtiger Adsorptionsmittel sind in den letzten Jahren durch die Untersuchungen von

¹⁾ E. Waldschmidt-Leitz und A. Schöffner, H. 151, 31 (1925/26).

²⁾ Noch H. 151, 273 (1925/26).

³⁾ Siehe dazu R. Willstätter, H. Kraut und O. Erbacher, B. 58, 2458 (1925).

R. Willstätter und H. Kraut¹⁾ „Über Hydrate und Hydrogele“ wertvolle Fortschritte erzielt worden. So hat es sich gezeigt, daß je nach der Darstellung des Adsorbens Tonerde, je nach den Bedingungen seiner Fällung, verschiedene Sorten von Tonerdehydrat erhalten werden, die sich in ihrer Adsorptionstüchtigkeit und in ihrer auswählenden Wirkung in bemerkenswertem Maße unterscheiden. Die beobachteten Unterschiede, die durch eine verschiedene Dispersität, durch den wechselnden Verteilungsgrad der kolloiden Teilchen sich nicht erklären lassen, sind auf die Existenz verschiedener chemischer Verbindungen zurückgeführt worden, die durch ihren Gehalt an chemisch gebundenem Wasser wie durch ihr Verhalten gegenüber verdünnten Säuren und Alkalien gekennzeichnet werden können. Eine erste Untersuchung²⁾ hat dazu geführt, eine Unterscheidung vier verschiedener Sorten von Aluminiumhydroxyd zu definieren, deren Bildung durch die näheren Bedingungen ihrer Ausfällung bestimmt ist, nämlich:

- Aluminiumhydroxyd A, mit überschüssigem konzentriertem Ammoniak gefällt und lange gekocht, plastisch;
- Aluminiumhydroxyd B, ebenso gefällt wie A, aber ohne längeres Erhitzen, plastisch;
- Aluminiumhydroxyd C, mit verdünntem Ammoniak gefällt, ohne längeres Erwärmen, feinkörnig, pulverig;
- Aluminiumhydroxyd D, aus Aluminatlösung mit Kohlensäure gefällt, grob pulverig.

Die Verbesserung der präparativen Vorschriften für die Darstellung der Adsorbentien und die Erweiterung ihrer analytischen Untersuchung hat dann in neueren Arbeiten³⁾ erlaubt, einige der erhaltenen Präparate als bestimmte chemische Individuen, als definierte Hydrate des Aluminiumoxydes zu kennzeichnen und ihre spezielle Gewinnung mit Sicherheit und reproduzierbar festzulegen. So hat es sich ergeben, daß das bei vorsichtiger Fällung mit verdünntem Ammoniak entstehende Tonerdepräparat C der Zusammensetzung eines Ortho-Aluminiumhydroxydes der Formel $\text{Al}(\text{OH})_3$ entspricht. Dieses Tonerdegel (C_α), das unter den gelindesten Bedingungen er-

¹⁾ B. 56, 149, 1117 (1923); 57, 58, 1082 (1924); 58, 2448, 2458 (1925).

²⁾ B. 56, 149 (1923).

³⁾ B. 58, 2448, 2458 (1925).

halten wird, zeichnet sich jedoch durch leichte Veränderlichkeit aus; es verwandelt sich in wässriger Suspension nach kurzer Zeit in eine zweite Verbindung (C_β), welche, ebenfalls unbeständig, aber beständiger als die α -Modifikation, allmählich in eine dritte Modifikation (C_γ) übergeht. Mit diesen Umwandlungen, die auf eine chemische Veränderung des Moleküls zurückzuführen sind, sei es auf eine Isomerie-, sei es auf eine Polymorphieerscheinung, ist eine Veränderung der basischen und sauren Eigenschaften und des Adsorptionsverhaltens der Gele verbunden, sie sind durch kolloidale Zustandsänderungen nicht zu erklären. Die Tonerdesorten A und B sodann erwiesen sich als Polyaluminiumhydroxyde. Es ist weiterhin gelungen, aus dem Orthohydroxyd des Aluminiums sowohl wie auch unter den Bedingungen der direkten Fällung bei länger dauernder Einwirkung von Ammoniak und höherer Versuchstemperatur ein weiteres definiertes Hydrat zu erhalten, dessen Zusammensetzung der Formel eines Metahydroxyds, $AlO.OH$, entspricht; dieses Hydrat, welches sich für die Trennung der Saccharase und Maltase in den Hefeautolysaten als besonders tauglich erwiesen hat, besitzt weder saure noch basische Eigenschaften.

Der weiteren Reinigung eines Enzyms durch Anwendung eines Adsorptionsmittels, beispielsweise nach der Abtrennung der mit ihm vergesellschafteten enzymatischen Begleiter, wird durch den Umstand eine Grenze gesetzt, daß von dem Adsorbens zugleich mit dem Enzym eine größere Menge nichtenzymatischer Stoffe aufgenommen wird, deren Affinität wie die des Enzyms auf einer entgegengesetzten elektrischen Ladung beruhen mag. In solchen Fällen hat der Wechsel in der Polarität des Adsorptionsmittels, der Übergang von einem elektropositiven zu einem elektronegativen Adsorbens, zum Erfolg geführt. So lassen sich Präparate der Hefesaccharase, die, durch Tonerdeadsorption vorgereinigt, noch zu etwa $\frac{3}{4}$ aus Hefegummi bestehen, durch eine darauffolgende Adsorption an Kaolin vollständig von diesem Kohlenhydrat befreien und ihre enzymatische Konzentration erhöht sich dabei etwa auf den fünf-fachen Wert, sie wird nämlich etwa 500mal so groß als in der Hefe selbst. Auch bei pankreatischer Lipase hat die aufeinanderfolgende Anwendung eines elektropositiven und eines elektronegativen Adsorbens eine viel erheblichere Steigerung ihres Reinheitsgrades erlaubt, als sie durch die alleinige wiederholte Anwendung eines der Adsorbenzen zu erreichen war. Noch weiter hat am

Beispiel der Pankreaslipase die Anwendung indifferenten, organischer Adsorptionsmittel, von Cholesterin oder Tristearin, geführt, die in diesem Falle noch strenger auswählend zu wirken scheinen als Kaolin oder Aluminiumhydroxyd. Diese Erscheinung ist auf eine der spezifischen Adsorption verwandte chemische Adsorption zurückgeführt worden, eine Auffassung, die durch die Tatsache gestützt erscheint, daß die Affinität der spezifischen aktiven Gruppe der Lipase in diesen Adsorbaten in Mitleidenschaft gezogen, nämlich bedeutend abgeschwächt wird, obwohl sich das Enzym aus ihnen in wirksamer Form wieder freilegen läßt.

Die Steigerung des enzymatischen Reinheitsgrades, die sich mit präparativen Mitteln erreichen läßt, wird in jedem Falle durch die absolute Konzentration des Enzyms im Ausgangsmaterial, die sich noch nicht ermitteln läßt, bestimmt sein. Wenn es beispielsweise gelungen ist, die Hefesaccharase in den besten erhaltenen Präparaten auf über 3000mal, tierische Lipase andererseits nur auf etwa 250mal höheren Reinheitsgrad zu heben, so ergeben sich aus diesem Vergleich noch keine Anhaltspunkte für die absolute enzymatische Konzentration der beiden Präparate. Das Ziel der präparativen Enzymchemie, die Reinigung so weit fortzusetzen, bis weitere Operationen keine Steigerung des Reinheitsgrades mehr ergeben, ist noch in keinem Falle erreicht. Aber die Erfahrungen, die in den neueren präparativen Untersuchungen an Hefesaccharase gewonnen wurden, erlauben die Anschauung, daß die Leistungsfähigkeit der Adsorptionsmethoden, so wie sie bis jetzt ausgebildet worden sind, in gewissem Sinne nur eine beschränkte ist und daß ihr Erfolg von einem gewissen enzymatischen Reinheitsgrad an durch die zunehmende Unbeständigkeit des Enzyms selbst kompensiert zu werden scheint. Es wird neuer Hilfsmittel bedürfen, um die Grenze, die den präparativen Fortschritten hier gesetzt ist, zu überschreiten.

Die bisher besprochenen Reinigungsverfahren wie die Methode der fraktionierten Fällung oder der Adsorption und Elution gelten ausschließlich für lösliche Enzyme. Die Reinigung unlöslicher Enzyme, für welche fettspaltendes Enzym aus Pflanzensamen, z. B. Ricinuslipase, als charakteristischer Vertreter anzusehen ist, erfordert dagegen eine wesentlich verschiedene präparative Methodik; sie muß sich nämlich darauf beschränken, die enzymatische Konzentration durch mechanische Anreicherung oder durch Weglösen von Begleitstoffen zu heben. Dafür stehen nur wenige Mittel zur Ver-

fügung, die so schonend sind, daß sich eine Zerstörung der enzymatischen Aktivität vermeiden läßt.

Für die Darstellung der Ricinuslipase, die hier als Beispiel dienen soll, gesellen sich nach R. Willstätter und E. Waldschmidt-Leitz¹⁾ dazu einige besondere Umstände, die in einer auffällig stark ausgeprägten Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität vom Kolloidzustand begründet sind. Man findet das Enzym in fettfreier Form sehr unbeständig gegenüber der Einwirkung von Wasser oder Glycerin, die es bei Gegenwart von Öl ohne Aktivitätseinbuße verträgt. In öl- und wasserhaltigen Emulsionen andererseits zeigt es eine überaus große Empfindlichkeit hinsichtlich der Überführung in trockene und fettfreie Form. Um die enzymatische Substanz unter Erhaltung ihrer lipatischen Wirkung der Einwirkung wässriger Reagenzien zugänglich zu machen, ist daher nur ein Verfahren anwendbar, das die Lipase bei allen Reinigungsvornahmen im Kontakt mit Öl beläßt. Ein solches Verfahren ist im Prinzip zuerst von E. Hoyer²⁾ befolgt worden; es beruht auf der Abtrennung des Enzyms aus der wässrigen Emulsion des ölhaltigen Samens in Form einer fett- und wasserhaltigen Sahne, wie sie beispielsweise in der Zentrifuge erfolgt. Es ist gelungen, aus solchen „Enzymsahnen“ unter der Einwirkung verdünnter wässriger Reagenzien, so von Alkali-, Säure- oder Salzlösungen, Enzympräparate von erheblich gesteigertem Reinheitsgrad zu erhalten. Zwar stehen der Gewinnung lipatisch aktiver Trockenpräparate aus diesen Sahnen, deren Abtrennung nach der Behandlung mit dem angewandten Reagens man mittels der Zentrifuge bewirkt, gewisse Schwierigkeiten entgegen, die sich aus der Empfindlichkeit des Enzyms gegenüber Trocknungsoperationen ergeben; sie werden indessen überwunden durch Anwendung besonders schonender Trocknungsverfahren, sei es mit Hilfe von Dispersoiden von großer spezifischer Oberfläche, sei es durch eine ganz allmähliche Entziehung des Wasser- und Ölgehaltes, z. B. durch gelinde Trocknung in einem mäßig warmen Luftstrom und durch die langsame Verdünnung der verbleibenden ölhaltigen Enzymsuspension in einer Atmosphäre von Äther. Es ist auf diesem Wege gelungen, in den günstigsten Beispielen eine Steigerung der lipatischen Konzentration auf mehr als das 50fache von der des Samens zu erzielen; allein

¹⁾ H. 134, 161 (1923/24).

²⁾ H. 50, 414, und zwar S. 430 (1906/07).

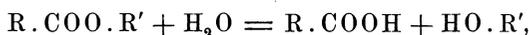
diese Reinigung, die als ganz unvollständig anzusehen ist und die eine völlige Abtrennung beispielsweise von proteinartiger Substanz nicht erlaubt hat, ist nur unter dem Gesichtspunkt zu werten, daß sie ein Beispiel für die präparative Methodik an unlöslichen Enzymen abgeben mag. Für die Zwecke der Reindarstellung enzymatischer Individuen und ihrer chemischen Kennzeichnung wird man sich vorerst auf wasserlösliche Stoffe zu beschränken und die präparativen Methoden hierfür zu verfeinern und zu erweitern haben.

Spezieller Teil.

Die Enzymliteratur hat im Laufe der letzten Jahrzehnte eine außerordentlich große Menge spezieller Angaben über die Wirkungen und über das Verhalten sowie über das Vorkommen enzymatischer Stoffe aufzuweisen. Es würde den Rahmen und die Aufgabe dieses Buches überschreiten, sollte darin eine vollständige Aufzählung und Berücksichtigung aller Einzelangaben der Emzymforschung erbracht werden. Es werden sich daher die nachfolgenden Abschnitte, die der speziellen Behandlung der Vertreter aus den einzelnen Gruppen enzymatischer Stoffe gewidmet sind, nur mit der Beschreibung der wichtigsten und bestuntersuchten enzymatischen Katalysatoren befassen.

I. Esterasen.

Die allgemeine Wirkung der Esterasen ist gekennzeichnet durch die Spaltung bzw. Synthese von Carbonsäureestern nach der Gleichung



und zwar sowohl durch die Umsetzung der Ester einfacher wie auch der Ester mehrwertiger Alkohole, beispielsweise der Fettsäureglyceride. Man teilt die Esterasen am zweckmäßigsten nach dem Vorschlag von W. Connstein¹⁾ nach ihrem Vorkommen in tierische und in pflanzliche Esterasen ein, während für eine allgemeine Unterscheidung zwischen Esterasen, welche vorzugsweise auf Ester niederer Fettsäuren, und Lipasen, welche hauptsächlich auf die Glycerinester höherer Fettsäuren eingestellt sein sollen, noch zu wenig Anhaltspunkte vorliegen.

¹⁾ Ergebn. d. Physiol. **3**, 194 (1904).

1. Tierische Esterasen.

a) Pankreaslipase.

Die Pankreaslipase, die von der Bauchspeicheldrüse zusammen mit anderen wichtigen Enzymen der tierischen Verdauung in den Darm sezerniert wird, um hier die der Resorption vorausgehende Verseifung der mit der Nahrung aufgenommenen Fette zu bewirken, hat als eine echte Lipase zu gelten, spezifisch für den Umsatz von Glycerinestern, während ihre Wirkung auf die Ester einfacher Alkohole dagegen zurücktritt. Für ihren Nachweis und ihre Messung sind zahlreiche Methoden veröffentlicht worden, die zum Teil auf der maßanalytischen Bestimmung der bei der Spaltung gebildeten Fettsäure, zum Teil auf der Verfolgung der bei der Verseifung von Glycerinestern niederer Fettsäuren eintretenden Änderung der Oberflächenspannung beruhen. Während man in dessen in der älteren Literatur die Umsetzung der Glyceride durch das Enzym, so wie es sich zufällig fand, messend verfolgte, haben R. Willstätter, E. Waldschmidt-Leitz und Fr. Memmen¹⁾ in einer eingehenden Untersuchung die Notwendigkeit erkannt und berücksichtigt, die Lipase unter Aktivierung oder unter Hemmung in ein geeignetes System zu bringen, um die Unterschiede im Wirkungsvermögen auszugleichen, die durch die Natur und die Menge zufällig vorhandener Begleitstoffe bedingt werden. Es hat sich nämlich ergeben, daß die Wirkung der Pankreaslipase, beispielsweise gegenüber echten Fetten, durch Begleitstoffe wie durch Reaktionsprodukte in hohem Maße beeinflußt wird, während die Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration für die Aktivität des Enzyms weniger hervortritt. Die Wirkung der Begleit- und Zusatzstoffe und der Reaktionsprodukte ändert sich mit der Reaktion; so wirken Calciumsalze, gallensaure Salze oder Eiweißstoffe aktivierend in alkalischem Medium und sie erweisen sich als indifferent oder sogar hemmend im sauren Gebiet. Die beobachteten Aktivierungen sind auf eine Verbesserung der Adsorptionsverhältnisse, die Hemmungen auf Störungen derselben zurückzuführen; denn für die Wirkung des wasserlöslichen Enzyms ist die Beförderung seines Kontaktes mit dem unlöslichen Substrat, wie sie durch die Bildung „komplexer Adsorbate“ bei der Aktivierung in alkalischem Milieu erfolgt, und ebenso die Störung seiner Asso-

¹⁾ H. 125, 93 (1922/23).

ziation mit dem Öl, auf welcher die bei saurer Reaktion beobachteten Hemmungserscheinungen beruhen, entscheidend. Für eine Methode, die die Menge des Enzyms und seine Ausbeute von der Drüse bis zum reinen Präparat verfolgen soll, ist daher die Ausschaltung des Zufälligen im lipatischen System erforderlich, soweit es auf den Grad der Wirkung Einfluß ausübt; sie wird erreicht durch das Verfahren der ausgleichenden Aktivierung oder Hemmung. Dieser Gedanke hat seinen Niederschlag gefunden in der Ausarbeitung von vier besonderen Bestimmungsweisen des lipatischen Enzyms, die sich im Gange seiner präparativen Reinigung bewährt haben:

1. Der alkalimetrischen Bestimmung der lipatischen Wirkung im System von Aktivatoren bei wechselndem p_H , nämlich der Spaltung von Olivenöl unter Aktivierung mit Calciumchlorid und Albumin bei einem anfänglichen p_H von 8,9.

2. Der alkalimetrischen Bestimmung in alkalischem Milieu bei dem konstanten $p_H = 8,9$, für welche gleichfalls Olivenöl als Substrat sowie Calciumchlorid und Albumin zur ausgleichenden Aktivierung dienen.

3. Der alkalimetrischen Bestimmung unter Hemmung in saurem Medium, nämlich der Ölsplaltung bei konstant saurer Reaktion ($p_H = 4,7$) unter Hemmung durch Albumin.

4. Der stalagmometrischen Bestimmung der Tributyrinhydrolyse nach P. Rona und L. Michaelis¹⁾, beruhend auf der Messung der Oberflächenspannungsänderung bei $p_H = 8,6$ und unter Aktivierung mit Calciumoleat und Albumin²⁾.

Von diesen Verfahren besitzt nur das zweite, bei dessen Ausführung es der Anwendung hoher Pufferkonzentrationen bedarf, den Nachteil, daß bei der Prüfung reinerer Enzympräparate schon während der Dauer der Bestimmung eine Zerstörung des Enzyms sich bemerkbar macht und die Genauigkeit der Messung beeinträchtigt. Da hinsichtlich des zeitlichen Verlaufs der Hydrolyse und der Proportionalität zwischen Reaktionsgeschwindigkeit und Enzymmenge unter den Bedingungen dieser Methoden keine Genauigkeit zu erwarten ist, so liegt den für Menge und Konzentration des Enzyms aufgestellten Maßen die Beziehung zwischen

¹⁾ Bio. Z. **31**, 345 (1911); P. Rona, ebenda **32**, 482 (1911); H. Davidsohn, ebenda **45**, 284 (1912); **49**, 249 (1913).

²⁾ R. Willstätter und Fr. Memmen, H. **129**, 1 (1923).

den Enzymmengen und den Spaltungsgraden zugrunde, die in bestimmten Zeiten erreicht werden.

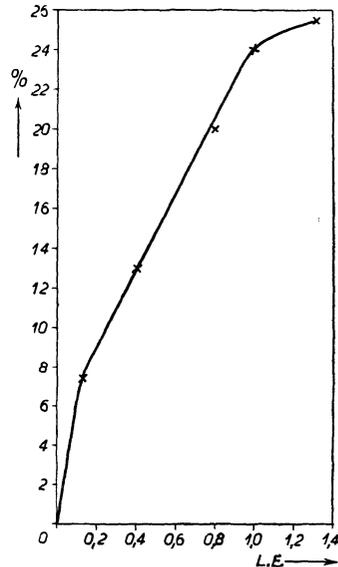
So wird als „Lipase-Einheit (L.-E.)“ diejenige Menge Lipase bezeichnet, die unter den Bedingungen der ersten Bestimmungsmethode (im Volumen von 13 ccm, enthaltend 2 ccm $n\text{NH}_3\text{—NH}_4\text{Cl}$ -Puffer von $p_{\text{H}} = 8,9$ und als Aktivatoren 10 mg CaCl_2 und 15 mg Albumin) bei 30° in einer Stunde 24 Proz. von 2,5 g Olivenöl (von der Verseifungszahl 185,5) spaltet; diese Enzymmenge ist z. B. in etwa 1 cg einer guten Probe getrockneter Pankreasdrüse enthalten. Aus der nachfolgenden Abb. 7, die der Untersuchung von Willstätter, Waldschmidt-Leitz und Memmen entnommen ist und die die Beziehungen zwischen Lipasemenge und Verseifungsgrad wiedergibt, ist ersichtlich, wie sich aus dem alkalimetrisch gemessenen Verseifungsgrad einer Analysenprobe, sofern er unter 24 Proz. beträgt, die in dieser enthaltene Enzymmenge in Enzymeinheiten ermitteln läßt.

Als Maß für den Reinheitsgrad der Lipase dient der „Lipase-Wert (L.-W.)“, der durch die Anzahl der Lipase-Einheiten in 1 cg des Präparats gegeben ist.

Ein anderes, davon unabhängiges Maß für die Lipasemenge, das auf der stalagmometrischen Verfolgung der Tributyrin-Hydrolyse nach der vierten Bestimmungsweise beruht, ist nach R. Willstätter und Fr. Memmen¹⁾ die „Butyrin-Einheit (B.-E.)“, nämlich

diejenige Enzymmenge, die unter den gegebenen Bedingungen (im Volumen von 60 ccm, enthaltend 56 ccm gesättigter Tributyrinlösung, 2 ccm $n\text{NH}_3\text{—NH}_4\text{Cl}$ -Puffer von $p_{\text{H}} = 8,6$ und als Aktivatoren 10 mg CaCl_2 , 10 mg Natriumoleat sowie 30 mg Albumin) bei 20° in 50 Minuten eine Abnahme der Tropfenzahl um 20, d. h.

Abb. 7.

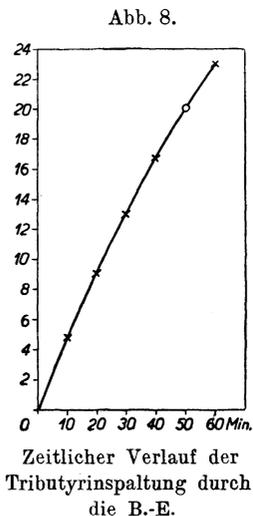


Lipasemenge und Verseifungsgrad.

¹⁾ a. a. O.

die Hälfte der Differenz zwischen den Tropfenzahlen von reiner Tributyrinlösung und von reinem Wasser, bewirkt.

Abb. 8 veranschaulicht den zeitlichen Verlauf der Tributyrinhydrolyse für die B.-E.; aus der für die Abnahme der Tropfenzahl um 20 bei einer untersuchten Analysenprobe erforderlichen Zeit t ergibt sich deren Gehalt an B.-E. zu $50/t$.



Die Beziehung der Einheit für die Tributyrinspaltung zur Einheit für die Ölspaltung, die bei einer untersuchten und verglichenen Probe von getrocknetem Schweinepankreas dem Verhältnis 1 B.-E. = 0,001 L.-E. entsprach, läßt sich indessen nicht verallgemeinern, sie ist abhängig von der Herkunft des Materials; man wird also zur Messung der Lipasemengen aus verschiedenem Ausgangsmaterial sich der nämlichen Bestimmungsweise bedienen müssen.

Die präparative Reinigung der Pankreaslipase ist von R. Willstätter und E. Waldschmidt-Leitz¹⁾ an einer Reihe von Beispielen durchgeführt worden. Als Ausgangsmaterial ist die getrocknete und entfettete Pankreasdrüse von Schweinen, deren Enzymgehalt am höchsten ist, angewandt worden, aus welcher sich die Lipase in guter Ausbeute durch Behandlung mit Wasser oder Glycerin in Lösung überführen läßt, während das Enzym durch diese Mittel der frischen Drüsensubstanz nur zum geringen Teil entzogen werden kann. Die Trocknung des in der Maschine zerkleinerten Drüsengewebes bewirkte man durch Anschütteln mit Aceton und Äther, sie verläuft ohne merkliche Schädigung des Enzyms; dagegen hat es sich gezeigt, daß das ältere, von H. Pottevin²⁾ zuerst angewandte Verfahren der Trocknung durch Alkohol und Äther mit sehr erheblichen Aktivitätseinbußen verbunden ist.

Zur Extraktion des Enzyms aus der getrockneten und gepulverten Drüsensubstanz hat sich vor allem die Anwendung von Glycerin als geeignet erwiesen, sie ist der Extraktion mit wässerigen Mitteln überlegen; der viel niedrigere Reinheitsgrad und die ge-

¹⁾ H. 125, 132 (1922/23).

²⁾ Bl. 35, 693 (1906).

ringe Beständigkeit des Enzyms machen nämlich die wässerigen Auszüge für die präparativen Zwecke unbrauchbar. Durch die Gegenwart von Glycerin wird die Lipase dagegen stabilisiert; so ist es auch für den Gang der präparativen Reinigung erforderlich, die Einhaltung einer gewissen Glycerinkonzentration zur Vermeidung enzymatischer Verluste zu beachten. In den Glycerinauszügen der Drüse, die man vom Ungelösten mittels der Zentrifuge oder durch Filtration abtrennt, ist die Lipase klar gelöst; die Angaben der älteren Forschung¹⁾, daß das Enzym in den Glycerinlösungen nur suspendiert, nicht gelöst enthalten sei, und daß es beispielsweise durch Verdünnen mit Wasser daraus niedergeschlagen werde, haben sich als irrig erwiesen; die erwähnten Beobachtungen sind auf Adsorption des Enzyms an suspendierte Fette in sehr unreinen Auszügen zurückzuführen. In den wässerigen und in den Glycerinauszügen der Drüse ist die Lipase begleitet von der ganzen Menge des stärke-spaltenden und von dem größten Teil des tryptischen Enzyms, von denen sie mit Hilfe von Fällungsmitteln wie Alkohol oder Aceton, deren Einwirkung die lipatische Aktivität zerstört, nicht abgetrennt werden kann. Die Gewinnung der Lipase in enzymatisch einheitlicher Form gelang erst durch die Anwendung von Adsorptionsmitteln auf Grund der spezifischen Adsorptionsaffinitäten der drei Enzyme. Das Adsorptionsverhalten der Lipase ist sehr unspezifisch, das Enzym wird von sauren wie von basischen Adsorbentien leicht aufgenommen; auch an amphotere Stoffe, beispielsweise an Proteine, vermag es sich anzulagern und wird auf diese Weise, wie aus seiner gesteigerten Aktivität hervorgeht, in ein die Ölspaltung begünstigendes Adsorptionssystem übergeführt. Auch findet man die Adsorption des Enzyms nur in geringem Maße oder gar nicht abhängig von der Gegenwart begleitender Stoffe, in den rohen wie in den reineren Lösungen zeigen sich in seinem qualitativen wie in seinem quantitativen Adsorptionsverhalten z. B. gegenüber Tonerde keine deutlichen Unterschiede.

Die sauren Eigenschaften der Lipase sind indessen stärker ausgeprägt als die von Amylase und Trypsin; so gelang ihre Isolierung aus dem Enzymgemisch durch die Adsorption an das basische Adsorbens Tonerde, vorzüglich bei saurer Reaktion; zwar bewirkte der Einfluß gewisser Begleitstoffe, daß in den aus den

¹⁾ Siehe dazu O. Rosenheim, *J. of Physiol.* **40**, XIV (1910); C. A. Pekelharing, *H.* **81**, 355 (1912); P. Rona und Z. Bien, *Bio. Z.* **64**, 13 (1914).

Tonerdeadsorbaten mit verdünntem Alkali oder mit alkalischem Phosphat gewonnenen Elutionen sich noch geringe Anteile der begleitenden Enzyme, die mitgeführt werden, wiederfanden; indessen genügte eine Wiederholung der Adsorptionsvornahme in der angesäuerten Elution, um ihre letzten Reste zurückzulassen. Allein der Reinheitsgrad der Lipase war in den neuen Elutionen noch nicht erheblich gestiegen, ihr Lipasewert erreichte nur etwa eine 30fache Zunahme. Nun führte die Adsorption an ein elektronegatives Adsorbens, an Kaolin, aus saurer Lösung zu einer weiteren beträchtlichen Steigerung der enzymatischen Konzentration, nämlich in den alkalischen Elutionen der Kaolinadsorbate auf das mehr als 200fache von der des Ausgangsmaterials. Noch schärfer auswählend wirken indifferente organische Adsorbentien wie Tristearin und Cholesterin, nach deren Weglösen, beispielsweise mit Benzol, das Enzym in der besten bisher gemessenen Konzentration erhalten worden ist, entsprechend dem Lipase-Wert 240. In der nachfolgenden Tabelle 24, die der Untersuchung von R. Willstätter und E. Waldschmidt-Leitz¹⁾ entnommen ist, ist eine Übersicht gegeben über die Reinheitsgrade auf den verschiedenen Stufen der präparativen Isolierung.

Tabelle 24.

Phasen der Isolierung und Reinheitsgrad der Pankreaslipase.
(Getrocknete Drüse: L.-W. = 0,81.)

Präparat	L.-W. durch Dialyse bestimmt	L.-W. durch Isolierung mit Stearin bestimmt
Glycerinauszug, geklärt.	3,2	—
Einmal mit Tonerde adsorbiert	9,0	72
Zweimal mit Tonerde adsorbiert	23,1	—
Einmal mit Tonerde u. Kaolin adsorbiert	25,8	119
Zweimal mit Tonerde und einmal mit Kaolin adsorbiert	207	240

Die Reinigung der Pankreaslipase ist nicht bis zur Konstanz des Lipase-Wertes durchgeführt worden; allein sie hat doch zu dem Ergebnis geführt, daß sich in reineren Präparaten keine Beimengungen von Vertretern aus bekannten Gruppen organischer Naturstoffe, von Proteinen und Kohlenhydraten, mehr nachweisen

¹⁾ H. 125, 132, und zwar S. 192 (1922/23).

lassen. Charakteristische chemische Reaktionen der enzymatischen Substanz wurden nicht beobachtet; der Stickstoffgehalt, der im Verlauf der Reinigung eine Abnahme aufwies, betrug im reinsten Präparat 10,5 Proz., während der gemessene Phosphorgehalt von 0,05 Proz. als zufällig und geringfügig zu gelten hat.

b) Magenlipase.

Die Beobachtungen über das Vorkommen eines fettspaltenden Enzyms im Magen sind alt; aber erst die Untersuchungen von F. Volhard¹⁾ und seinen Schülern haben die Frage nach seiner besonderen Existenz neben dem pankreatischen Enzym eingehender behandelt. Eine sichere Unterscheidung zwischen der gastrischen und der pankreatischen Lipase schienen indessen erst die Untersuchungen von H. Davidsohn²⁾ zu ermöglichen, die zu der Feststellung führten, daß das Enzym des menschlichen Magens im Gegensatz zu dem pankreatischen bei saurer Reaktion viel stärker wirkt als bei alkalischer und ein ziemlich breites Wirkungsoptimum zwischen p_H 4 und 5 besitzt. Allein die Unterscheidung der beiden Enzyme nach diesem Gesichtspunkt hat sich nicht als zuverlässig erwiesen. Aus den Untersuchungen R. Willstätters³⁾ und seiner Mitarbeiter, die die Magenlipase verschiedener Tiere und ihren Vergleich mit der Pankreaslipase betreffen, hat es sich ergeben, daß die p_H -Abhängigkeit des Magenenzym mit der untersuchten Tierart wechselt und daß sie durch begleitende Stoffe, die je nach der Reaktion zu hemmen und zu aktivieren vermögen, entstellt und vorgetäuscht wird; mit der Abtrennung dieser Begleitstoffe im Verlauf der präparativen Reinigung verschwinden die beobachteten Unterschiede; das gastrische Enzym nähert sich in seinem Verhalten gegenüber Aktivatoren wie in seiner Abhängigkeit vom p_H schrittweise der Pankreaslipase, der optimale Wirkungsbereich wandert beispielsweise bei der Lipase des Hundemagens vom sauren bis ins alkalische Gebiet. Für die Annahme einer Verschiedenheit von Magen- und Pankreaslipase ließ sich bei den untersuchten Tier-

¹⁾ Zs. f. klin. Med. **42**, 414; **43**, 397 (1901); W. Stade, Hofm. Beitr. **3**, 291 (1902); A. Zinsser, ebenda **7**, 31 (1905); A. Fromme, ebenda **7**, 57 (1905).

²⁾ Bio. Z. **45**, 284 (1912); **49**, 249 (1913).

³⁾ R. Willstätter und Fr. Memmen, H. **133**, 247 (1923/24); R. Willstätter, F. Haurowitz und Fr. Memmen, H. **140**, 203 (1924); F. Haurowitz und W. Petrou, H. **144**, 68 (1925).

arten auf Grund ihrer p_H -Abhängigkeit keine Stütze erbringen; nur die verschiedene stereochemische Spezifität der beiden Enzyme scheint, wie später dargelegt werden wird, zu ihrer Unterscheidung zu berechtigen.

Für die Messung der Magenlipase und für den Vergleich ihrer Mengen in verschiedenem Reinheitsgrad gilt noch nicht die nämliche Sicherheit, die bei der Bestimmung des pankreatischen Enzyms erreicht wurde. Das Enzym kommt in einem Komplex von wechselnder Zusammensetzung mit aktivierend und hemmend wirkenden Begleitstoffen vor, deren Wirkung ebenso wie die zusätzlicher Aktivatoren sich bei wechselndem p_H in ungleichem Maße äußert; es ist noch nicht gelungen, ihre Einflüsse auszugleichen. Daher entsprechen die von R. Willstätter, F. Haurowitz und Fr. Memmen¹⁾ angewandten Maße, die aus der stalagmometrischen Messung der Hydrolyse von Tributyrin abgeleitet wurden, nicht wirklichen, sondern nur scheinbaren Enzymmengen, die in B.(e) (= scheinbaren Butyrase-Einheiten) ausgedrückt werden.

Für die präparative Gewinnung des Enzyms hat die Schleimhaut des Hundemagens gedient, in welcher sich die Lipase im Vergleich zu den übrigen Teilen des Magens angereichert findet; ihre Extraktion bewirkte man mittels verdünnten Ammoniaks. Zu weiterer Reinigung diente ihre Ausfällung mit verdünnter Essigsäure sowie die Elektrodialyse der in Alkali gelösten Fällung, nach welcher das Enzym sich wiederum in dem entstandenen Niederschlage fand; endlich unterwarf man seine Lösung noch einer Vordesorption mit Kaolin, und zwar bei neutraler Reaktion, nach der sich für das in der Mutterlauge verbliebene Enzym noch eine charakteristische Steigerung der Reinheit ergab; sie drückte sich nicht so sehr in der Zunahme der analytisch meßbaren enzymatischen Konzentration, als vielmehr in der Abtrennung charakteristischer, die enzymatischen Eigenschaften entstellender Begleitstoffe aus.

In der folgenden Tabelle 25 werden die von Willstätter, Haurowitz und Memmen bei der präparativen Reinigung des Enzyms erzielten Ausbeuten mit der Steigerung des enzymatischen Reinheitsgrades verglichen; die bei der Messung in alkalischem Gebiet beobachteten scheinbaren Enzymzunahmen wie auch die Abnahmen der Enzymmengen bei saurer Reaktion sind mit einer

¹⁾ H. 140, 203, und zwar S. 207 (1923/24).

Abtrennung von alkalisch hemmenden, sauer aktivierenden Stoffen zu erklären, welche sich auch in der vergleichsweise angeführten Änderung der p_H -Abhängigkeit des Enzyms zu erkennen gibt.

Tabelle 25.

Reinheitsgrad und Ausbeute von Hundemagenlipase.

Präparat	Reinheitsgrad	Ausbeute	Reinheitsgrad	Ausbeute	Wirk. Opt. bei p_H	Wirk. Minimum bei p_H
	B.(w.)	Proz.	B.(w.)	Proz.		
	bei $p_H = 6,3$		bei $p_H = 8,6$			
Schleimhautauszug. . . .	3,9	(100)	0,4	(100)	5,5—6,3	8,6
Nach Fällung d. Essigsäure	10,9	95	2,4	200	5,5—6,3	8,6
Nach Elektrodialyse . . .	35,1	31	25,8	220	6,3—7,1	4,7
Nach Voradsorpt. m. Kaolin	37	24	27	232	7,1—7,9	4,7

Ähnliche Veränderungen der p_H -Abhängigkeit haben F. Haurowitz und W. Petrou¹⁾ auch bei der Reinigung menschlicher Magenlipase beobachtet.

c) Leberesterase.

Von den Esterasen der tierischen Gewebe ist die der Leber am eingehendsten untersucht. Ihre ausgesprochene Affinität zu Estern einfacher Alkohole hat vor allem zu kinetischen Messungen Veranlassung gegeben. Während die älteren Untersuchungen von J. H. Kastle und A. S. Loevenhart²⁾ für den Reaktionsverlauf der Äthylbutyrat- und Äthylacetathydrolyse durch das Enzym keine einfachen Gesetzmäßigkeiten erkennen ließen, fand E. Knaffl-Lenz³⁾ die Kinetik der Esterhydrolyse bei konstant gehaltener Acidität entsprechend einer Reaktion nullter Ordnung, also direkte Proportionalität zwischen Umsatz und Zeit; die in älteren Arbeiten beobachteten Abweichungen von dieser Beziehung werden neben der Inkonstanz des p_H auf die stark hemmende Wirkung der entstehenden Buttersäure zurückgeführt. Die Dissoziationskonstante

¹⁾ H. **144**, 68 (1925).

²⁾ Am. **24**, 491 (1900); s. auch J. H. Kastle, M. E. Johnston und E. Elvove, Am. **31**, 521 (1904) und dazu R. O. Herzog in C. Oppenheimer, Die Fermente und ihre Wirkungen, 4. Aufl., S. 1021ff. (1913).

³⁾ Medd. K. Vetenskapsakad. Nobelinst. **6**, 1—18, Nr. 2 (1922); Arch. exp. Pathol. u. Pharmakol. **97**, 242 (1923).

der Esterase-Esterverbindung ist zufolge G. Peirce¹⁾ nur gering, die Affinität des Enzyms zu seinem Substrat also sehr groß, man findet die Leistung des Enzyms verhältnismäßig unabhängig von der Konzentration des Substrats. Demgegenüber haben R. Willstätter und Fr. Memmen²⁾ darauf hingewiesen, daß man für pankreatische Lipase eine viel geringere Affinität zu einfachen Estern beobachtet und daß hier selbst in gesättigter Lösung des Esters noch nicht alles Enzym an das Substrat gebunden zu sein scheint; diesem Unterschied in der Abhängigkeit von der Substratkonzentration bei beiden Enzymen entspricht eine Verschiedenheit des Reaktionsverlaufs, der für Pankreaslipase keine Proportionalität zwischen Zeit und Umsatz ergibt, vielmehr bei annähernder Proportionalität zwischen absoluter Spaltung und Substratkonzentration einer Gleichung erster Ordnung entsprechen dürfte. Der optimale Wirkungsbereich des Enzyms liegt nach Knaffl-Lenz zwischen p_H 7,8 und 8,8, also bei schwach alkalischer Reaktion.

Die präparative Reinigung des Leberenzym ist in den älteren Untersuchungen nicht weit geführt worden; man hat sich zumeist darauf beschränkt, Auszüge aus rohem Leberbrei der Dialyse oder auch einer fraktionierten Aussalzung zu unterwerfen; die erhaltenen Präparate sind in bezug auf enzymatische Ausbeute und Konzentration nur ungenügend gekennzeichnet worden. Auch die neuere Untersuchung von Willstätter und Memmen führt nur einige Beispiele für die Gewinnung wirksamer Enzymlösungen und für ihre Konzentrationssteigerung an. Es hat sich dabei ergeben, daß die Leberesterase von der Pankreaslipase nicht nur in ihrer Spezifität, sondern auch in ihrer Haltbarkeit und in ihrer Abhängigkeit von Aktivatoren und Hemmungskörpern zu unterscheiden ist. Das Leberenzym ist in diesen Lösungen viel beständiger als pankreatische Lipase, aber es ist noch ungewiß, ob diese Erscheinung durch eine Verschiedenheit der Enzymkomplexe oder aber durch einen ungleichen Reinheitsgrad bedingt wird; denn nicht die Stabilität eines Enzyms wird man als ein sicheres Merkmal desselben betrachten dürfen, sondern mehr seine Stabilisierbarkeit durch begleitende Stoffe. An diesem Stabilitätsunterschied zwischen Leber- und Pankreasenzym hat auch die bisher durchgeführte Reinigung nur wenig zu ändern vermocht. Dies gilt auch für die Erschei-

¹⁾ Am. Soc. **32**, 1517 (1910).

²⁾ H. **138**, 216, und zwar S. 234 (1924).

nungen der Aktivierung und Hemmung, die für die beiden Enzyme ein vollkommen verschiedenes Bild ergeben. Aktivatoren der Pankreaslipase, wie gallensaures Salz, Natriumoleat oder Calciumoleat, versagen beim Leberenzym, sie wirken hier sogar hemmend; diese Unterschiede, die auch bei der Reinigung des Enzyms bestehen bleiben, deuten gleich wie ihre verschiedene stereochemische Spezifität auf eine Verschiedenheit der enzymatischen Individuen selbst hin, deren Identität sich nur mit einer Hilfsvorstellung aufrechterhalten ließe.

Die Reinigung des Enzyms, dessen Menge man durch die stalagmometrische Verfolgung der Tributyrinhydrolyse maß, ist von Willstätter und Memmen durch Adsorption mit Tonerde und mit Kaolin und darauf folgende Elektrodialyse unternommen worden; als Ausgangsmaterial dienten alkalische Auszüge der mit Aceton und Äther getrockneten Lebersubstanz. Die Präparate erreichten in den besten Beispielen etwa die 50fache enzymatische Konzentration von der des Leberpulvers. Es ist indessen zu erwarten, daß sich an diesem Enzym, dessen Beständigkeit in dem erzielten Reinheitsgrade noch sehr günstig ist, durch auswählende Adsorption eine weitere erhebliche Steigerung seiner Konzentration durchführen läßt.

Zur Spezifität tierischer Esterasen.

Die Feststellung von A. S. Loevenhart¹⁾, wonach die esterspaltenden Enzyme von Pankreas und Leber auf Grund ihrer quantitativ abweichenden Spezifität für Substrate von verschiedener Konstitution als verschiedene enzymatische Individuen zu betrachten seien, hat in den Untersuchungen von R. Willstätter und Fr. Memmen²⁾ eine wertvolle Vertiefung erfahren. Es hat sich ergeben, daß unabhängig vom enzymatischen Reinheitsgrad die Pankreaslipase für die Spaltung hoher Glyceride, z. B. der natürlichen Fette, ein sehr wirksames Enzym darstellt, während das Leberenzym, das man dafür sehr ungeeignet findet, sich für die Hydrolyse von Estern einwertiger Alkohole, wie Buttersäureester, als besonders tauglich erweist. „Man kann das Pankreasenzym als eine Lipase bezeichnen, die befähigt ist, auch einfache Ester gut zu hydrolysieren, und das Leberenzym als eine Esterase, die nur

¹⁾ Jl. Biol. Chem. **2**, 427 (1906/07)

²⁾ H. **138**, 216 (1924).

in geringem Maße befähigt ist Fett zu spalten.“ Diese Spezifitätsunterschiede, die sich unter der Annahme der Identität beider Enzyme nicht ungezwungen erklären lassen, sind sehr groß; von einer Probe getrockneter Schweineleber hätte man nämlich, um die gleiche Hydrolyse zu erzielen wie durch 1 cg getrockneter Pankreasdrüse, für die Ölsplattung zwar 106 g, aber für die Spaltung des Tributyrins nur 1 g und für die von Methylbutyrat nur 4 mg anzuwenden. Sodann hat es sich gezeigt, daß die Magenlipase nicht nur in bezug auf ihre physiologische Aufgabe, sondern auch in ihrer Konstitutionsspezifität der Pankreaslipase nahesteht, wenn auch ihr Vorkommen weit geringfügiger gefunden wird; „sie ist eine eigentliche Lipase“¹⁾.

Die stereochemische Spezifität, die als ein Sonderfall der allgemeinen strukturellen Spezifität anzusehen ist, ist für ein esterspaltendes Enzym, die Leberesterase, zuerst von H. D. Dakin²⁾ an racemischen Estern der Mandelsäuregruppe beobachtet worden; O. Warburg³⁾ sowie E. Abderhalden⁴⁾ haben diese Erscheinung sodann für präparative Zwecke am Beispiel racemischer Aminosäureester nutzbar zu machen versucht. Die konfiguratив spezifische Einstellung ist bei den Esterasen im allgemeinen weniger streng als beispielsweise bei glucosidspaltenden Enzymen, gewöhnlich werden nämlich die beiden Antipoden, nur mit verschiedener Geschwindigkeit, hydrolysiert. Aus den Untersuchungen R. Willstätters⁵⁾ und seiner Mitarbeiter, die dem Vergleich der stereochemischen Spezifität der drei wichtigsten tierischen Esterasen, aus Pankreas, Leber und Magen, gelten, hat sich nun die Feststellung ergeben, daß in der konfigurativen Eigenart keines der drei Enzyme mit den anderen identisch gefunden wird; man beobachtet zwar Fälle, in denen zwei der untersuchten Enzyme, beispielsweise Pankreaslipase und Leberesterase, die nämliche aktive Komponente vorziehen, in anderen Fällen dagegen werden die Komponenten von entgegengesetztem Drehungssinn von den beiden Enzymen mit größerer Geschwindigkeit verseift. Wenn, was noch nicht sicher zu be-

¹⁾ R. Willstätter, F. Haurowitz und Fr. Memmen, H. **140**, 203, und zwar S. 206 (1924).

²⁾ J. of Physiol. **30**, 253 (1903/04); **32**, 199 (1905).

³⁾ B. **38**, 187 (1905); H. **48**, 205 (1906).

⁴⁾ E. Abderhalden, H. Sickel und H. Ueda, Fermentforschung **7**, 91 (1923).

⁵⁾ A. a. O.

urteilen ist, die stereochemische Spezifität gegenüber asymmetrischen Substraten als eine Eigenschaft der Enzyme selbst zu gelten hat, die sich unabhängig von der Art der gerade vorliegenden physiologischen Enzymkomplexe äußert, so geht aus diesen Beobachtungen hervor, daß die drei untersuchten Esterasen, Pankreaslipase, Magenlipase und Leberesterase, als verschiedene Enzyme anzusehen sind.

Tabelle 26 veranschaulicht die verschiedene sterische Einstellung der drei Esterasen zusammen mit der des esterspaltenden Enzyms aus *Aspergillus oryzae*¹⁾ an charakteristischen Beispielen; ihre Angaben beziehen sich auf den Drehungssinn der rascher verarbeiteten Komponente.

Tabelle 26.
Optische Spezifität tierischer Esterasen.

Racemisches Substrat	Enzym aus			
	Pankreas	Magen	Leber	<i>Aspergillus oryzae</i>
Mandelsäure-äthylester	—	+	+	+
Phenyl-chloressigsäure-methylester	—	+	—	—
Phenyl-methoxy-essigsäure-methylester	—		+	+
Tropasäure-methylester	+	+	—	—

Für die Prüfung der Identität bzw. der Verschiedenheit esterspaltender Enzyme sind von P. Rona²⁾ und seinen Mitarbeitern auch die spezifischen Einflüsse gewisser Alkaloide und anderer Gifte herangezogen worden. Ihre Schlußfolgerungen beruhen auf der Annahme, daß die Giftempfindlichkeit der Enzyme nicht durch ihre jeweiligen Begleitstoffe, ihr Reaktionssystem, sondern nur durch ihre eigene chemische und physikalische Konstitution bedingt sei; sie war nämlich auch nach einer wenn auch nicht weit gehenden Reinigung erhalten geblieben. R. Willstätter und Fr. Memmen³⁾ haben indessen darauf hingewiesen, daß den begleitenden Fremdstoffen ein großer Einfluß auf die Wirkung der Gifte

¹⁾ Siehe dazu R. Willstätter und H. Kumagawa, H. **146**, 151 (1925).

²⁾ Bio. Z. **111**, 166 (1920); **118**, 213; **130**, 225 (1921); **134**, 108, 118 (1922); **146**, 28 (1924).

³⁾ H. **138**, 216, und zwar S. 241 (1924).

zukommen kann; eine Lösung der Pankreaslipase, die gegen Chinin unempfindlich war, wurde durch das Alkaloid nach einem Zusatz von Eieralbumin sehr stark gehemmt, auch schwankte die Giftwirkung des Alkaloids von Präparat zu Präparat. Für eine Unterscheidung verschiedener enzymatischer Individuen wird man diese Vergiftungserscheinungen nicht mehr als charakteristisch genug ansehen dürfen.

2. Pflanzliche Esterasen.

a) Ricinuslipase.

Die Lipase der ölhaltigen Samen von *Ricinus communis*, ein typischer Vertreter der fettspaltenden Enzyme des Pflanzenreichs, ist zuerst von W. Sigmund¹⁾ und von J. R. Green²⁾ beschrieben worden; als wahres intrazelluläres Enzym ist diese Lipase ausgezeichnet vor allem durch ihre vollkommene Unlöslichkeit in wässrigen Mitteln, und sie unterscheidet sich dadurch von den meisten anderen esterspaltenden Enzymen der Tier- und Pflanzenwelt.

Nach H. E. Armstrong³⁾ besitzt die Ricinuslipase starke Aktivität nur gegenüber eigentlichen Fetten, während sie niedere Ester verhältnismäßig träge spaltet, sie ist also eine ausgesprochene Lipase. Daher gründen sich die zu ihrer Messung angewandten Verfahren überwiegend auf die Verseifung echter Fette. Die Lipase der ruhenden, ungekeimten Pflanzensamen, die in der Regel zur Untersuchung gedient hat, besitzt ein Wirkungsoptimum bei saurer Reaktion, nämlich zufolge D. E. Haley und J. F. Lyman⁴⁾ sowie R. Willstätter und E. Waldschmidt-Leitz⁵⁾ bei einer Wasserstoffzahl von 4,7 bis 5,0. Für ihre Wirkung gegenüber echten Fetten sind hinsichtlich des Reaktionsverlaufs wie hinsichtlich der Beziehungen zwischen Enzymmenge und Umsatz keine einfachen Gesetzmäßigkeiten zu erwarten; sie sind auch nicht beobachtet worden. Auch wird ihre Leistung, wie es den besonderen physiologischen Reaktionsbedingungen des Enzyms entspricht, durch Aktivatoren nicht beeinflusst. Die von Willstätter und Waldschmidt-Leitz für die Messung des Enzyms und für die Kontrolle

¹⁾ Monatshefte f. Chemie **11**, 272 (1890).

²⁾ Proc. Roy. Soc. B. **48**, 370 (1890).

³⁾ Ebenda **76**, 606 (1905); **78**, 376 (1906).

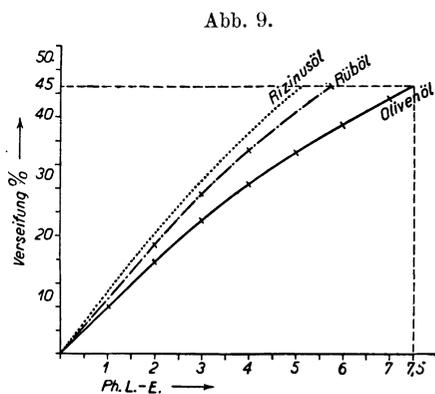
⁴⁾ Am. Soc. **43**, 2664 (1921).

⁵⁾ H. **134**, 161 (1923/24).

seiner präparativen Isolierung vorgeschlagenen Maße, die sich bewährt haben, beruhen daher auf den empirisch ermittelten Beziehungen zwischen den Mengen des Enzyms und der für eine Reihe von Ölen nach einer bestimmten Versuchsdauer beobachteten Verseifung, welche man durch die alkalimetrische Bestimmung der gebildeten Fettsäure ermittelt; sie sind in der nachfolgenden Abb. 9 wiedergegeben.

Als Maß für die Ricinuslipase ist die „Phytolipase-Einheit (Ph. L.-E.)“ gewählt, nämlich diejenige Enzymmenge, welche unter den Bedingungen der Bestimmung bei 20° und $p_{\text{H}} = 4,7$ 2,5 g Olivenöl (V.-Z. = 185,5) in 20 Minuten zu 7,5 Proz. spaltet. Der „Phytolipase-Wert (Ph. L.-W.)“ bezeichnet dann die enzymatische Konzentration, nämlich die Anzahl Ph. L.-E. in 1 cg der Präparate.

Die präparative Reinigung des Enzyms, für die sich in der Literatur einige Beispiele finden, wird in hohem Maße erschwert durch seine Unlöslichkeit und durch seine große Empfindlichkeit gegenüber kolloiden Zustandsänderungen, die auf seine Verkettung mit einem unlöslichen, wahrscheinlich der Proteingruppe angehörenden kolloiden Träger zurückzuführen sind. Nicht nur, daß die Lipase sich als völlig unlöslich in wässrigen oder organischen Mitteln erwiesen hat, ihre Aktivität wird in trockener, fettfreier Form unter der Einwirkung von wässrigen und von vielen organischen Solvenzien, beispielsweise von Glycerin oder von Glykol, fast gänzlich zerstört; andererseits besitzt das Enzym in öl- und wasserhaltigen Emulsionen eine überaus große Empfindlichkeit bei der Überführung in trockene und fettfreie Form. So gibt es nur wenige Verfahren, die so schonend sind, daß sie zu einer Anreicherung der enzymatischen Substanz aus dem Samenmaterial geführt haben. Dahin gehören beispielsweise die Methoden der Fraktionierung des mit Öl bzw. mit Öllösungsmitteln aufgeschlämmten fetthaltigen Samens nach



Lipasemenge und Verseifungsgrad.

dem spezifischen Gewicht, die von M. Nielloux¹⁾ und von E. Hoyer²⁾ empfohlen worden sind; bei der Entfettung der erhaltenen enzymreicheren Fraktion mit organischen Solvenzien treten indessen, wie auch bei der Entölung der Samenmasse selbst, beträchtliche Verluste an enzymatischer Wirkung ein, und die weitere Reinigung des Enzyms von dieser Stufe aus scheidet an seiner Empfindlichkeit gegenüber der Einwirkung wässriger Agenzien. Um die enzymatische Substanz dem Einfluß solcher Mittel unter Erhaltung des spezifischen Wirkungsvermögens zugänglich zu machen, hat man ein Verfahren zu wählen, das die Lipase bei allen Reinigungsvornahmen in Berührung mit Fett beläßt. Ein derartiges Verfahren befolgten R. Willstätter und E. Waldschmidt-Leitz³⁾ mit der Überführung des Enzyms in Form einer fett- und wasserhaltigen Sahne, deren im Prinzip bereits von E. Hoyer⁴⁾ angegebene Bereitung auf der Separation einer wässrigen Emulsion der ölhaltigen Samen beruht; infolge ihrer Affinität zu dem Öl des Samens findet sich die Lipase mit diesem in der kompakten, mittels der Zentrifuge abgeschleuderten sahnartigen Oberschicht angereichert. Unterwirft man das Enzym in dieser Form der Einwirkung verdünnter wässriger Reagenzien zur Abtrennung von enzymatisch Unwirksamem, so mittels Alkali-, Säure- oder Salzlösungen, so erhält man Präparate von erheblich gesteigertem Reinheitsgrad; aber auch hier ist der ausgedehnten Anwendung solcher Mittel in der Unbeständigkeit des Enzyms eine Grenze gesetzt. Der Erfolg der Reinigungsvornahmen, soweit er in der analytisch gemessenen enzymatischen Konzentration der Trockenpräparate des Enzyms seinen Ausdruck findet, wird zudem herabgesetzt durch die bei der Trocknung und Entfettung der Sahne eintretenden Verluste an Aktivität; es ist nur durch die Anwendung schonendster Mittel möglich gewesen, die hierbei beobachteten Aktivitätseinbußen auf ein erträgliches Maß zu beschränken. So war es dafür erforderlich, die enzymhaltige Sahne zunächst in mäßig warmem Luftstrom weitgehend zu entwässern und aus der verbliebenen öligen Suspension die aktive Trockensubstanz durch ganz allmähliche Verdünnung mit Öllösungsmitteln in fettfreie Form überzuführen. Die günstigste erreichte enzymatische Konzen-

1) Contribution à l'étude de la saponification des corps gras, Paris 1906; s. a. Y. W. Yalander, Bio. Z. **36**, 435 (1911).

2) H. **50**, 414, und zwar S. 423 (1906/07).

3) a. a. O., und zwar S. 186.

4) H. **50**, 414, und zwar S. 430 (1906/07).

tration war etwa die 100fache (Ph. L.-W. = 5,23) von der des rohen Ausgangsmaterials (Ph. L.-W. = 0,054); aber es war auch bei weitergehender Einwirkung der angewandten Reagenzien nicht gelungen, das Enzym frei von Proteinsubstanz zu erhalten.

Für pankreatische Lipase, die man von Einweißkörpern völlig befreien kann, findet man deren Gegenwart unter den natürlichen Wirkungsbedingungen des Enzyms für seine Leistung von großer Bedeutung; sie vermitteln den Kontakt zwischen Enzym und Substrat mit der Bildung „komplexer Adsorbate“. Die pflanzliche Lipase scheint schon im Cytoplasma der Zelle zusammen mit ihrem Substrat an einen unlöslichen, proteinartigen Träger verankert zu sein; allein um sie hier zur Wirkung zu bringen, bedarf es einer besonderen Veränderung des Enzymkomplexes.

Diese Veränderung des Enzyms tritt bei der Keimung der Samen ein; es gelingt, sie auch künstlich durch die Einwirkung einer tierischen Protease, des Pepsins, hervorzurufen. Das ursprünglich in den Samen vorhandene Enzym, das gekennzeichnet ist durch ein Wirkungsoptimum bei einer Wasserstoffzahl von 4,7 bis 5,0 und durch seine Unwirksamkeit bei neutraler Reaktion, nimmt im Verlauf der Keimung oder der Pepsineinwirkung mehr und mehr ab, und es erlangt dann der Samen in zunehmendem Maße die Fähigkeit, Fette bei neutraler, auch bei schwach alkalischer Reaktion zu verseifen. Die beobachtete Veränderung der enzymatischen Eigenschaften ist zurückzuführen auf einen hydrolytischen Abbau der Proteinkomponente des Enzyms, sei es unter der Wirkung der Samenprotease, sei es unter der Wirkung des Pepsins. Die in der älteren Literatur vorherrschende Ansicht¹⁾, wonach die Entstehung von Säure, bei der Keimung die Bildung einer besonderen Samensäure²⁾, zur Auslösung der lipatischen Funktionen erforderlich sei, hat sich nicht bestätigt³⁾; die Einwirkung von Säure auf das Enzym des ungekeimten Samens führt rasch zur Bildung eines Additionsproduktes von Lipase und Säure, zwar gleichfalls befähigt, Fette bei neutraler Reaktion zu zerlegen, aber in seinen Eigenschaften und in seinem Wirkungsvermögen unterschieden von dem bei dem proteolytischen Abbau gebildeten Produkte.

¹⁾ Vgl. W. Connstein, E. Hoyer und H. Wartenberg, B. **35**, 3988, und zwar S. 4004 (1902).

²⁾ Vgl. E. Hoyer, B. **37**, 1436, und zwar S. 1447 (1904).

³⁾ Siehe dazu R. Willstätter und E. Waldschmidt-Leitz, a. a. O., und zwar S. 163 und S. 205 (1923/24).

Die Umwandlung der Lipase bei der Keimung ist dagegen gekennzeichnet durch einen allmählichen Verlauf; sie entspricht der allmählichen Mobilisierung des Reservefettes der Samen, welcher eine gewisse Hydrolyse der Samenproteine vorausgehen scheint; allein auch durch diese Umwandlung wird das Enzym nicht in lösliche Form übergeführt, auch erfährt seine Affinität zu niederen Glyceriden keine Verstärkung. Die neue Form des Enzyms, die „Blasto-Lipase“, unterscheidet sich indessen von der ursprünglichen, der „Spermato-Lipase“, in manchen anderen Beziehungen. So findet man ihre Empfindlichkeit gegenüber kolloiden Zustandsänderungen abgeschwächt, wohl infolge einer Verringerung des Molekularkomplexes; sodann werden ihre synthetisierenden Eigenschaften stärker ausgeprägt, sie äußern sich selbst noch in stark verdünntem Glycerin. Offenbar verfügt der Organismus der wachsenden Pflanze hier über eine besondere Regulierungsmöglichkeit für die Aufspaltung seines hochwertigen Reservefettes.

b) Chlorophyllase.

Die Chlorophyllase ist von R. Willstätter und A. Stoll¹⁾ in den grünen Blättern aller untersuchten Pflanzenklassen als ständiger Begleiter des Blattgrüns aufgefunden worden. Ihre Wirkung besteht in der Aufspaltung der Esterbindung eines der drei Carboxyle des Chlorophyllids mit dem hochmolekularen Alkohol Phytol, $C_{30}H_{39}OH$, wie sie im natürlichen Chlorophyll vorliegt. Diese Reaktion tritt z. B. bei der Einwirkung des als Enzymmaterial verwendeten, mit Alkohol von Chlorophyll erschöpfend befreiten Blattmehls auf das Chlorophyll in wässrig-acetoniger Lösung ein, während bei Gegenwart von Alkohol, Äthyl- oder Methylalkohol, nicht die Bildung freier Säure, sondern eine gleichzeitige Umesterung unter Ersatz des Phytols durch Äthyl- bzw. Methylalkohol beobachtet wird: es entsteht im Falle des Äthylalkohols das sogenannte kristallisierte Chlorophyll oder Äthyl-Chlorophyllid.

Die Wirkung der Chlorophyllase ist streng spezifisch auf das Chlorophyll selbst und auf seine nächsten Abkömmlinge wie seine magnesiumfreie Grundsubstanz, das Phäophytin, beschränkt; auf Fette oder Wachse wirkt das Enzym nicht ein. Der Reaktionsverlauf der Chlorophyllspaltung scheint einer Gleichung erster Ordnung zu gehorchen, soweit es bei den für die Messung der

¹⁾ A. 378, 18 (1910); 380, 148 (1911).

Reaktionsgeschwindigkeit hier besonders ungünstigen Bedingungen zu erwarten ist, die durch die Beschaffenheit des stark verdünnten Enzyms wie durch die komplizierte und größtenteils unbekannte Zusammensetzung des als Substrat dienenden Blätterauszugs gegeben sind. Der Verlauf der Hydrolyse des Chlorophylls wird mit einer einfachen kolorimetrischen Methode bestimmt, die auf der Säurenatur der gebildeten freien Chlorophyllide beruht: sie werden nämlich dem in Äther übergeführten Reaktionsgemisch mit Alkali entzogen. Für die Verfolgung der Alkoholyse des Blattfarbstoffs andererseits, des Austausches von Phytol gegen Alkohol, dienen zwei besondere analytische Verfahren, die auf der Bestimmung des nach der Enzymwirkung verbliebenen Phytolgehaltes beruhen, und zwar durch vollständige Verseifung und Wägung des isolierten Alkohols bzw. auf der Ermittlung der „Jodsilberzahl“, nämlich der Menge Jodsilbers, das nach der Abspaltung von Methoxyl und Äthoxyl durch Jodwasserstoffsäure erhalten wird. Auch die Umkehrung des hydrolytischen Prozesses, die Veresterung der freien Carbonsäure Chlorophyllid mit Phytol, ist unter der Wirkung der Chlorophyllase beobachtet worden.

c) Tannase.

Die Tannase, deren spaltende Wirkung gegenüber Tannin in Schimmelpilzen schon von Scheele beobachtet wurde, ist als eine spezifische Esterase zu betrachten, die mit einer besonderen Affinität zu den Estern von Phenolcarbonsäuren ausgestattet ist, welche in der Form der Depsidbindung nach E. Fischer einen charakteristischen strukturellen Typ der natürlichen Gerbstoffe darstellen. Solche Depside bilden ja eine Verkettung mehrerer Phenolcarbonsäuren, bei welcher die Carboxylgruppe der einen esterartig mit der phenolischen Hydroxylgruppe einer anderen verknüpft ist. So hat die Tannase, die, zuerst von A. Fernbach¹⁾ und von H. Pottevin²⁾ aus dem Schimmelpilz *aspergillus niger* isoliert, die Hydrolyse solcher depsidischer Bindungen bewirkt, in den Untersuchungen von K. Freudenberg³⁾ zur konstitutionellen Aufklärung natürlicher Gerbstoffe wertvolle Dienste geleistet. Es ist indessen noch nicht

¹⁾ C. R. **131**, 1214 (1900).

²⁾ C. R. **131**, 1215 (1900); **132**, 704 (1901).

³⁾ B. **52**, 177 (1919); **53**, 232, 953, 1728 (1920); **54**, 1698 (1921); **55**, 2420 (1922).

untersucht, ob das durch Alkoholfällung aus dem Autolysensaft des Pilzes gewonnene Enzym als esteratisch einheitlich anzusehen ist oder ob es sich mit anderen esterspaltenden Enzymen vergesellschaftet findet. So erlauben die Angaben der Literatur auch keine sichere Beurteilung der Frage, ob der Pilz stets mehrere Esterasen ausbildet oder ob er nur bei der Züchtung auf besonderer, gerbstoffreicher Nahrung, so wie man ihn an Tannase anreichert, eine spezifische Einstellung seiner Esterase vornimmt, ähnlich, wie es für die Gewöhnung der Hefe an die Vergärung von Galaktose festgestellt wurde.

Eingehender ist die Tannase von K. Freudenberg und E. Vollbrecht¹⁾ untersucht worden, die das Enzym aus dem auf Myrobalanen gezüchteten und unter ständigem Neutralisieren autolysierten Pilz durch Fällung mit Alkohol gewannen. Das für diese Untersuchungen angewandte einfache Substrat, Gallussäure-methylester, dürfte für reaktionskinetische Messungen geeignet sein; allein die unter der Wirkung des Enzyms eintretende starke Aziditätsänderung durch die Bildung freier Gallussäure, die nicht ausgeschaltet wurde, hat in der Untersuchung von Freudenberg und Vollbrecht die sichere Erkenntnis des Reaktionsverlaufs, der monomolekular sein sollte, verschleiert; auch ist aus diesem Grunde die p_H -Abhängigkeit der Tannasewirkung noch nicht erkannt. Die Messung der enzymatischen Aktivität, die durch den „Spaltwert“ ausgedrückt wird, beruht auf den empirisch ermittelten Beziehungen zwischen Enzymmenge und Umsatz.

d) Phosphatase, Sulfatase.

Enzyme, die die Spaltung organischer Phosphorsäureester bewirken, z. B. der Phosphorsäureester des Glycerins oder von Zuckern, sind im Tier- und Pflanzenreich verbreitet; ihre besondere Existenz und ihre Unterscheidung von den gewöhnlichen Esterasen tierischer Gewebe oder pflanzlicher Zellen ist indessen noch nicht als gesichert zu betrachten. Diesen Nachweis wird man nur von ihrer präparativen Isolierung erwarten können, die bisher nicht durchgeführt, nicht einmal angestrebt worden ist. Es ist nicht gerade wahrscheinlich, daß der tierische Organismus oder einzellige Organismen wie die Hefe für die Hydrolyse der Phosphorsäureester des Glycerins sowie der verschiedenen Hexosen jeweils verschiedene

¹⁾ H. 116, 277 (1921).

Enzyme ausbilden werden; wenn sich daher in der Literatur zahlreiche Beobachtungen über die Spaltung solcher Ester, beispielsweise durch Hefe oder durch tierische Organe finden, so wird man sie nicht in allen Fällen auf verschiedene enzymatische Individuen beziehen dürfen. Dahin gehören die Angaben über die Hydrolyse der Glycerinphosphorsäure durch Hefe¹⁾ wie durch ein Enzym der Darmschleimhaut²⁾, sowie die wichtigen Beobachtungen von A. Harden und W. J. Young³⁾ sowie G. Embden⁴⁾ über Synthese und Spaltung der Fruktosediphosphorsäure, des Laktacidogens, welchem als Zwischenprodukt bei der alkoholischen Gärung wie beim Kohlehydratumsatz im arbeitenden Muskel eine bedeutsame Rolle zukommt. Die Unterscheidung einer besonderen Hexosephosphatase⁵⁾ von dem hydrolysierenden Enzym, sowie auch die Beschreibung einer spezifischen Sacharophosphatase⁶⁾ in der Hefe ist noch nicht sicher zu beurteilen.

Auch beim hydrolytischen Abbau der Nucleinsäuren sind Phosphatasen beteiligt, welche die Kohlehydrat-Phosphorsäurebindung in den Nucleotiden zu lösen vermögen; eine solche Wirkung, welche von A. P. Levene und F. Medigreceanu⁷⁾ besonderen Nucleotidasen zugeschrieben worden ist, beobachtet man in den Auszügen der verschiedensten tierischen Organe, vor allem der Darmschleimhaut.

Endlich zählen zu den Esterasen noch die von C. Neuberg⁸⁾ zuerst an ihrer Wirkung beschriebenen Sulfatasen, für welche die Spaltung der sogenannten Ätherschwefelsäuren, der Schwefelsäureester von Phenolen, charakteristisch ist, also von Produkten, die der tierische Organismus zur Entgiftung und Ausscheidung eingeführter Phenole aufbaut. Solche Enzyme finden sich in Schimmelpilzen wie *aspergillus oryzae*, und ihre Wirkung ist von Neuberg dann auch im Muskel sowie in der Niere nachgewiesen worden.

1) C. Neuberg und L. Karczag, *Bio. Z.* **36**, 60 (1911).

2) P. Grosser und J. Hussler, *Bio. Z.* **39**, 1 (1912).

3) *Proc. Roy. Soc. B.* **82**, 321 (1910).

4) Siehe dazu *H.* **93**, 1, 54, 124 (1914).

5) Siehe dazu H. v. Euler und S. Kullberg, *H.* **74**, 15; **76**, 468 (1911); H. v. Euler und Y. Funke, *H.* **77**, 488; **79**, 375 (1912); H. P. Barendrecht, *Bio. Z.* **118**, 245 (1921).

6) Siehe dazu K. Djenab und C. Neuberg, *Bio. Z.* **82**, 391 (1912).

7) *Jl. Biol. Chem.* **9**, 65, 389 (1911).

8) *Naturw.* **12**, 797 (1924).

II. Proteasen.

Unter dem Begriff der Proteasen werden alle diejenigen Enzyme zusammengefaßt, welche am Abbau der Proteine zu ihren einfachsten Bausteinen, den Aminosäuren, beteiligt sind. Es gibt indessen nur eine einzige Gruppe von Proteasen, die Peptidasen, deren Wirkungsweise genauer untersucht ist und deren Angriff sich auf Substrate bekannter Konstitution beziehen läßt, nämlich auf die zuerst von E. Fischer dargestellten Polypeptide; die Aufgabe dieser Enzyme besteht hier in der Sprengung der Säureamidbindung, der Bindung $-NH-CO-$, unter Bildung freier Amino- und Carboxylgruppen. Die eigentlichen Proteasen jedoch, die die Hydrolyse beispielsweise der genuinen Proteine und ihrer höheren Abbauprodukte vollziehen, von Substraten also, über deren konstitutionellen Aufbau wir kaum Anhaltspunkte besitzen, lassen sich mit ihrer besonderen Wirkungsweise und mit den ihrem Angriff unterliegenden spezifischen Strukturen noch nicht näher kennzeichnen. Zwar ist von J. H. Northrop¹⁾ der Versuch unternommen und experimentell gestützt worden, eine Einteilung der Proteasen nach überwiegend physikalisch-chemischen Gesichtspunkten vorzunehmen, nämlich nach dem Prinzip der Unterscheidung zweier Typen proteolytischer Enzyme, je nachdem ob sie mit den negativ oder mit den positiv geladenen Ionen der amphoteren Proteine in Reaktion treten; zu ihnen würden sich als dritter Typ von Proteasen diejenigen Enzyme gesellen, deren Wirkung sich auf den Angriff der undissoziierten, elektrisch neutralen Eiweißmoleküle bezieht. Gegen eine solche Einteilung, die allgemein nicht durchführbar sein wird, sind indessen gewichtige Bedenken zu erheben, da sie der Beachtung der in erster Linie für den Angriff eines Enzyms maßgebenden chemischen Strukturen nicht genügend gerecht wird. Eine rationelle Einteilung der proteolytischen Enzyme wird sich auf die Erkenntnis und auf den Vergleich der besonderen strukturellen Gruppierungen gründen müssen, auf die sich ihre Wirkung bezieht. Wenn eine solche rationelle Unterscheidung auf Grund unserer bisherigen Kenntnisse von der Struktur der Proteine noch nicht durchführbar erscheint, so wird sie in vorläufigem Sinne mit der Angabe der für die einzelnen Enzyme spezifischen Substrate vorzunehmen sein. Da indessen die meisten tierischen und pflanzlichen Proteasen noch nicht sicher genug mit

¹⁾ Naturw. **11**, 713 (1923).

streng spezifischen Substraten gekennzeichnet werden können, soll im folgenden nach einer Beschreibung der zum Nachweis und zur Bestimmung der Proteasen dienenden allgemeinen analytischen Verfahren die Behandlung der einzelnen enzymatischen Individuen und ihrer Wirkungen getrennt durchgeführt werden, während ihre gegenseitigen Beziehungen im Zusammenhang zu erörtern sind; der Beschreibung der peptidspaltenden Enzyme ist ein besonderer Abschnitt gewidmet.

Zur Bestimmung des proteolytischen Abbaues.

Die zahlreichen in der Literatur beschriebenen Methoden zur Verfolgung der enzymatischen Proteolyse lassen sich in zwei prinzipiell verschiedene Klassen einteilen, je nachdem sie auf der Bestimmung des unveränderten Substrats oder auf der Messung der entstandenen Abbauprodukte beruhen. Zu den ersteren gehören die wichtigen älteren Bestimmungsweisen von W. Ebstein und P. Grützner¹⁾ sowie von S. Mett²⁾, die in der Verfolgung der Auflösung koagulierter Proteine bestehen; sie haben indessen nur historische Bedeutung, da sie keine exakten, nicht einmal vergleichbare enzymatische Messungen erlauben. Auch gegen einige neuere Verfahren, die die Verminderung der Substratmenge bestimmen, ist der Einwand zu erheben, daß sie meist nur einen Bruchteil der Enzymwirkung zu erfassen vermögen; dies gilt z. B. für die Methoden von F. Volhard³⁾, von G. Gross⁴⁾ sowie von E. Fuld und L. A. Levison⁵⁾, nach welchen die Menge des unangegriffenen Substrats, beispielsweise von Kasein oder Edestin, durch Ausfällung und Wägung ermittelt wird, oder für die neuere Bestimmungsweise von P. Rona und H. Kleinmann⁶⁾, die auf der nephelometrischen Messung des ausgeschiedenen, unverdauten Substrates beruht. Auch die in neuerer Zeit von W. Waldschmidt⁷⁾ modifizierte ältere Methode von P. Grützner⁸⁾, die die Enzymwirkung nicht auf

¹⁾ Pflüg. Arch. **6**, 1 (1872).

²⁾ Arch. Physiol. 1894, S. 68.

³⁾ Münchener med. Wochenschr. 1903, S. 2129; 1907, S. 403; siehe auch W. Löhlein, Hofm. Beitr. **7**, 120 (1905).

⁴⁾ Arch. exp. Pathol. u. Pharmakol. **58**, 157 (1906).

⁵⁾ Bio. Z. **6**, 473 (1907).

⁶⁾ Bio. Z. **140**, 461 (1923); H. Kleinmann und K. Asada, Klin. Wo. **3**, 572 (1924).

⁷⁾ Pflüg. Arch. **143**, 189 (1912).

⁸⁾ Ebenda **8**, 452 (1874); **144**, 545 (1912).

Grund der ungelöst gebliebenen, sondern auf Grund der in Lösung übergeführten Menge des Substrates kolorimetrisch verfolgt, dürfte nur zu mehr oder weniger zutreffenden Schätzungen führen.

Wichtiger sind die Verfahren, welchen die Messung der entstehenden Spaltprodukte oder die kontinuierliche Verfolgung der Änderung bestimmter Eigenschaften des Reaktionsgemenges zugrunde liegt. So gestatten das Verfahren der Viskositätsbestimmung nach C. Fermi¹⁾, wie es von S. Palitzsch und L. E. Walbum²⁾ für die tryptische Verdauung von Gelatine angewandt wurde, sowie die Messung der elektrischen Leitfähigkeit nach V. Henri und L. des Bancels³⁾, einen etwas breiteren Abschnitt der Proteolyse zu verfolgen; allein ihre Grundlagen sind nicht genügend übersichtlich und ihr Anwendungsbereich ist zu beschränkt, zumal sie keinen sicheren Vergleich der Hydrolysen verschiedener Substrate zulassen. Hingegen dürfte die Anwendung der polarimetrischen Analyse, die Bestimmung der Drehungsänderung bei proteolytischen Prozessen, vor allem in einfachen Fällen eine allgemeinere Bedeutung erlangen, ein Verfahren, das bisher nach dem Vorbilde von E. Abderhalden und A. H. Koelker⁴⁾ nur für die Verfolgung der Hydrolyse einfacher, optisch aktiver Peptide mit Erfolg angewandt wurde. In ihrer Bedeutung für die Erkenntnis und die Lösung strukturchemischer und enzymchemischer Probleme in der Proteinchemie mag die polarimetrische Analyse den drei wichtigsten neueren proteolytischen Untersuchungsmethoden gleichzustellen sein, welche bestimmte chemische Veränderungen beim enzymatischen Abbau der Proteine zu erfassen gestatten, Veränderungen, die in der Bildung freier Aminogruppen und Carboxyle bestehen.

Zu diesen Methoden zählt das wichtige gasanalytische Verfahren nach D. D. van Slyke⁵⁾, das die Menge der freien Aminogruppen auf Grund ihrer Reaktion mit salpetriger Säure, die zur Bildung von Stickstoff führt, volumetrisch zu analysieren erlaubt. Zwei andere Verfahren betreffen die Ermittlung der bei der Proteolyse freigelegten Carboxyle, es sind dies die viel angewandte Formoltritation nach S. P. L. Sørensen⁶⁾ und die alkali-

¹⁾ Archiv für Hygiene **12**, 238 (1891); **40**, 155 (1906).

²⁾ Bio. Z. **47**, 1 (1912).

³⁾ Soc. Biol. **55**, 563, 787, 788, 789 und 866 (1903); vgl. dazu W. M. Bayliss, J. of Physiol. **36**, 221 (1908).

⁴⁾ H. **51**, 294 (1907).

⁵⁾ B. **43**, 3170 (1910).

⁶⁾ Bio. Z. **7**, 43 (1907); **25**, 1 (1910).

metrische Bestimmung von Aminosäuren und Peptiden in alkoholischer Lösung nach R. Willstätter und E. Waldschmidt-Leitz¹⁾). Die Formoltitration, die auf der Abdeckung der basischen Aminogruppen von Aminosäuren, Peptiden und Proteinen durch Formaldehyd und auf der Entwicklung der sauren Funktion der zugehörigen Carboxylgruppen dieser amphoterer Stoffe beruht, gestattet mit einigen Ausnahmen den Verlauf proteolytischer Prozesse, soweit er in der Sprengung von Säureamidbindungen, d. h. in der Freilegung von Amino- und Carboxylgruppen zugleich zum Ausdruck kommt, hinreichend zu erfassen; ihre Anwendung versagt indessen oder sie wird umständlich, wenn dem proteolytischen Abbaugemenge Ammonsalze²⁾ oder Phosphate, etwa als p_H -Regulatoren, beigemischt sind.

Von noch allgemeinerer Anwendbarkeit als die Formoltitration erscheint die alkalimetrische Bestimmung nach Willstätter und Waldschmidt-Leitz in alkoholischer Lösung, bei welcher durch den Alkoholzusatz die basischen Eigenschaften der Aminogruppen zurückgedrängt, die sauren der Carboxyle entwickelt werden und die auch im Gemenge mit Ammonsalzen oder Phosphat exakte Ergebnisse gewährleistet. Dieses Verfahren gestattet zudem, bei der Messung der Proteolyse zwischen den Anteilen der Aminosäuren und der Peptide an der Azidität zu unterscheiden, während die stufenweise Formoltitration nach V. Henriques und S. P. L. Sörensen³⁾ für den gleichen Zweck nur zu Schätzungen führt; die sauren Eigenschaften der Peptidcarboxyle sind nämlich stärker ausgeprägt, ihre Menge wird schon in 50proz. Alkohol vollständig erfaßt, die der Aminosäuren erst in über 90proz.

Für die genauere Kenntnis der beim Abbau der Proteine sich abspielenden Vorgänge wird indessen die alleinige Anwendung nur einer dieser Untersuchungsweisen nicht ausreichen, man wird vielmehr erst von der kombinierten und vergleichenden Untersuchung mittels der verschiedensten analytischen Methoden, die noch zu wenig unternommen worden ist, nähere Einblicke in die Wirkungsweise der eigentlichen Proteasen und damit in strukturelle Probleme der Proteinchemie zu erwarten haben.

¹⁾ B. **54**, 2988 (1921).

²⁾ Siehe dazu L. de Jager, H. **2**, 333, und zwar S. 342 (1909).

³⁾ H. **63**, 27 (1909); V. Henriques und J. K. Gjaldbaek, H. **71**, 485; **75**, 363 (1911).

1. Eigentliche Proteasen.

a) Pepsin, Lab.

Die eiweißverdauende Wirkung des Magensaftes ist zuerst von Th. Schwann¹⁾ als ein enzymatischer Vorgang erkannt worden. Das Enzym, das er Pepsin nannte, findet sich vor allem im Fundusteil der Magenschleimhaut und wird von dieser mit dem Magensaft sezerniert. Die Geschwindigkeit dieses Sekretionsvorganges, der auf die Verabreichung eiweißhaltiger Nahrung hin einsetzt, folgt nach den Berechnungen, die R. O. Herzog²⁾ auf Grund von Versuchen J. P. Pawlows³⁾ angestellt hat, dem monomolekularen Zeitgesetz; es gilt nämlich die Beziehung, daß die Geschwindigkeit der Sekretion $k = \frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-x}$, wenn x die zur Zeit t , und a die gesamte im Versuche abgesonderte Enzymmenge darstellt. Die hormonale Auslösung des Sekretionsvorganges wird nach den Untersuchungen von A. Frouin⁴⁾ und anderen auf einen in der Schleimhaut selbst enthaltenen innersekretorischen Stoff, das Gastrin, zurückgeführt, dessen Wirkung sich von der Blutbahn aus äußern soll. Die zahlreichen Angaben insbesondere der älteren Literatur über die Sekretion des Enzyms in Form einer unwirksamen Vorstufe, des Pepsinogens oder Propepsins, sind heute nicht mehr als gesichert zu betrachten; wenn man auch einige für wesentlich gehaltene Unterschiede zwischen der inaktiven und der aktiven Form des Pepsins, so eine verschiedene Beständigkeit gegenüber Alkali, für diese Annahme ins Feld geführt hat, so liegt doch die Erklärung näher, daß die beobachteten Unterschiede als p_H -Effekte zu bewerten sind, zumal man eine Aktivierung des angenommenen Zymogens durch Säure beschrieb; die angegebenen Beständigkeitsunterschiede mögen auf einen verschiedenen Gehalt der verglichenen Enzymlösungen an schützenden Begleitstoffen zurückzuführen sein.

Die schon früh beobachtete Abhängigkeit der Pepsinwirkung von der Acidität ist zuerst von S. P. L. Sörensen⁵⁾ genauer untersucht worden. Es hat sich dabei ergeben, daß die optimale Wir-

¹⁾ Müllers Archiv 1836, S. 90.

²⁾ H. 41, 425 (1904).

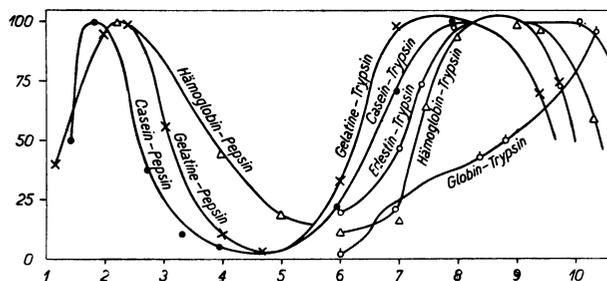
³⁾ Die Arbeit der Verdauungsdrüsen. Wiesbaden 1898.

⁴⁾ Soc. Biol. 57, 887 (1905).

⁵⁾ Bio. Z. 21, 131, und zwar S. 288 (1909); s. auch L. Michaelis und H. Davidsohn, Bio. Z. 28, 1 (1910).

kung des Enzyms, gemessen an der Verdauung von Eieralbumin, stark saurer Reaktion entspricht, nämlich bei Einhaltung geringer Versuchsdauer einem p_H von etwa 1,5; bei größeren Umsätzen war indessen eine beträchtliche Ausdehnung des optimalen Wirkungsbereichs in der Richtung geringerer Acidität zu bemerken, deren Ursachen noch nicht zu erkennen sind. Nach J. H. Northrop¹⁾ wird die Abhängigkeit der Wirkung des Pepsins wie anderer proteolytischer Enzyme bedingt durch den Ionisierungszustand der angewandten Substrate. Da die Wirkung des Pepsins nach dieser Anschauung auf seine Reaktion mit den Eiweißkationen zurückgeführt wird, so verschiebt sich sein p_H -Optimum zugleich mit dem isoelektrischen Punkte des Substrats; es liegt nach den Unter-

Abb. 10.

Aktivitäts- p_H -kurven von Pepsin und Trypsin mit verschiedenen Substraten.

suchungen von Northrop, deren Ergebnisse in Abb. 10 für die p_H -Abhängigkeit von Pepsin wie von Trypsin graphisch wiedergegeben sind, beispielsweise für die Hydrolyse von Casein bei $p_H = 1,8$, von Hämoglobin und Gelatine bei $p_H = 2,2$. Die beobachteten Unterschiede, die mehr noch als in der jeweiligen Lage des Optimums in der Form der Aktivitäts- p_H -kurven zum Ausdruck kommen, mögen indessen teilweise auch durch den Wechsel in den angewandten Bestimmungsweisen bedingt sein.

Für den Reaktionsverlauf der Hydrolyse von Eieralbumin durch Pepsin hat E. Schütz²⁾ zuerst die nach ihm benannte Regel aufgestellt, wonach die gebildeten Mengen Pepton den Quadratwurzeln der angewandten Enzymmengen direkt proportional ge-

¹⁾ Jl. of gen. Physiol. **1**, 607 (1919); **3**, 211 (1920); **5**, 263 (1922).

²⁾ H. **9**, 577 (1885).

funden werden. Die beobachteten Beziehungen, die in der nachstehenden Tabelle 27 wiedergegeben sind, sind von J. H. Schütz¹⁾ später nach einer anderen Bestimmungsweise bestätigt worden.

Tabelle 27.

Pepsinmenge und Umsatz nach E. Schütz.

Pepsinmenge	Drehung (°)	
	beobachtet	berechnet
1	9,40	10,8
4	20,6	21,6
9	32,3	32,4
16	45,4	43,2
25	55,2	54,1
36	65,0	64,9
49	76,0	75,7
64	85,3	86,5

Die Gültigkeit der Schütz'schen Regel für die Wirkung des Pepsins ist auch in mehreren anderen Untersuchungen unter Anwendung der verschiedenartigsten Bestimmungsweisen festgestellt worden, so beispielsweise in den Arbeiten von J. Sjöqvist²⁾, von E. J. Spriggs³⁾, von S. Küttner⁴⁾ oder von R. O. Herzog und M. Margolis⁵⁾; und Sv. Arrhenius⁶⁾, der die theoretischen Grundlagen dieser Regel besprochen und dafür ein Beispiel aus der nichtenzymatischen Katalyse erbracht hat, hat die experimentellen Ergebnisse von E. Schütz und von Sjöqvist auch mit Hilfe anderer Formeln zu interpretieren versucht. Hingegen findet man nach E. Abderhalden und E. Steinbeck⁷⁾ für die Auflösung von festen, denaturierten Proteinen die Produkte aus den Enzymmengen und den Zeiten gleichen Umsatzes annähernd konstant; der Reaktionsverlauf dieser Prozesse ist indessen zu unübersichtlich, um eindeutige Aussagen zu erlauben.

¹⁾ H. **30**, 1 (1900).

²⁾ Skand. Arch. f. Physiol. **5**, 317 (1895).

³⁾ H. **35**, 465 (1902).

⁴⁾ H. **52**, 63 (1907).

⁵⁾ H. **60**, 298 (1909).

⁶⁾ Immunochemie, Leipzig 1907, und zwar S. 53.

⁷⁾ H. **68**, 297 (1910); siehe auch H. **71**, 315 und 339 (1911); Fermentf. **6**, 248 (1922); **7**, 61 (1923).

Unsere unzureichenden Kenntnisse von der Wirkungsweise des Pepsins gestatten noch keine nähere Kennzeichnung der für seinen Angriff spezifischen chemischen Strukturen; auch wird es für das Verständnis seiner Wirkung nicht genügen, sie allein auf den Ionisierungszustand der Proteine zurückzuführen. Im allgemeinen werden, abgesehen von den Protaminen, alle genuinen Eiweißstoffe durch Pepsin hydrolysiert, sofern sie nicht, wie die Proteinoide, die tierische Skelettsubstanz, überhaupt als enzymatisch unangreifbar zu gelten haben; aber die Geschwindigkeit, mit der der Abbau der einzelnen Proteine sich vollzieht, hängt von ihrer Natur und von ihrer Beschaffenheit in wechselndem Sinne ab; die Erscheinung, daß eine vorhergehende Koagulation einen Teil der Proteine leichter, andere dagegen durch Pepsin schwerer hydrolysierbar macht, wird nicht mit dem Wechsel in der kolloidalen Verteilung, sondern mit chemisch-strukturellen Änderungen im Molekül des Proteins zu erklären sein, die die Anlagerung des Enzyms entweder begünstigen oder blockieren.

Es gilt nach den Untersuchungen von E. Fischer und E. Abderhalden¹⁾ als gesichert, daß das Pepsin gewöhnliche Polypeptidbindungen nicht zu lösen vermag, wenngleich die Auswahl der geprüften Peptide unzureichend gewesen sein kann; dasselbe gilt für die Spaltbarkeit einfacher 2,5-Diketopiperazine zufolge den Angaben von E. Abderhalden²⁾ sowie von E. Waldschmidt-Leitz und A. Schöffner³⁾. Zwar konnte es nach der Stellungnahme der referierenden Literatur und auf Grund der neueren Anschauungen über die Struktur der Proteine zweifelhaft erscheinen, ob es möglich ist, die spezifische Wirkung des Pepsins auf bestimmte chemische Strukturänderungen in den Proteinen zurückzuführen und sie mit chemischen Methoden zu erfassen. Allein eine Anzahl von Beobachtungen der neueren Forschung, die zu wenig Beachtung gefunden haben, deuten darauf hin, daß die Wirkung des Enzyms in bestimmten chemischen Umsetzungen zum Ausdruck kommt; dahin gehören die Angaben von V. Henriques und J. K. Gjaldbaek⁴⁾ über das Auftreten formoltitrierbarer

¹⁾ H. **46**, 52 (1905).

²⁾ H. **55**, 384 (1908); E. Abderhalden und K. Goto, *Fermentf.* **7**, 169 (1923).

³⁾ B. **58**, 1356 (1925).

⁴⁾ H. **75**, 362; **83**, 83 (1913).

Carboxyle, die Beobachtungen von E. M. Frankel¹⁾ über einen Zuwachs freier Aminogruppen sowie der Befund von K. Felix²⁾ über die Vermehrung des methylierbaren Stickstoffs und die Bildung von freiem Lysin bei der Einwirkung auf Histon. Diese Beobachtungen sind in vergleichenden Messungen von S. Edlbacher³⁾ und von E. Waldschmidt-Leitz und E. Simons⁴⁾ bestätigt und vertieft worden; sie betreffen nämlich das Verhältnis, in welchem bei der peptischen Hydrolyse Aminogruppen und Carboxyle freigelegt werden. Während hierbei nach Edlbacher die Anzahl der gebildeten Carboxyle eine stärkere Zunahme als die Menge des methylierbaren Stickstoffes als Maß der freien Aminogruppen erfährt, konnten Waldschmidt-Leitz und Simons zeigen, daß bei der peptischen Verdauung einer Anzahl von Proteinen der freie Aminostickstoff, gemessen nach dem Verfahren von van Slyke, in demselben Maße zunimmt wie die Bildung freier Carboxyle, daß also die Wirkung des Pepsins in diesem Falle in der Lösung von Säureamidbindungen besteht; wenn in einigen Fällen, bei der Hydrolyse von Proteinen besonderer Zusammensetzung, Abweichungen von dem angegebenen Verhältnis zu bemerken waren, so bei den alkohollöslichen Proteinen Gliadin und Zein, so war dafür eine Unzulänglichkeit des analytischen Verfahrens verantwortlich; es ergab sich der Hinweis, daß die enzymatische Wirkung in solchen Fällen zum erheblichen Teil die Lösung einer Säureamidbindung mit tertiär gebundenem Stickstoff betraf. Diese Beobachtungen geben indessen nur einige Anhaltspunkte; es wird weit eindringenderer analytischer Untersuchung bedürfen, um die spezifische Wirkungsweise des Pepsins deutlicher zu definieren⁵⁾. Auch die Angaben der Literatur⁶⁾ über synthetische Wirkungen des Pepsins, die sogenannte Plasteinbildung, die aus physikalischen Zustandsänderungen des Substrates abgeleitet sind, werden mit chemisch-analytischen Methoden noch näher zu beschreiben und sicherzustellen sein.

Infolge der qualitativ wie quantitativ unzureichenden Kenntnisse vom Wesen der Pepsinwirkung fehlt es noch an einem sicheren

1) Jl. Biol. Chem. **26**, 31 (1916).

2) H. **146**, 103 (1925).

3) H. **107**, 52, und zwar S. 67 (1919); **108**, 287 (1919/20).

4) H., im Druck.

5) Siehe dazu die neueren Untersuchungen von H. Steudel, G. Ellinghaus und A. Gottschalk, H. **154**, 21, 198 (1926).

6) Siehe dazu V. Henriques und J. K. Gjaldbaek, H. **71**, 485 (1911); **81**, 439 (1912).

Maßstabe für die Bestimmung der Menge und der Konzentration des Enzyms. Auch ist die präparative Reinigung des Pepsins, deren von der älteren Forschung verzeichnete Ergebnisse schwer zu beurteilen sind, mit moderner enzymatischer Methodik noch nicht unternommen worden, obwohl gerade an diesem Enzym die ersten Beobachtungen über Enzymadsorption gewonnen worden sind. Es mag zur Kennzeichnung des Standes der präparativen Untersuchung genügen, daß man das Pepsin einerseits bei der Verarbeitung des Magensekretes in phosphorfreien¹⁾, andererseits bei der Isolierung aus der Schleimhaut in eiweißfreien Präparaten²⁾ erhalten hat.

Es ist in diesem Zusammenhang noch eine wichtige und schon im Altertum bekannte Eigenschaft der Extrakte und Sekrete von tierischer Magenschleimhaut zu besprechen, nämlich die Fähigkeit, Milch zur Gerinnung zu bringen, die man vielfach der Wirkung eines besonderen proteolytischen Enzyms, des Labs, zugeschrieben hat. Dieser Vorgang, der nur in Gegenwart löslicher Erdalkalisalze in Erscheinung tritt, beruht auf der enzymatischen Umwandlung des wichtigsten Eiweißkörpers der Milch, des Caseinogens, in Casein und auf dessen Ausfällung in Form eines unlöslichen Salzes; er ist indessen nicht für das Magenenzym spezifisch, man beobachtet ihn vielmehr auch bei der Einwirkung anderer Proteasen, wie des Trypsins aus der Pankreasdrüse oder des Papains aus dem Melonenbaum. Diese Erkenntnis hat wesentlich dazu beigetragen, die Unterscheidung eines besonderen labenden Enzyms neben dem Pepsin der Magenschleimhaut, die vor allem in den Untersuchungen von O. Hammarsten³⁾ ausgesprochen war und die auch experimentell begründet schien, zu erschüttern und die Gerinnung des Milcheiweißes nur als die erste Phase seines proteolytischen Abbaues anzusehen, zumal man wahrnahm, daß das ausgeflockte Casein in allen Fällen einer weiteren hydrolytischen Auflösung unterlag. Auch sind die älteren Angaben Hammarstens, die von einer Trennung von Pepsin und Lab und von der Gewinnung pepsinfreier Lösungen des labenden Enzyms berichten, nicht bestätigt worden;

¹⁾ Vgl. C. A. Pekkelharing, H. **35**, 8 (1902); **75**, 282 (1911); W. E. Ringer, H. **95**, 195 (1915).

²⁾ Vgl. C. Sundberg, H. **9**, 319 (1885); P. Schrupf, Hofm. Beitr. **6**, 396 (1905).

³⁾ Siehe dazu R. Malys Jahresbericht über die Fortschritte der Tierchemie, 2. Band für 1872, S. 118 (1874).

nach den neueren Untersuchungen von J. P. Pawlow und seiner Schule¹⁾ sowie von O. Hammarsten²⁾ wird die Enzymlösung in diesen Fällen nicht frei von Pepsin, sondern nur von Pepsinwirkung; sie enthält inaktives Pepsin. Die Frage nach der Unterscheidung von Lab und Pepsin, die viel bearbeitet worden ist, ist auf Grund der neueren Erkenntnisse in dem Sinne zu beantworten, daß man nur für die Magenschleimhaut junger Tiere, beispielsweise der Kälber, ein Enzym mit ausgesprochener labender Wirkung anzunehmen hat, während von O. Hammarsten³⁾ für die Enzympräparate aus älteren, ausgewachsenen Tieren, in welchen die Pepsinwirkung hervor-, die Labwirkung dagegen zurücktritt, eine veränderte Form des echten Labs oder Chimosins, das „Parachymosin“, angenommen wird. Gegen die Annahme einer Identität der beiden Enzyme ergeben sich aus diesen Befunden keine sicheren Belege; sie würde nur durch eine einwandfreie Trennung ihrer Wirkungen zu widerlegen sein. Die beobachteten Verschiebungen der enzymatischen Einzelwirkungen, die den physiologischen Erfordernissen entsprechen, brauchen nicht mit der Unterscheidung zweier Enzyme gedeutet zu werden; sie erinnern an die spezifische Einstellung und Gewöhnung des Zymasekomplexes der Hefe an nicht vergärbare Substrate, die nicht auf die Ausbildung eines neuen Enzyms, sondern auf eine Umstellung und Veränderung der enzymatischen Affinität zurückzuführen sind.

b) Trypsin.

Das Trypsin, dessen Wirkungen zuerst von W. Kühne⁴⁾ genauer untersucht wurden, ist das wichtigste proteolytische Enzym der Bauchspeicheldrüse, von welcher es mit dem Pankreassaft in den Darm abgegeben wird; die Absonderung dieses Sekretes erfolgt unter normalen Bedingungen nach der Einwirkung innersekretorischer Reize, unter dem Einfluß eines aus der Darmschleimhaut in die Blutbahn gelangenden Hormons, des Sekretins. Der Reaktion des Pankreassekretes, die schwach alkalisch ist, entspricht der optimale Wirkungsbereich des tryptischen Enzyms, dessen Bestimmung eine Reihe von Untersuchungen gewidmet worden sind. Während die erste exakte Untersuchung der p_{H} -Abhängigkeit der Trypsinwirkung

1) H. **42**, 415 (1904); **46**, 307 (1905); **54**, 32 (1907); **55**, 84 (1908).

2) H. **56**, 18 (1908).

3) Siehe dazu H. **121**, 261 (1922); **130**, 55 (1923).

4) Virch. Arch. **39**, 130 (1867).

von L. Michaelis und H. Davidsohn¹⁾ mit Pepton als Substrat ein Optimum von $p_H = 8,0$ ergab, haben S. Palitzsch und L. E. Walbum²⁾ weit alkalischere Reaktionen, z. B. $p_H = 9,9$ bei 30° , als optimal angegeben, und W. E. Ringer³⁾ schloß aus seinen Versuchen, daß die tryptische Wirkung mit steigender Alkalität kontinuierlich zunehme. Diese Ergebnisse sind indessen auf eine Vernachlässigung der Wirkung von Alkali allein zurückgeführt worden; nach E. Waldschmidt-Leitz⁴⁾ liegt das Optimum der Gelatine-spaltung bei p_H 8,2 bis 8,7 in Übereinstimmung mit den Angaben von J. H. Northrop⁵⁾, nach dessen Versuchen, die die Abhängigkeit der Aktivitäts- p_H -kurve von der Natur des Substrates erweisen, man eine verschiedene elektrochemische Natur der einzelnen Ferment-Substratverbindungen anzunehmen haben wird (vgl. die Ausführungen des vorausgehenden Abschnittes).

Die Untersuchungen der älteren Literatur haben für den komplizierten Verlauf der tryptischen Proteinhydrolyse, wie zu erwarten war, keine einfachen Gesetzmäßigkeiten ergeben; auch trifft die Proportionalität zwischen Enzymmenge und Reaktionsgeschwindigkeit meist nur für die Messung kleiner Umsätze zu. Die Frage nach der Bildung von Enzym-Substratverbindungen und nach der hemmenden Wirkung der Reaktionsprodukte ist für Trypsin in neuerer Zeit von J. H. Northrop⁶⁾ eingehend geprüft worden. Während nach diesen Untersuchungen die Bindung des Trypsins an die enzymatischen Spaltprodukte, die reversibel ist, durch das Massenwirkungsgesetz beschrieben werden kann, läßt sich die Anlagerung des Enzyms an seine Substrate, die Bildung der Enzym-Substratverbindungen, dieser Beziehung nicht unterordnen; dies ist aus der Unabhängigkeit der Hemmung durch Spaltprodukte wie aus den Versuchen über den Einfluß der Substratkonzentration auf die Reaktionsgeschwindigkeit und über die gleichzeitige Hydrolyse mehrerer Substrate gefolgert worden. Die Annahme von Northrop, daß für die Wirkung proteolytischer Enzyme die Bildung einer intermediären Enzym-Substratverbindung entbehrlich sei, bedarf in-

¹⁾ Bio. Z. **36**, 280 (1911).

²⁾ Bio. Z. **47**, 1 (1912).

³⁾ H. **116**, 107 (1921); **124**, 171 (1922/23).

⁴⁾ H. **132**, 181, und zwar S. 196 (1923/24).

⁵⁾ Jl. of gen. Physiol. **5**, 263 (1922/23).

⁶⁾ Jl. of gen. Physiol. **4**, 266 (1921/22); **5**, 487 (1922); **6**, 239 (1923/24).

dessen noch der Bestätigung; es ist zu erwarten, daß die vergleichende Untersuchung der tryptischen Hydrolyse mit verschiedenen analytischen Methoden eine vertiefte Erkenntnis der enzymatischen Kinetik erlauben wird.

Es ist eine alte, auf Beobachtungen von W. Kühne¹⁾ und von R. Heidenhain²⁾ zurückgehende Anschauung, daß das Pankreas-trypsin von der Drüse nicht in fertigem Zustand, sondern in Form einer unwirksamen Vorstufe ausgebildet werde; sie schien eine Bestätigung zu erfahren durch die grundlegende Entdeckung von N. P. Schepowalnikow³⁾ über den spezifischen Einfluß des Darmsaftes auf die Aktivierung des pankreatischen Sekretes. Es ließ sich zeigen, daß reiner pankreatischer Fistelsaft, für die Hydrolyse genuiner Proteine vollständig inaktiv, durch Zugabe geringer Mengen Darmsaft intensiv aktiviert wurde; die Wirkung des Aktivators, den man Enterokinase nannte, verstand man als eine enzymatische Umwandlung des Trypsins aus seinem Zymogen; der Beobachtung nämlich, daß die Aktivierung Zeit benötigte, und der Unbeständigkeit des Aktivators maß man entscheidende Bedeutung bei für die Beurteilung seiner enzymatischen Natur. Diese Vorstellung, die in der Literatur die vorherrschende geblieben war⁴⁾, hat sich als irrig erwiesen. Aus einer Untersuchung von E. Waldschmidt-Leitz⁵⁾ geht hervor, daß die Reaktion zwischen Enterokinase und Trypsin auf stöchiometrischer Grundlage beruht, und daß sie jeweils nach einer bestimmten, kurzen Einwirkungszeit zum Stillstand kommt; es bildet sich eine leicht dissoziierende Verbindung von Enzym und Aktivator, deren Zerlegung sich beispielsweise durch Adsorptionsmittel bewirken läßt. Diese Tatsache, insbesondere daß es gelingt, durch eine einfache, präparative Vornahme Enzym und Aktivator wieder zu trennen und so bereits maximal aktiviertes Trypsin von neuem in inaktive Form überzuführen, ist mit der Annahme einer enzymatischen Umwandlung von Trypsinogen zu Trypsin unvereinbar. Zudem haben E. Waldschmidt-Leitz und A. Harteneck⁶⁾ den Nachweis geführt, daß das Trypsin in ge-

1) Virch. Arch. **39**, 130 (1867).

2) Pflüg. Arch. **10**, 557, und zwar S. 587 (1875).

3) Inaugural-Diss. St. Petersburg 1899; Referat in *Malys Jahresbericht über die Fortschritte der Tierchemie* **29**, 378 (1899).

4) Vgl. W. M. Bayliss und E. H. Starling, *J. of Physiol.* **30**, 61 (1904); **32**, 129 (1905).

5) *H.* **132**, 181 (1923/24).

6) *H.* **149**, 203, und zwar S. 207 (1925).

wissen Fällen auch ohne den Aktivator beträchtliche proteolytische Wirkungen auszuüben vermag, beispielsweise bei der Einwirkung auf Protamin oder auch Pepton, daß also der Enterokinase nur die Bedeutung eines Hilfsstoffs für den Angriff bestimmter, vor allem in höhermolekularen Proteinen vorliegender Strukturen zukommt.

Von der Aktivierung des Trypsins durch Enterokinase, die spezifisch ist und die sich durch andere Mittel, beispielsweise durch Kalksalz oder auch durch Gallensalz, nicht, wie man früher annahm, ersetzen läßt, hat man vielfach eine andere Art der Aktivierung, die sogenannte spontane Aktivierung unterschieden, die schon R. Heidenhain¹⁾ wahrgenommen hat. Sie tritt bei der Aufbewahrung der Pankreasdrüse und ihrer wässerigen Auszüge oder des Sekrets ein und ist mit einer enzymatischen Bildung des Trypsins erklärt worden. Es hat sich indessen ergeben, daß es sich hierbei um die Bildung eines Aktivators aus der Drüsensubstanz selbst handelt, der in seinem Verhalten, z. B. in seinem Adsorptionsverhalten und in seinen charakteristischen Eigenschaften, mit der Enterokinase übereinstimmt. Einmal war es gelungen, spontan aktiviertem Trypsin in der gleichen Weise, wie es sich bei der Verbindung von Trypsin und Enterokinase durchführen ließ, durch Adsorption mittels Tonerde, den Aktivator wieder zu entziehen, der dann in der Elution der Tonerdeadsorbate nachweisbar war²⁾; und weiterhin hat die Anwendung des nämlichen Adsorptionsverfahrens auf nicht aktivierte Drüsenauszüge erlaubt, den Aktivator in Form seiner Vorstufe, der „Pro-Kinase“, von Trypsin zu trennen und seine Bildung unabhängig von der Gegenwart des Trypsins zu verfolgen. Die Bestimmung des Leistungsvermögens an dem aus der Pankreasdrüse gebildeten Aktivator hat ergeben, daß er identisch ist mit Enterokinase³⁾; auch hat seine Entstehung, die auf einem enzymatischen Vorgang beruht, als spezifisch für die Pankreasdrüse zu gelten, man beobachtet sie nicht bei anderen tierischen Organen. Auch in dem Sekret der Pankreasdrüse ist das Trypsin von der Vorstufe des Aktivators begleitet, deren Umwandlung in die fertige Kinase in der Drüse selbst zum Schutz gegen die Selbstverdauung unterbleibt; sie vollzieht sich vielmehr erst in den Zellen der Darmschleimhaut.

1) a. a. O.

2) E. Waldschmidt-Leitz, H. 132, 181, und zwar S. 191 (1923/24).

3) E. Waldschmidt-Leitz und A. Harteneck, H. 149, 221 (1925).

Aus der gewonnenen Erkenntnis von der Natur der Enterokinase-wirkung ergab sich zugleich die Aufgabe, die präparative Reinigung des Aktivators anzustreben und seine Eigenschaften zu beschreiben; das in einer Untersuchung von E. Waldschmidt-Leitz¹⁾ befolgte Verfahren der Reinigung, das sich einer Anzahl von Fällungs- und Adsorptionsvornahmen bediente, und dessen Kontrolle auf einer vorläufigen Bestimmungsweise des Aktivators beruhte, nämlich seiner Einwirkung auf eine bestimmte Menge Pankreasdrüse, hat im besten Beispiel zu einer etwa 100fachen Konzentrationssteigerung der Enterokinase aus der getrockneten Darmschleimhaut geführt. Dabei hat sich die beachtenswerte Feststellung ergeben, daß die Enterokinase, deren Wirkungsweise als nichtenzymatischer Natur erkannt war, in vielen ihrer Eigenschaften an Enzyme erinnert; dies gilt beispielsweise für ihre Fähigkeit zur Bildung von Assoziationsprodukten mit begleitenden Stoffen, die wie bei den Enzymen das wahre Verhalten des Stoffes entstehen, oder es gilt für die beobachtete Abnahme der Beständigkeit des Aktivators in reinerer Lösung und für seine Stabilisierbarkeit durch Glycerin. Auch die Temperaturempfindlichkeit des Aktivators, der unabhängig vom Reinheitsgrad schon bei 50° rascher Zerstörung unterliegt, dürfte auf eine labile, enzymähnliche Struktur hinweisen.

Verfahren zur Messung von Trypsinmengen sind von J. H. Northrop²⁾ auf die Beobachtung der Verflüssigung von Gelatine, von R. Willstätter und H. Persiel³⁾ auf die Ermittlung des Aciditätszuwachses in alkoholischer Lösung bei der Gelatinespaltung gegründet worden. Vor der ersteren wie vor älteren Bestimmungsweisen dürfte die Methode von Willstätter und Persiel den Vorzug verdienen, da sie den Einfluß des Aktivierungsgrades des Enzyms berücksichtigt und seine ausgleichende Aktivierung mit Enterokinase anstrebt. Weitere wichtige Verbesserungen, die dieses analytische Verfahren kennzeichnen, beruhen auf der Erkenntnis, daß das rasche zeitliche Abklingen der Eiweißspaltung, das durch die stark hemmende Wirkung der Spaltprodukte bedingt ist, die Messung sehr kleiner Enzymmengen an großen Mengen des Substrats erforderlich macht. Die ermittelten Beziehungen zwischen Enzymmenge und Spaltungsgrad haben zur Aufstellung eines vorläufigen Maßes für die Menge des Trypsins geführt, der „Trypsin-

¹⁾ H. 142, 217 (1924/25).

²⁾ Jl. of gen. Physiol. 5, 487 (1922).

³⁾ H. 142, 245 (1924/25).

Einheit (T.[e.]⁴), dessen Definition in einer späteren Untersuchung von R. Willstätter, E. Waldschmidt-Leitz und S. Duñaiturria¹⁾ noch etwas abgeändert worden ist und das die präparative Isolierung des Enzyms geleitet hat.

Für die präparative Darstellung des Trypsins ist es als zweckmäßig erkannt worden, das Ausgangsmaterial, die Pankreasdrüse z. B. von Schweinen, unmittelbar nach der Schlachtung der Tiere zu entwässern und zu entfetten, so wie es bei der Besprechung der Pankreaslipase beschrieben wurde. Man erhält so das Enzym in nichtaktivierter Form und man vermeidet die Bildung von Hemmungskörpern, die bei der beginnenden Zersetzung des Drüsengewebes auftreten und die die Sicherheit der Trypsinbestimmung beeinträchtigen. Das Enzym, das der getrockneten Drüsensubstanz mit wässrigen Mitteln oder mit Glycerin in guter Ausbeute entzogen wird, findet sich in diesen Lösungen mit dem fett-, dem stärke- und dem peptidspaltenden Enzym, sowie mit der Vorstufe der Enterokinase vergesellschaftet; seine Abtrennung von diesen beruht auf dem Überwiegen seiner basischen Eigenschaften, die es gestatten, zunächst durch eine Adsorption mit Tonerde die Lipase²⁾ und ferner Erepisin³⁾ und „Pro-Kinase“⁴⁾ den Lösungen zu entziehen, während die Hauptmenge des Trypsins zusammen mit dem stärke-spaltenden Enzym in den Mutterlaugen der Adsorption verbleibt; ihre Trennung wird erreicht durch den Wechsel in der Polarität des Adsorbens, man nimmt nämlich mit Kaolin das tryptische Enzym aus der Lösung auf und läßt die Amylase darin zurück⁵⁾. So erhält man, wie auch neuere Versuche von Willstätter, Waldschmidt-Leitz und Duñaiturria bestätigt haben, das Trypsin in enzymatisch einheitlicher Lösung; zahlenmäßige Unterlagen für den Grad der erzielten Konzentrationssteigerung sind indessen noch nicht gewonnen worden. Die Abtrennung der Pro-Kinase, die bei der Adsorption mit Tonerde erfolgt und die bewirkt, daß das Trypsin nun keine Selbstaktivierung mehr erleidet, hat nach E. Wald-

1) Noch unveröffentlicht; siehe dazu E. Waldschmidt-Leitz und A. Harteneck, H. **147**, 286, und zwar S. 291 (1925).

2) R. Willstätter und E. Waldschmidt-Leitz, H. **125**, 132, und zwar S. 142 (1922/23).

3) E. Waldschmidt-Leitz und A. Harteneck, H. **147**, 286, und zwar S. 301 (1925).

4) Dieselben, H. **149**, 221, und zwar S. 226 (1925).

5) R. Willstätter, E. Waldschmidt-Leitz und A. R. F. Hesse, H. **126**, 143, und zwar S. 162 (1922/23).

schmidt-Leitz und A. Harteneck¹⁾ noch eine besondere Bedeutung, die die weitere Reinigung des Enzyms erleichtert. Da nämlich die Haltbarkeit des nichtaktivierten Trypsins viel größer ist als die seiner Verbindung mit Enterokinase, so findet man das Enzym z. B. in den Mutterlaugen der Tonerdeadsorption viel beständiger als in den ursprünglichen Lösungen, obgleich es reiner ist; auch Glycerin, das den Vorgang der Selbstaktivierung verlangsamt, erhöht die Beständigkeit des Enzyms.

Die zahlreichen Angaben der älteren Literatur über die spezifischen Wirkungen des Pankreastrypsins sind meist überholt. Insbesondere hat sich die Anschauung, wonach man als die spezifischen Substrate des Trypsins diejenigen höhermolekularen Proteine ansah, zu deren Hydrolyse das Enzym der Aktivierung durch Enterokinase bedurfte, als irreführend erwiesen; sie beruhte auf der herrschenden Ansicht über die Wirkungsweise der Kinase, nämlich die einer enzymatischen Bildung des Trypsins aus seinem Zymogen. So haben sich nach der Sicherstellung der Natur dieses Vorgangs für die Unterscheidung der besonderen Substrate von Pankreastrypsin und Pankreaserepsin, welch letzterem man alle mit nichtaktivierten Pankreaspräparaten beobachteten Wirkungen zuschrieb, neue Richtlinien ergeben. Die Trennung der beiden Enzyme durch das Verfahren der fraktionierten Adsorption mittels Tonerde, die von E. Waldschmidt-Leitz und A. Harteneck²⁾ ausgeführt wurde, hat zudem den Weg eröffnet zu einer gesicherten Prüfung ihrer spezifischen Wirkungen wie auch der Bedeutung des Hilfsstoffes Enterokinase für die Spezifität des tryptischen Enzyms. Es hat sich ergeben, daß die besonderen Wirkungen von Trypsin und von Erepsin streng voneinander zu unterscheiden sind. Die Hydrolyse durch Trypsin beobachtete man für alle untersuchten genuinen Proteine, wie auch für höhere proteolytische Abbauprodukte z. B. der Pepsinverdauung, wiewohl sie sich in einzelnen Fällen mit stark abweichender Geschwindigkeit vollzieht; gewöhnliche Peptide dagegen, z. B. Di- oder Tripeptide, werden durch Trypsin nicht angegriffen, für ihre Spaltung ist das ereptische Enzym spezifisch. Sodann hat es sich gezeigt, daß der Einfluß der Aktivierung durch Enterokinase nur für die Hydrolyse der höhermolekularen Proteine wesentlich ist, daß hingegen einfacher konstituierte Substrate, z. B. gewisse basische Proteine wie die Protamine oder auch Produkte

¹⁾ H. 149, 221, und zwar S. 226 (1925).

²⁾ a. a. O.

des peptischen Abbaues, auch von dem nichtaktivierten Enzym rasch zerlegt werden; in diesen Fällen kommt die Gegenwart der Entero-kinase nur in einer Verstärkung und Weiterführung der Hydrolyse zum Ausdruck. Es hat sich indessen in neueren Untersuchungen ¹⁾ gezeigt, daß der Angriff des aktivierten und der des nichtaktivierten Trypsins sich auf spezifische Strukturen bezieht; auch ist ihre Wirkungsweise scharf unterschieden. Die nachfolgende Tabelle 28 veranschaulicht den Vergleich der Spezifität von Pankreastrypsin und Pankreaserepsin in qualitativer Form.

Tabelle 28. Spezifität von Trypsin und Erepsin.
(Angaben bedeuten: — = keine nachweisbare, + = positive,
++ = verstärkte Spaltung.)

Substrat	Trypsin	Trypsin + Entero-kinase	Erepsin
Peptide	—	—	+
Pepton aus Eialbumin . . .	+	++	—
Protamin	+	++	—
Histon.	—	+	—
Casein	—	+	—
Fibrin.	—	+	—
Gelatine	—	+	—
Gliadin	—	+	—
Zein	—	+	—

Die besondere Wirkungsweise des Trypsins und die Natur der für seinen Angriff maßgebenden chemischen Strukturen ist noch nicht deutlich erkennbar; aber seine Wirkung äußert sich, wie besondere Versuche gelehrt haben, in der Spaltung von Säureamidbindungen und vor allem in der Bildung beträchtlicher Mengen freier Aminosäuren; in dieser letzteren Beziehung, die wesentlich zu sein scheint, unterscheidet sie sich, zum mindesten in quantitativem Sinne, von der des peptischen Enzyms.

c) Thrombin.

Es gilt als zweifelhaft, ob man berechtigt ist, die Erscheinung der Blutgerinnung als einen proteolytischen und überhaupt als einen enzymatischen Vorgang aufzufassen; man hat sie auch unter rein

¹⁾ E. Waldschmidt-Leitz, A. Schöffner und W. Grassmann, „Über die Struktur des Clupeins“, sowie E. Waldschmidt-Leitz und E. Simons, „Über die enzymatische Hydrolyse des Caseins“, H., im Druck.

kolloidchemischen Gesichtspunkten zu verstehen versucht. Im Rahmen dieses Buches mag eine kurze Beschreibung des Gerinnungsvorgangs und der dafür maßgebenden Bedingungen genügen, die ein näheres Eingehen auf die strittigen und noch nicht zu entscheidenden Fragen des Reaktionsmechanismus vermeidet. Die Ähnlichkeit dieser Erscheinung mit der der Labgerinnung des Caseins, die nicht nur auf formelle, sondern auch auf innere Analogie sich gründen mag, mahnt zur Vorsicht in der Aberkennung ihrer enzymatischen Grundlagen; die analytische Untersuchung ist hier wie dort nicht tief genug vorgedrungen, um ein abschließendes Urteil zu gestatten.

Die Erscheinung der Blutgerinnung beruht auf der Umwandlung eines im Blutserum gelösten Proteins, des Fibrinogens, in das unlösliche Fibrin. Sie ist zuerst von A. Schmidt¹⁾ auf die Wirkung eines Enzyms, des Thrombins, zurückgeführt worden, das beim Zerfall von Zellelementen, z. B. der roten Blutkörperchen, an das Blut abgegeben werden soll, und zwar in Form einer inaktiven Vorstufe, die erst durch den Hinzutritt von Kalksalzen in das aktive, die Gerinnung bewirkende Enzym übergeführt wird. Die Bedeutung der Kalksalze, auf die zuerst M. Arthus und Pagès²⁾ aufmerksam gemacht haben, ist nach O. Hammarsten³⁾ nicht wie bei der Labwirkung, in ihrer Reaktion mit dem umgewandelten Protein, dem Fibrin, sondern in ihrer Einwirkung auf das unfertige Enzym zu sehen, zu dessen Aktivierung es nach E. Fuld⁴⁾ und P. Morawitz⁵⁾ außerdem der Gegenwart eines besonderen, in den Gewebssäften enthaltenen Aktivators, der Thrombokinase, bedarf. Diese Beobachtungen erinnern an die älteren Angaben über die Aktivierung des Trypsins durch Calciumsalze, deren Wirkung indessen, wie es sich gezeigt hat, lediglich auf einer Änderung der Reaktion der Enzymlösungen beruht. Bezüglich weiterer Einzelheiten, die die Bedingungen der Blutgerinnung wie die Ansichten über ihren Mechanismus betreffen, mag auf die umfangreiche Spezialliteratur verwiesen werden⁶⁾.

¹⁾ Pflüg. Arch. **6**, 413 (1872); **11**, 291, 515 (1875); **13**, 93 (1876).

²⁾ Arch. de Physiol. **2**, 739 (1890).

³⁾ H. **22**, 333 (1896/97); **28**, 98 (1899).

⁴⁾ Zbl. f. Physiol. **17**, 529 (1903); E. Fuld und K. Spiro, Hofm. Beitr. **5**, 171 (1904).

⁵⁾ Hofm. Beitr. **4**, 381; **5**, 171 (1904); D. Arch. klin. Med. **79**, 1 (1904).

⁶⁾ Siehe dazu P. Morawitz, Die Blutgerinnung. Handb. d. Biochem. **4**, 44, 2. Aufl. Jena 1923.

d) Papain.

Das Papain oder Papayotin findet sich in den Früchten und im Milchsafte des Melonenbaums, dessen eiweißverdauende Wirkung schon lange bekannt war; das Enzym ist zuerst von A. Wurtz und E. Bouchut¹⁾ genauer, sehr eingehend von dem Botaniker S. H. Vines²⁾ untersucht und mit anderen pflanzlichen Proteasen verglichen worden. Allein die Erkenntnisse von den besonderen Wirkungen des Papains, die aus diesen Arbeiten hervorgingen, haben durch neuere Untersuchungen eine wesentliche Vertiefung und Richtigstellung erfahren, seitdem man nämlich auf die Bedeutung einer spezifischen Aktivierung des Enzyms durch Blausäure aufmerksam geworden war. Diese Aktivierung, die zuerst von L. B. Mendel und A. F. Blood³⁾ und von E. M. Frankel⁴⁾ als solche erkannt war, ist von R. Willstätter und W. Grassmann⁵⁾ in ihrem Mechanismus und in ihrer Bedeutung für die Spezifität des Enzyms eingehend untersucht worden. Es hat sich gezeigt, daß die Wirkung der Blausäure auf Papain große Ähnlichkeit besitzt mit der von E. Waldschmidt-Leitz⁶⁾ untersuchten Reaktion zwischen Trypsin und Enterokinase; die Bindung des Aktivators an das Enzym ist in beiden Fällen eine zeitlich bedingte Reaktion, im Falle des Papains ist zur Erzielung maximaler Aktivierungsleistung beispielsweise eine einstündige Einwirkung der Blausäure erforderlich. Auch die Papain-Blausäureverbindung zeichnet sich durch eine beträchtliche Dissoziationsfähigkeit aus; man kann dem aktivierten Enzym den Aktivator schon durch Druckverminderung wieder entziehen. Das aktivierte und das nichtaktivierte Enzym, Papain-Blausäure und Papain, deren optimale Wirkung auf Gelatine einem p_H von 5,0 entspricht und deren Aktivitäts- p_H -kurven übereinstimmend gefunden wurden, unterscheiden sich in ihrer Spezifität, sie verhalten sich wie zwei spezifische proteolytische Enzyme. So wie die Aktivierung des Trypsins durch Enterokinase zufolge

¹⁾ C. r. **89**, 425 (1897); **91**, 787 (1880); **93**, 1104 (1888).

²⁾ Annals of Botany **16**, 1 (1902); **17**, 237, 597 (1903); **18**, 289 (1904); **19**, 149, 171 (1905); **20**, 113 (1906); **22**, 103 (1908); **23**, 1 (1909); **24**, 213 (1910).

³⁾ JI. Biol. Chem. **8**, 177 (1910).

⁴⁾ JI. Biol. Chem. **31**, 201 (1917).

⁵⁾ H. **138**, 184 (1924).

⁶⁾ H. **132**, 181 (1923/24).

E. Waldschmidt-Leitz und A. Harteneck¹⁾ eine Erweiterung der dem Enzym zugänglichen Substrate, und zwar in der Richtung der Angreifbarkeit vor allem der genuinen Proteine zur Folge hat, erfordert umgekehrt bei dem pflanzlichen Enzym die Hydrolyse der Proteinabbauprodukte, der Peptone und wohl auch der Polypeptide, eine Ergänzung durch sein Koenzym Cyanwasserstoff. So werden Peptone, sowohl durch peptische wie durch Papainverdauung erhaltene, durch Papain allein nicht angegriffen, aber sie werden in fortschreitender und weitgehender Reaktion durch Papain mit Blausäure gespalten; auch für die Hydrolyse von Tripeptid wird der Aktivator unentbehrlich sein, während einfache Dipeptide wie durch Trypsin, so auch durch Papain-Blausäure nicht angegriffen werden. Die bemerkenswerten Beziehungen, die sich zwischen der Spezifität des Trypsins und der des Papains und dem Einfluß der spezifischen Aktivatoren auf diese zu ergeben scheinen, sind in der nachfolgenden Tabelle 29 in qualitativer Form veranschaulicht. Aus

Tabelle 29.

Spezifität von Papain und Trypsin.

(Angaben bedeuten: — = keine nachweisbare, + = positive,
++ = verstärkte Hydrolyse.)

Enzym	Gelatine	Substrat Pepton	Dipeptid
Papain	+	—	—
Papain + Blausäure	++	+	—
Trypsin + Enterokinase	+	++	—
Trypsin	—	+	—

der Tabelle ergibt sich die Berechtigung einer Gegenüberstellung von Papain mit Trypsin-Enterokinase einerseits und von Papain-Blausäure mit Trypsin andererseits, wenn auch weitere Untersuchungen erweisen mögen, daß eine Gleichstellung je zweier Enzymtypen hinsichtlich ihrer spezifischen Wirkungen nicht statthaft ist; denn die Ausdehnung des spezifischen Wirkungsbereiches bei der Proteolyse, die der Aktivator herbeiführt und deren Richtung für beide Enzyme entgegengesetzt gefunden wird, wird in beiden Fällen auch von verschiedenem Ausmaß sein; dies dürfte schon aus der

¹⁾ H. 149, 203 (1925).

beobachteten verschiedenen Einstellung gegenüber einem Tripeptid hervorgehen, das wohl durch Papain-Blausäure, nicht aber durch Trypsin gespalten wird.

Auch das präparative Verhalten des Papains, nämlich aus dem eingetrockneten Milchsaft von *Carica papaya*, ist von Willstätter und Grassmann geprüft worden, indessen war die erzielte Steigerung der enzymatischen Konzentration auf etwa das Fünffache von der des Ausgangsmaterials nicht sehr erheblich. Bemerkenswert ist das Adsorptionsverhalten des Enzyms, das einer Vorreinigung durch Selbstverdauung des Milchsaftes und Fällung mittels Alkohol unterworfen war; während die Adsorption des Papains an Kaolin von der Reaktion nur wenig beeinflußt zu werden scheint, findet man seine Aufnahme durch Tonerde bei weitem am günstigsten bei alkalischer Reaktion, und das Enzym wird dem Adsorbens durch Einwirkung verdünnter Säure wieder entzogen; die basischen Eigenschaften, die das Enzym oder sein Assoziationsprodukt mit begleitenden Stoffen zu besitzen scheint, werden durch den Zusatz von Alkohol abgeschwächt, der die Adsorption an Tonerde befördert und dessen Wirkung mit der bei Aminosäuren und Peptiden beobachteten Entwicklung der Säurefunktion¹⁾ verglichen werden kann.

Von den Proteasen der höheren Pflanzen sind vor allem noch die Enzyme der ruhenden und gekeimten Samen zu nennen, die die Mobilisierung der pflanzlichen Reserveproteine bewirken; auf ihre besondere Bedeutung für die Auslösung der Fettspaltung in ölhaltigen Samen ist schon bei der Besprechung der Ricinuslipase hingewiesen worden. Am besten untersucht erscheinen die Proteasen des Malzes, in welchen man nach den Untersuchungen von L. Adler²⁾ und H. Lundin³⁾ zwei verschiedene proteolytische Enzyme, eine Protease und eine Peptidase, anzunehmen hat, deren Unterscheidung sich auf ihre p_H -Abhängigkeit gründet. Es ist noch nicht untersucht, ob, wie es wahrscheinlich ist, das protein-spaltende Enzym des Malzes hinsichtlich seiner Spezifität Beziehungen zum Papain aufweist; auch die viel bearbeitete Bildung proteolytischer Enzyme im keimenden Samen, bei welcher man eine besondere Mitwirkung von Sauerstoff angenommen hat, bedarf der Nachprüfung mit verbesserter Methodik, die vor allem den ungenügend beachteten Einfluß der Acidität auszuschalten haben wird.

¹⁾ Vgl. R. Willstätter u. E. Waldschmidt-Leitz, B. **54**, 2988 (1921).

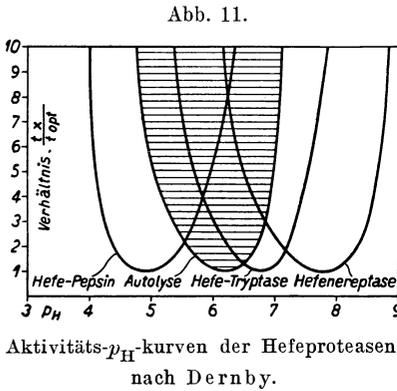
²⁾ Zs. ges. Brauw. **38**, H. 17—20 (1915).

³⁾ Bio. Z. **131**, 193 (1922).

e) Hefeproteasen.

Die Beobachtung, daß bei der Autolyse der Hefe die in ihr enthaltenen Proteine zu löslichen Produkten abgebaut werden, ist schon alt; sie ist zuerst von E. Salkowski¹⁾ auf enzymatische Wirkung zurückgeführt worden. M. Hahn und L. Geret²⁾ haben dann den Nachweis geführt, daß der Preßsaft der Hefe genuine Proteine zu hydrolysieren vermag und daß bei dieser Reaktion große Mengen von Aminosäuren entstehen, während die Abbaustufe des Peptons nicht nachgewiesen werden konnte; sie verglichen daher

den proteolytischen Abbau durch Hefenzym mit dem des Trypsins und nannten das Enzym Endo-Tryptase, obwohl sie bereits die Beobachtung machten, daß die optimale Wirkung des Enzyms, abweichend von der des Trypsins, wie auch die günstigsten Bedingungen des autolytischen Prozesses schwach saurer Reaktion entsprachen. Die Kenntnis der Hefeproteasen ist dann



durch eine neuere, umfangreiche Untersuchung von K. G. Dernby³⁾ wesentlich gefördert worden. Den optimalen Bereich der Autolyse des Hefe-eiweißes fand Dernby bei einem p_H von etwa 6,2, während ihre Grenzen zu $p_H = 4$ bzw. 7 bestimmt wurden. An diesem Vorgang sind nach Dernby drei verschiedene proteolytische Enzyme beteiligt, deren Differenzierung auf Grund ihrer verschiedenen p_H -Abhängigkeit ausgesprochen wird. So wird die Wirkung einer bei $p_H = 4,5$ optimalen Peptidase von der einer Tryptase und einer Peptidase mit dem Wirkungsoptimum bei $p_H = 7,0$ bzw. 7,8 unterschieden, die ersten beiden Enzyme befähigt zur Hydrolyse genuiner Proteine bzw. von Pepton, das dritte Enzym spezifisch eingestellt auf einfache Peptide. Aus dem Ineinandergreifen der Wirkungen dieser drei Enzyme ergibt sich das Bild der Autolyse, deren p_H -Abhängig-

¹⁾ H. **13**, 506 (1889).

²⁾ Z. Biol. **40**, 117 (1900).

³⁾ Bio. Z. **81**, 107 (1917).

keit, wie in Abb. 11 wiedergegeben, aus den Aktivitäts- p_H -kurven der beteiligten Enzyme abgeleitet wird.

Die Annahme dreier verschiedener Hefeproteasen hat sich indessen in neueren Untersuchungen von R. Willstätter und W. Grassmann¹⁾ nicht bestätigen lassen. Man hat vielmehr nur zwei enzymatische Individuen zu unterscheiden, deren präparative Trennung durchgeführt werden konnte, nämlich eine eigentliche Protease vom Typus des Papains, gekennzeichnet durch ein Wirkungsoptimum bei $p_H =$ etwa 5,5, neben einem peptidspaltenden Enzym, dem Hefe-Erepsin. Für die Annahme eines dritten Enzyms, der Tryptase von Dernby, dessen Wirkung z. B. auf Pepton bei $p_H = 7,0$ am günstigsten sein sollte, beläßt die Übereinstimmung der für die Hydrolyse von genuinem Protein wie von Pepton beobachteten Aktivitäts- p_H -kurven bei dem erepsinfreien Enzym keine Stütze, die abweichenden Befunde von Dernby werden auf die Beteiligung des beigemengten peptidspaltenden Enzyms, dessen p_H -Optimum schwach alkalischer Reaktion entspricht, an der Hydrolyse zurückzuführen sein.

2. Peptidasen.

Die peptidspaltenden Enzyme des Tier- und Pflanzenreiches, die von den übrigen Proteasen zu unterscheiden sind, haben als die einfachsten Vertreter proteolytischer Enzyme zu gelten, als die einzigen, deren Wirkung sich auf Substrate bekannter Konstitution beziehen läßt; die exakte Abgrenzung ihrer besonderen Wirkungen von denen der übrigen Proteasen ist indessen erst in neuester Zeit durchgeführt worden. Die Übersichtlichkeit der von diesen Enzymen katalysierten, verhältnismäßig einfachen Reaktionen läßt ihre Untersuchung in besonderem Maße geeignet erscheinen, zur Erkenntnis des Mechanismus proteolytischer Prozesse beizutragen, und es ist zu erwarten, daß ihnen auch bei der Erkennung und Lösung struktureller Fragen in der Proteinchemie eine hervorragende Rolle zufallen wird. Um so auffallender mag es erscheinen, daß dem Studium ihrer Eigenschaften und ihrer Wirkung verhältnismäßig viel weniger Beachtung geschenkt worden ist.

Die wichtigste und am besten untersuchte Peptidase ist das im Jahre 1901 von O. Cohnheim²⁾ entdeckte Erepsin der Darm-

¹⁾ H. 153, 250 (1926).

²⁾ H. 33, 451 (1901).

schleimhaut; seine Auffindung beruhte auf der Beobachtung, daß sowohl mit Pepsin vorverdautes Eiweiß wie auch die durch Trypsin nicht weiter zerlegbaren Eiweißabbauprodukte, die Trypsinpeptide, die W. Kühne¹⁾ zuerst beschrieben hat, unter der Einwirkung von Extrakten der Darmschleimhaut bis zum Verschwinden der Biuretreaktion, also zu Aminosäuren abgebaut wurden. Die besondere Existenz des Darmerepsins, die mehrfach angezweifelt worden war, ist heute völlig erwiesen; aber seine Wirkungen sind nicht sicher genug von denen des pankreatischen Trypsins unterschieden worden, zumal man für die Pankreasdrüse und ihre Sekrete vielfach die nämlichen enzymatischen Wirkungen wahrnahm. Später schrieb man diese indessen einem besonderen ereptischen Enzym in der Pankreasdrüse zu. Die Angaben der älteren Literatur über die besonderen Wirkungen des Darmerepsins, nach welchen man unter seinen spezifischen Substraten die meisten synthetischen Polypeptide sowie die Peptide der peptischen und tryptischen Verdauung und ferner Protamin, Histon und auch Casein zusammenfaßte, haben sich in einer neueren Untersuchung von E. Waldschmidt-Leitz und A. Schöffner²⁾ in mehreren Punkten als unzuverlässig erwiesen; in dem gleichen Sinne ist auch die Unterscheidung der Literatur zwischen den spezifischen Substraten des Pankreastrypsins und des Pankreaserepsins, die man auf Grund der jeweiligen Aktivierbarkeit ihrer Spaltung durch den Trypsinaktivator Entero-kinase vornahm, von E. Waldschmidt-Leitz und A. Harteneck³⁾ mit der Trennung der beiden Enzyme und der Kennzeichnung ihrer Einzelwirkungen widerlegt und richtiggestellt worden. Es hat sich dabei ergeben, daß das enzymatisch einheitliche Erepisin aus Darm wie aus Pankreas spezifisch auf die Hydrolyse gewöhnlicher Peptide und nur auf diese eingestellt ist; weder Pepton der Pepsinverdauung noch Protamin oder Histon noch irgendwelche andere Proteine werden von dem reinen Enzym angegriffen, die Aussagen der Literatur über die Spaltbarkeit solcher Substrate sind vielmehr auf beigemengtes Trypsin zu beziehen, dessen Abtrennung durch fraktionierte Adsorption mittels Tonerde gelingt. Die gleiche Spezifität, die Beschränkung ihrer Wirkung auf die Hydrolyse einfacher, natürlicher oder synthetischer Polypeptide, ist für pflanzliche Peptidase

¹⁾ Virch. Arch. **39**, 130 (1867); Z. Biol. **22**, 450; **28**, 571, **29**, 1, 308.

²⁾ H. **151**, 31 (1925/26).

³⁾ H. **149**, 203 (1925).

zu folgern, z. B. für das Erepsin der Hefe, das von R. Willstätter und W. Grassmann¹⁾ in proteolytisch einheitlicher Lösung erhalten worden ist.

Der qualitative und der quantitative Vergleich der Spezifität von Darm- und Pankreaserepsin, den Waldschmidt-Leitz und Schäffner geprüft haben, hat zu der Feststellung geführt, daß für eine Verschiedenheit der beiden Enzyme, wie sie auf Grund älterer Angaben von E. Fischer und E. Abderhalden²⁾ angenommen worden war, nun keine Anhaltspunkte mehr vorliegen. Es kommt hinzu, daß auch das Adsorptionsverhalten der beiden Enzyme gegenüber Tonerde wie auch die Abhängigkeit ihrer Aktivität von der Wasserstoffzahl übereinstimmend gefunden wird; sie sind also identisch zu betrachten. Diese Schlußfolgerung führt zufolge E. Waldschmidt-Leitz und A. Harteneck³⁾ zu einer weitergehenden physiologischen Fragestellung; es ist nämlich damit zu rechnen, daß die primäre Bildung auch des Darmerepsins sich in der Pankreasdrüse vollzieht und daß seiner Absonderung durch die Darmschleimhaut eine sekundäre Anhäufung in deren Drüsenzellen vorausgeht.

Aus den Untersuchungen von Fischer und Abderhalden hat sich ferner zuerst die bedeutsame Tatsache ergeben, daß die enzymatische Hydrolyse der synthetischen Polypeptide asymmetrisch verläuft; die Beobachtungen, auch der neueren Literatur, stimmen darin überein, daß die Peptidasen nur zur Spaltung der aus den natürlich vorkommenden optischen Antipoden der Aminosäuren aufgebauten Peptide befähigt sind; und in den Racematen der synthetischen Polypeptide unterliegt nur das eine, dem natürlich vorkommenden entsprechende stereische Isomere der Verseifung. Andere beachtenswerte Vergleiche, über die E. Abderhalden und A. H. Koelker⁴⁾ berichtet haben und E. Abderhalden und C. Brahm⁵⁾, betreffen die Spezifität der Reaktionswege bei der Spaltung höherer Peptide durch peptidspaltende Enzyme verschiedener Herkunft; sie haben in einer Reihe von Fällen eine Verschiedenheit des Angriffspunktes tierischer und pflanzlicher Peptidasen, beispielsweise bei der Hydrolyse von Tri- und Tetrapeptiden ergeben.

¹⁾ H. **153**, 250 (1926).

²⁾ H. **46**, 52 (1905).

³⁾ H. **149**, 221 (1925).

⁴⁾ H. **51**, 294 (1907); **54**, 363; **55**, 416 (1908).

⁵⁾ H. **57**, 342 (1908).

Das p_H -Optimum des Darmerepsins haben P. Rona und F. Arnheim¹⁾ sowie K. G. Dernby²⁾ zu 7,8 bestimmt; die Lage des Optimums, die für die Spaltung von Glycyl-glycin nach Dernby bei Darm- und bei Hefeenzym identisch gefunden wird, schwankt nach E. Abderhalden und A. Fodor³⁾ bei dem pflanzlichen Enzym in gewissen Grenzen, nämlich zwischen $p_H = 6,2$ und $p_H = 8,5$, je nach der Natur des angewandten Peptids; E. Waldschmidt-Leitz und A. Schöffner⁴⁾ konnten diese Beobachtung indessen für tierisches Erepsin nicht bestätigen. Auch der Reaktionsverlauf der Peptidhydrolyse scheint sich bei den tierischen und den pflanzlichen Enzymen zu unterscheiden. Während die Untersuchungen von H. v. Euler⁵⁾ sowie von Dernby über die Hydrolyse von Glycyl-glycin durch Darmerepsin zur Aufstellung monomolekularer Reaktionsgleichungen führten, geben Abderhalden und Fodor an, daß der zeitliche Verlauf der Peptidspaltung durch pflanzliches Enzym, aus Hefepreßsaft, in hohem Maße von der Wasserstoffzahl abhängt; ihre Versuche ergaben bei $p_H = 6,3$ direkte Proportionalität zwischen Umsatz und Zeit, während bei $p_H = 7,4$ die Gültigkeit der Gleichung erster Ordnung, bei $p_H = 8,4$ aber der Schützchen Regel beobachtet wurde, unter Bedingungen, unter welchen eine Enzymzerstörung nicht in Frage kam. Dieses Verhalten erinnert an die bei dem rohrzuckerspaltenden Enzym der Hefe beobachteten Erscheinungen wechselnder Kinetik, deren Abhängigkeit von der Acidität durch R. Willstätter, J. Graser und R. Kuhn⁶⁾ beschrieben worden ist. Dieser Einfluß der Wasserstoffzahl gilt indessen nach Waldschmidt-Leitz und Schöffner nicht für die Wirkung des tierischen Erepsins, die der monomolekularen Reaktionsgleichung entspricht; es hat den Anschein, daß der Reaktionsmechanismus von tierischer und von pflanzlicher Peptidase sich unterscheidet, oder daß die Affinität des Hefeerepsins zu seinen Substraten in starkem Maße von Begleitstoffen beeinflusst wird.

Auf dem monomolekularen Verlauf der Peptidhydrolyse und auf der beobachteten Proportionalität zwischen Enzymmenge und Reaktionsgeschwindigkeit beruhen die von Waldschmidt-Leitz

1) Bio. Z. **57**, 84 (1913).

2) Bio. Z. **81**, 107 (1916/17).

3) Fermentf. **1**, 533 (1916).

4) H. **151**, 31 (1925/26).

5) H. **51**, 213 (1907).

6) H. **123**, 1, und zwar S. 63 (1922).

und Schöffner¹⁾ vorgeschlagenen Maße für Menge und Konzentration des Erepsins; als „Erepsin-Einheit (Er.-E.)“ ist das 1000fache derjenigen Enzymmenge gewählt, für welche sich unter den Bedingungen der Bestimmung die Reaktionskonstante 0,001 ergibt, während der „Erepsin-Wert (Er.-W.)“ als Maß der enzymatischen Konzentration durch die Anzahl Erepsin-Einheiten in 1 cg des Präparates gegeben ist.

Die präparative Reinigung des Erepsins, die Waldschmidt-Leitz und Schöffner an dem Enzym der Darmschleimhaut angestrebt haben, wird in ihrem Erfolg beeinträchtigt durch die überaus geringe Beständigkeit des Enzyms, für dessen Extraktion aus der Schleimhaut nur glycerinhaltige Mittel, die stabilisierend wirken, sich eignen. Die Adsorption des Enzyms an Tonerde, die, beispielsweise aus den mittels Fällung durch Essigsäure vorgereinigten Auszügen, in saurer Lösung sich glatt vollzieht, hat in erster Linie eine analytische Bedeutung, da sie die Abtrennung der mit dem Enzym stets vergesellschafteten tryptischen Verunreinigungen bewirkt, die in den Mutterlaugen der Adsorption zurückbleiben; sie hat die Erkenntnis der spezifischen Wirkungen des Erepsins entscheidend gefördert.

Über die Eigenschaften und die besonderen Wirkungen der in vielen anderen tierischen Organen und Geweben sowie in pflanzlichem Material aufgefundenen Peptidasen fehlen noch nähere Untersuchungen.

Zur Einteilung der Proteasen.

Es finden sich in der neueren Literatur mehrere Versuche, eine rationelle Einteilung der verschiedenen proteolytischen Enzyme nach ihrer Wirkungsart vorzunehmen. Während J. H. Northrop²⁾, wie schon erwähnt, eine Klassifizierung der Proteasen nach dem Ionisierungszustand der mit ihnen in Reaktion tretenden Protein-Teilchen vornimmt, hat K. G. Dernby³⁾ zwischen primären und sekundären Proteasen, entsprechend den Typen des Pepsins und Trypsins, und C. Oppenheimer⁴⁾ zwischen Pepsinasen und Trypsinasen unterschieden. Diese Unterscheidungen, deren Berechtigung

¹⁾ a. a. O.; siehe dazu E. Waldschmidt-Leitz und A. Harteneck, H. 147, 286, und zwar S. 295 (1925).

²⁾ Naturw. 11, 713 (1923).

³⁾ Bio. Z. 133, 432 (1922).

⁴⁾ Ebenda 136, 140 (1923).

in erster Linie aus den verschiedenen, für die Enzymwirkungen beobachteten optimalen Aciditätsverhältnissen abgeleitet wurde, werden nach den neueren Erkenntnissen über die spezifische Einstellung der Proteasen zu erweitern und in chemischem Sinne zu vertiefen sein; hat doch die Nutzenanwendung der insbesondere von R. O. Herzog¹⁾ sowie durch E. Abderhalden²⁾ vertretenen Vorstellungen vom Aufbau der Proteine als polymerer, aus einfachen Grundkörpern zusammengesetzter Gebilde dazu geführt, daß die Wirkungen sowohl des Pepsins wie des Trypsins in erster Linie als desaggregierende verstanden und daß den beobachteten, in dem strukturellen Aufbau ihrer spezifischen Substrate begründeten Affinitätsunterschieden nur untergeordnete Bedeutung beigemessen wurde³⁾.

Die Hydrolyse der höhermolekularen Proteine ist nämlich zufolge den Angaben der Literatur⁴⁾ durch keine der aus nur zwei Komponenten bestehenden möglichen Kombinationen von Pepsin, Trypsin und Erepsin vollständig; und in den einfachsten Fällen, für den Abbau der Protamine, erweist sich nur das Pepsin als entbehrlich. Die Folgerung verschiedener Angriffspunkte und verschiedener Reaktionswege ist daher nach E. Waldschmidt-Leitz und A. Harteneck⁵⁾ mit der Feststellung zu ergänzen, daß für eine gegenseitige unmittelbare Vertretbarkeit dieser Enzyme bis heute keine Anhaltspunkte vorliegen, und daß ihr Angriff auf spezifische Strukturen zu beziehen sein wird. So haben die neuen Erkenntnisse über die Spezifität der tierischen Proteasen in der Untersuchung von Waldschmidt-Leitz und Harteneck zu einer Unterscheidung von vier Typen proteolytischer Enzyme geführt. Zur ersten Gruppe, den Peptidasen, gehört das Erepsin, als dessen spezifische Substrate einfache Peptide, z. B. Di- oder Tripeptide zu gelten haben; eine zweite Gruppe umfaßt die Enzyme vom Typus des nichtaktivierten Trypsins, dessen Wirkungen zwar nachgewiesen, aber noch nicht mit einem streng spezifischen Substrat gekennzeichnet werden konnten; für die dritte Gruppe wäre das

¹⁾ Naturw. **11**, 172 (1923).

²⁾ Ebenda **12**, 716 (1924).

³⁾ Siehe dazu G. Oppenheimer, Die Fermente und ihre Wirkungen, 5. Auflage, Leipzig 1925, 2. Band, S. 811 und 890.

⁴⁾ Vgl. E. Fischer und E. Abderhalden, H. **39**, 81; **40**, 215 (1903); V. Henriques und J. K. Gjaldbaek, H. **75**, 363 (1911).

⁵⁾ H. **149**, 203, und zwar S. 213 (1925).

aktivierte Trypsin, also das System Trypsin + Enterokinase als charakteristischer Vertreter anzusehen, für die vierte Gruppe endlich das Pepsin, deren spezifische Wirkungen zwar noch nicht mit Sicherheit zu beschreiben, aber voneinander zu unterscheiden sind¹⁾. Einer solchen Einteilung dürften auch die Erfahrungen entsprechen, über die R. Willstätter und W. Grassmann²⁾ hinsichtlich der spezifischen Wirkungen eines pflanzlichen Enzyms, des Papains, berichtet haben und nach welchen das nichtaktivierte Papain der dritten, seine Blausäureverbindung dagegen der zweiten Gruppe proteolytischer Enzyme zuzuordnen wäre. Es ist indessen nicht zweifelhaft, daß die weniger streng spezifizierten Enzyme aus dem Pflanzenreiche oder von niederen Organismen sich dem oben gegebenen Schema nicht in allen Fällen einfügen werden und daß ihre Wirkungen die von Vertretern aus mehreren der unterschiedenen Gruppen zugleich umfassen können; aber die deutlich erkennbare Differenzierung, die der Organismus der höheren Tiere für den stufenweisen Abbau der Eiweißkörper mittels spezifisch wirkender enzymatischer Individuen ausgebildet hat, läßt die strengere Unterscheidung dieser vier beschriebenen Typen als erforderlich und als nützlich erscheinen, zumal sie beachtenswerte Rückschlüsse gestattet auf strukturelle Besonderheiten ihrer spezifischen Substrate. Zwar ist die Natur der für den Angriff der Enzyme aus den drei letzten Gruppen von Proteasen spezifischen Strukturen noch nicht erkennbar, aber die Erfahrungen, die über die auswählende Wirkung dieser Enzyme vorliegen, führen zu dem Schlusse, daß sie sowohl vom Typus der einfachen Peptide als auch unter sich verschieden sein werden. Es ist noch nicht sicher zu beurteilen, ob der Unterschied in der Spezifität, beispielsweise von Trypsin und Erepsin, sich etwa nur auf die Abspaltung gewisser besonderer Proteinbausteine bezieht; er ließe sich dann etwa dem streng ausgeprägten Spezifitätsunterschiede zwischen Peptidasen einerseits und Aminoacylasen andererseits vergleichen, deren Wirkungen zwar in beiden Fällen in der Lösung von Säureamidbindungen zum Ausdruck kommt, aber in ausgesprochener Abhängigkeit von der Natur der beteiligten Komponenten. Weniger wahrscheinlich dürfte die Annahme sein, daß die spezifische Wirkung der eigentlichen Proteasen sich auf Sprengung von Säureamidbindungen in besonderen zyklischen Strukturen bezieht.

¹⁾ Vgl. C. Oppenheimer, a. a. O., S. 839.

²⁾ H. 138, 184, und zwar S. 204 (1924).

III. Aminoacylasen.

Zur Gruppe der Aminoacylasen, die in ihrer Spezifität von den Peptidasen streng zu unterscheiden sind, zählen einige wichtige Enzyme, für welche als gemeinsames Kennzeichen die Hydrolyse acylierter Amine oder Aminosäuren gelten darf, deren einzelne Vertreter indessen wieder unter sich durch besondere Wirkungen, beispielsweise die Spaltung von Acyl-Aminosäuren oder die Hydrolyse von Harnstoff und von Guanidinderivaten, unterschieden werden.

Die nachfolgende Besprechung wird sich im wesentlichen auf die Beschreibung der drei wichtigsten Enzyme dieser Gruppe, Histozym, Arginase und Urease, beschränken.

1. Histozym.

Die Fähigkeit der Niere zur Synthese und zur Spaltung benzoylierter Aminosäuren, beispielsweise der Hippursäure, des Benzoylglykokolls, ist von O. Schmiedeberg¹⁾ auf die Wirkung eines besonderen Enzyms, des Histozyms, zurückgeführt worden. Man hat dieses Enzym dann auch in der Leber und im Muskel der Säugetiere aufgefunden und es ist besonders von C. Neuberg²⁾ auch in dem Schimmelpilz *Aspergillus oryzae* beschrieben worden; am beträchtlichsten ist sein Vorkommen nach R. Willstätter, E. Waldschmidt-Leitz und J. Waldschmidt-Graser³⁾ in der Niere vor allem von Hund und Katze, während der Enzymgehalt der Leber dagegen stark zurücktritt. Die Wirkung des Histozyms beschränkt sich auf die Abspaltung der Säurereste in acylierten Aminosäuren und Peptiden, beispielsweise der Zerlegung von Benzoylalanin, Benzoyl-glycyl-glycin, Phenacetursäure oder auch Glykocholsäure, während die eigentliche Peptidbindung z. B. im Glycyl-glycin unangegriffen bleibt. Die optische Spezifität des Enzyms, die zuerst von J. A. Smorodinzew⁴⁾ am Beispiel des Benzoylleucins beschrieben worden ist, fanden Willstätter, Waldschmidt-Leitz und Waldschmidt-Graser unabhängig von der

1) Virch. Arch. **14**, 288, 379 (1881).

2) Bio. Z. **145**, 186; **147**, 370, 372 (1924).

3) Noch unveröffentlicht.

4) H. **124**, 123 (1922).

Herkunft des Enzyms so ausgeprägt, daß fast in allen Fällen nur die Derivate der natürlich vorkommenden Aminosäureantipoden gespalten wurden; C. Hoppert¹⁾ hat daher die Anwendung des Enzyms zur Spaltung racemischer Aminosäuren empfohlen. Die Hydrolyse der Hippursäure durch Hystozym folgt nach N. Mutch²⁾ der Reaktionsgleichung erster Ordnung, sie verläuft bis zu einem Gleichgewicht entsprechend einer Spaltung von etwa 97 Proz.; die fermentative Synthese der Hippursäure ist indessen noch nicht mit Sicherheit experimentell durchgeführt worden.

Bemerkenswert ist das Löslichkeitsverhalten des tierischen Enzyms, das zufolge Willstätter, Waldschmidt-Leitz und Waldschmidt-Graser mit der untersuchten Tierart wechselt; so findet man das Enzym aus der Hundeniere vollständig, aus der Schweiniere nur teilweise, aus der Pferdiniere aber gar nicht löslich in wässrigen Mitteln oder in Glycerin, eine Erscheinung, die nicht mit der Annahme absolut verschiedener enzymatischer Individuen, sondern mit einer verschieden festen Bindung des Enzyms an unlösliche Begleitstoffe zu deuten sein wird.

Es ist noch nicht untersucht, ob das Hystozym bei der Umwandlung der Harnsäure in Allantoin, die sich aus einem hydrolytischen und einem oxydativen Teilvorgang zusammensetzen wird, und die man bisher auf ein einheitliches urikolytisches Enzym in der Niere zurückführen zu können glaubte, beteiligt ist. Diese Vorstellung erscheint um so naheliegender, als nach den Beobachtungen von W. Wiechowski³⁾ in der menschlichen Niere zwar Harnsäure zerstört, aber kein Allantoin gebildet wird, eine Erscheinung, die durch das Fehlen des spezifischen oxydierenden Enzyms in diesem Falle erklärt werden mag.

2. Arginase.

Die Arginase ist als ein spezifisch auf Arginin eingestelltes Enzym zuerst von A. Kossel und H. D. Dakin⁴⁾ in der Leber aufgefunden und beschrieben worden; seine Wirkung besteht in der Zerlegung des Arginins, der Guanido-amino-valeriansäure, in die

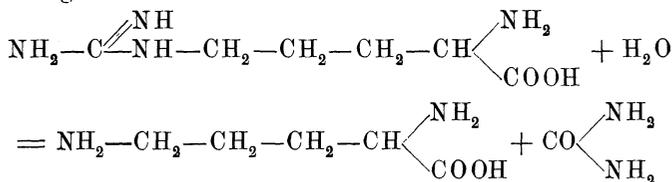
1) Bio. Z. **149**, 510 (1924).

2) J. of Physiol. **44**, 176 (1912).

3) Hofm. Beitr. **9**, 246, 295 (1907).

4) H. **41**, 321; **42**, 181 (1904).

Diaminovaleriansäure oder Ornithin und in Harnstoff nach der Gleichung



Dem Vorkommen und der quantitativen Bestimmung der Arginase hat S. Edlbacher¹⁾ eine Reihe von Untersuchungen gewidmet. Es hat sich dabei ergeben, daß das Enzym in der Leber der Säugetiere, nicht dagegen der Vögel, aber in Niere und Hoden aller untersuchten Tiere in reichlicher Menge sich findet, während es in den Ovarien fast ganz zu fehlen scheint. Aus der Tatsache, daß der Arginasegehalt der Organe männlicher Tiere den der weiblichen stets weit übertraf, ergab sich die Schlußfolgerung, daß die männlichen Individuen einen gegenüber den weiblichen stark gesteigerten hydrolytischen Argininsatz besitzen und daß der Argininstoffwechsel zur Sexualität in Beziehung zu stehen scheint, zumal es sich zeigen ließ, daß die Arginasebildung mit erwachender Geschlechtsreife einen starken Impuls erfährt. Diese Beziehungen zwischen Sexualität und Arginasegehalt mögen verständlich werden, wenn man bedenkt, daß im Sperma argininreiche basische Proteine überwiegen, daß daher der Organismus zur Zeit der Geschlechtsreife eine gesteigerte Menge des argininumsetzenden Enzyms benötigen wird. Auch in Pflanzen ist die Arginase zufolge A. Kiesel²⁾ weit verbreitet.

Zur Bestimmung der Arginasewirkung ist von S. Edlbacher³⁾ und von A. Clementi⁴⁾ die Anwendung der Formoltitration nach Sørensen empfohlen worden, welche die frei werdende Aminogruppe des Ornithins zu bestimmen gestattet, während der gleichfalls gebildete Harnstoff nicht mit Formaldehyd reagiert. Ein anderes Verfahren, dessen sich in neuerer Zeit A. Hunter und J. A. Dauphinée⁵⁾ sowie Edlbacher und Bonem⁶⁾ zur Messung

¹⁾ S. Edlbacher und P. Bonem, H. **145**, 69 (1925); S. Edlbacher und H. Röthler, H. **148**, 264, 273 (1925).

²⁾ H. **60**, 460 (1909); **118**, 267 (1922).

³⁾ H. **95**, 81 (1915); **100**, 111 (1917).

⁴⁾ R. Acc. Linc. **23**, 517, 612 (1914).

⁵⁾ Proc. Roy. Soc. **97**, 209, 227 (1924).

⁶⁾ a. a. O.

der Enzymwirkung bedient haben, beruht auf der quantitativen Zerlegung des frei gewordenen Harnstoffs durch Urease und auf der kolorimetrischen oder auch titrimetrischen Ermittlung der entstandenen Menge Ammoniak. Diese Methode dürfte den Vorzug verdienen, da sie die Wirkung der Arginase neben der Wirkung proteolytischer Enzyme, z. B. in Enzympräparaten, die der Selbstverdauung unterliegen, zu erfassen gestattet. Die Abhängigkeit der Arginasewirkung von der Wasserstoffzahl ist von Hunter und Dauphinée und von Edlbacher und Bonem geprüft und das Optimum der Hydrolyse bei $p_H = 9,5$ bis $9,9$ beobachtet worden, entsprechend der Alkalität einer verdünnten Lösung von kohlensaurem Arginin. Die Zerlegung des Arginins, deren Verlauf nach R. E. Gross¹⁾ infolge der stark hemmenden Wirkung des Ornithins einem beträchtlichen Absinken der monomolekularen Reaktionskonstante entspricht, ist unter optimalen Bedingungen fast vollständig. Die von S. Edlbacher und H. Röthler²⁾ als Maß der Enzymmenge vorgeschlagene Einheit gründet sich auf die empirisch ermittelten Beziehungen zwischen Enzymmenge und Umsatz; als „Arginase-Einheit (A.-E.)“ ist nämlich diejenige Enzymmenge bezeichnet, welche 10 ccm einer 1 proz. Lösung von Arginin-carbonat in 60 Minuten bei 38° und $p_H = 9,5$ unter Bildung einer Harnstoffmenge zerlegt, die bei der Einwirkung von Urease 0,34 mg Ammoniak (entsprechend 1,0 ccm 0,02 n) ergibt. Die unter den angegebenen Bedingungen der Bestimmung beobachteten Beziehungen zwischen Arginasemenge und Umsatz, die einer Abnahme der relativen Reaktionsgeschwindigkeit mit steigender Enzymmenge entsprechen, stimmen für das Enzym fast aller tierischer Organe überein; nur in einem besonderen Falle, für die Arginase der Hühnerniere, ergab die Untersuchung direkte Proportionalität zwischen Enzymmenge und Umsatz, so daß für diesen Fall die Aufstellung einer besonderen Enzymeinheit für notwendig erachtet wurde. Diese bemerkenswerte Erscheinung ist auf das Fehlen eines spezifischen, die enzymatische Affinität beeinflussenden Hemmungskörpers zurückgeführt worden, dessen Gegenwart auch den Reaktionsverlauf entstellen dürfte; sie erinnert an die Beobachtungen über den Einfluß begleitender Stoffe auf die Affinität der Hefesaccharase, über die R. Kuhn³⁾ berichtet hat.

¹⁾ H. **112**, 236 (1920/21).

²⁾ a. a. O.

³⁾ H. **125**, 28 (1922/23).

Die Prüfung der spezifischen Wirkungen der Arginase ergibt nach Edlbacher und Bonem, daß nur das natürlich vorkommende rechtsdrehende Arginin gespalten wird und daß andere Guaninderivate, wie Guanidinessigsäure oder Guanidinpropionsäure, nicht angegriffen werden. Aus der Beobachtung, daß sowohl der Methyl-ester des Arginins wie die decarboxylierte Aminosäure, das Agmatin, gar nicht und in dem Dipeptid Arginylarginin nur die eine Hälfte des Moleküls der Hydrolyse unterliegt, ist ferner die Folgerung abgeleitet worden, daß nur diejenigen Argininmoleküle gespalten werden, welche eine freie Carboxylgruppe tragen.

Es dürfte für die enzymatische Forschung eine reizvolle Aufgabe sein, die Verschiedenheit von Arginase und Histozyim, die angenommen wird, aber noch nicht sichergestellt erscheint, mit exakter Methodik nachzuprüfen, oder aber eine Identität der beiden Enzyme zu erweisen, die auf Grund der Übereinstimmung ihres Vorkommens nicht ohne weiteres auszuschließen wäre.

3. Urease.

Die Beobachtungen über eine bakterielle Zersetzung des Harnstoffs im Harn in Ammoniak und Kohlensäure, die schon sehr weit zurückreichen, haben in der Diskussion der Liebigschen und der Pasteurschen Ansichten über das Wesen der Fermentation eine wichtige Rolle gespielt; die Isolierung des wirksamen Enzyms, der Urease, aus bakteriellem Material, an dem man seine Wirkung früher allein beschrieben hatte, ist aber erst verhältnismäßig spät gelungen¹⁾. Auch ist man erst viel später auf die allgemeine Verbreitung der Urease in der Pflanzenwelt aufmerksam geworden, für deren Eiweißstoffwechsel dem Enzym insofern eine besondere Bedeutung zukommt, als es durch die Zerlegung des intermediär gebildeten Harnstoffs, der nicht ausgeschieden wird, für die Nutzbarmachung und Bereitstellung des zur Eiweißsynthese benötigten Stickstoffs in Form von Ammoniak gebraucht wird. So hat man das Vorkommen in den eiweißhaltigen Pflanzensamen, vor allem der Leguminosen, am beträchtlichsten gefunden; insbesondere die Samen der Sojabohne, *Glycine hispida*, in denen das Enzym zuerst von T. Takeuchi und R. Jonone²⁾ beschrieben wurde und denen es durch wässrige Mittel leicht entzogen werden

¹⁾ Siehe dazu M. Jakoby, *Bio. Z.* 84, 354 (1917).

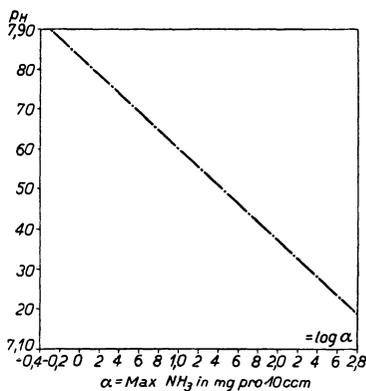
²⁾ *Jl. of the Colleg. of Agric. Imper. Univ. Tokyo* 1, 1 (1909).

kann, haben sich als geeignetes Ausgangsmaterial zu seiner Darstellung und Untersuchung erwiesen. In der Tierwelt findet sich das Enzym nur ganz vereinzelt und in geringen Mengen.

Die einzige bekannte Reaktion, die die Urease beschleunigt, ist die Spaltung des Harnstoffs in Ammoniak und Kohlensäure, zu deren Messung nach St. Lövgren¹⁾ unter der großen Anzahl der angewandten Methoden die Bestimmung des unangegriffenen Substrats mittels Xanthidrol nach R. Fosse²⁾ und die Titration des abgespaltenen Ammoniaks am genauesten sind. Die für die Ureasewirkung optimale Wasserstoffzahl, die D. D. van Slyke und G. Zacharias³⁾ zu $p_H = 7,0$ bestimmten, findet man nach St. Lövgren⁴⁾ abhängig von der Konzentration des Harnstoffs, indem gleiche prozentische Änderungen der Harnstoffkonzentration gleiche prozentische Änderungen des p_H -Optimums zur Folge haben. Diese wichtigen Beobachtungen sind in Abb. 12 veranschaulicht, die das p_H -Optimum der Urease in Abhängigkeit von der Harnstoffkonzentration, ausgedrückt durch die maximal möglichen Mengen NH_3 , darstellt.

Dieser Befund, der im Gegensatz zu der für die Saccharasewirkung geltenden Beobachtung der Unabhängigkeit von p_H -Einfluß und Substratkonzentration steht, mag für das Verständnis der Ureasewirkung besondere Bedeutung erlangen. Die aus der wiedergegebenen Kurve ersichtliche Zunahme der optimalen Wasserstoffzahl bei fallender Substratkonzentration scheint die natürliche Aufgabe des Enzyms zu erleichtern, bei dessen Wirkung die Alkalität unter dem Einfluß des gebildeten Ammoniumcarbonats in dem Maße steigt, wie die Harnstoffkonzentration zurückgeht; bei

Abb. 12.



p_H -Abhängigkeit der Urease
und Harnstoffkonzentration.

¹⁾ Bio. Z. **119**, 215 (1921).

²⁾ C. r. **158**, 1076, 1432 (1914); Soc. Biol. **77**, 129 (1914).

³⁾ JI. Biol. Chem. **19**, 181 (1914).

⁴⁾ Bio. Z. **137**, 206 (1923).

der stark ausgeprägten p_{H} -Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität würde der Umsatz ohne eine Verschiebung des Optimums in der beobachteten Richtung eine noch stärkere Verminderung aufweisen.

Die durch das frei werdende Ammoniak bedingte beträchtliche p_{H} -Änderung des Reaktionsgemisches erfordert zur Aufrechterhaltung konstanter Wasserstoffzahl die Anwendung höherer Pufferkonzentrationen, die jedoch andererseits nach van Slyke und Zacharias die Reaktionsgeschwindigkeit erheblich herabsetzen. Auf eine ungenügende Berücksichtigung des p_{H} -Einflusses sind zufolge P. Rona und P. György¹⁾ im wesentlichen auch die zahlreichen Angaben der Literatur über spezifische Aktivierungen der Urease zurückzuführen, die zuerst von N. Onodera²⁾ mit der Existenz eines besonderen Co-Enzyms erklärt wurden und die von M. Jakob³⁾ der Wirkung besonderer „Auxo-Ureasen“, nämlich von Aminosäuren und Bestandteilen des Serums, zugeschrieben werden; es ist leicht verständlich, daß die Gegenwart solcher amphoterer Stoffe die p_{H} -Änderung des enzymatischen Reaktionsgemisches abzuschwächen und damit den Umsatz zu steigern vermag. Auch die Beobachtungen der Literatur über die Abhängigkeit des Umsatzes von der Substratkonzentration scheinen in manchen Fällen durch eine unzureichende Beachtung der p_{H} -Wirkungen entstellt zu sein. Während aus den Untersuchungen von H. E. Armstrong und E. Horton⁴⁾ sowie von D. H. Wester⁵⁾ die Unabhängigkeit des absoluten Umsatzes von der angewandten Harnstoffmenge, wenigstens innerhalb gewisser Grenzen, hervorzugehen scheint, haben D. D. van Slyke und G. E. Cullen⁶⁾ den Nachweis geführt, daß bei Einhaltung konstanter Acidität, wie sich aus der nachfolgenden Tabelle 30 ergibt, in verdünnten Harnstofflösungen mit der Steigerung der Anfangskonzentration eine absolute Zunahme der in gleichen Zeiten umgesetzten Substratmengen bis zu einem maximalen Werte eintritt; aus den nachfolgenden Zahlen ist die Dissoziationskonstante der Urease-Harnstoffverbindung zu etwa 0,025 abgeleitet worden.

¹⁾ Bio. Z. **111**, 115 (1920).

²⁾ Biochem. J. **9**, 544 (1915).

³⁾ Bio. Z. **74**, 105 (1916); **114**, 152 (1921).

⁴⁾ Proc. Roy. Soc. **85**, 109 (1912).

⁵⁾ Ber. d. Deutsch. pharm. Ges. **30**, 163 (1920).

⁶⁾ J. Biol. Chem. **19**, 141 (1914).

Tabelle 30.

Umsatz und Substratkonzentration nach van Slyke und Cullen.

Harnstoffkonzentration Mol.	Gefunden Milligramm NH ₃ nach 60 Min.	$k = \frac{10^4}{t} \log \frac{a}{a-x}$	$a \cdot k$
0,006 25	0,99	45	1,4
0,012 5	1,77	39	2,5
0,025	2,64	27	3,4
0,05	3,60	17,3	4,3
0,1	4,22	9,6	4,8
0,2	4,59	5,1	5,1
0,4	4,85	2,6	5,2
0,8	5,27	1,8	7,2
1,6	5,27	0,7	5,6

Für den Reaktionsverlauf der Harnstoffzerlegung durch Urease, der oft untersucht worden ist, hat sich eine einfache Gesetzmäßigkeit noch nicht aufstellen lassen. Van Slyke und Cullen, die die enzymatische Reaktion in zwei Teilvorgänge mit verschiedener Reaktionsgeschwindigkeit, nämlich in die Bildung und in den Zerfall der Urease-Harnstoffverbindung zerlegten, haben zwar die Reaktionsgeschwindigkeit auf die Summe einer linearen und einer logarithmischen Funktion des Umsatzes zurückgeführt; allein diese Annahme, die ähnlich schon von V. Henri¹⁾ für den Reaktionsverlauf der enzymatischen Rohrzuckerhydrolyse ausgesprochen war, haben spätere experimentelle Untersuchungen von H. P. Barendrecht²⁾ und von St. Lövgren³⁾ nicht bestätigen können. So hat insbesondere Lövgren erwiesen, daß der Reaktionsverlauf entgegen den älteren Angaben von H. E. Armstrong, M. S. Benjamin und E. Horton⁴⁾ wenigstens für den Anfangsbereich des Umsatzes der Gleichung erster Ordnung folgt und daß das Produkt aus Substratkonzentration und Reaktionsgeschwindigkeit in gewissen Grenzen konstant gefunden wird, während man für diese Größe innerhalb eines einzelnen Versuchs je nach der angewandten Substratkonzentration einen verschiedenen Gang beobachtet. Diese Erscheinung, die aus der nachfolgenden Tabelle 31 ersichtlich ist, ist von St. Lövgren mit der Veränderung der p_H -Abhängigkeit

¹⁾ C. r. **115**, 916 (1902).

²⁾ Rec. trav. chim. **39**, 1 (1920).

³⁾ Bio. Z. **119**, 215 (1921).

⁴⁾ Proc. Roy. Soc. B **86**, 328 (1913).

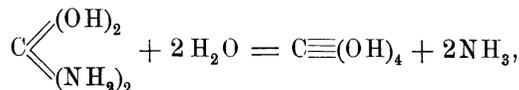
des Enzyms bei Abnahme der Harnstoffkonzentration, wie sie im Verlauf eines Versuchs erfolgt, erklärt worden; es wird danach für die Erkenntnis des Mechanismus der Ureasewirkung von Bedeutung sein, die Untersuchung des enzymatischen Reaktionsverlaufs nicht bei konstant, sondern bei optimal gehaltener Wasserstoffzahl vorzunehmen.

Tabelle 31.
Reaktionsverlauf und Harnstoffkonzentration
nach Lövgren.

Substrat- konzentration Mol.	a . k		Mittelwert (korrigiert)
	anfangs	zu Ende	
0,00625	11	13	15
0,0125	16	17	21
0,025	21	29	31
0,05	31	41	37
0,1	34	44	43
0,2	34	34	35
0,2	39	39	39
1,6	38	27	36

Da diese Beziehung, die der Reaktionsgleichung $k = \frac{a}{t} \ln \frac{a}{a-x}$ entspricht, sich indessen nur innerhalb enger Grenzen als gültig erwiesen hat, ist von Lövgren der Versuch unternommen worden, eine allgemeine, rein empirisch ermittelte Zeitgleichung für die Ureasewirkung aufzustellen, deren Anwendbarkeit für den Vergleich verschiedener Enzympräparate jedoch fraglich erscheint.

Über den Mechanismus der Ureasewirkung sind verschiedene Ansichten geäußert worden, die jedoch experimentell in keinem Falle genügend gestützt erscheinen. So ist von H. E. Armstrong und E. Horton¹⁾ eine direkte Zerlegung des Harnstoffs in hydratisierter Form entsprechend



von W. R. Fearon²⁾ die Bildung von Cyansäure und Ammoniak als Zwischenstufe angenommen worden. Während sich in den

¹⁾ Proc. Roy. Soc. B **85**, 109 (1912); **86**, 328 (1913).

²⁾ Biochem. J. **17**, 84 (1923).

Untersuchungen mehrerer Autoren die Angabe findet, daß die Hydrolyse des Harnstoffs praktisch vollständig verlaufe und daß ein Gleichgewicht nicht zu beobachten sei, haben E. Mack und D. S. Villars¹⁾ sowie H. Kay²⁾ auch über geringe synthetische Wirkungen der Urease in konzentrierten Lösungen von carbaminsaurem Ammonium berichtet, die zur Ausbildung eines Gleichgewichtes führen sollen.

Systematische Versuche zur Reinigung des Enzyms mit modernen Mitteln sind noch nicht unternommen worden. Die meisten Untersuchungen haben sich darauf beschränkt, die Urease aus den entfetteten Samen der Sojabohne oder anderer Leguminosen mit wässrigen Mitteln in Lösung überzuführen und sie daraus durch Zusatz von Alkohol oder Aceton wieder niederschlagen. Es ist nicht sicher zu beurteilen, ob das Enzym, dessen Beständigkeit in wässriger Lösung nicht sehr beträchtlich zu sein scheint, bei seiner Ausfällung mit wasserentziehenden Mitteln nicht, ähnlich vielen anderen Enzymen, erheblich geschädigt wird. Zusatz von Glycerin soll nach B. C. P. Jansen³⁾ die Haltbarkeit wässriger Lösungen des Enzyms, so wie es bei einer Reihe tierischer Enzyme beobachtet worden ist, beträchtlich erhöhen, während es die enzymatische Wirkung schon in geringerer Konzentration zu hemmen scheint. Über das Verhalten der Urease gegenüber Adsorptionsmitteln liegen noch keine Angaben vor; man darf indessen von solchen Untersuchungen erwarten, daß sie eine endgültige Entscheidung über das Vorhandensein besonderer Aktivatoren herbeiführen werden.

IV. Carbohydrasen.

Unter den kohlehydratspaltenden Enzymen, deren Wirkung sich auf die Lösung glucosidischer Bindungen bezieht, hat man zwei große Gruppen zu unterscheiden, nämlich die Hexosidasen, welche die Spaltung der einfachen Saccharide und Glucoside katalysieren, und die Polyasen, die den Abbau der höheren Kohlehydrate, beispielsweise von Stärke oder Glykogen, bewirken. Eine dritte, für spezifisch gehaltene Gruppe von Enzymen, deren Wirkung in der Aufspaltung glucosidischer Bindungen in den Nucleinsäuren und

¹⁾ Am. Soc. **45**, 501 (1923).

²⁾ Biochem. J. **17**, 277 (1923).

³⁾ Chem. Weekbl. **12**, 483 (1915).

ihren Abbauprodukten besteht, ist noch zu wenig untersucht, um ein abschließendes Urteil über ihre besondere Existenz zu gewährleisten.

1. Hexosidasen.

a) Fructosidasen: Saccharase.

Das rohrzuckerspaltende Invertin oder die Saccharase, wie sie sich in der Hefe oder im Darm findet, kann als das bestuntersuchte Enzym überhaupt angesehen werden, als das Enzym, über dessen Eigenschaften und über dessen Wirkungsweise wir die eindringendsten Kenntnisse besitzen. Zu dieser besonderen Stellung des Invertins mag neben der einfachen analytischen Methode, mit der seine Wirkung gemessen wird und die auf der polarimetrischen Bestimmung der Drehungsänderung von Rohrzuckerlösungen beruht, der Umstand beigetragen haben, daß seine verhältnismäßig große Beständigkeit seine präparative Verarbeitung erleichtert und daß die weitgehende Unabhängigkeit seiner Wirkung von begleitenden Stoffen das Enzym zur Beschreibung der enzymatischen Reaktionsweise besonders geeignet erscheinen läßt. So sind im allgemeinen Teil dieses Buches bereits die wichtigsten Erkenntnisse, die über die Kinetik und den Reaktionsmechanismus der Enzymwirkung wie über eine Reihe besonderer, bei enzymatischen Reaktionen geltender Einflüsse gewonnen worden sind, gerade am Beispiel der Saccharase besprochen und veranschaulicht worden; es mag sich daher erübrigen, an dieser Stelle auf die Kinetik der enzymatischen Rohrzuckerhydrolyse und ihre Abhängigkeit von äußeren Faktoren, wie der Wasserstoffzahl, den Reaktionsprodukten oder anderen affinitätsbeeinflussenden Stoffen, nochmals einzugehen.

Die folgenden Ausführungen sollen vielmehr in erster Linie einer Charakterisierung des präparativen Verhaltens der Saccharase und einer Kennzeichnung ihrer besonderen Eigenschaften gelten, so wie sie aus den Untersuchungen der letzten Jahre vor allem der Willstätterschen und der Eulerschen Schule hervorgeht; es wird für diesen Zweck hinreichend sein, die präparative Beschreibung des Enzyms mit einer Erörterung der verschiedenen für die Menge und den Reinheitsgrad der Saccharase angewandten Maße einzuleiten.

Ein einigermaßen exakter Ausdruck für den Reinheitsgrad des Invertins ist zum erstenmal von C. O'Sullivan und F. W. Tomp-

son¹⁾ aufgestellt worden; diese Forscher charakterisierten ein Enzympräparat durch den „Zeit-Wert“, d. i. diejenige Zeit in Minuten, welche 0,05 g eines Präparates benötigen, um bei 15,5° 4,0 g Rohrzucker in 25 ccm Lösung, welche 1 Proz. NaH₂PO₄ enthält, bis zur Nulldrehung gegenüber Natriumlicht zu invertieren, also bis zu einer Hydrolyse von 75,75 Proz.; der Zeit-Wert sinkt also mit zunehmender enzymatischer Konzentration.

Von dieser Definition des enzymatischen Reinheitsgrades leitet sich die zuerst von R. Willstätter und F. Racke²⁾ als Maß für die Enzymmenge aufgestellte Größe ab, der „Menge-Zeit-Quotient (M.-Z.-Q.)“, nämlich der Quotient des in irgend einer Form gewonnenen Enzymmaterials und seiner durch den Zeit-Wert gemessenen Wirkungszeit; dieser Wert, der der Enzymmenge direkt proportional ist, stellt eine additive Größe dar.

Der Ausdruck M.-Z.-Q. ist von R. Willstätter und R. Kuhn³⁾ durch das anschaulichere Maß der „Saccharase-Einheit (S.-E.)“ ersetzt worden, nämlich die Enzymmenge in 50 mg invertinhaltinger Substanz vom Zeit-Wert 1 unter den Bedingungen der Definition von O'Sullivan und Tompson; und der Reinheitsgrad des Enzyms wird ausgedrückt durch den „Saccharase-Wert (S.-W.)“, die Anzahl der Saccharase-Einheiten in 50 mg Präparat, er bedeutet also das Reziproke des Zeit-Wertes und steigt mit zunehmender enzymatischer Konzentration. Zu einem von H. v. Euler und O. Svanberg⁴⁾ zur Bezeichnung des Reinheitsgrades eingeführten rationalen Maße, der „Inversionsfähigkeit“, $If = \frac{k \cdot g \text{ Zucker}}{g \text{ Präparat}}$, steht der Saccharase-Wert in einer einfachen rechnerischen Beziehung. Infolge der wechselnden Affinität der Saccharase zum Rohrzucker sind die Maße der Saccharase-Einheit und des Saccharase-Wertes nach Willstätter und Kuhn für den Vergleich von Enzympräparaten mit verschiedener Affinität auf eine Saccharase von der mittleren Affinitätskonstante = 50 (Dissoziationskonstante der Saccharase-Rohrzuckerbindung = 0,020) umzurechnen; die reduzierten Saccharase-Einheiten ergeben sich auf Grund der Beziehung $S.-E._{\text{red.}} = S.-E. \frac{n + k}{n + 0,02}$, worin n die Normalität der

¹⁾ Soc. 57, 834 (1890).

²⁾ A. 425, 1 (1921).

³⁾ B. 56, 509 (1923).

⁴⁾ H. 107, 269 (1919).

Rohrzuckerlösung bedeutet, in der die Reaktionsgeschwindigkeit ermittelt wird. Für die Verfolgung der Enzymmengen im Gange der präparativen Arbeit aus dem nämlichen Ausgangsmaterial, mit hin von gleichbleibender Affinität, ist diese Umrechnung indessen entbehrlich.

Rohrzuckerspaltendes Enzym findet sich in der Tier- und Pflanzenwelt; vor allem in letzterer ist es weit verbreitet. Sieht man von dem am meisten untersuchten Vorkommen in den Kryptogamen, z. B. in der Hefe, ab, so ist hervorzuheben, daß das Enzym nach den Angaben von J. H. Kastle und M. E. Clark¹⁾ nicht nur in Rohrzucker speichernden Pflanzenteilen, beispielsweise in der Zuckerrübe, beobachtet wird, sondern allgemein da, wo höhere Kohlehydrate, Stärke oder Inulin, als Reservestoffe dienen. Die Verbreitung des Enzyms in der Tierwelt ist verhältnismäßig gering; außer in der Honigblase und im Speichel Zucker invertierender Insekten findet sich Saccharase vor allem im Darm, in welchem sie von Cl. Bernard²⁾ aufgefunden worden ist. Nach den Untersuchungen von H. Bierry³⁾ und von H. v. Euler und O. Svanberg⁴⁾ hat man anzunehmen, daß das Enzym von den Zellen der Darmschleimhaut nicht an das Sekret abgegeben wird, sondern daß sich die Umsetzung des Rohrzuckers in den Drüsenzellen selbst vollzieht; in dem reinen Fistelsaft der Darmdrüsen beobachtet man nämlich keine invertierende Wirkung. Von der Saccharase der Hefe unterscheidet sich das tierische Enzym zufolge Euler und Svanberg durch seine geringere Beständigkeit und durch die Abhängigkeit seiner Wirkung von der Wasserstoffzahl, deren Optimum für Darminvertin bei $p_H = 5 - 7$, für das Enzym der Hefe aber bei $p_H = 4,5$ gefunden wird, während die Wirksamkeit des pflanzlichen Enzyms bei $p_H = 7$ nur noch etwa ein Drittel der optimalen beträgt.

Von der Saccharase der Hefe ist die tierische und mit ihr die Saccharase aus *Aspergillus oryzae* nach R. Kuhn⁵⁾ auch unterschieden hinsichtlich ihrer Spezifität; während das Enzym der Hefe nach den Untersuchungen von R. Willstätter und R. Kuhn⁶⁾ sowohl den Rohrzucker als auch das Trisaccharid Raffinose

1) Am. **30**, 422 (1903).

2) Lec. sur le Diabète, Paris 1887, S. 259.

3) Bio. Z. **44**, 415 (1912).

4) H. **115**, 43 (1921).

5) H. **129**, 57 (1923).

6) H. **125**, 28 (1922/23).

hydrolysiert, beobachtet man keine Einwirkung von tierischer oder Taka-Saccharase auf Raffinose oder andere Fructoside. Es kommt hinzu, daß die Wirkung des Hefeenzymns nur durch Fructose, die des Enzyms aus *Aspergillus oryzae* dagegen nur durch α -Glucose gehemmt wird, eine Erscheinung, die von Kuhn mit der Schlußfolgerung verbunden wird, daß die Hydrolyse des Rohrzuckers durch die beiden Enzyme über verschiedenartige Reaktionszwischenprodukte führe, nämlich durch eine Anlagerung des Enzyms im einen Falle an den Fructose-, im anderen Falle an den Glucoserest des Disaccharids. Eine Unterscheidung zwischen Fructo- und Gluco-Saccharasen auf dieser Grundlage erscheint nach den Untersuchungen von R. Kuhn und H. Münch¹⁾ sowie von R. Kuhn und G. E. v. Grundherr²⁾ durchführbar, entgegen den Anschauungen von H. v. Euler und K. Josephson³⁾, nach welchen in allen Fällen die Wirkung des Enzyms auf eine gleichzeitige Anlagerung an beide Zuckerreste zurückzuführen wäre.

Die präparative Isolierung der Saccharase, der R. Willstätter und seine Mitarbeiter sowie H. v. Euler eine größere Anzahl von Untersuchungen gewidmet haben, ist bisher nur am Enzym der Hefe durchgeführt worden. Während E. Fischer⁴⁾ die Ansicht vertreten hatte, daß das rohrzuckerspaltende Enzym beim Auslaugen der frischen Hefe mit Wasser in Lösung gehe, haben R. Willstätter und F. Racke⁵⁾ mittels quantitativer Kontrolle gezeigt, daß die Isolierung des Enzyms aus der Hefe nicht in einem einfachen Lösungsvorgang besteht, und daß bei dem üblichen Verfahren des Zerreibens und Abpressens oder des Auslaugens mit Wasser nur ein Bruchteil der Saccharase in Lösung geht. Es hat sich weiter ergeben, daß bei den verschiedenen Verfahren der raschen oder allmählichen Autolyse des Pilzes, welche zu präparativ brauchbaren Ausbeuten an enzymatischer Substanz führen, die Auflösung der Saccharase auf einen enzymatischen Vorgang zurückzuführen ist, auf eine Freilegung des Enzyms, die einen genauer bestimmten Teilvorgang des allgemeinen enzymatischen Abbaus der Hefesubstanz bildet. Die Beobachtung, daß bei der Entleerung

¹⁾ H. **150**, 220 (1925); H., im Druck.

²⁾ B., im Druck.

³⁾ H. **132**, 301; **134**, 50; **136**, 62 (1924); **143**, 79; **149**, 71 (1925); **152**, 31 (1925/26).

⁴⁾ B. **27**, 3479 (1894).

⁵⁾ A. **425**, 1; **427**, 111 (1921).

der Hefezelle mittels proteolytischer Enzyme keine Saccharase in Lösung geht, daß dagegen ihr Abbau durch die Einwirkung kohlehydratspaltender Enzyme die Freilegung des Invertins bewirkt, scheint die Schlußfolgerung zu erlauben, daß das Enzym in der Hefezelle durch Einlagerung in die aus Polyosen gebildete Zellmembran geschützt wird; seine Loslösung von diesen läßt sich danach entweder durch die enzymatische Freilegung, die im Abbau der Polyosen besteht, oder aber auf mechanischem Wege, durch die völlige Zerstörung der Zellstruktur, erreichen.

Die Bedingungen der Hefeautolyse, mit der die präparative Gewinnung der Saccharase zweckmäßig eingeleitet wird, sind von großer Bedeutung für die Menge und für die Natur der Begleitstoffe, die mit dem Enzym in die Autolysate übergehen. Die Untersuchungen R. Willstätters¹⁾ haben zur Ausarbeitung von vier verschiedenen autolytischen Verfahren geführt, deren besondere Eignung für die präparative Reinigung des Invertins aus der nachfolgenden Zusammenstellung ersichtlich wird, die neben der Methodik die erreichte Verbesserung der enzymatischen Konzentration in den Autolysaten wiedergibt.

1. Das Verfahren der vier- bis siebentägigen Autolyse bei Zimmertemperatur durch Einwirkung von Toluol auf die mit Wasser verdünnte Hefe nach C. S. Hudson²⁾, das eine Enzymanreicherung auf das Doppelte von der in der Trockenhefe ermittelten Konzentration erlaubt.

2. Das ähnliche Verfahren der Neutralautolyse verdünnter Hefe³⁾, nämlich unter Neutralisation der auftretenden Säure, das zu Enzymlösungen von etwa dreifach gesteigerter Konzentration führt.

3. Das Verfahren der raschen Autolyse bei neutraler Reaktion⁴⁾, bestehend in der ein- bis zweitägigen Einwirkung von Chloroform auf unverdünnte Hefe und nachfolgender Verdünnung und Neutralisieren; der Reinheitsgrad der Autolysate ist ähnlich dem nach dem zweiten Verfahren beobachteten.

4. Das Verfahren der fraktionierten Autolyse⁵⁾ unverdünnter Hefe durch Abtötung mit Toluol unter Neutralisation, rasche Ab-

¹⁾ Vgl. R. Willstätter, K. Schneider und E. Bamann, H. **147**, 248, und zwar S. 264 (1925).

²⁾ Am. Soc. **30**, 1564 (1908); **36**, 1566 (1914).

³⁾ R. Willstätter und F. Racke, A. **425**, 1, und zwar S. 54 (1921).

⁴⁾ R. Willstätter und K. Schneider, H. **142**, 257, und zwar S. 266 (1924/25).

⁵⁾ R. Willstätter, K. Schneider und E. Bamann, a. a. O.

trennung des austretenden, invertinarmen Verflüssigungssaftes nach etwa einer Stunde und Weiterführung der Autolyse bis zu einem Tage; dieses Verfahren, das sich insbesondere bei der Verarbeitung enzymreicher Hefen bewährt hat, führt zu einer etwa vier- bis achtfachen Steigerung der enzymatischen Konzentration, verglichen mit der des Ausgangsmaterials.

Größere Unterschiede in der qualitativen Zusammensetzung der Autolysate beobachtet man zufolge R. Willstätter, K. Schneider und E. Wenzel¹⁾ nur zwischen der raschen Autolyse unverdünnter Hefe und der langsameren Autolyse des verdünnten Materials, bei welcher die Hefe viel weitgehender ausgeleert wird. Die Abbauenzyme, die bei der energischeren Abtötung der unverdünnten Hefe weniger stark arbeiten als bei der gelinderen Abtötung in verdünntem Zustand, bewirken eine auswählendere Freilegung des Invertins und einen verminderten Abbau des Enzymkomplexes; das Mengenverhältnis der Saccharase zu anderen Enzymen und zu ihren Zersetzungsprodukten ist günstiger im Falle der unverdünnten Autolyse. Die Konzentration des Enzyms in den Autolysaten wird weiterhin erheblich gesteigert durch das von R. Willstätter, Ch. D. Lowry jr. und K. Schneider²⁾ beschriebene Verfahren der spezifischen Invertinanreicherung in der Hefe, das auf der Gärführung der Hefe bei minimaler Rohrzuckerkonzentration beruht und dessen experimentelle Grundlagen im allgemeinen Teil dieses Buches bereits ausführlich erörtert worden sind. Durch kombinierte Anwendung dieser Methoden und durch Vervollkommnung des Freilegungsverfahrens sind die enzymreichsten Hefeauszüge erhalten worden, deren Reinheitsgrad Saccharase-Werten von 0,5 bis 1 entsprach, gegenüber einer enzymatischen Konzentration von S.-W. etwa 0,03 bis 0,05 in dem ursprünglichen Pilzmaterial.

Die präparative Reinigung des Invertins aus den Hefeautolysaten ist von R. Willstätter in zahlreichen Fällen durchgeführt worden. Indessen haben die Erfahrungen, die in den ersten Arbeiten über Invertin gewonnen wurden, für die Darstellung des Enzyms keine allgemein gültigen Vorschriften und Richtlinien, sondern nur Beispiele zu geben erlaubt. Das Verhalten der Saccharase bei der Reinigung, gegenüber Fällungs- wie gegenüber Adsorptionsmitteln, ist in hohem Maße abhängig von der Natur und vom Alter der angewandten Hefeauszüge, nämlich von der Menge und Natur der

¹⁾ H. 151, 1 (1925/26).

²⁾ H. 146, 158 (1925).

begleitenden Stoffe. Es kommt hinzu, daß die Wahl der in den einzelnen Untersuchungen zur Anreicherung des Enzyms eingeschlagenen Verfahren durch das jeweils angestrebte Ziel entscheidend beeinflußt war, sei es, daß man ausschließlich die Steigerung des enzymatischen Reinheitsgrades, sei es, daß man nur die Abtrennung bestimmter akzessorischer Stoffe erstrebte. Wenngleich die älteren Beispiele für die Reinigung des Enzyms durch die neueren Untersuchungen, deren Fortschritte auf der Anwendung der fraktionierten Autolyse besonders invertinreicher Hefe beruhen, in bezug auf die Anzahl und die Dauer der zur Reinigung erforderlichen Operationen und in bezug auf die Reproduzierbarkeit des Verfahrens weit überholt sind, mag es doch von Interesse sein, ihre wichtigsten Ergebnisse hier kurz zu beschreiben, zumal sie der Entwicklung der präparativen Methodik förderlich waren.

R. Willstätter und F. Racke¹⁾, die von Hefeautolysaten nach Hudson ausgingen, reinigten die Saccharase durch Abtrennung von Verunreinigungen mittels Kaolin und durch fraktionierte Adsorption aus den Mutterlaugen mit Tonerde bei saurer Reaktion unter Zusatz von Aceton; es zeigte sich, daß nunmehr aus den ammoniakalischen Elutionen der Tonerdeadsorbate das Enzym nach dem Ansäuern von Kaolin aufgenommen wurde, daß also das Adsorptionsverhalten in rohen Lösungen, das von L. Michaelis²⁾ im Sinne einer überwiegend sauren Natur des Enzyms gedeutet worden war, durch Begleitstoffe vorgetäuscht wird. Die Bedeutung der Adsorption des Enzyms an Kaolin ergab sich aus der Beobachtung, daß in den Elutionen der Adsorbate, deren bestes Beispiel durch den Saccharasewert 1,0 gekennzeichnet war, das Enzym sich frei von Hefegummi erhalten ließ, einem Kohlehydrat, das vielfach mit ihm identifiziert worden war. Die Untersuchung von R. Willstätter, J. Graser und R. Kuhn³⁾ erbrachte weitere präparative und analytische Erkenntnisse mit der Feststellung, daß das Invertin aus den gealterten Hefeautolysaten durch Bleisalz niedergeschlagen wird, während man in den frischen Auszügen keine Fällung des Enzyms beobachtet. In der Anwendung einer fraktionierten Fällung mit Blei auf adsorptiv vorgereinigte Enzymlösungen ergab sich sodann ein Mittel zur Abtrennung phosphorhaltiger Verunreinigungen,

¹⁾ A. **425**, 1 (1921).

²⁾ Bio. Z. **7**, 488 (1907/08); L. Michaelis und M. Ehrenreich, ebenda **10**, 283 (1908).

³⁾ H. **123**, 1 (1922).

deren hartnäckige Vergesellschaftung mit dem Enzym H. v. Euler und O. Svanberg¹⁾ zu irrtümlichen Vorstellungen über die Zusammensetzung des Enzyms geführt hatte. Das reinste erhaltene Präparat, durch Kombination von Tonerdeadsorption und fraktionierte Bleifällung gewonnen, entsprach dem Saccharasewert 5,0.

Wichtige methodische Fortschritte erzielten R. Willstätter und W. Wassermann²⁾ hinsichtlich der Anwendung von Kaolin zur Adsorption der Saccharase; sie beobachteten nämlich, daß die störenden Einflüsse der Begleitstoffe, mit denen das Enzym in den rohen Hefeauszügen assoziiert ist und die seine Aufnahme durch Kaolin beeinträchtigen, durch sehr große Verdünnung und bei geeigneter Acidität ausgeschaltet werden, so daß die Saccharase unmittelbar aus den Hefeautolysaten durch Kaolin adsorbiert werden kann; und R. Willstätter und K. Schneider³⁾ konnten zeigen, daß diese Operation auch ohne Verdünnung und mit beliebigen Autolysaten gelingt, sofern man für die Anwendung stärker saurer Reaktion Sorge trägt. Durch die systematische Anwendung der fraktionierten Adsorption mit Tonerde und durch die Aufsuchung der für die auswählende Adsorption des Enzyms jeweils günstigsten Bedingungen haben dann R. Willstätter und K. Schneider⁴⁾ eine weitere Steigerung der enzymatischen Konzentration zum Saccharase-Wert 6,66 erreicht; die Methodik der Adsorption war so geleitet, daß sich das Verhalten des Enzyms im Sinne der Untersuchungen von H. Kraut und E. Wenzel⁵⁾ mehr und mehr dem Adsorptionsverhalten eines reinen Stoffes näherte, das bei der Erreichung eines Saccharase-Wertes von etwa 5 beobachtet wurde; aber die Analyse der Präparate in diesem Zustand führte zu der Feststellung, daß das Enzym, obwohl es sich bei der Adsorption wie ein einheitlicher Stoff verhielt, mit einem wahrscheinlich großen tryptophanhaltigen Peptidkomplex vergesellschaftet vorlag, welcher das Enzym vor Inaktivierung zu schützen scheint und für dessen Abtrennung die befolgten präparativen Richtlinien zu versagen scheinen.

Der nach den älteren Verfahren der fraktionierten Adsorption und Fällung des Invertins aus den Auszügen der verdünnten Auto-

¹⁾ H. **112**, 282 (1921).

²⁾ H. **123**, 181 (1922).

³⁾ H. **133**, 193 (1923/24).

⁴⁾ H. **142**, 257 (1924/25).

⁵⁾ H. **133**, 1 (1923/24); **142**, 71 (1924/25).

lyse gewöhnlicher Hefe erreichbare Reinheitsgrad ist auch in den neueren Untersuchungen mit erheblich verbessertem Ausgangsmaterial nicht mehr wesentlich gesteigert worden. Die Erwartung, daß nach einer namhaften Steigerung des Invertingehaltes im Pilzmaterial und nach der Vervollkommnung des Freilegungsverfahrens die Anwendung der Adsorptionsmethode zu Invertinpräparaten von viel höherer enzymatischer Konzentration führen würde, hat sich nicht bestätigt. Zwar ist es R. Willstätter, K. Schneider und E. Wenzel¹⁾ gelungen, durch die fraktionierte Autolyse von Hefe, deren Enzymgehalt sehr hoch, beispielsweise auf das 15fache des gewöhnlichen gesteigert worden war, zu Auszügen zu gelangen, deren Reinheitsgrad Saccharase-Werten von 0,5 bis 1,0 entsprach und die durch einfache Dialyse auf eine enzymatische Konzentration vom Saccharase-Wert 2,5 gebracht werden konnten; allein die Adsorption dieser Hefeauszüge mit Tonerde und mit Kaolin hat in der Steigerung des Reinheitsgrades wiederum zu der Grenze geführt, deren Überschreitung vormem nicht gelungen war. „Das Enzym vom Saccharase-Wert etwa 5 ist mit seinen Koadsorbenzien zu so festen Aggregaten vereinigt, daß es bei der Adsorption an Tonerde das Verhalten eines einheitlichen Stoffes aufweist.“ Der Fortschritt, der die neuen Verfahren gegenüber älteren kennzeichnet, beruht auf der Möglichkeit, in kurzer Arbeit von der Hefe zu Enzympräparaten von hohem Reinheitsgrad zu gelangen. Während die neuen Hefeauszüge von hoher enzymatischer Konzentration sich für die Anwendung der Kaolinadsorption nicht eignen, gelingt es, beispielsweise durch einmalige Adsorption des Enzyms an Tonerde und nachfolgende Dialyse und Elektrodialyse, Präparate vom Saccharase-Wert etwa 7,3 zu gewinnen. Auch läßt sich das Mengenverhältnis der Saccharase zu anderen Enzymen der Autolysate nach R. Willstätter und E. Bamann²⁾ noch günstiger gestalten durch die Abtrennung des malzzuckerspaltenden Enzyms bei der auswählenden Adsorption mit Tonerde von bestimmter Darstellung, oder aber bei der auswählenden Elution von Tonerdeadsorbaten beider Enzyme; bei der Einwirkung von sauren Phosphatlösungen wird nämlich aus dem gemeinsamen Adsorbat nur die Saccharase abgelöst.

Weitere methodische Fortschritte sind erreicht worden durch eine fraktionierte Ausfällung der mit Tonerde vorgereinigten Invertin-

¹⁾ H. 151, 1 (1925/26).

²⁾ H. 151, 273 (1925/26).

lösungen mittels Tannins bei tiefer Temperatur, die bis zu Präparaten vom Saccharase-Wert 9,4 geführt hat; sie werden in der präparativen und in der allgemeinen Bedeutung übertroffen durch die Anwendung eines Verfahrens der fraktionierten Adsorption an ein Adsorbens, das erst in der Enzymlösung selbst erzeugt wird; so ist es durch anteilweise Bildung eines adsorptiv wirkenden Niederschlags von Bleiphosphat gelungen, den Saccharase-Wert in der Elution der letzten Fraktion auf etwa 10 zu steigern, und weiterhin hat sich die bedeutsame Beobachtung ergeben, daß diese Methode in sicherer Weise das Enzym von seinen Inaktivierungsprodukten zu trennen erlaubt, sie führt nämlich bei der Anwendung auf teilweise zerstörte Enzymlösungen wieder zu Reinheitsgraden vom ursprünglichen Werte.

Die Analyse der gewonnenen gereinigten Enzympräparate von verschiedenem Reinheitsgrad hat in den Untersuchungen R. Willstätters auch die Erkenntnis bestätigt, daß die Saccharase wie andere Enzyme weder zu den Kohlehydraten noch zu den Eiweißkörpern zählt; doch ist es noch nicht möglich gewesen, die Natur des Enzyms auf bestimmte, chemisch definierte Bausteine zurückzuführen. Die älteren Aussagen von A. Fodor¹⁾ oder von H. v. Euler und O. Svanberg²⁾, nach welchen das Invertin mit Hefegummi oder mit einem phosphorhaltigen Bestandteil der Hefe zu identifizieren war, sind mit der völligen Abtrennung dieser Stoffe vom Enzym gegenstandslos geworden. H. v. Euler und K. Josephson³⁾ haben indessen in späteren Untersuchungen die Annahme ausgesprochen, daß die Saccharase als eine proteinähnliche Substanz aufzufassen sei und daß ihre Aktivität mit der als „Proteinteil“ bezeichneten Komponente des Enzyms aufs engste zusammenhänge; diese selbst nämlich soll danach den schließlichen Zerfall des Substrats bewirken. Diese Schlußfolgerungen sind aus dem Verhalten der Saccharase gegenüber Trypsin, von dem es zwar schwer, aber nur unter Verlust seiner Aktivität angegriffen wird, und aus einer beobachteten Proportionalität zwischen der enzymatischen Konzentration und dem Stickstoff- und Schwefelgehalt der Präparate abgeleitet, und sie sind erweitert worden durch neuere Angaben über eine ganz spezifische Bauart des Enzymeiweißes, gekennzeichnet

¹⁾ Das Fermentproblem. Dresden und Leipzig 1922.

²⁾ H. **112**, 282 (1921).

³⁾ B. **56**, 446, 1097 (1923); **57**, 299, 859 (1924); H. **138**, 11, 38 (1924); **145**, 130 (1925).

durch einen hohen Gehalt an Tryptophan, der mit der enzymatischen Konzentration zu steigen scheine.

Diese speziellen Anschauungen sind durch die Untersuchungen R. Willstätters nicht bestätigt worden. Einmal hat es sich ergeben¹⁾, daß eine Proportionalität zwischen Stickstoffgehalt und enzymatischem Reinheitsgrad nicht zu beobachten ist und daß die empfindlichen Eiweißreaktionen, die bei einigen der reineren Enzympräparate mehr oder weniger deutlich auftreten, bei anderen versagen. Weiterhin ist es gelungen²⁾, die unter gewissen Bedingungen vorgereinigte Saccharase durch fraktionierte Adsorption mittels Kaolin ganz von ihrem ursprünglichen Gehalt an Tryptophan zu befreien, wenn auch unter gewisser Einbuße an enzymatischer Aktivität; das Enzym scheint nämlich durch beigemengtes tryptophanhaltiges Peptid stabilisiert zu werden. Den Nachweis, daß der Gehalt an Eiweißspaltprodukten, nämlich an irgend einem bestimmten Peptid, für die Zusammensetzung der Saccharase als unwesentlich zu betrachten ist, haben R. Willstätter, K. Schneider und E. Wenzel³⁾ überzeugend bestätigt mit der Feststellung, daß es auch durch die fraktionierte Adsorption mit Bleiphosphat gelungen war, das Enzym vollkommen frei von Tryptophan wie von Tyrosinpeptid zu erhalten. Auch scheint der Gehalt an Tryptophan allein nicht einmal für die Beständigkeit der Saccharase von Bedeutung zu sein.

Während H. v. Euler und K. Josephson⁴⁾ von der Annahme ausgehen, daß der kolloide Träger der Saccharase genau zu unterscheiden sei von anderen aus dem Ausgangsmaterial stammenden Begleitstoffen, können zufolge Willstätter, Schneider und Wenzel die kolloiden Begleitstoffe des Enzyms, wie Hefegummi, Nucleinsäuren oder Peptide, von anderen Inhaltsstoffen des Ausgangsmaterials in ihrer Wirkung auf das Enzym nicht unterschieden werden. Die Erfahrung, daß es gelingt, durch wechselnde Reinigungsvornahmen das Enzym von jedem einzelnen dieser Stoffe vollständig zu befreien, erweist, daß sie für die Zusammensetzung des Enzyms selbst ohne Bedeutung sind, wenngleich sie, jeder für sich, für die Erhaltung der enzymatischen Aktivität im gegebenen Falle von Einfluß sein können. Es ist zwar noch nicht erreicht, das eigent-

¹⁾ R. Willstätter und K. Schneider, H. **133**, 193 (1923/24).

²⁾ Dieselben, H. **142**, 257 (1924/25).

³⁾ H. **151**, 1 (1925/26).

⁴⁾ H. **145**, 130 (1925).

liche Saccharasemolekül, seine spezifische aktive Gruppe, unter Erhaltung der Wirksamkeit von allen schützenden Kolloiden insgesamt zu trennen; aber die experimentellen Beobachtungen, die über das Verhalten des Enzyms bei der Abtrennung der verschiedenen einzelnen Schutzstoffe gewonnen worden sind, führen zu dem Schlusse, daß die Natur der kolloiden Träger veränderlich ist und daß das Enzym seine Aggregate zu wechseln vermag.

b) α -Glucosidasen: Maltase.

Das wichtigste α -glucosidische Bindungen lösende Enzym ist die Maltase, die zuerst von E. Bourquelot¹⁾ in der Hefe beschrieben wurde und die in tierischen und in pflanzlichen Organismen weit verbreitet ist; sie findet sich vor allem gewöhnlich zusammen mit dem stärke-spaltenden Enzym, der Amylase, durch deren Wirkung ja der Malzzucker gebildet wird und mit der zusammen sie den Abbau der Kohlehydrate zum Traubenzucker vollzieht. Während das Enzym der tierischen Organe und Sekrete nur wenig untersucht und seine Beschreibung z. B. in den Samen höherer Pflanzen durch eine die Lösung des Enzyms verhindernde geschützte Lagerung und durch seine geringe Beständigkeit beeinträchtigt wurde, sind der Untersuchung der Maltase in der Hefe, in der sie reichlich vorkommt, zahlreiche Arbeiten gewidmet.

Das p_H -Optimum der Maltasewirkung der Hefe, das von P. Rona und L. Michaelis²⁾ sowie von R. Willstätter und W. Steibelt³⁾ zwischen $p_H = 6,0$ und $6,8$, etwas verschieden je nach dem angewandten Substrat, angegeben wurde, haben R. Willstätter und E. Bamann⁴⁾ unter Anwendung genügender Pufferung zu $6,75$ bis $7,25$ bestimmt, also bei sehr schwach saurer bis ganz schwach alkalischer Reaktion. Die Kinetik der Maltosespaltung, die nach den Untersuchungen von R. Willstätter, T. Oppenheimer und W. Steibelt⁵⁾ von Hefe zu Hefe und von Substrat zu Substrat verschieden gefunden wird, folgt nur selten der Reaktionsgleichung erster Ordnung, gewöhnlich verläuft die Reaktion in Übereinstimmung mit älteren Literaturangaben langsamer als monomolekular; diese Erscheinung ist von R. Willstätter,

1) *Jl. de l'Anat. et Physiol.* **22**, 162 (1886).

2) *Bio. Z.* **57**, 70; **58**, 148 (1913).

3) *H.* **115**, 199 (1921).

4) *H.* **151**, 242 (1925/26).

5) *H.* **110**, 232 (1920); **115**, 199 (1921).

R. Kuhn und H. Sobotka¹⁾ auf wechselnde Affinitäten des Enzyms zurückgeführt worden, deren Ursache noch nicht erkannt ist. Zu ihrer Erkenntnis hat die Untersuchung von Willstätter und Bammann wichtige neue Beiträge erbracht. Es hat sich gezeigt, daß der Reaktionsverlauf der Malzzuckerspaltung in hohem Maße vom Reinheitsgrad des Enzyms abhängig ist. Die in der Hefe und in ihren rohen Auszügen beobachtete Kinetik gilt nicht mehr für die Adsorbate des Enzyms an Tonerde und für die daraus gewonnenen Elutionen; auch wenn nur ein Teil des Enzyms durch Eintragen von Tonerde in seine Lösung adsorbiert war, so folgt die gesamte Maltase in der Lösung wie in der aus dem Adsorbat bereiteten Elution einem anderen Zeitgesetz, ihre Wirkung wird nämlich langsamer; diese Erscheinung beruht zufolge Willstätter und Bammann nicht auf einer Zerstörung des reiner gewordenen Enzyms im Verlauf seiner Reaktion, denn man findet auch in der reineren Form für den gleichen Spaltungsgrad das Produkt aus Enzymmenge und Reaktionsdauer konstant; sie wird vielmehr auf die Abtrennung eines Stoffes zurückgeführt, dessen Gegenwart der Hemmung durch das Spaltprodukt Glucose entgegenzuwirken vermag. Diese Änderungen der Reaktionskinetik im einen oder im anderen Sinne werden auch bei der Filtration gealterter Autolysate oder beim Stehen der filtrierten Lösungen beobachtet, in denen der reaktionsfördernde Stoff neu gebildet zu werden scheint. Die beobachteten Änderungen der enzymatischen Aktivität bieten dem exakten Vergleich der Maltasemengen in verschiedenem Reinheitsgrad größere Schwierigkeiten.

So ist als Maß der Enzymmenge die „scheinbare Maltase-Einheit (M.-[e.]“ aufgestellt worden, nämlich diejenige Enzymmenge, welche 2,5 g Maltosehydrat in 50 ccm Lösung bei $p_{\text{H}} = 6,8$ und 30° in einer Minute zur Hälfte spaltet; dieser Ausdruck bedarf indessen der Ergänzung durch die Angabe der jeweils beobachteten Kinetik.

Als Maß für den Reinheitsgrad dient der Maltase-Wert (M.-[w.]), d. i. die Anzahl der M.-[e.] in 1 kg des Präparates.

Nach Willstätter, Kuhn und Sobotka besteht kein Grund für die Annahme verschiedener absolut spezifischer Enzyme für die Hydrolyse der Maltose und für die anderer α -Glucoside, sie scheinen also durch dasselbe Enzym gespalten zu werden. Die unter Be-

¹⁾ H. 134, 224 (1923/24).

rücksichtigung der jeweiligen Dissoziationskonstante der Maltase-Glucosidverbindung, also bei gleicher Konzentration der Reaktionszwischenprodukte ermittelten Enzym-Wert-Quotienten stimmen nämlich für den Vergleich der Hydrolyse von Maltase, α -Methyl- und α -Phenylglucosid durch verschiedene Heferassen ziemlich nahe überein, wie aus der nachfolgenden Tabelle 32 hervorgeht.

Tabelle 32.
Enzym-Wert-Quotienten verschiedener Heferassen.

Heferasse	Quotient	
	α -Methylglucosid : Maltose	α -Phenylglucosid : Maltose
Löwenbräuhefe	0,21	5,1
Hofbräuhefe	0,18	6,1
Kopenhagener Hefe	0,23	—

Die Bestimmung des malzzuckerspaltenden Enzyms in der lebenden Hefe selbst, die der älteren Forschung große Schwierigkeiten bot¹⁾, ist durch R. Willstätter und W. Steibelt²⁾ und durch R. Willstätter und E. Bamann³⁾ vervollkommenet und quantitativ sichergestellt worden. Es scheint danach, daß die Maltase im Gegensatz zu dem rohrzuckerspaltenden Enzym für den in die Zellen eintretenden Zucker erst nach den starken Veränderungen, die bei der Abtötung eintreten, genügend zugänglich wird. Es ist für die exakte Analyse des Enzyms in der Hefe nur erforderlich, die Abtötung des Pilzes auf einen kurzen Zeitraum zusammenzudrängen und durch genügende Pufferung für eine Neutralisation und Ausschaltung der bei der Autolyse auftretenden Säure zu sorgen. Die Übereinstimmung der Enzymmengen, die nach mehreren Bestimmungsweisen, entweder durch rasche Abtötung des Pilzes mit Zellgiften wie Essigester, Toluol, Chloroform oder durch osmotische Zerstörung, z. B. durch Einwirkung von Diammonphosphat oder Natriumchlorid, erhalten wurde, wird ergänzt durch die Beobachtung, daß es gelingt, genau soviel Maltase bei der Autolyse in Lösung überzuführen, wie die Analyse der Hefe selbst ergibt.

¹⁾ Siehe dazu G. H. Morris, Proc. Chem. Soc. 1895, S. 46; E. Fischer, B. 27, 2985, 3479 (1894); 28, 1429 (1895).

²⁾ H. 111, 157 (1920).

³⁾ H. 151, 242, und zwar S. 253 (1925/26).

Die Isolierung der Maltase aus der Hefe durch Auslaugen mit Wasser war nach den älteren Angaben von C. J. Lintner¹⁾, E. Fischer²⁾ und von A. Croft' Hill³⁾ nur nach vorangehender Trocknung des Pilzes, nicht durch die gewöhnlichen Verfahren der Autolyse frischen Hefematerials, möglich; der beobachtete Unterschied im Verhalten der Saccharase und der Maltase wurde auf eine Schwerlöslichkeit der Maltase oder auf eine Störung ihrer Diffusion durch die Zellmembran zurückgeführt. R. Willstätter, T. Oppenheimer und W. Steibelt⁴⁾ haben dann gezeigt, daß die bei der Abtötung des lebenden Pilzes mit Zellgiften auftretende Säure die empfindlichere Maltase zerstört, und daß es gelingt, stark maltasehaltige Autolysate zu gewinnen, wenn man die jeweils gebildete Säure neutralisiert. Die Freilegung des Enzyms aus der Hefezelle ist sodann von Willstätter und Bamann verbessert und spezifischer geleitet worden, und zwar durch das Verfahren der fraktionierten Autolyse der Hefe, das zwischen der Verflüssigung der Zellen und den nach der Abtötung einsetzenden enzymatischen Vorgängen der Freilegung unterscheidet. Es hat sich gezeigt, daß die rasche Abtötung der Hefe in unverdünntem Zustand wie für Invertin so auch für die Gewinnung der Maltase vorteilhafter ist; man nimmt sie zweckmäßig mit Essigester oder auch mit gepulvertem Diammonphosphat vor; dann erst beginnt der Prozeß der Ablösung des Enzyms vom Zellinhalt, der unter Verdünnung, bei Anwendung von Essigester und unter Neutralisation durchgeführt wird; in den gewonnenen Autolysaten findet sich nach einer halb- bis eintägigen Dauer die gesamte Maltase der Hefe zusammen mit nur einem Bruchteil der ursprünglichen Hefemasse. Noch reinere Maltaselösungen erhält man nach der Abtrennung des zuerst austretenden Verflüssigungssaftes. Der Vergleich der Auflösungs geschwindigkeit von Maltase und von Saccharase hat dabei zu der überraschenden Feststellung geführt, daß die Maltase nicht etwa schwerer, sondern rascher als die Saccharase aus der Zelle in Lösung übergeführt wird.

Die Maltase ist im Gegensatz zu der Saccharase auch in den rohen Hefeauszügen viel unbeständiger; Willstätter und Bamann empfehlen daher, die Lösungen des Enzyms ständig bei 0° zu halten

1) Zs. f. ges. Brauw. 1892, S. 106; C. S. Lintner und E. Kröber, B. 28, 1050 (1895).

2) B. 27, 3479 (1894); 28, 1429 (1895); H. 26, 60 (1898).

3) Soc. 73, 634 (1898); 83, 578 (1903).

4) H. 110, 232 (1920).

und zu verarbeiten. Es hängt mit dieser Zersetzlichkeit des Enzyms zusammen, daß systematische Versuche zu seiner präparativen Reinigung noch nicht unternommen worden sind. Es sei hier nur angeführt, daß nach Willstätter und Bamann Maltase und Saccharase in ihrem Adsorptionsverhalten gegenüber Tonerde so beträchtliche Unterschiede aufweisen, daß ihre Trennung mit diesem Mittel gelingt. Die Trennung der beiden Enzyme durch Adsorption, für welche sich die Anwendung eines Tonerdegels der Formel $\text{AlO} \cdot \text{OH}$ am geeignetsten erwiesen hat, scheint nicht auf einem Unterschied in den sauren oder basischen Eigenschaften der enzymatischen Individuen zu beruhen; das angewandte Adsorbens, dessen auswählende Wirkung am größten ist, hat nämlich von den untersuchten Tonerdesorten am wenigsten ausgeprägt sauren oder basischen Charakter; und doch erreicht man in einer Adsorptionsvorprobe die Aufnahme der gesamten Maltasemenge, die sich in enzymatisch einheitlichem Zustand in den alkalischen Elutionen der Adsorbate findet. Hingegen wird man die Beobachtung von Willstätter und Bamann über die auswählende Elution der Saccharase aus gemeinsamen Tonerdeadsorbaten der beiden Enzyme, die bei Einwirkung von primärem Phosphat erfolgt und bei welcher die Maltase allein zurückgelassen wird, in elektrochemischem Sinne zu verstehen haben.

c) β -Glucosidasen: Emulsin.

Die klassische Reaktion der Spaltung des natürlichen Glucosids Amygdalin in den bitteren Mandeln in 2 Mol. β -Glucose, Benzaldehyd und Blausäure ist auf das Zusammenwirken dreier Enzyme zurückzuführen, die man bisher unter dem Namen Emulsin zusammengefaßt hat; die erste Stufe der Reaktion besteht in der Abspaltung von 1 Mol. Glucose aus dem Amygdalindisaccharid durch die sogenannte Amygdalase, die man vielfach mit Gentiobiase identifiziert hat, einer Glucosidase, die sich in Hefen findet und die die Zerlegung beispielsweise der Gentiobiose, der 1,6- β -Glucosido- β -glucose bewirkt. In der zweiten Phase der Reaktion erfolgt die Lösung der glucosidischen Bindung zwischen dem Benzaldehydcyanhydrin und dem zweiten Mol. β -Glucose, sie ist auf ein besonderes β -glucosidisches Enzym, die Prunase¹⁾ oder β -Phenyl-

¹⁾ H. E. Armstrong, E. F. Armstrong und E. Horton, Proc. Roy. Soc. B. **85**, 359 (1912).

glucosidase, zurückgeführt worden. Für die dritte Reaktionsstufe endlich, die Spaltung des Benzaldehydcyanhydrins in seine Komponenten, wird die Existenz einer Oxynitrilase angenommen, deren Eigenschaften noch wenig sichergestellt erscheinen und deren besondere synthetische Wirkungen bereits im allgemeinen Teil behandelt worden sind.

Die erste Phase der Reaktion, die Spaltung des Amygdalins in Prunasin und β -Glucose, und nur diese wird nach den wichtigen Beobachtungen E. Fischers¹⁾ auch durch eine in der Hefe enthaltene β -Glucosidase bewirkt, während die das Prunasin zerlegende β -Glucosidase dem Pilz zu fehlen scheint; diese Feststellung hat zusammen mit der älteren Annahme, daß die Hefe nur α -Glucosidase ausbilde, lange die Auffassung gestützt, wonach dem zweiten Glucosemolekül im Amygdalin α -glucosidische Bindung zuzusprechen sei; mit der Synthese des Amygdalins aus Gentiobiose²⁾, der β -Glucosido- β -glucose, und mit der Erkenntnis seiner β -glucosidischen Struktur haben diese Beobachtungen indessen eine veränderte Grundlage erhalten. Es ist jedoch noch nicht sicher zu beurteilen, ob an der Zerlegung des Amygdalins in den bitteren Mandeln zwei spezifische β -glucosidische Enzyme beteiligt sind oder ob nicht, wie man anzunehmen haben wird, die Abspaltung der beiden Moleküle β -Glucose durch ein und dasselbe Enzym erfolgt, dessen Spezifität gegenüber der des Hefeenzym erweitert wäre; auch ist noch nicht erkannt, ob das Enzym der Hefe, das man Amygdalase genannt hat, mit einem ebenfalls in Hefe aufgefundenen, Gentiobiose spaltenden Enzym zu identifizieren ist, da ihr Vorkommen sich nicht immer zu decken scheint.

Für die β -Glucosidase des Emulsins haben zuerst R. Willstätter und G. Oppenheimer³⁾ durch quantitative Messungen den Befund erhoben, daß sie außer Amygdalin auch andere β -Glucoside wie Helicin, Salicin und β -Phenylglucosid zu spalten vermag; zu ihren spezifischen Substraten gehören nach der Untersuchung von R. Willstätter, R. Kuhn und H. Sobotka⁴⁾ auch aliphatische β -Glucoside wie das β -Methylglucosid. Diese Feststellung

¹⁾ B. **28**, 1508 (1895).

²⁾ R. Campbell und W. N. Haworth, Soc. **125**, 1337 (1924); R. Kuhn und H. Sobotka, B. **57**, 1767 (1924); G. Zemplén und A. Kunz, B. **57**, 1357 (1924).

³⁾ H. **121**, 183 (1922).

⁴⁾ H. **123**, 33 (1923).

ergab sich aus der Übereinstimmung der unter Berücksichtigung der wechselnden Affinitäten, nämlich bei gleicher Konzentration der Enzym-Substratverbindung, ermittelten Glucosidase-Wert-Quotienten.

Der zeitliche Verlauf der Hydrolyse einfacher β -Glucoside, wie des Arbutins, des β -Methyl- und des β -Phenylglucosids, nicht dagegen der des Helicins, folgt nach den Angaben von C. S. Hudson und H. S. Paine¹⁾ und von Willstätter und Oppenheimer der Gleichung erster Ordnung²⁾. Dagegen gilt zufolge den Beobachtungen von R. Willstätter und W. Czanyi³⁾ für den verwickelteren Vorgang der Amygdalinspaltung, bei welcher nach S. J. M. Auld⁴⁾ sowie nach Armstrong und Horton die Glucosebildung der Freilegung von Benzaldehyd und Blausäure vorausgeht, die monomolekulare Reaktionsgleichung nicht mehr, man beobachtet ein stetiges Absinken der Reaktionskonstanten, während der Teilvorgang der Zerlegung in Glucose und Prunasin, der durch Hefenzym katalysiert wird, nach R. Willstätter und W. Steibelt⁵⁾ monomolekular verläuft. Es kommt für die Verwicklung des Reaktionsverlaufs bei der Amygdalinspaltung hinzu, daß, wie Willstätter und Czanyi fanden, das p_H -Optimum der Amygdalin- und der Prunasinspaltung nicht unerheblich differieren, sie entsprechen nämlich einer Wasserstoffzahl von 6,0 bzw. 4,4; bei längerer Versuchsdauer verschiebt sich danach das Optimum für den gesamten Spaltungsvorgang im Sinne saurerer Reaktion.

Als Maß für die Konzentration der Enzympräparate verwandten Willstätter und Czanyi zur Kontrolle der präparativen Reinigung des Emulsins die Zeitwerte der 50proz. Spaltung der Glucoside, z. B. die Anzahl Minuten, welche 1 mg des Präparates benötigt, um 50 Proz. der theoretischen Monosemenge aus 0,1 g Amygdalin unter bestimmten Bedingungen freizulegen; man bestimmte den abgespaltenen Zucker nach Abtrennung der Blausäure reduktometrisch. Als Maß der Enzymmenge diene, wie bei Saccharase, ein „Menge-Zeit-Quotient“; diese Ausdrücke sind von Willstätter, Kuhn und Sobotka durch die anschaulicheren

¹⁾ Am. Soc. **31**, 1242 (1909).

²⁾ Siehe dazu die etwas abweichenden Angaben von K. Josephson, H. **147**, 1, und zwar S. 33 (1925).

³⁾ H. **117**, 172 (1921).

⁴⁾ Soc. **93**, 1251, 1276 (1908).

⁵⁾ H. **134**, 224 (1923/24).

Maße des β -Glucosidase-Wertes und der β -Glucosidase-Einheit ersetzt worden.

Die Versuche der älteren Literatur zur präparativen Isolierung des Enzyms aus den bitteren Mandeln haben keine Abtrennung der begleitenden Enzyme angestrebt¹⁾. K. Ohta²⁾ sowie B. Helferich³⁾ erhielten aus den Mandeln bzw. aus ihren durch Alkohol und Dialyse vorgereinigten Auszügen durch Verdauung mit Trypsin eiweißfreie Präparate. R. Willstätter und W. Czanyi⁴⁾ verbesserten die Ausbeuten in den wässrigen Auszügen des entöltten Mandelpulvers durch Einwirkung verdünnten Alkalis, das die adsorptive Bindung des Enzyms an unlösliche Substanz zu lösen vermag; die Reinigung der Extrakte durch Essigsäure und die wiederholte Fällung des Enzyms mit Alkohol führte zu einer etwa 40fachen Steigerung der enzymatischen Konzentration entsprechend dem Zeitwert 10 in den reinsten Präparaten; diese enthielten indessen noch geringe Mengen Proteinsubstanz.

Noch reinere Enzympräparate (β -Gl.-W. = 81) erhielt in jüngster Zeit K. Josephson⁵⁾ durch Adsorption an Kaolin und Dialyse der ammoniakalischen Elutionen.

Auf die Besprechung anderer β -Glucosidasen, wie der Cellobiase, die in vielen Schimmelpilzen und in Samen, oder der Gentiobiase, die auch in der Hefe beschrieben worden ist, muß hier verzichtet werden, zumal die besondere Existenz und die Spezifität dieser Enzyme noch ganz unzureichend geklärt erscheint.

d) Galaktosidasen: Lactase, Melibiase.

Die Spezifität der Galaktoside spaltenden Enzyme ist noch nicht genügend untersucht. Man wird nach unseren heutigen Kenntnissen wenigstens zwei Enzymgruppen zu unterscheiden haben, für deren eine die Lactase, Milchzucker spaltendes Enzym, für deren andere die Melibiase als charakteristischer Vertreter anzusehen ist, da ihre Substrate, Lactose als 5-Galaktosidoglucose, Melibiose als 6-Galaktosidoglucose, strukturverschieden sind.

Lactose spaltendes Enzym findet sich vor allem in den Milchkücheln und Kefirkörnern, aber auch in Schimmelpilzen wie

¹⁾ Siehe dagegen K. Josephson, B. 58, 2726 (1925).

²⁾ Bio. Z. 58, 329 (1914).

³⁾ H. 117, 159 (1921); 128, 99 (1923).

⁴⁾ a. a. O.

⁵⁾ B. 59, 821 (1926).

Aspergillus oryzae, seine Wirkung ist ferner auch in bitteren Mandeln beobachtet worden. Das Enzym der Milchzuckerhefen scheint eine β -Galaktosidase zu sein, da es nach den Angaben von E. Fischer und H. E. Armstrong¹⁾ auch einfaches β -Methylgalaktosid hydrolysiert; die Annahme von H. E. Armstrong, E. F. Armstrong und E. Horton²⁾, wonach man von diesem das Enzym der bitteren Mandeln zu unterscheiden habe, da nämlich die Wirkung des ersteren nur durch Galaktose, die des letzteren nur durch Glucose gehemmt werde, bedarf noch der näheren Bestätigung, wenn gleich sich für die beiden Enzyme nach R. Willstätter und W. Czanyi³⁾ auch erhebliche Differenzen im p_H -Optimum ergeben.

Von der Lactase ist die Melibiase vor allem durch ihr Vorkommen unterschieden, sie findet sich nämlich im Gegensatz zu dieser außer in den Mandeln auch in untergäriger Hefe, während in der obergärigen Hefe beide Enzyme fehlen. Es ist noch nicht sicher entschieden, aber wahrscheinlich, daß die Aufspaltung des Trisaccharids Raffinose in Rohrzucker und Galaktose, die C. Neuberger⁴⁾ mit Mandelpräparaten beobachtet hat, der Melibiase zuzuschreiben ist; ebensowenig läßt sich die Identität des Mandelenzyms mit dem der untergärigen Hefen sicher beurteilen.

Den zeitlichen Verlauf der Hydrolyse sowohl von Lactose wie von Raffinose durch Mandelpräparate fanden Willstätter und Czanyi monomolekular, auch beobachteten sie Proportionalität von Enzymmenge und Reaktionsgeschwindigkeit; die abweichenden Ergebnisse, über welche R. Willstätter und G. Oppenheimer⁵⁾ bei der Spaltung von Milchzucker durch Kefirlactase berichten, sind nach R. Kuhn⁶⁾ auf Enzymzerstörung zurückzuführen.

Eine präparative Isolierung von Galaktosidasen ist noch nicht durchgeführt worden. Nach R. Willstätter und R. Kuhn⁷⁾ scheint die Melibiase der Hefe in ihrem chemischen Verhalten dem rohrzuckerspaltenden Enzym nahezustehen, da sie dieses auch in weitgehend gereinigte Präparate begleitet.

1) B. **35**, 3158 (1902).

2) Proc. Roy. Soc. B. **80**, 321 (1908).

3) H. **117**, 182 (1921).

4) Bio. Z. **3**, 519 (1907).

5) H. **118**, 168 (1921/22).

6) In C. Oppenheimer, Die Fermente und ihre Wirkungen. 5. Aufl., Leipzig 1925, S. 296.

7) H. **115**, 180 (1921).

2. Polyasen.

Die wichtigsten und verbreitetsten Enzyme, die den Umsatz höherer Kohlehydrate in tierischen und in pflanzlichen Organismen vollziehen, sind die Amylasen oder Diastasen; ihre Wirkung bezieht sich auf die Synthese und auf den Abbau von Stärke und von Glykogen, der über die Zwischenstufen der Dextrine zu Maltose als Endprodukt führt. Im tierischen Organismus finden sie sich vor allem in den verdauenden Sekreten, so im Speichel und im Pankreassaft, und in den Kohlehydrat speichernden Organen wie der Leber; auch in der Pflanzenwelt hat man sie hauptsächlich in denjenigen Teilen aufgefunden, in welchen die Stapelung und die Mobilisierung der Reservestärke erfolgt, so in den Samen, in welchen die Wirkung des Enzyms bei der Keimung hervortritt.

Die verschiedenen Bestimmungsweisen, die die Literatur zum Nachweis und zur quantitativen Erfassung des diastatischen Abbaues von Stärke oder Glykogen empfiehlt, lassen sich zwei besonderen Gesichtspunkten unterordnen, je nachdem sie die Veränderung bestimmter Eigenschaften des Substrats und die Abnahme seiner Menge oder die Messung der entstandenen Reaktionsprodukte durch ihre reduzierende Wirkung zur Grundlage haben. Zu ersteren gehören die Verfahren von A. Pollak¹⁾ und von J. Wolff und A. Fernbach²⁾, welche die fortschreitende Dispersitätsänderung der Stärkelösungen, ihre Verflüssigung, verfolgen, sowie die viel angewandte Methode von J. Wohlgemuth³⁾, die auf der beim Stärkeabbau eintretenden Änderung der Farbreaktion mit Jod beruht, und endlich die elegante neuere Bestimmungsweise von P. Rona und C. van Eweyk⁴⁾, welche die Abnahme des Trübungsgrades von Glykogenlösungen unter der Wirkung des Enzyms nephelometrisch ermittelt.

Zuverlässiger dürften die Verfahren sein, welche die Reduktionswirkung der abgebauten Stärke bestimmen, beispielsweise gegenüber Fehlingscher Lösung nach G. Bertrand⁵⁾ oder gegenüber Hypojodit nach dem Verfahren von R. Willstätter

¹⁾ Wochenschr. f. Brauerei **20**, 595 (1903).

²⁾ C. r. **140**, 1403 (1905).

³⁾ Bio. Z. **9**, 1 (1910).

⁴⁾ Bio. Z. **149**, 174 (1924).

⁵⁾ G. Bertrand und P. Thomas, Guide pour les manipulations de chimie biologique, Paris 1910, S. 67 ff.

und G. Schudel¹⁾, deren Ergebnisse K. Josephson²⁾ übereinstimmend fand. Für die Anwendbarkeit dieser Methoden zur Messung der Amylasewirkung, die in Untersuchungen von H. C. Sherman, E. C. Kendall und E. D. Clark³⁾, bzw. von R. Willstätter, E. Waldschmidt-Leitz und A. R. F. Hesse⁴⁾ genauer ausgearbeitet worden ist, besteht nur die Voraussetzung, daß die geprüften Enzymlösungen keine Maltase enthalten, deren Wirkung sich zu der amylyatischen hinzugesellen würde. Die vergleichende Anwendung der verschiedenen Bestimmungsmethoden zur Messung des Stärkeabbaues, welche jeweils zu verschiedenen Ergebnissen führen, hat, wie später näher erörtert werden wird, wichtige Rückschlüsse auf die Natur dieses Vorganges erlaubt.

Die Abhängigkeit der Wirkung tierischer Amylase von der Gegenwart von Neutralsalzen ist zuerst durch die Beobachtungen von O. Nasse⁵⁾ an Speichelamylase erkannt, und sie ist seitdem viel untersucht worden. In der Aktivierbarkeit durch Elektrolyte unterscheiden sich nach H. Bierry⁶⁾ tierische und pflanzliche Amylasen; während H. Bierry und J. Giaja⁷⁾ beobachteten, daß der Pankreassaft und die Pankreasauszüge ihre diastatische Wirkung bei der Dialyse einbüßen und auf Salzzusatz wiedergewinnen, behält Malzamylase ihre Wirksamkeit bei und wird durch Salze nicht aktiviert. Dagegen geht aus einer Untersuchung von H. Haehn und H. Schweigart⁸⁾ hervor, daß die Lösungen der Kartoffelamylase sich denen des tierischen Enzyms ähnlich verhalten; es gelang, das Enzym in diesen durch Dialyse und Ultrafiltration in inaktive, aktivierbare Form überzuführen.

Die theoretische Bedeutung der Amylaseaktivierung durch anorganische Ionen, unter welchen den Anionen und in erster Linie den Cl⁻-Ionen ein besonderer Einfluß zukommt, ist bereits im allgemeinen Teil dieses Buches gewürdigt worden. Es ist noch nicht sicher zu erkennen, ob ihr Einfluß die Dissoziation des Enzyms oder ob er, wie nach den Untersuchungen von W. Biedermann⁹⁾

¹⁾ B. **51**, 780 (1918).

²⁾ B. **55**, 1758 (1923).

³⁾ Am. Soc. **32**, 1072 (1910).

⁴⁾ H. **126**, 143 (1922/23).

⁵⁾ Pflüg. Arch. **9**, 138 (1875).

⁶⁾ Bio. Z. **40**, 357 (1912).

⁷⁾ C. r. **143**, 300 (1906).

⁸⁾ Bio. Z. **143**, 516 (1923).

⁹⁾ Bio. Z. **129**, 282; **137**, 35 (1923).

über eine Salzhydrolyse der Stärke zu erwarten wäre, die Zerfallstendenz des Substrats betrifft. Zwar ist eine Veränderung der p_{H} -Abhängigkeit von Speichelamylase und eine Verschiebung der optimalen Wasserstoffzahl in den Untersuchungen von W. E. Ringer und H. van Trigt¹⁾ sowie von L. Michaelis und H. Pechstein²⁾ je nach der Natur der angewandten Elektrolyte beobachtet und mit der Annahme verschiedener Amylase-Elektrolytkomplexe gedeutet worden; diese Erscheinung ist indessen nach A. Hahn und K. Harpuder³⁾ und nach Willstätter, Waldschmidt-Leitz und Hesse als eine kombinierte Salzpufferaktivierung im Sinne ungleicher Aktivierbarkeit bei wechselnder Wasserstoffzahl zu verstehen. Das p_{H} -Optimum der Amylase aus Pankreas ist von H. C. Sherman, A. W. Thomas und M. W. Baldwin⁴⁾ und von Willstätter, Waldschmidt-Leitz und Hesse unabhängig von der Menge der anwesenden Cl⁻-Ionen zu 6,8 bestimmt worden, in Übereinstimmung mit den Angaben von Michaelis und Pechstein für Speichelamylase und den Beobachtungen von O. Holmbergh⁵⁾ für das Leberenzym. Es scheint, daß die verschiedenen Amylasen des tierischen Organismus, deren Verhalten weitgehend übereinstimmt, identisch oder doch nahe miteinander verwandt sind⁶⁾. Der optimale Wirkungsbereich der meisten pflanzlichen Amylasen entspricht dagegen stärker saurer Reaktion; so liegt das p_{H} -Optimum der Malzamyase nach übereinstimmenden Beobachtungen von H. C. Sherman und M. D. Schlesinger⁷⁾, L. Adler⁸⁾ und von H. Lüers und W. Wasmund⁹⁾ zwischen $p_{\text{H}} = 4,4$ und $5,2$, und ähnliche Werte geben K. Sjöberg¹⁰⁾ sowie Sherman, Thomas und Baldwin für die Amylase der Blätter bzw. von *Aspergillus oryzae* an; Kartoffelamylase steht dagegen auch in dieser Beziehung den tierischen Enzymen näher, sie wirkt nach Gr. McGuire und G. Falk¹¹⁾ bei $p_{\text{H}} = 6,7$ optimal.

1) H. **82**, 484 (1912).

2) Bio. Z. **59**, 77 (1914).

3) Z. Biol. **71**, 287 (1920).

4) Am. Soc. **41**, 231 (1918/19).

5) H. **134**, 68 (1924).

6) Vgl. jedoch die bemerkenswerten neueren Feststellungen von H. Pringsheim u. J. Leibowitz über eine Verschiedenheit von Speichel- und Pankreasenzym, B. **59**, 991 (1926).

7) Am. Soc. **37**, 623, 643, 1305 (1915).

8) Bio. Z. **77**, 146 (1916).

9) Fermentf. **5**, 169 (1921/22).

10) Bio. Z. **133**, 218, 294 (1923).

11) Jl. of Gen. Physiol. **2**, 215 (1920).

Die Kinetik der diastatischen Stärkehydrolyse ist viel untersucht worden. Es ist zuerst in den Untersuchungen von R. H. Chittenden¹⁾ und seinen Mitarbeitern erkannt und exakt belegt worden, daß der enzymatische Abbau der Stärke nicht glatt zur Bildung der theoretischen Maltosemenge führt, daß vielmehr die Reaktion schon früher zum Stillstand kommt; nach neueren eingehenden Arbeiten von Mc Guigan²⁾, von H. v. Euler und O. Svanberg³⁾ und von Lüers und Wasmund liegt die Verzuckerungsgrenze, der „Grenzabbau“, bei etwa $\frac{3}{4}$ der theoretischen Menge Maltose. Diese Erscheinung ist früher vielfach auf einen hemmenden Einfluß der Spaltprodukte zurückgeführt worden, zumal man ein Fortschreiten der Verzuckerung, eine „diastatische Nachwirkung“, nach der Vergärung der gebildeten Maltose bei der Spiritusfabrikation beobachtete. H. Pringsheim und W. Fuchs⁴⁾ haben indessen gezeigt, daß diese Nachverzuckerung auf der Wirkung eines in der Hefe enthaltenen Komplementes beruht, dessen die Amylase zur Hydrolyse gewisser Abbauprodukte, der sogenannten Grenzdextrine, bedarf. Es ist naheliegend, manche Beobachtungen der Literatur⁵⁾, die über einen charakteristischen Unterschied in der Verzuckerungsgrenze durch Amylase aus ungekeimten und aus gekeimten Samen, z. B. aus Gerste und Malz, berichten, mit der Bildung eines weiteren Komplementes oder Aktivators, die bei der Keimung erfolgt, zu deuten. Unterschiede im Reaktionsverlauf des diastatischen Abbaues ergeben sich auch für den Vergleich der beiden Komponenten des Stärkekorns, der Amylose und des Amylopektins; die Beobachtungen, die an Amylasen verschiedenster Herkunft gewonnen worden sind, stimmen darin überein, daß die Amylose nicht nur schneller, sondern auch weitgehender verzuckert wird als die Hüllsubstanz, das Amylopektin. So lassen auch unsere geringen Kenntnisse vom Aufbau des Stärkemoleküls und der Art der bei seiner Hydrolyse sich abspielenden Teilvorgänge, die man noch nicht aufzulösen vermag, kein Urteil über die innere Bedeutung der Tatsache zu, daß der Reaktionsverlauf der Zuckerbildung durch tierische und pflanzliche Amylase charakteristische Unterschiede aufweist. Während sich

1) Trans. Conn. Acad. VI und VII; Referat in R. Malys Jahresbericht über die Fortschritte der Tierchemie **15**, 256 ff. (1885).

2) JI. Biol. Chem. **39**, 273 (1919).

3) H. **112**, 191 (1920/21).

4) B. **56**, 1752 (1923); H. Pringsheim u. K. Schmalz, Bio. Z. **142**, 108 (1923); H. Pringsheim und A. Reiser, Bio. Z. **148**, 336 (1924).

5) In unveröffentlichten Versuchen des Verfassers bestätigt.

aus den Untersuchungen von H. C. Sherman und J. C. Baker¹⁾ sowie R. Willstätter, E. Waldschmidt-Leitz und A. R. F. Hesse²⁾ ergibt, daß die Hydrolyse der Stärke durch pankreatische Amylase bis zu einer Verzuckerung von etwa 40 Proz. praktisch monomolekular verläuft, sofern man der Berechnung der Reaktionskonstanten die erreichbare Verzuckerungsgrenze zugrunde legt, haben zuerst H. T. Brown und A. T. Glendinning³⁾ darauf aufmerksam gemacht, daß der Stärkeabbau durch Malzamyase meist rascher verläuft als entsprechend einer Gleichung erster Ordnung, und Lüers und Wasmund fanden sogar bis zu einem Umsatz von 40 Proz. direkte Proportionalität von Reaktionsdauer und gebildeter Maltose; auch die Befunde von Sherman und Baker an Takadiastase zeigen ein beträchtliches Ansteigen der monomolekularen Reaktionskonstanten.

Die Aufstellung bestimmter Formeln zur Beschreibung des diastatischen Stärkeabbaus wird so lange der inneren Berechtigung entbehren, als es nicht gelingt, die Teilvorgänge dieses Prozesses zu zergliedern und gesondert zu erfassen, zumal die Einheitlichkeit der Amylase selbst noch nicht hinreichend sichergestellt erscheint. Für die praktische Messung von Enzympräparaten werden jedoch einfache Beziehungen, wie sie für den ersten Bereich des Umsatzes durch tierische Amylase aufgefunden wurden, zugrunde gelegt werden können, da zudem nach den Beobachtungen von Willstätter, Waldschmidt-Leitz und Hesse hier genaue Proportionalität zwischen Reaktionsgeschwindigkeit und Enzymmenge besteht; dieselbe Beziehung gilt nach v. Euler und Svanberg und nach Lüers und Wasmund auch für den Vergleich der Anfangsgeschwindigkeiten bei pflanzlichem Enzym. So ist als Maß der Pankreasamyase von Willstätter, Waldschmidt-Leitz und Hesse die „Amylase-Einheit (Am.-E.)“ vorgeschlagen worden als das 100fache derjenigen Enzymmenge, für die sich unter bestimmten Versuchsbedingungen die monomolekulare Reaktionskonstante zu 0,01 ergibt; und als Maß für den Reinheitsgrad dient der „Amylase-Wert (Am.-W.)“, gegeben durch die Anzahl Am.-E. in 1 cg der Präparate. Diese Ausdrücke stehen zu anderen, von Euler und Svanberg und von H. C. Sherman und M. D. Schlesinger⁴⁾

¹⁾ Am. Soc. **38**, 1885 (1916).

²⁾ a. a. O.

³⁾ Soc. **81**, 388 (1902).

⁴⁾ a. a. O.

gegebenen Definitionen für den Wirkungswert von Amylasepräparaten in einfachen Beziehungen¹⁾.

Die abweichenden Ergebnisse, die man bei der vergleichenden Anwendung der verschiedenen Bestimmungsweisen zur Verfolgung des Stärkeabbaus durch Amylase wechselnder Herkunft beobachtet hat, haben schon früh zu der Auffassung geführt, daß man bei der diastatischen Stärkehydrolyse die Wirkung zweier Enzyme zu unterscheiden habe, eine Auffassung, die zuerst von H. P. Wijsman²⁾ geäußert worden ist. Zur Entscheidung dieser bis heute noch nicht gelösten Frage, die die Enzymforschung viel beschäftigt hat, ob man nämlich neben dem Stärke verflüssigenden oder depolymerisierenden ein besonderes verzuckerndes Enzym, nach einer Bezeichnung von H. Pringsheim³⁾ eine Amylase und eine Amylobiase anzunehmen hat, hat man sich auf Beobachtungen über das wechselnde Verhältnis zu stützen versucht, durch welches verzuckernde und verflüssigende Kraft der verschiedenen bekannten diastatischen Enzyme ausgezeichnet sind; auch ist über Versuche zur Trennung der beiden Enzymwirkungen oder zur Unterdrückung der einen von ihnen berichtet worden. So geben H. Pottevin⁴⁾ und in neuerer Zeit E. Ohlsson⁵⁾ an, daß es durch kurzes Erhitzen von Amylase-lösungen gelingt, die zuckerbildende Komponente des enzymatischen Systems unter Erhaltung der verflüssigenden Wirkung ganz zu zerstören; weiterhin haben vergleichende Versuche von O. Holmbergh⁶⁾ an Leberamylase ergeben, daß durch die Gegenwart von Jodiden die Zuckerbildung gehemmt, die Stärkeverflüssigung dagegen aktiviert wird, während zufolge K. Hizume⁷⁾ nach dem Zusatz der verschiedensten Elektrolyte zu Lösungen pankreatischer Amylase keine Veränderungen im Wirkungsverhältnis zu beobachten sind. Vor allem sind es aber die beträchtlichen Unterschiede im Verflüssigungs- und Verzuckerungsvermögen der verschiedenen Amylasearten gewesen, die zur Annahme zweier, in wechselndem Verhältnis vorkommender Enzyme zu berechtigen schienen. So haben die

¹⁾ Siehe dazu R. Willstätter, E. Waldschmidt-Leitz u. A. R. F. Hesse, a. a. O., und zwar S. 157 und 167 (1922/23).

²⁾ Rec. trav. chim. **9**, 1 (1890).

³⁾ B. **57**, 1581 (1924).

⁴⁾ Ann. Inst. Pasteur **13**, 665 (1899).

⁵⁾ Soc. Biol. **87**, 1183 (1922).

⁶⁾ H. **134**, 68 (1924).

⁷⁾ Bio. Z. **146**, 52 (1924).

Untersuchungen von H. C. Sherman und M. D. Schlesinger¹⁾ und von E. C. Kendall und H. C. Sherman²⁾ dargetan, daß unter der Wirkung von pankreatischer Amylase die Verflüssigung, von Malzamylyase dagegen die Verzuckerung stark überwiegt; und nach den Beobachtungen von J. Effront³⁾ und von T. Chrzaszcz⁴⁾ fehlt in den ruhenden Samen z. B. von Getreide das amyloklastische Vermögen fast ganz, während man ihre verzuckernde Wirkung normal findet; es erfolgt also bei der Keimung eine starke Zunahme der Verflüssigungsfähigkeit. Es ist indessen sehr bemerkenswert, daß es bisher nicht gelungen ist, mit präparativen Mitteln eine Trennung der beiden angenommenen enzymatischen Komponenten oder auch nur eine Verschiebung ihres Wirkungsverhältnisses zu erreichen; so hat sich aus den Untersuchungen von Sherman und Schlesinger mit Pankreasamylyase und von H. Lüers und E. Sellner⁵⁾ mit Malzamylyase, die sich auch der Anwendung von Adsorptionsmitteln bedienen, die Feststellung ergeben, daß das Verhältnis der enzymatischen Wirkungen, der verflüssigenden und der verzuckernden, in allen Präparaten jeweils konstant gefunden wird, wenn auch zwischen Malz- und Pankreasenzym selbst bedeutende Unterschiede bestehen.

Es ist auf Grund dieser Befunde nicht gerade wahrscheinlich, daß eingehendere Untersuchungen die Unterscheidung zweier diastatischer Enzyme bestätigen werden; die bestehenden Abweichungen im Wirkungsverhältnis der verschiedenen Amylyasen, am ausgeprägtesten zwischen dem Enzym aus Gerste und dem aus Malz, werden eher auf die Gegenwart besonderer Komplemente oder Aktivatoren zurückzuführen sein, die für die Aufspaltung bestimmter Atomgruppierungen erforderlich sind, zumal auch die Verzuckerungsgrenze für das Enzym aus dem ruhenden Samen tiefer gefunden wird. Mit dieser Auffassung stehen die Ergebnisse im Einklang, die in neuerer Zeit R. Kuhn⁶⁾ über den Wirkungsmechanismus der verschiedenen Amylyasen veröffentlicht hat und die zur Unterscheidung zweier Gruppen diastatischer Enzyme, der α -Amylyasen und der β -Amylyasen geführt haben, welche an verschiedenen Punkten

1) Am. Soc. **35**, 1784 (1913); **38**, 1885 (1916).

2) Am. Soc. **32**, 1087 (1910).

3) C. r. **174**, 18 (1922).

4) Bio. Z. **142**, 471 (1923).

5) Wochenschr. f. Brauerei **42**, 97, 103, 110 (1925).

6) A. **444**, 1 (1925).

des Stärkemoleküls angreifen. Die optische Analyse des beim raschen Abbau der Stärke entstehenden Zuckers, dessen Mutarotationssinn verschieden gefunden wurde, hat zu der Feststellung geführt, daß die α -Amylasen, als deren wichtigste Vertreter Pankreas- und Takadiastase zu gelten haben, das Endprodukt des Stärkeabbaus, die Maltose, in α -Form entstehen lassen, während die Einwirkung der β -Amylasen, für welche das Malzenzym als charakteristischer Vertreter anzusehen ist, zur primären Bildung von β -Maltose führt. Aus diesen Beobachtungen haben sich wichtige Rückschlüsse auf den konstitutionellen Aufbau des Stärkemoleküls ableiten lassen, die in der Annahme abwechselnder α - und β -glucosidischer Bindungen und in der Existenz nichtfuroider Traubenzuckerreste ihren Ausdruck finden¹⁾. Die Verschiedenheit der Reaktionswege, auf welchen α - und β -Amylasen die Hydrolyse der Stärke vollziehen, drückt sich auch in der Verschiedenheit des Geschwindigkeitsverhältnisses aus, das sich nach H. C. Sherman und A. W. Thomas²⁾ für das Verschwinden der Jod-Stärke-Reaktion und die Zuckerbildung bei Pankreas- und Malzamyase ergibt; die Farbreaktion der Stärke mit Jod hat man nämlich nach W. v. Kaufmann und A. Lewite³⁾ und nach M. Samec und A. Mayer⁴⁾ auf bestimmte Atomgruppierungen in dem Kohlehydrat zu beziehen.

In der präparativen Isolierung diastatischer Enzyme sind die wichtigsten Fortschritte an tierischer Amylase erzielt worden. Nach dem zuerst von A. Danilewsky⁵⁾ für die Trennung der Enzyme des Pankreassaftes befolgten Prinzip erhielt schon J. Cohnheim⁶⁾ die Speichelamylase durch Adsorption an Calciumphosphat und Elution mit Wasser frei von Proteinsubstanz und er beschrieb die wichtige Beobachtung, die er beim Vergleich des Adsorptionsverhaltens der pankreatischen Enzyme gewann, daß „das Stärke umsetzende Ferment sich viel weniger innig an kleine Teilchen heftet als das Fibrin lösende“. Allein spätere Untersuchungen, die der Reinigung tierischer Amylasen gewidmet waren, haben an

1) In Übereinstimmung mit dieser Auffassung stehen die neueren Befunde von H. Pringsheim über die direkte Aufspaltung der Stärke zu Traubenzucker durch kombinierte Einwirkung von α - und β -Amylasen, B. 58, 1262 (1925); 59, 991, 996 (1926).

2) Am. Soc. 37, 623 (1915).

3) B. 52, 616 (1919).

4) Kolloidchem. Beitr. 13, 165 (1920); 13, 272, und zwar S. 285 (1921).

5) Virch. Arch. 25, 279 (1862).

6) Ebenda 28, 241 (1863).

diese wichtigen älteren Erfahrungen über das Adsorptionsverhalten des Enzyms nicht mehr angeknüpft. So haben sich die präparativen Beispiele, die H. C. Sherman und M. D. Schlesinger¹⁾ zur Isolierung der Pankreasamylase gegeben haben, darauf beschränkt, das Enzym aus käuflichen Drüsenpräparaten durch fraktionierte Extraktion mit wässrigem Alkohol und durch fraktionierte Fällung der Auszüge bei tiefer Temperatur anzureichern; dieses Verfahren, das sehr verlustreich ist, hat auch in den besten Präparaten, deren Amylasewert etwa 6,1 betrug, die Amylase weder vom Trypsin noch von eiweißartiger Substanz abzutrennen erlaubt.

Mittels der Adsorptionsmethodik haben erst R. Willstätter, E. Waldschmidt-Leitz und A. R. F. Hesse²⁾ die Reinigung der Pankreasamylase wieder aufgenommen. Es hat sich dabei ergeben, daß der Amylase von den drei wichtigsten pankreatischen Enzymen die am wenigsten ausgeprägten Adsorptionsaffinitäten zukommen, sie ist gegen elektropositive und elektronegative Adsorbentien recht indifferent, während die Lipase von den untersuchten Adsorptionsmitteln unspezifisch und sehr leicht, das Trypsin andererseits vorwiegend von sauren Adsorbentien aufgenommen wird. Daher lassen sich die drei pankreatischen Enzyme infolge ihres verschiedenen Adsorptionsverhaltens voneinander trennen. Aus dem Gemisch der drei Enzyme, wie es beispielsweise in den Glycerinauszügen der getrockneten Pankreasdrüse vorliegt, wird zunächst die Lipase durch Adsorption mittels Tonerde bei saurer Reaktion, sodann aus der Adsorptionsrestlösung das Trypsin mit Kaolin entfernt, während die Verluste an Amylase, bedingt durch eine teilweise Adsorption des Enzyms unter dem Einfluß von Koadsorbentien, nicht sehr erheblich sind.

Da es der Amylase an Adsorptionsaffinitäten mangelt, hat sich ihre enzymatische Konzentration mit Adsorptionsmitteln noch nicht so weit steigern lassen wie bei anderen Enzymen; immerhin verdankt das Enzym, wenn es den Zustand enzymatischer Einheitlichkeit erreicht hat, seinen Begleitstoffen noch eine gewisse Adsorbierbarkeit, die sich zu einer weiteren Reinigung ausnutzen läßt. Es wird in diesem Reinheitsgrad noch von Tonerde aufgenommen, und zwar bei neutraler Reaktion und zweckmäßig bei einem hohen Gehalt an Alkohol, der, wie bei anderen amphoterer Stoffen, Amino-

¹⁾ Am. Soc. **37**, 1305 (1915).

²⁾ H. **126**, 143 (1922/23); **142**, 14 (1924/25).

säuren oder Peptiden, die Entwicklung saurer Eigenschaften der Koadsorbenzien bewirkt. In den alkalischen Elutionen der Tonerdeadsorbate ist die Amylase, frei von Eiweiß, aber noch kohlehydrathaltig, in erheblich gesteigertem Reinheitsgrad erhalten worden, entsprechend dem Amylasewert 64 etwa 125fach konzentrierter als in der getrockneten Drüse.

Die Adsorbierbarkeit der Amylase durch Tonerde, die man unter gewissen Bedingungen beobachtet und die zu ihrer Reinigung dienen kann, beruht indessen lediglich auf einer Assoziation des Enzyms mit begleitenden Stoffen. Es ist gelungen, das Enzym durch Voradsorption, nämlich durch Adsorption eines Teiles der Substanz, so zu reinigen, daß es weder aus wässriger noch aus alkoholischer Lösung mehr von Tonerde aufgenommen wird¹⁾; sein wahres Adsorptionsverhalten wird also erst in reinerer Lösung erkennbar. Es gelingt in diesem Zustand, die Adsorption der Amylase zu erreichen durch Anwendung viel stärker basischer Adsorbentien, von Beryllium- oder Ferrihydroxyd; es ist aber noch nicht untersucht, ob nicht auch für dieses Verhalten Begleitstoffe entscheidend sind.

Von den pflanzlichen Amylasen ist das Enzym der keimenden Gerste präparativ am eingehendsten untersucht. Die viel vertretene Anschauung, daß das Enzym in der Hauptsache erst bei der Keimung der Gerste aus einer Vorstufe gebildet würde, und zwar unter Mitwirkung von Sauerstoff, und nach H. Lüers²⁾, sowie J. L. Baker und H. F. E. Hulton³⁾ aus Proteinsubstanzen des Gerstenkorns, scheint nach neueren Untersuchungen von V. Syniewski³⁾, wie nach unveröffentlichten Versuchen des Verfassers nicht zu Recht zu bestehen: die älteren Beobachtungen, deren analytische Grundlagen unzureichend sind, werden nicht mit einem quantitativen, sondern mit einem qualitativen Unterschiede der Amylasen in Gerste und Malz zu verstehen sein; der Wirkungsbereich des Enzyms, gemessen an der Bildung reduzierenden Zuckers, scheint sich bei der Keimung zu erweitern.

Die Versuche zur Anreicherung der Malzamyrase in der älteren Literatur beschränken sich im wesentlichen auf die Anwendung fraktionierter Fällung von wässrigen oder wässrig-alkoholischen

1) R. Willstätter, E. Waldschmidt-Leitz u. A. R. F. Hesse, H. 142, 14 (1924/25); sowie noch unveröffentlichte Versuche des Verfassers.

2) Bio. Z. 104, 30, und zwar S. 71 (1920).

3) Soc. 121, 1929 (1922).

Malzauszügen mit organischen Solvenzien, Alkohol oder Aceton, nach dem Vorbild von C. J. Lintner¹⁾. Nach H. C. Sherman und M. D. Schlesinger²⁾ wird das Enzym aus dem Malze durch verdünnten Alkohol extrahiert und nach der Dialyse der Extrakte durch organische Mittel oder durch Aussalzung mit Ammonsulfat niedergeschlagen; das beste von diesen Forschern erhaltene Präparat entsprach einem Amylasewert von etwa 2,8, war also noch sehr unrein; auch durch Anwendung von Adsorptionsmitteln, beispielsweise Tonerde, konnten H. Lüers und E. Sellner³⁾ die enzymatische Konzentration nur zum Amylasewert von etwa 1,6 steigern. Zu eiweißfreien, aber stark kohlehydrathaltigen Lösungen sind R. Fricke und P. Kaja⁴⁾ durch Elektrodialyse und Elektro-osmose von Lösungen käuflicher Amylasepräparate gelangt; die Konzentration des Enzyms, die nach diesen Operationen auf das 6fache gesteigert war, läßt sich indessen mit der in anderen Literaturpräparaten erreichten nicht sicher vergleichen.

Auch an dem Enzym aus *Aspergillus oryzae* ist eine präparative Reinigung von H. C. Sherman und A. P. Tanberg⁵⁾ durchgeführt worden; die reineren Präparate, die durch Ausfällung mit Ammonsulfat und durch fraktionierte Alkoholfällung erhalten waren und deren enzymatische Konzentration etwa das 30fache von der in den Handelspräparaten gemessenen betrug, enthielten indessen noch erhebliche Mengen Proteinsubstanz.

Zu den Polyasen gehören außer den stärke- und glykogenspaltenden Enzymen noch eine Anzahl anderer Vertreter, welche teils Reservekohlehydrate, teils echte pflanzliche Gerüstsubstanzen zu hydrolysieren vermögen, deren Wirkungen und Eigenschaften aber nicht so eingehend untersucht worden sind. Unter ihnen ist die Inulinase zu nennen, welche den Abbau eines Reservestoffs in unterirdischen Knollen und Wurzeln, des Inulins, zu d-Fructose vollzieht; die spezifischen Wirkungen und die Eigenschaften des Enzyms, das sich beispielsweise in Schimmelpilzen wie *Aspergillus niger* und *Penicillium glaucum* findet und das in neuerer Zeit H. Pringsheim und G. Kohn⁶⁾ beschrieben haben, sind indessen

¹⁾ J. pr. **34**, 378; **36**, 481 (1886/87).

²⁾ Am. Soc. **37**, 643 (1915).

³⁾ Wochenschr. f. Brauerei **42**, 97, 103, 110 (1925).

⁴⁾ B. **57**, 310, 765 (1924).

⁵⁾ Am. Soc. **38**, 1638 (1916).

⁶⁾ H. **133**, 80 (1924).

noch nicht näher erkannt, zumal seine Abtrennung von begleitender Saccharase noch nicht durchgeführt wurde. Auch die Lichenase, die die Aufspaltung der Flechtenstärke, des Lichenins, in Cellobiose bewirkt und die von H. Pringsheim und K. Seifert¹⁾ in Malzauszügen, von P. Karrer, B. Joos und M. Staub²⁾ auch im Darmtraktus der Weinbergschnecke aufgefunden und näher beschrieben wurde, mag hier Erwähnung finden; sie wird zu den Hemicellulasen gerechnet, deren Wirkungen man zwar bei der Keimung der Samen mit der Auflösung der Hemicellulosen beobachtet, deren Eigenart aber noch nicht näher zu charakterisieren ist. Das gleiche gilt für die echte Cellulose spaltenden Enzyme, deren Wirkung man bei der Tätigkeit holzzerstörender Bakterien und Pilze anzunehmen hat; nur in einem Falle ist hier durch H. Pringsheim³⁾ aus cellulosevergärenden Bakterien eine Cellulase isoliert und mit ihrer Wirkung beschrieben worden.

V. Katalasen.

Die Zersetzung von Wasserstoffsuperoxyd durch lebendes pflanzliches und tierisches Gewebe ist schon sehr früh beobachtet worden; indessen ist diese Erscheinung erst verhältnismäßig spät durch O. Loew⁴⁾ auf die Wirkung eines besonderen Enzyms zurückgeführt worden, das er Katalase nannte und dessen außerordentliche Verbreitung in fast allen Geweben und Sekreten pflanzlicher und tierischer Organismen man bald erkannte. Die einzige bekannte Wirkung des Enzyms ist die Zerlegung des Wasserstoffsuperoxyds in Sauerstoff und Wasser, während es andere Peroxyde, wie die organischen Derivate des Hydroperoxyds nicht zu spalten vermag. Die große Verbreitung der Katalase in den Organismen legt die Annahme nahe, daß diesem Enzym bei der Vermittlung biologischer Oxydationsvorgänge eine bedeutsame physiologische Funktion zukommen müsse, wengleich sein Substrat, das Hydroperoxyd, in lebendem Gewebe nicht beobachtet worden ist. So sind eine Reihe bemerkenswerter Ansichten über die Rolle der Katalase bei der

¹⁾ H. 128, 284 (1923); H. Pringsheim u. J. Leibowitz, H. 131, 226 (1923); H. Pringsheim u. W. Kusenack, H. 137, 264 (1924).

²⁾ Helv. 6, 800 (1923); 7, 518 (1924).

³⁾ H. 78, 266 (1912).

⁴⁾ Bull. Dep. Agricult. Washington 68 (1900); s. a. Bio. Z. 34, 354 (1911).

Atmung der Gewebe geäußert worden, denen die gemeinsame Vorstellung zugrunde liegt, daß dem Enzym die Aufgabe zufalle, intermediär bei Oxydationsvorgängen entstehendes Hydroperoxyd als Zellgift zu beseitigen. So hat H. Wieland¹⁾, der die meisten Oxydationsprozesse, auch die biologischen Oxydationen, als Dehydrierungsreaktionen versteht, die Auffassung vertreten, daß die Atmungsenzyme die Hydrierung des molekularen Sauerstoffs nur bis zur Stufe seiner halben Sättigung mit Wasserstoff, die dem Hydroperoxyd entspricht, zu leiten vermögen und daß hier die Wirkung der Katalase einsetzt, die mit der Entfernung dieses Zellgiftes gleichzeitig neuen Sauerstoff für die Dehydrierung bereitstellt. Die Feststellung, daß nur sauerstoffbedürftige Zellen Katalase enthalten, anaerobe dagegen nicht, und die Verteilung der Katalasen in ihrer Abhängigkeit vom Sauerstoffbedarf der einzelnen Zellarten berechtigt jedenfalls zu der Schlußfolgerung, daß diese Enzyme für die Vermittlung der Oxydationsprozesse unentbehrlich erscheinen, mag man diese nun mit Wieland als Dehydrierungsreaktionen, im Sinne einer Wasserstoffaktivierung in den Substraten der Oxydation, oder mag man sie mit A. Bach und R. Chodat²⁾ als direkte Oxydationen, unter Vermittlung von aktiviertem Sauerstoff beschreiben.

Für die Bestimmung der Katalasewirkung stehen zwei gleichwertige Meßmethoden zur Verfügung, nämlich entweder die volumetrische Messung des entwickelten Sauerstoffs oder aber die Titration des unzersetzten Wasserstoffsuperoxyds mit Kaliumpermanganat.

Die p_H -Abhängigkeit der Katalasewirkung ist zuerst von S. P. L. Sørensen³⁾ an dem Enzym aus Leber exakt bestimmt worden, das Optimum der Enzymwirkung ergab sich bei $p_H = 7,0$, also entsprechend neutraler Reaktion. Dieses Ergebnis ist durch spätere Untersuchungen von L. Michaelis und H. Pechstein⁴⁾, von S. Morgulis⁵⁾ sowie von P. Rona und A. Damboviceanu⁶⁾ bestätigt und mit der Feststellung ergänzt worden, daß die Breite der optimalen Wirkungszone und die Lage der Aktivitäts- p_H -Kurve vom Gehalt der Lösung an Neutralsalzen abhängt; mit zunehmen-

1) B. **55**, 3639 (1922); *Ergebn. d. Physiol.* **20**, 477 (1922).

2) *Soc. Biol.* **83**, 1544 (1920); *Arch. int. de Physiol.* **18**, 403 (1921).

3) *Bio. Z.* **21**, 131, 279 (1909).

4) *Ebenda* **53**, 320 (1913).

5) *Il. Biol. Chem.* **47**, 341 (1921).

6) *Bio. Z.* **134**, 20 (1922).

dem Salzgehalt verstärkt sich die Abhängigkeit von der Wasserstoffzahl, während zugleich die maximal erreichbare Reaktionsgeschwindigkeit abnimmt.

Die Beobachtungen der Literatur über die Kinetik der Wasserstoffsuperoxydzersetzung durch Katalase weisen bemerkenswerte Unterschiede auf zwischen der Wirkung der pflanzlichen und der tierischen Enzyme, Unterschiede, die sich zum Teil auf eine verschiedene Beständigkeit des Enzymmaterials zurückführen lassen mögen. So haben die Versuche von W. Issajew¹⁾ mit Katalaselösungen aus getrockneter Hefe zu dem Ergebnis geführt, daß der Umsatz des Hydroperoxyds durch das Enzym durch eine Gleichung erster Ordnung beschrieben werden kann, beispielsweise bei Anwendung verdünnter Hydroperoxydlösungen und 25° oder bei 0° und höherer Substratkonzentration. Ähnlich sind die Befunde von H. v. Euler²⁾ mit der Katalase aus Pilzextrakten, die zudem direkte Proportionalität zwischen Enzymmenge und Reaktionsgeschwindigkeit ergaben. Diese Beziehungen sind für die Wirkung tierischer Katalase nur unter bestimmten Bedingungen beobachtet worden, unter welchen eine Zerstörung des Enzyms nicht eintritt, nämlich bei niedriger Temperatur und bei Anwendung sehr verdünnten Hydroperoxyds. So haben einen monomolekularen Verlauf der Reaktion und Proportionalität von Katalasemenge und Reaktionskonstante G. Senter³⁾ für Blut-, S. Hennichs⁴⁾ für Leberkatalase beschrieben. Dagegen haben Michaelis und Pechstein, Morgulis sowie Rona und Damboviceanu über die Beobachtung berichtet, daß konzentrierten Katalaselösungen aus tierischem Material eine verhältnismäßig stärkere Aktivität zukomme als verdünnten Lösungen des Enzyms; nach Morgulis wird die Kinetik der Katalasewirkung bedingt durch das jeweilige Mengenverhältnis von Enzym und Substrat. Die Angaben, daß der Reaktionsverlauf der Hydroperoxydzersetzung, der nur bei Einwirkung größerer Enzymmengen durch eine Gleichung erster Ordnung ausgedrückt werden könne, mit verdünnteren Enzymlösungen verhältnismäßig langsamer gefunden werde und unter Umständen einer bimolekularen Reaktionsgleichung entspreche, werden mit der beträchtlichen Unbeständigkeit verdünnter Katalaselösungen und mit

¹⁾ H. **42**, 102 (1904); **44**, 546 (1905).

²⁾ Hofm. Beitr. **7**, 1 (1905).

³⁾ Ph. Ch. **44**, 257 (1903); **51**, 673 (1905).

⁴⁾ Bio. Z. **145**, 286 (1923/24).

einer enzymzerstörenden wie hemmenden Wirkung des Wasserstoff-superoxyds zu deuten sein. Es hängt damit zusammen, daß in den angeführten Untersuchungen gleiche Umsätze nicht in Zeiten beobachtet wurden, die den angewandten Enzymmengen umgekehrt proportional waren; dagegen sind nach Morgulis und nach Rona und Damboviceanu die in gleichen Zeiten zersetzten Wasserstoffsuperoxydmengen den Katalasemengen direkt proportional. Es ist verständlich, daß aus solchen Beobachtungen die Schlußfolgerung abgeleitet worden ist, daß die Katalase nicht als wahrer Katalysator zu wirken vermöge, sondern daß eine bestimmte Katalasemenge nur für den Umsatz einer bestimmten Hydroperoxydmenge befähigt sei.

Nach dieser Auffassung soll nämlich das Enzym im Sinne einer gekoppelten Reaktion an derjenigen Stelle seines Moleküls, die als seine spezifische aktive Gruppe den Umsatz des Hydroperoxyds bewirkt, selbst eine Oxydation erleiden, deren Ausmaß durch die angewandten Versuchsbedingungen, Temperatur und Konzentration des Wasserstoffsuperoxyds, bedingt werde. Die Erfahrungen, die mit der Widerlegung ähnlicher Anschauungen über die Wirkungsweise peroxydatischer Enzyme gewonnen worden sind, sollten zur Vorsicht mahnen; es ist unter Berücksichtigung der andersartigen Beobachtungen an pflanzlicher Katalase viel wahrscheinlicher, daß auch das tierische Enzym als echter Katalysator anzusehen ist, dessen Aktivität im Verlaufe seiner Reaktion selbst keine Beeinträchtigung erfährt und dessen Zerstörung, die leichter als bei dem pflanzlichen einzutreten scheint, unabhängig von der eigentlichen enzymatischen Reaktion erfolgt. Man ist daher berechtigt, die Messung der Aktivität von Katalasepräparaten auf die beobachteten monomolekularen Reaktionskonstanten zurückzuführen; so dient als Maß für die Konzentration des Enzyms der „Katalase-Wert (K.-W.)“, das ist die für die Wirkung von 1 g des Präparats auf 0,02 n H_2O_2 bei 0° und optimaler Wasserstoffzahl ermittelte Reaktionskonstante.

Die theoretisch wichtige Analogie zwischen der Wirkung der Katalase und derjenigen anorganischer Katalysatoren, auf die bereits Faraday hingewiesen hat, erscheint hier von besonderem Interesse auf Grund der Feststellung, daß die Wirksamkeit der anorganischen Katalysatoren durch die des enzymatischen Materials quantitativ weit übertroffen wird; diese Tatsache ergibt sich anschaulich aus der nachfolgenden Tabelle 33, die die Aktivität

verschiedener Katalasepräparate der Literatur mit der des kolloidalen Platins vergleicht.

Tabelle 33.

Aktivität von Katalase und anorganischen Katalysatoren.

Präparat	K.-W.	Autor
Kolloidales Platin . . .	1,8	G. Bredig
Blutkatalase	35	A. Madinaveitia
Leberkatalase	67	F. Batelli
Leberkatalase	532	S. Hennichs

Die älteren Verfahren zur präparativen Isolierung der Katalase aus pflanzlichem oder tierischem Material beschränken sich im wesentlichen auf die Anwendung einer Alkohol-fällung der Enzymauszüge, so wie F. Batelli und L. Stern¹⁾ die Gewinnung des Leberenzym beschrieben haben. Die hierdurch erzielte Steigerung des enzymatischen Reinheitsgrades war unbedeutend, wenn auch H. v. Euler²⁾ auf diesem Wege in Malzauszügen eine Trennung von stärke-spaltendem Enzym erzielte und wenn auch G. Senter³⁾ zu der analytisch und theoretisch bemerkenswerten Feststellung gelangte, daß sich die Blutkatalase, die „Hämase“, so frei von Eisen erhalten läßt. Den Weg einer auswählenden Adsorption der Katalase aus Blut haben zuerst R. Willstätter und A. Madinaveitia⁴⁾ beschrritten auf Grund der Beobachtung, daß das Enzym aus seinen Lösungen sehr leicht durch Fette aufgenommen wird, entsprechend dem gesteigerten Katalasegehalt fetthaltiger Gewebe. Allein die geringe Beständigkeit des Enzyms in den Adsorbaten an Fett, insbesondere bei Versuchen zu seiner Freilegung, beeinträchtigte den präparativen Erfolg; das beste erhaltene Präparat entsprach nur dem Katalase-Wert 35. Von Bedeutung für die Beschreibung der Blutkatalase erscheint ferner die neuere Angabe von M. Tsuchihashi⁵⁾, daß sich das Enzym durch Adsorption an Tricalciumphosphat und durch Elution mit sekundärer Phosphatlösung von Proteinsubstanz

¹⁾ Soc. Biol. **57**, 375 (1905).

²⁾ Hofm. Beitr. **7**, 1 (1906).

³⁾ Ph. Ch. **44**, 257 (1903); **51**, 673 (1905).

⁴⁾ A. Madinaveitia, Zur Kenntnis der Katalase. Promotionsarbeit Zürich 1912.

⁵⁾ Bio. Z. **140**, 63 (1923).

befreien läßt; die von P. Waentig und O. Steche¹⁾ geäußerte Ansicht über die Eiweißnatur der Katalase, die aus ihrer Unbeständigkeit gegenüber Trypsin abgeleitet war, wird sich danach nicht aufrechterhalten lassen. Die bedeutendsten präparativen Fortschritte hat S. Hennichs²⁾ mit der systematischen Anwendung von Adsorptionsmitteln, Tonerde und Kaolin, zur Reinigung der Leberkatalase erzielt. Durch Aufnahme des Enzyms mit Kaolin bei saurer Reaktion und Ablösung mittels schwach alkalischen Phosphats wurden Präparate vom Katalase-Wert 532, durch wiederholte Adsorption der Katalase an Tonerde und Dialyse der alkalischen Elutionen, obgleich diese große Verluste an enzymatischer Aktivität zur Folge hatte, Präparate von ähnlicher Konzentration erhalten (K.-W. 521), entsprechend einer Konzentrationssteigerung auf etwa das 16 fache von der des Ausgangsmaterials³⁾. Es ist zu erwarten, daß ein mehr auswählend gestaltetes Verfahren der Adsorption an diesem Beispiel eine weitere beträchtliche Steigerung des Reinheitsgrades erlauben wird, wengleich der Erfolg der präparativen Reinigung von Katalase durch die stark zunehmende Unbeständigkeit des Enzyms beeinträchtigt werden mag; ihr wird durch Anwendung von Stabilisatoren zu begegnen sein.

VI. Peroxydasen.

Die Peroxydasen, deren Wirkung in der Übertragung peroxydisch gebundenen Sauerstoffs auf oxydable Substanzen besteht, sind als Hilfsenzyme für die Vermittlung biologischer Oxydationen außerordentlich verbreitet; in besonders reichlicher Menge finden sie sich beispielsweise in den Wurzeln und den Samenkeimlingen höherer pflanzlicher Organismen. Von den Katalasen sind diese Enzyme durch ihre spezifischen Wirkungen scharf zu unterscheiden, vor allem durch die Tatsache, daß sie nicht wie jene imstande sind, Wasserstoffsuperoxyd auch ohne die Gegenwart oxydierbarer

¹⁾ H. 83, 315 (1913); 93, 228 (1914/15); P. Waentig und W. Gierisch, Fermentf. 1, 165 (1916).

²⁾ Bio. Z. 145, 286 (1924).

³⁾ Noch etwas weiter (K.-W. 1250) führt nach neueren Versuchen von S. Hennichs die Adsorption mittels Kaolin; es ist von Bedeutung, daß bei dieser Reinigung keine Proportionalität zwischen der enzymatischen Wirkung und dem Eisengehalt der Präparate beobachtet wurde [B. 59, 218 (1925/26)].

Substanz zu zersetzen; sie führen also nur eine Aktivierung des Hydroperoxyds herbei. Auch die scheinbar entgegenstehenden Beobachtungen von E. Abel¹⁾, die über eine „Katalasewirkung“ pflanzlicher Peroxydase in Gegenwart von Jodionen aussagen, sind nicht auf eine Beteiligung des Enzyms an der eigentlichen sauerstoffliefernden Reaktion zurückzuführen, der Einfluß des Enzyms erstreckt sich vielmehr nur auf einen bestimmten Teilvorgang der Reaktion, nämlich auf die Oxydation der Jodwasserstoffsäure zu Jod.

Für den Nachweis und die Bestimmung peroxydatischer Enzyme bedient man sich in der Regel der Oxydation organischer Farbbasen oder auch von Phenolen in Gegenwart von Wasserstoffsuperoxyd; so wird die Wirkung der Peroxydase beispielsweise verfolgt durch die Bildung von Malachitgrün aus seiner Leukoverbindung, indem man die Menge des entstandenen Farbstoffs kolorimetrisch ermittelt, oder aber nach dem viel angewandten Verfahren der Oxydation von Pyrogallol zu Purpurogallin, einem orangefarbenen, ätherlöslichen Farbstoff, dessen Konstitution R. Willstätter und H. Heiss²⁾ weitgehend aufgeklärt haben; seine Menge bestimmt man entweder kolorimetrisch oder durch Wägung des ausgeätherten Produktes. Ein exaktes Verfahren zur Messung von Peroxydasemengen ist indessen zuerst von R. Willstätter und A. Stoll³⁾ ausgearbeitet worden, die an diesem Beispiel zum erstenmal auf die Bedeutung einer zuverlässigen Bestimmungsmethode als Voraussetzung präparativer Arbeit hingewiesen haben. Die älteren Angaben von A. Bach und R. Chodat⁴⁾, wonach zwischen den an der peroxydatischen Reaktion beteiligten Stoffen, Peroxydase, Hydroperoxyd und Purpurogallin, ein bestimmtes Verhältnis bestehe und das Enzym ebenso wie Hydroperoxyd im Oxydationsprozeß verbraucht werde, haben sich als irrig erwiesen. Es bedurfte vielmehr nur der Ermittlung von Bedingungen, unter denen das Enzym während seiner Anwendung in seiner Wirkung vollkommen erhalten blieb, um mit einer gegebenen Menge desselben unbegrenzte Mengen von Oxydationsprodukt zu erzeugen, nämlich der Ausschaltung des enzymzerstörenden Einflusses von saurer Reaktion und der Anwendung sehr verdünnter Lösungen

¹⁾ Z. El. Ch. **28**, 489 (1922).

²⁾ A. **433**, 17 (1923).

³⁾ A. **416**, 21 (1917/18).

⁴⁾ B. **37**, 1342, 2434, 3785 (1904).

von Hydroperoxyd; dieses selbst vermag nämlich, wie sich aus einer Untersuchung von R. Willstätter und H. Weber¹⁾ ergeben hat, in größerer Konzentration die Wirkung pflanzlicher Peroxydase zwar nicht zu zerstören, aber erheblich zu hemmen. Die für Menge und Konzentration der Peroxydase aufgestellten Maße beruhen auf der Erkenntnis, daß unter den Bedingungen der Bestimmung die Aktivität des Enzyms keine Änderung erfährt und daß daher gleiche Umsätze in Zeiten erzielt werden, welche den angewandten Peroxydasmengen umgekehrt proportional sind. So drücken Willstätter und Stoll den Reinheitsgrad von Enzympräparaten aus durch die „Purpurogallinzahl (P.-Z.)“, nämlich die von 1 mg des Präparates bei der Einwirkung auf 5 g Pyrogallol + 50 mg Hydroperoxyd in 2 Liter Wasser von 20° nach 5 Min. gebildete Menge Purpurogallin in Milligramm. Auf dieser Definition beruht ferner das Maß für die Menge der Peroxydase, die „Peroxydase-Einheit (P.-E.)“, die enthalten ist in 1 g Substanz von der Purpurogallinzahl 1, bzw. in 1 mg von der Purpurogallinzahl 1000; man ermittelt also die Anzahl der vorhandenen Peroxydase-Einheiten durch das Produkt aus Purpurogallinzahl und Menge des Präparats.

Mit Hilfe dieser Maße ist in den Untersuchungen R. Willstätters die präparative Reinigung der Peroxydase kontrolliert worden, für welche in erster Linie das Enzym der Meerrettichwurzel und der Rübe als Ausgangsmaterial dienten. Für die Gewinnung roher, enzymreicher Lösungen aus der zerkleinerten Pflanzenwurzel waren in der Untersuchung von Willstätter und Stoll drei Richtlinien bestimmend, nämlich die Dialyse im Pflanzenmaterial, sodann die Niederschlagung des Enzyms mit Oxalsäure und endlich seine fraktionierte Extraktion mit Alkali. Der erste Schritt der präparativen Verarbeitung, die Dialyse der grob zerkleinerten pflanzlichen Substanz, beruht auf der Erfahrung, daß das Enzym bei dieser Operation zum größten Teil von der intakten Zelle zurückgehalten wird, während leichter diffundierende, niedrigmolekulare Begleitstoffe entfernt werden; die Verluste an enzymatischer Substanz, die bei diesem Vorgang eintreten, betragen nur einen geringen Bruchteil, höchstens $\frac{1}{5}$ des gesamten Enzymgehaltes, sie werden auf die mechanische Zerstörung der Zellstruktur bei der Zerkleiner-

¹⁾ Zitiert nach R. Willstätter und A. Pollinger, H. **130**, 281, und zwar S. 285 (1923).

rung zurückgeführt. Es hat sich vielmehr ergeben, daß bei der Dialyse nach anfänglicher Abwanderung einer geringen Menge Peroxydase in erheblichem Umfang eine Neubildung von Enzym erfolgt, die im Steigen der Peroxydase-Werte zum Ausdruck kommt und die auf der noch fortdauernden Lebenstätigkeit der Pflanzenzelle beruht; erst nach sehr lange, nämlich mehrere Wochen dauernder Dialyse beobachtet man wieder einen Rückgang des Peroxydasegehaltes infolge überwiegender Exosmose des Enzyms. Zahlreiche und immer wiederkehrende Beobachtungen, die auf die Existenz zweier verschiedener Arten von Peroxydase in der Pflanzenzelle, einer löslichen und einer unlöslichen Form, beispielsweise auf Grund des Verhaltens bei der Dialyse, hinzuweisen schienen¹⁾, sind von R. Willstätter und A. Pollinger²⁾ auf die Erscheinung zurückgeführt worden, daß ein Teil des Enzyms, im Zellsaft gelöst, leicht aus der Zelle austritt, während ein anderer Teil, an Protoplasma gebunden, erst nach vollständiger Zerstörung der Zellstruktur freigelegt werden kann; so gestattet die Erfahrung, daß es gelingt, die gesamte Menge der Peroxydase beispielsweise durch verdünntes Alkali in Lösung überzuführen, keine Unterscheidung zwischen löslichem und unlöslichem Enzym.

Der zweite Schritt der Isolierung beruht auf der Beobachtung, daß bei der Einwirkung von Oxalsäure auf die Pflanzensubstanz die Dialyse fortschreitet, während zugleich die Peroxydase von der pflanzlichen Masse adsorbiert und fester gebunden wird. Die Veränderung der Zelle, die bei der Behandlung mit Säure erfolgt und die die Tätigkeit autolytischer Zellenzyme einleitet, führt zur Umwandlung einer Reihe hochmolekularer Substanzen des Zellinhalts in leichter diffundierende, niedrig molekulare; andererseits wird die Peroxydase bei der Einwirkung der Säure so auf koagulierter pflanzlicher Substanz niedergeschlagen, daß sich das Material nach Abschluß der Dialyse ohne erhebliche Enzymabgabe zerkleinern und auspressen läßt. Die Ablösung des peroxydatischen Enzyms aus dem Wurzelbrei gelingt erst auf der dritten Stufe der Isolierung, nämlich nach vollständiger Absättigung seines Säuregehaltes. So erreicht man durch allmähliche Einwirkung verdünnten Alkalis, z. B. von Baryt, eine fraktionierte Entleerung des Pflanzenmaterials, bei der das Enzym erst in die letzten, schon schwach alkalischen Auszüge übergeht; seine Abscheidung aus den im Vakuum einge-

¹⁾ R. Willstätter und K. Riehm, A. **422**, 47 (1920/21).

²⁾ A. **430**, 269, und zwar S. 312 (1922/23).

engten Lösungen erfolgt durch fraktionierte Fällung mit Alkohol nach dem Verfahren von Bach und Chodat. Das beschriebene Verfahren der Isolierung führt zu Peroxydasepräparaten von erheblich gesteigertem Reinheitsgrad, entsprechend P.-Z. 100 bis 260 aus Meerrettich, bzw. P.-Z. 200 bis 350 aus Rübe, bei einer Durchschnittsausbeute an Enzym von etwa einem Drittel.

Eine weitere Reinigung des Enzyms in den so erhaltenen Rohpräparaten verbanden Willstätter und Stoll mit der Beobachtung, daß sich durch Fällung mit Quecksilbersalz ein Teil der die Peroxydase begleitenden glucosidischen Stoffe abtrennen läßt, während das Enzym in dem nicht durch das Schwermetall fällbaren Anteil zurückbleibt; die enzymatische Konzentration der durch Umfällung mit Alkohol von Quecksilber befreiten Substanz stieg hierbei beträchtlich, im besten Beispiel zur P.-Z. 670. Allein die Bedeutung der Einwirkung von Quecksilbersalz zur Reinigung der Peroxydase, die in präparativem Maßstab nur schwer anwendbar erscheint und deren Ergebnisse nicht leicht zu reproduzieren sind, wird für die analytische Beschreibung des Enzyms übertroffen durch die Fällung der Peroxydase selbst mittels Gerbsäure, die Willstätter und Pollinger zur Isolierung des Enzyms angewandt haben, sei es aus seinen rohen, sei es aus adsorptiv vorgereinigten Lösungen. Diese Reaktion, deren analytische Bedeutung vor allem in der Abtrennung hartnäckiger eisenhaltiger Verunreinigungen besteht, scheint dem Enzym selbst zuzukommen, man beobachtet sie nämlich in den rohen wie in den reinsten bisher erhaltenen Präparaten der Peroxydase. Ihre präparative Auswertung wird indessen erschwert durch die Unlöslichkeit der Fällung mit Tannin, deren Zerlegung erst nach ihrer Darstellung aus vorgereinigten Enzymlösungen erreicht wurde; so besteht das Verfahren der Reinigung hochwertiger Peroxydasepräparate mit Tannin in der Zerlegung des mit essigsäurehaltigem Alkohol gelösten Niederschlags mittels Kaolin, aus welchem das adsorbierte Enzym sich frei von Tannin mit Alkali ablösen läßt.

Wichtiger noch als die Ausarbeitung von Fällungsmethoden hat sich die Anwendung der Adsorptionsmittel für die Reinigung der Peroxydase erwiesen. So ist das Adsorptionsverhalten pflanzlicher Peroxydase gegenüber Tonerde sehr charakteristisch und hat sich zu ihrer Reinigung mit Erfolg nutzbar machen lassen. Die Erfahrung, daß die Peroxydase aus wässriger Lösung von Aluminiumhydroxyd nur sehr wenig aufgenommen wird, erlaubt eine ge-

wisse Vorreinigung der Lösungen durch Vorbehandlung mit dem Adsorbens, die ohne Enzymverluste die Abtrennung eines Teiles der Beimengungen bewirkt; und die Beobachtung, daß das Enzym nach dem Zusatz von Alkohol durch Tonerde adsorbierbar wird, hat zu dem Versuch geführt, durch den Wechsel im Lösungsmittel bei der Bindung und Freilegung des Enzyms seine Verteilung zwischen Lösung und Adsorbens zugunsten des letzteren bei der Adsorption, im entgegengesetzten Sinne bei der Elution zu beeinflussen. Diese Erscheinung, daß Peroxydase nur aus alkoholhaltiger Lösung von Tonerde aufgenommen wird, entspricht den überwiegend basischen Eigenschaften des Enzyms; sie erinnert an das Verhalten anderer amphoterer Stoffe, beispielsweise der Polypeptide und Aminosäuren, deren saure Funktionen erst in alkoholischer Lösung zur Geltung kommen; auch ist im Verlauf der Reinigung keine Änderung im qualitativen Adsorptionsverhalten der Peroxydase beobachtet worden. Das präparative Verfahren zur Adsorption des Enzyms an Tonerde, das sich aus diesem Befunde ergibt, besteht in der Aufnahme durch das Adsorbens aus wässrig-alkoholischer Lösung und in der Freilegung des Enzyms aus dem Adsorbat, die man zweckmäßig durch Einwirkung kohlenensäurehaltigen Wassers bewirkt.

Den basischen Eigenschaften der Peroxydase entspricht ferner ihr Verhalten gegenüber Kaolin, von welchem sie leicht und vollständig aufgenommen wird; der Zusatz von Alkohol erweist sich hier als entbehrlich. Für die präparative Anwendung ergeben sich die günstigsten Bedingungen in der Adsorption des Enzyms aus sehr verdünnten essigsäuren Lösungen, während man die Elution der Kaolinadsorbate durch Einwirkung verdünnten Ammoniaks bewirkt, Operationen, die insbesondere bei der Verwendung reinerer Enzympräparate häufig ohne Enzymverlust ausführbar waren. Für die Trennung der Peroxydase von Begleitstoffen bietet, wie bei anderen Enzymen, der Wechsel in der Polarität des Adsorbens große Vorteile; so ist es erst durch Kaolin gelungen, hartnäckig anhaftende glucosidische Verunreinigungen zu beseitigen, die die Zusammensetzung älterer Präparate gefälscht hatten¹⁾; in den Elutionen der Kaolinadsorbate erhielt man die Peroxydase der Pflanzenwurzel frei von kohlehydrathaltiger Substanz; und auch in einem anderen Beispiel, bei der Verarbeitung von Getreidekeimlingen, hat

¹⁾ Siehe dazu R. Willstätter und A. Stoll, A. **416**, 21, und zwar S. 56 (1917/18); R. Willstätter und A. Pollinger, A. **430**, 269, und zwar S. 278 (1922/23).

die Anwendung der Kaolinadsorption erlaubt, das Enzym direkt in hohem Reinheitsgrad zu isolieren; und endlich erweist sich die präparative Bedeutung der Kaolinadsorption an der Zerlegung der Peroxydase-Tanninverbindung, auf die bereits hingewiesen worden ist.

Die Anwendung der Adsorptionsmethoden hat in der Untersuchung von Willstätter und Pollinger auch zur Erklärung einer Erscheinung beizutragen erlaubt, die sehr häufig im Gange der präparativen Reinigung von Peroxydase beobachtet worden ist, nämlich einer Zunahme der peroxydatischen Wirkung. Dieser Erscheinung, die die quantitative Bestimmung des Enzyms als Grundlage der präparativen Arbeit unsicher zu machen geeignet ist, begegnete man beispielsweise bei der Aufbewahrung von Peroxydase-Lösungen oder festen Peroxydasepräparaten, sie äußert sich in einem ausgesprochenen Gang der enzymatischen Aktivität; man begegnete ihr ferner bei Adsorptionsvornahmen, z. B. mit Tonerde, beim Einengen verdünnter Enzymlösungen unter vermindertem Druck oder endlich bei der Isolierung der Peroxydase aus ihren Lösungen durch Fällung mit Alkohol. Diese Befunde versuchen Willstätter und Pollinger mit der Annahme zusammenzufassen und zu erklären, daß ein Zersetzungsprodukt der Peroxydase, und zwar ein ihr noch sehr nahe stehendes, durch Assoziation mit dem Enzym die Wirkung seiner aktiven Gruppe zu beeinträchtigen vermag und daß diese Hemmung durch Abtrennung oder durch weitergehende freiwillige Zersetzung des Hemmungskörpers in Wegfall kommt; es war nämlich gelungen, Peroxydase, die durch Zersetzung Verlust an enzymatischer Konzentration erlitten hatte, durch Adsorption an Tonerde von ihren Zersetzungsprodukten abzutrennen und wieder auf den ursprünglichen Reinheitsgrad zu heben.

Durch kombinierte Anwendung der Adsorptions- und Fällungsmittel sind Willstätter und Pollinger bis zu hohen Reinheitsgraden der Peroxydase gelangt. So hat an einem Beispiel der Verarbeitung des Enzyms aus Rübe die aufeinanderfolgende Adsorption mit Kaolin und mit Tonerde und die Fällung des Enzyms mit Tannin in der Elution des mittels Kaolin zerlegten Gerbsäureniederschlags zu einem Präparat von der Purpurogallinzahl 3160 geführt; und in einem anderen Beispiel, in welchem die Steigerung des Reinheitsgrades noch höher getrieben wurde, ist nach fünfmaliger Aufnahme durch Tonerde und einmaliger Adsorption an Kaolin an der gelösten enzymatischen Substanz die Purpurogallin-

zahl 4900 beobachtet worden, entsprechend einer fast 20000fachen Erhöhung der enzymatischen Konzentration gegenüber der der getrockneten Wurzel.

Der erreichte Stand der präparativen Methodik hat wichtige neue Erkenntnisse vermittelt hinsichtlich der analytischen Beschreibung des Enzyms. So hat die Untersuchung reinerer Peroxydasepräparate eine charakteristische Eigenschaft des Enzyms zu erkennen erlaubt, nämlich seine Farbe; die Peroxydase besitzt in Lösung eine hellrot-bräunliche Farbe, die an gewisse, aus den Blut- und Blattfarbstoffen gewonnene Porphyrine, insbesondere an Pyrroporphyrin, erinnert. Die sichere Erkenntnis der Beziehungen zwischen Peroxydasewirkung und Farbe wird durch den Umstand erschwert, daß sich das Enzym in den rohen Lösungen mit ähnlich gefärbten, nichtenzymatischen Begleitstoffen vergesellschaftet findet und daß auch die Zersetzungsprodukte des Enzyms selbst farbig sind; so hat es sich gezeigt, daß bei der Zerstörung reinerer Peroxydase durch Säure oder in der Wärme oder auch bei ihrer spontanen Zersetzung die Farbe bestehen bleibt. Diesen Beobachtungen entsprechen die Erfahrungen, die über die Beziehungen von peroxydatischer Wirkung und Farbe im Gange der präparativen Reinigung gewonnen worden sind. Es hat sich hierbei ergeben, daß bei der Reinigung roher Peroxydaselösungen mit Adsorbentien und ferner bei der Isolierung des Enzyms mit Tannin, die die Abtrennung eisenhaltiger, gefärbter Fremdstoffe bedingt, die Farbtintensität verhältnismäßig zurückgeht, daß dagegen bei weiteren Reinigungsvornahmen mit reinerer Peroxydase die Aktivitätsverluste, die der Zersetzung des Enzyms entsprechen, den Rückgang der Färbung überwiegen.

Weitere neue analytische Erkenntnisse betreffen die Frage des Eisengehaltes der Peroxydase. In den Untersuchungen von G. Gola¹⁾ sowie von R. Willstätter und A. Stoll²⁾ war die Annahme erörtert und experimentell gestützt worden, daß das Eisen, das auch bei allen Reinigungsprozessen die Peroxydase begleitete, einen integrierenden Bestandteil des Enzymmoleküls bilde. Die Analyse der reineren Peroxydasepräparate hat indessen die Beziehung nicht bestätigt, welche zwischen Eisengehalt und enzymatischer Wirkung zu bestehen schien. Zwar sind Eisenverbindungen mit

¹⁾ R. Acc. Linc. (5) **24**, I, 1239; II, 289 (1915); **28**, II, 393 (1919).

²⁾ A. **416**, 21, und zwar S. 60 (1917/18).

dem Enzym hartnäckig vergesellschaftet und reichern sich zuweilen im Gange der Reinigung noch stärker an als die Peroxydase; allein in der Adsorption an Kaolin aus verdünnter Lösung, vor allem aber in der Fällung der Peroxydase mit Tannin hat sich ein Mittel ergeben, um die Frage des Eisengehaltes zu entscheiden. Die Abtrennung der eisenhaltigen Fremdschubstanz durch Tannin ist so weit geführt worden, daß das fünffach konzentriertere Präparat nunmehr sogar einen siebenmal geringeren Eisengehalt aufwies, nämlich 0,06 Proz. Für Konstitution und Farbe der Peroxydase ist also das Eisen ohne Bedeutung.

Die in der Literatur viel erörterte Frage, ob dem Blutfarbstoff, dem Oxyhämoglobin, peroxydatische Wirkung zukomme, ist von R. Willstätter und A. Pollinger¹⁾ in positivem Sinne entschieden worden. Diese Vorstellung, die zuerst aus den Untersuchungen von J. Wolff und E. de Stoecklin²⁾ sich zu ergeben schien, war schon von Willstätter und Stoll in quantitativer Richtung vertieft worden mit der Feststellung, daß das Oxyhämoglobin sich in der Größenordnung seiner peroxydatischen Wirksamkeit von pflanzlicher Peroxydase unterscheidet, es wirkt nämlich verhältnismäßig schwach. Die quantitative Verfolgung der peroxydatischen Wirkung des Blutfarbstoffs bei seiner Reinigung, die sich der bei pflanzlicher Peroxydase angewandten Bestimmungsweise bediente, hat nun ergeben, daß die in den rohen Präparaten beobachtete Wirkung den Farbstoff bis in die reinsten Kristallisationen unverändert begleitet, auch nach der völligen Abtrennung von Katalase, die man andererseits frei von peroxydatischer Wirkung aus dem Blut erhalten kann. Die katalytische Funktion des Oxyhämoglobins, dessen Wirkung im Gegensatz zu der der pflanzlichen Peroxydase mit steigender Wasserstoffsuperoxydkonzentration beträchtlich zunimmt, findet man bei den verschiedenen Tierarten von wechselnder Größe. Während die Abhängigkeit der Aktivität des Farbstoffs aus dem Blut verschiedener Tiere von der Konzentration des Hydroperoxyds übereinzustimmen scheint, dessen Verteilung zwischen der Lösung und den Farbstoffteilchen also in derselben Weise erfolgt, ist die quantitative Leistung der einzelnen Hämoglobine verschieden, die Aktivierung des Hydroperoxyds erfolgt in ungleichem Ausmaße. Diese Abstufungen, denen die per-

¹⁾ H. 130, 281 (1923).

²⁾ C. r. 151, 483 (1910); Ann. Inst. Pasteur 25, 313 (1911).

oxydatische Wirkung der bei verschiedenen Tierarten mit verschiedenen Globinkomplexen verbundenen eisenhaltigen Farbstoffgruppe unterliegt, bieten ein einfaches Beispiel für die Beeinflussung der spezifischen, wirksamen Gruppe eines Enzyms in bezug auf ihre Affinität durch ihre Assoziation mit dem kolloiden Träger. Es zeigt sich an diesem Modell, daß im Sinne der von R. Willstätter, J. Graser und R. Kuhn¹⁾ entwickelten Vorstellung, wonach ein Enzym aus einem kolloiden Trägerkomplex und einer rein chemisch wirkenden aktiven Gruppe besteht, das spezifische Reaktionsvermögen eines enzymatischen Stoffes nicht nur durch die Natur der wirksamen Gruppe, sondern auch durch Unterschiede in der Konstitution des kolloiden Trägers beeinflußt zu werden vermag.

VII. Oxydasen.

Unsere Kenntnisse vom Wesen biologischer Oxydationsvorgänge sind noch sehr unsicher, obgleich die Forschung der Bearbeitung dieses Gebietes eine sehr große Anzahl theoretischer und experimenteller Studien gewidmet hat. Da keine der geäußerten Ansichten über den Mechanismus der Oxydasewirkung zur Erklärung aller beobachteten Erscheinungen ausreichend gestützt erscheint, mag es im Rahmen dieses Buches genügen, den heutigen Stand dieser Frage kurz zu skizzieren mit der Wiedergabe der drei wichtigsten Erklärungsweisen, der Oxydationstheorien von Bach und Warburg und der Dehydrierungstheorie von Wieland.

Die Anschauungen, die A. Bach²⁾ zur Erklärung der biologischen Oxydationen entwickelt hat, fußen auf den Gedankengängen von C. Engler³⁾ über das Wesen katalytischer Oxydationen überhaupt. Danach erfolgt die katalytische Sauerstoffübertragung in Gegenwart eines leicht oxydierbaren Stoffes A, des „Autoxydators“, und eines schwerer oxydierbaren B, des „Acceptors“, in der Weise, daß der Autoxydator mit molekularem Sauerstoff in Reaktion tritt

unter Bildung eines Peroxyds $A \begin{matrix} \diagup O \\ | \\ \diagdown O \end{matrix}$, das den Sauerstoff in aktiver

¹⁾ H. 123, 1 (1922).

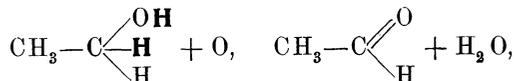
²⁾ A. Bach und R. Chodat, Soc. Biol. 83, 1544 (1920); Arch. int. de Physiol. 18, 403 (1921).

³⁾ Siehe dazu Engler und Weissberg, Kritische Studien über den Vorgang der Autoxydation. Braunschweig 1904.

Form enthält und unter Rückbildung des Stoffes A leichter die Oxydation von $2B$ zu $2BO$ zu vermitteln vermag. Im Sinne dieser Vorstellung sind nach Bach die Oxydationswirkungen in lebenden Organismen auf das Zusammenwirken zweier Enzymgruppen zurückzuführen, der „Oxygenasen“ und der „Peroxydasen“, deren erstere unter Aufnahme von Sauerstoff in peroxydischer Form zugleich die Voraussetzung schaffen für die Wirkung der peroxydatischen Komponenten, welche unter Übertragung des peroxydischen Sauerstoffs auf oxydierbare Substanz die eigentliche Oxydation vollziehen unter Regenerierung der Oxygenasen; dieser letztere Vorgang erfolgt entweder direkt durch Sauerstoffabspaltung oder auf dem Wege der Umsetzung des organischen Peroxyds mit Wasser zu Hydroperoxyd.

Die vielfach gleichzeitig mit biologischen Oxydationen beobachteten Reduktionswirkungen werden auf die kombinierte Wirkung von Oxygenase und einer „Perhydridrase“ zurückgeführt¹⁾, welche letztere den Wasserstoff in vorhandenem Wasser aktiviert, während der zugleich entstehende Sauerstoff von der oxygenatischen Komponente aufgenommen werde. Diese Vorstellungen erscheinen zwar geeignet, das Verständnis der großen Verbreitung und der Bedeutung speziell der peroxydatischen Enzyme zu erleichtern, es ist indessen gegen sie der Einwand zu erheben, daß sie kein einfaches und anschauliches Bild insbesondere der häufig sich abspielenden gekoppelten Oxydations- und Reduktionsvorgänge zu vermitteln vermögen, die man wohl mit einiger Sicherheit der Wirkung jeweils ein und desselben Enzyms zuzuschreiben hat.

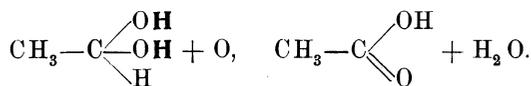
Unter strenger einheitlichen Gesichtspunkten hat H. Wieland²⁾ die Erklärung der biologischen Oxydationen und Reduktionen zusammengefaßt. Nach Wieland beruht das Wesen der Oxydationsvorgänge nicht auf einer Betätigung von aktiviertem Sauerstoff, sondern auf einer Aktivierung von Wasserstoff in den Substraten der Oxydation. So wird beispielsweise die Oxydation von Alkohol zum Aldehyd, die in der Zelle erfolgt, zurückgeführt auf die Herausnahme zweier Atome Wasserstoff aus dem Molekül des Alkohols:



1) Vgl. A. Bach, *Bio. Z.* **31**, 443 (1911).

2) *B.* **55**, 3639 (1922); *Ergebn. d. Physiol.* **20**, 477 (1922).

oder es vollzieht sich nach dieser Anschauung ein anderer, der Zelle vertrauter Vorgang, die Bildung einer Carbonsäure aus Aldehyd, durch Dehydrierung auf dem Wege über das Aldehydhydrat:



Diese Auffassung von der Aktivierung des Wasserstoffs hat eine bemerkenswerte experimentelle Stütze erfahren durch den Befund, daß es, auch bei biologischen Oxydationen, gelingt, den an der Dehydrierungsreaktion nur in der Rolle eines Wasserstoffacceptors beteiligten Sauerstoff durch andere Wasserstoffacceptoren zu ersetzen, beispielsweise durch leicht reduzierbare Stoffe wie Chinon oder Methylenblau. So ist die Vergärung von Alkohol zu Essigsäure mit Essigsäurebakterien und auch die Verbrennung von Traubenzucker bis zu Kohlensäure unter Ausschluß von Sauerstoff, nämlich bei Gegenwart der angeführten Wasserstoffacceptoren durchgeführt worden; und im Beispiel der Essigsäuregärung erwies sich die gebildete Menge der Säure der aus dem Wasserstoffacceptor, Chinon bzw. Methylenblau, entstandenen Menge an Reduktionsprodukt äquivalent. Die gleichen korrelativen Beziehungen zwischen den Vorgängen der Dehydrierung und der Hydrierung sind weiterhin an der Wirkung einer typischen „Oxydo-Redukase“, dem Schardingerschen Enzym der Milch, quantitativ bestätigt worden, das die Reduktion von Aldehyden in Gegenwart von Methylenblau oder auch die Disproportionierung der Aldehyde zu Alkohol und Säure, die Cannizzarosche Reaktion, zu katalysieren vermag.

Der Vorgang der Sauerstoffhydrierung bei der Atmung der Zelle verläuft nach Wieland in dem Sinne, daß der unter der Wirkung der Oxydase aktivierte Wasserstoff dem Substrat der Oxydation entnommen wird unter korrelativer Hydrierung von molekularem Sauerstoff zu Hydroperoxyd, dessen Zerlegung nunmehr die Katalase vollziehen mag unter gleichzeitiger Freilegung neuen Sauerstoffs; in anderen Fällen dient das gebildete Hydroperoxyd als Wasserstoffacceptor für die Wirkung peroxydatischer Enzyme, welche letztere gleichfalls auf eine Wasserstoffaktivierung in den Substraten der Oxydation, beispielsweise in den Phenolen, zurückgeführt wird.

Die von Wieland entwickelten Vorstellungen, deren experimentelle Grundlagen sich in erster Linie auf den oxydativen Abbau

der Zucker beziehen, gewinnen erhöhtes Interesse durch die Beobachtungen von T. Thunberg¹⁾ über den Mechanismus der biologischen Fettsäureoxydation; die experimentell durchgeführte Dehydrierung der Bernsteinsäure zu Fumarsäure durch Muskelgewebe mit Methylblau als Wasserstoffacceptor scheint darauf hinzudeuten, daß auch der Abbau gesättigter Fettsäuren im Organismus dem Prinzip einer Dehydrierung folge, zunächst zur Stufe ungesättigter Säuren, aus welchen sich dann durch Wasseranlagerung und weitere Dehydrierung über die Zwischenstufe von β -Ketocarbonsäuren die hydrolytische Abspaltung von Essigsäure ableiten ließe. Für die Auffassung der Zellatmung als eines Dehydrierungsprozesses sprechen auch die Befunde von W. Lipschitz²⁾, daß es gelingt, im Lebensprozeß niedriger organisierter Zellen das gasförmige Atmungselement Sauerstoff durch einen zellfremden, andersartigen Wasserstoffacceptor, m-Dinitrobenzol, zu ersetzen, welcher dabei zu m-Nitrophenylhydroxylamin hydriert wird und welcher gleich dem Methylblau die Atmung von überlebendem Muskelgewebe beispielsweise mit Bernsteinsäure zu unterhalten vermag.

Eine der Wielandschen Auffassung entgegengesetzte Anschauung ist von O. Warburg³⁾ vertreten und experimentell gestützt worden; sie sieht das Wesen der biologischen Oxydationen in der Einwirkung aktivierten Sauerstoffs, nicht in peroxydischer Form, sondern im Sinne einer Oberflächenaktivierung an bestimmten Schwermetallorten, für deren Vermittlung in besonderer Weise gebundenes Eisen als wesentlich zu gelten hat. Diese Anschauung gründet sich auf Modellversuche über die Oxydation beispielsweise von Aminosäuren an aktiver, eisenhaltiger Kohle, deren Aktivität ebenso wie der Prozeß der zellulären Atmung durch Blausäure eine spezifische Hemmung erleidet, während die Wirkung der Blausäure auf den biologischen Oxydationsprozeß nach Wieland auf eine Beeinflussung der Katalasekomponente des Oxydationssystems zurückzuführen ist⁴⁾.

Es ist verständlich, daß bei der noch bestehenden Unsicherheit über den Mechanismus der biologischen Oxydationen und über die

¹⁾ Skand. Arch. f. Physiol. **25**, 37 (1911); vgl. F. Batelli u. L. Stern, Bio. Z. **30**, 172 (1910).

²⁾ Pflüg. Arch. **196**, 463 (1922).

³⁾ B. **58**, 1001 (1925).

⁴⁾ Über die Möglichkeit einer Kombination der Theorien von Wieland und Warburg siehe C. Oppenheimer, Die Fermente und ihre Wirkungen, 5. Aufl., Leipzig 1925/26, S. 1291 ff.

Art und Anzahl der dabei beteiligten Enzyme auch die Kenntnis der spezifischen Wirkungen der Oxydationsenzyme von verschiedenen Zellarten ganz unzureichend geblieben ist. So ist die ältere Einteilung der Oxydasen nach den verschiedenen beobachteten Wirkungen beispielsweise in die eigentlichen sogenannten „Aerooxydasen“ und in die Hydroxydasen, zu welcher letzteren die Enzyme mit reduzierender und disproportionierender Wirkung gerechnet wurden, ganz unsicher geworden. Die Benennung und Unterscheidung von Oxydasen auf Grund der jeweils wahrgenommenen Wirkungen, die den neueren allgemeineren Prinzipien nicht mehr entspricht, sollte auf rationeller Grundlage mit der Isolierung der betreffenden Enzyme und der Beschreibung ihrer besonderen Wirkungen sichergestellt oder berichtigt werden. Dann wird man auch ein Urteil gewinnen über die natürliche Zusammensetzung des an den biologischen Oxydationen beteiligten Enzymsystems und über die speziellen Aufgaben der einzelnen Komponenten, deren Existenz in manchen Fällen nicht einmal sichergestellt erscheint.

Es sei an dieser Stelle auf die bemerkenswerten Untersuchungen von F. G. Hopkins¹⁾ hingewiesen, nach welchen ein aus verschiedenartigem Zellmaterial, aus Hefe, Muskelsubstanz und aus der Leber isoliertes schwefelhaltiges Peptid, das Glutathion, Cysteinylglutaminsäure, je nach der Acidität der Lösung dehydrierende oder hydrierende Funktion auszuüben vermag; seine Wirkung als Oxydoreduktase beruht nämlich auf dem Wechsel zwischen der Cysteinform mit der Gruppierung R_1-R-SH ($R =$ Cystein-, $R_1 =$ Glutaminsäurerest), die als Wasserstoffdonator, und zwischen der Cystin-form, der Disulfidform mit der Gruppierung $R_1-R-S-S-R-R_1$, welche als Wasserstoffacceptor fungiert. Das Peptid vermag also auf diesem Wege in Gegenwart anderer Wasserstoffacceptoren katalytische Dehydrierungen zu vollziehen; seine Bedeutung für die Vermittlung von Oxydationsreaktionen in der Zelle ist indessen noch nicht genügend geklärt.

Spezielle und einigermaßen gesicherte Angaben über die Eigenschaften und die Wirkungsweise von Enzymen der Oxydasengruppe lassen sich der Literatur bisher nur in einigen besonderen Fällen entnehmen, bei welchen besondere Oxydasen oder doch Enzyme von stärker ausgeprägter Spezifität vorzuliegen scheinen.

¹⁾ Biochem. J. **15**, 286 (1921); F. G. Hopkins u. M. Dixon, J. Biol. Chem. **54**, 527 (1922); M. Dixon u. H. E. Tunnicliffe, Proc. Roy. Soc. B. **94**, 266 (1923).

Dies gilt beispielsweise für die sogenannten „Purinoxidasen“, deren Wirkung man durch die Oxydation der bei der Desamidierung der beiden Aminopurine, Guanin und Adenin, entstehenden Oxy-purine zu Harnsäure kennzeichnet; sie finden sich vorwiegend in der Leber und in der Muskelsubstanz tierischer Organismen. Eine Beurteilung der spezifischen Einstellung dieser Enzyme auf die einzelnen Substrate aus der Gruppe der Purine und ihre sichere Unterscheidung von anderen Oxydasen ist indessen auf Grund der vorliegenden Beobachtungen noch nicht möglich; so lassen auch die eingehenderen kinetischen Untersuchungen von R. Burian¹⁾ über die Oxydation von Xanthin zu Harnsäure durch Leberauszüge, bei welchen eine weitere Umsetzung auch der Harnsäure beobachtet wurde, kein Urteil über die spezifischen Wirkungen der untersuchten Oxydase zu; es erscheint noch ungewiß, ob die wahrgenommene Zerstörung der Harnsäure der Wirkung eines besonderen Enzyms zuzuschreiben ist und ob man ferner auch die vielfach unterschiedene „Urikasewirkung“, die Umwandlung von Harnsäure zu Allantoin, die sich aus einem hydrolytischen und einem oxydativen enzymatischen Vorgang zusammensetzen wird, für ihren oxydativen Teilvorgang auf eine spezifische Oxydase dieser Gruppe zurückzuführen hat.

Auch eine andere besondere Oxydase, die „Tyrosinase“, ist hier zu nennen, die in tierischen und pflanzlichen Organismen verbreitet ist und deren Wirkung in der Oxydation des Tyrosins, der p-Oxyphenylaminopropionsäure, oder von Derivaten dieser Aminosäure zu einem roten und weiterhin zu einem schwarzen Pigment, dem sogenannten Melanin, besteht.

Die Bildung von Melanin durch die Tyrosinase der Kartoffel, zu der es nach den Untersuchungen von H. Haehn²⁾ der Gegenwart bestimmter Aktivatoren bedürfe, konnten in einer neueren Arbeit H. St. Raper und A. Wormall³⁾ in drei Stufenreaktionen zerlegen, nämlich in die enzymatische Bildung eines roten Oxydationsproduktes, in dessen spontane Umwandlung zu einer farblosen Substanz und endlich in die enzymatisch beschleunigte Oxydation dieser letzteren zu Melanin; der erste der angegebenen Teilvorgänge, der durch das Verschwinden des Tyrosins

¹⁾ H. **43**, 497 (1905).

²⁾ B. **52**, 2029 (1919); Bio. Z. **105**, 169 (1920); siehe dazu H. St. Raper u. A. Wormall, Biochem. Jl. **17**, 454 (1923).

³⁾ Biochem. Jl. **17**, 454 (1923).

gemessen wurde und dessen Geschwindigkeit bei alkalischer Reaktion am größten gefunden wird, verläuft nach Raper und Wormall monomolekular.

VIII. Gärungsenzyme.

Der Vorgang der alkoholischen Gärung, der Spaltung der Zucker in Alkohol und Kohlensäure, durch den Enzymkomplex der „Zymase“, der wohl als die am frühesten untersuchte und praktisch angewandte enzymatische Reaktion zu gelten hat, spielt im Stoffwechsel einer Anzahl aerober Pilze vor allem der Gattung *Saccharomyces*, der Hefearten, eine wichtige Rolle. Mit der Beschreibung dieser Reaktion, die die ältere Forschung mit der Lebenstätigkeit der Mikroorganismen verbunden glaubte, sind die grundlegenden Erkenntnisse der modernen Enzymchemie gewonnen worden, die mit den klassischen Untersuchungen von E. Buchner¹⁾ über die Abtrennung der Zymasegärung vom Lebensvorgang der Hefezelle gegeben waren. In der präparativen Isolierung der Zymase hat man indessen über das bekannte Buchnersche Verfahren hinaus, die Darstellung eines Zellpreßsaftes nach mechanischer Zerstörung der Zellstruktur, keine wesentlichen Fortschritte zu verzeichnen; neuere Verfahren zur Reinigung enzymatischer Stoffe wie die Adsorptionsmethoden sind am Beispiel der Gärungsenzyme noch nicht systematisch angewandt worden. Dagegen sind über den Reaktionsmechanismus der alkoholischen Gärung und über die Bedingungen, unter denen sie verläuft, viele neue Erkenntnisse gewonnen worden.

Eine der wichtigsten Beobachtungen, die für die Erforschung der Zusammensetzung enzymatischer Reaktionssysteme überhaupt von großer Bedeutung war, betraf die Auffindung eines spezifischen kochbeständigen Aktivators der alkoholischen Gärung in den Hefepreßsäften durch A. Harden und W. J. Young²⁾, der „Ko-Zymase“, sowie die von den nämlichen Forschern, zuvor schon von A. Wróblewski³⁾ und von L. Iwanoff⁴⁾ beschriebene besondere Aktivierung der Gärgeschwindigkeit unter dem Zusatz phosphorsaurer Salze. Die spezielle Wirkung der Phosphate, die mit der Bedeutung

1) E. Buchner, H. Buchner und M. Hahn, Die Zymasegärung. München 1903.

2) Proc. Roy. Soc. B. **77**, 405; **78**, 368 (1906).

3) Zbl. f. Physiol. **13**, 284 (1899).

4) H. **50**, 281 (1907); Zbl. f. Bakt. **24**, (1909).

des Hardenschen Ko-Enzyms nahe zusammenhängt und die auf der intermediären Bildung von Zucker-Phosphorsäureestern beruht, soll bei der Besprechung des Gärungsschemas eingehender behandelt werden. Die Erkenntnis der besonderen Eigenschaften der Ko-Zymase andererseits ist durch neuere Untersuchungen von H. v. Euler und K. Myrbäck¹⁾ weitgehend gefördert worden. Die spezifische Wirkung dieses Aktivators, ohne dessen Gegenwart beispielsweise in ausgewaschener Trockenhefe nach Harden und Young eine Gärfähigkeit überhaupt nicht beobachtet wird, läßt sich danach durch andere, die Gärgeschwindigkeit lebender Hefe steigernde Stoffe wie das antineuritische Vitamin oder die Wachstumsfaktoren nicht ersetzen; seine Lösungen, die man durch Extraktion abgetöteter oder getrockneter Hefe mit Wasser erhält, sind von v. Euler und Myrbäck auf der Grundlage einer quantitativen Bestimmungsmethode mit Hilfe verschiedener Fällungsreagenzien sowie durch Tonerdeadsorption auf hohe Reinheitsgrade, nämlich auf etwa 200fache Konzentration gehoben worden, eine sichere chemische Charakterisierung des Aktivators ist indessen noch nicht möglich gewesen.

Die Messung des Reaktionsverlaufs der alkoholischen Gärung beruht gewöhnlich auf der volumetrischen oder gravimetrischen Bestimmung der entwickelten Kohlensäure; so wird die Gärwirkung nach dem Vorschlage von R. Willstätter und W. Steibelt²⁾ ausgedrückt durch die „Halbgärzeit“, das ist die zur Entbindung von 50 Proz. der theoretischen Kohlensäuremenge unter bestimmten normalen Bedingungen erforderliche Zeit in Minuten. Es ist bemerkenswert, daß sowohl die Kinetik wie auch die p_{H} -Abhängigkeit der Gärung mit frischer und mit getrockneter Hefe große Unterschiede aufzuweisen hat. So ist die schon von A. Harden und W. J. Young³⁾ beobachtete Erscheinung der „Induktion“, d. h. das spontane Einsetzen der Gärwirkung nach Ablauf einer gewissen Induktionsperiode, die man bei frischer Hefe nicht wahrnimmt, nach O. Meyerhof⁴⁾ und nach v. Euler und Myrbäck auf eine in den ersten Stadien unzureichende Bildung von Zucker-Phosphorsäureester zurückzuführen, da die Gärung in Gegenwart dieser Stoffe

¹⁾ H. **131**, 179 (1923); **133**, 260 (1923/24); **136**, 107; **138**, 1; **139**, 15, 281 (1924).

²⁾ H. **115**, 211 (1921).

³⁾ Vgl. A. Harden, *Alcoholic Fermentation*, 3. Auflage 1923, S. 39.

⁴⁾ H. **101**, 165 f.; **102**, 1, und zwar S. 3 (1918).

sofort beginnt; sie ist bei der quantitativen Bestimmung der Gärfähigkeit von Trockenhefe zu berücksichtigen; in anderen Untersuchungen wird diese Erscheinung als eine Regeneration der Hefezellen verstanden¹⁾. Auf eine verschiedene Abhängigkeit von der Wasserstoffzahl, deren optimaler Bereich nach H. v. Euler und S. Heintze²⁾ sich für Frischhefe von $p_H = 3$ bis $p_H = 7,5$, für Trockenhefe aber nur von $p_H = 6,2$ bis $6,8$ erstreckt, mögen die beobachteten Unterschiede in der Kinetik der beiden Enzymmaterialien teilweise zurückzuführen sein; so besteht nach A. Slator³⁾ für die Gärwirkung frischer Hefe in weitem Bereiche Proportionalität zwischen Hefemenge und Anfangsgeschwindigkeit und nach den Untersuchungen von G. Tammann⁴⁾ werden mit diesem Material in gleichen Zeiten gleiche Kohlensäuremengen entbunden, während zufolge R. O. Herzog⁵⁾, T. Gromow und O. Grigoriew⁶⁾ sowie H. v. Euler⁷⁾ für Trockenhefe die Beziehungen zwischen Hefemenge und Reaktionsgeschwindigkeit wie auch der Reaktionsverlauf sich nicht sicher kennzeichnen lassen. Für die quantitative Bestimmung der Zymase wie ihres Ko-Enzyms hat man ferner nach H. v. Euler und Myrbäck zu berücksichtigen, daß die Verbindung dieser beiden Stoffe in erheblichem Maße dissoziiert zu sein scheint und daß die meisten Hefen weniger Aktivator enthalten, als ihrem Enzymgehalt entspricht; das eigentliche Maß der Zymasemengen hat sich danach auf die maximale Gärgeschwindigkeit zu beziehen, die sich nach dem Zusatz von überschüssigem Aktivator, nämlich von Hefekochsaft, ergibt; sodann erscheint es zweckmäßiger, der Bestimmung von Zymasemengen und Gärfähigkeit nicht die „Halbgärzeit“ zugrunde zu legen, sondern sie auf die Anfangsgeschwindigkeiten der Gärung zu beziehen, bei welchen die im späteren Gärungsverlauf eintretenden Störungen, beispielsweise infolge Hefevermehrung, noch nicht beobachtet werden.

Über die auswählenden Wirkungen der Zymase hat die Forschung eine große Anzahl von Beobachtungen gesammelt. So

¹⁾ Siehe dazu E. Abderhalden, *Fermentf.* **5**, 89, 110, 255, 273 (1922); E. Abderhalden u. S. Glaubach, *Fermentf.* **6**, 143, 149, 162 (1922); H. Sobotka, *H.* **134**, 1, und zwar S. 9 (1923/24).

²⁾ *H.* **108**, 165 (1919).

³⁾ *Soc.* **89**, 128 (1906); **93**, 217 (1908).

⁴⁾ *Ph. Ch.* **3**, 25, und zwar S. 36 (1889).

⁵⁾ *H.* **37**, 149 (1903).

⁶⁾ *H.* **42**, 299 (1904).

⁷⁾ *H.* **45**, 420, und zwar S. 445 (1905).

haben die Untersuchungen von R. O. Herzog und O. Saladin¹⁾ erwiesen, daß die Hefen, die die Monosaccharide Glucose, Fructose und Mannose mit nahezu gleicher Geschwindigkeit vergären, bei der Trocknung mit Aceton wesentliche Verschiebungen im Verhältnis der Einzelgärgeschwindigkeiten erfahren. Die zuerst von E. F. Armstrong²⁾ beschriebene Erscheinung, daß die meisten Hefen, die unvermögend sind, Galaktose zu vergären, durch Züchtung in Lösungen dieses Substrats die Fähigkeit zur Galaktosevergärung erlangen, ist nach R. Willstätter und H. Sobotka³⁾ nicht im Sinne der Annahme H. v. Eulers⁴⁾ auf die Ausbildung einer besonderen, die Galaktose zu Glucose umlagernden „Galaktase“, sondern auf eine Anpassung des Zymasekomplexes an das neue Gärsubstrat zurückzuführen; nach H. v. Euler und R. Nilsson⁵⁾ wird die Erscheinung der Galaktosegewöhnung auch an steriler Trockenhefe beobachtet⁶⁾ und es erfährt die erworbene Fähigkeit zur Galaktosevergärung auch durch einen neuerlichen Wechsel im Gärsubstrat, beispielsweise bei der Rückführung auf Glucose, selbst nach längerer Zeit keine Abnahme⁷⁾. Indessen hat die Untersuchung von Willstätter und Sobotka zu dem bemerkenswerten Ergebnis geführt, daß sich im Gemisch zweier Gärsubstrate das Verhältnis der Gärgeschwindigkeiten wesentlich vom Geschwindigkeitsverhältnis der Einzelgärungen unterscheidet. Die Erscheinung, daß eine an Galaktose gut gewöhnte Hefe diesen Zucker für sich allein schneller als Glucose vergärt, im Gemisch beider Zucker dagegen die Glucose vorzieht, läßt erkennen, daß die Vergärungen von Glucose und Galaktose parallele Prozesse sind, die in einem späteren Stadium der Gärung zusammenfallen, wobei das erste gemeinsame Zwischenprodukt, dessen Zerfall die Reaktion limitiert, aus einem Zerfallsprodukt der Glucose mit größerer Geschwindigkeit entsteht. Ähnliche Verhältnisse bestimmen die auswählende Gärung in Gemischen von Glucose und Fructose oder von α - und β -Glucose⁸⁾.

¹⁾ H. **73**, 263 (1911).

²⁾ Proc. Roy. Soc. B **76**, 600 (1905).

³⁾ H. **123**, 176 (1922).

⁴⁾ Chemie der Enzyme, 2. Aufl., 1. Teil, München und Wiesbaden 1920, S. 293 ff.

⁵⁾ H. **143**, 89 (1925).

⁶⁾ Vgl. die entgegenstehenden Beobachtungen von N. L. Söhngen u. C. Coolhaas, Zbl. f. Bakt. **66**, II, 5 (1925).

⁷⁾ H. v. Euler u. Th. Lövgren, H. **146**, 44 (1925).

⁸⁾ Vgl. R. Willstätter u. H. Sobotka, H. **123**, 164 (1922).

Die theoretisch wichtige Frage, ob der Vergärung von Disacchariden ihre enzymatische Spaltung in Monosen vorausgehen müsse, ist durch die Untersuchungen R. Willstätters¹⁾ dahin entschieden worden, daß man für die untersuchten Disaccharide, Maltose, Rohrzucker und Lactose, entgegen den älteren Anschauungen von E. Fischer und P. Lindner²⁾ direkte Vergärbarkeit anzunehmen hat. Diese Folgerung hat sich aus der Bestimmung der Gärfähigkeit maltasearmer Hefen für Malzzucker oder in anderen Beispielen aus dem ungeschwächten Gärvermögen des auf künstlichem Wege an Saccharase arm gemachten Pilzes gegenüber Rohrzucker ergeben; der Nachweis der direkten Vergärung von Rohrzucker durch die Hefe ist auch auf anderem Wege erbracht worden, nämlich durch die Messung der Gärung bei starker Acidität, bei welcher die Gärung der hydrolytischen Spaltung des Disaccharids vorausseilt.

Über den Mechanismus der alkoholischen Gärung haben vor allem die ausgedehnten Untersuchungen von C. Neuberg³⁾ wertvolle Aufschlüsse ergeben. Nach der Auffassung von Neuberg hat als primäres Spaltprodukt der Hexosen ein Körper mit drei Kohlenstoffatomen zu gelten, das Methylglyoxal $\text{CH}_3\text{—CO—CHO}$, das ein wesentliches Zwischenglied des Zuckerabbaus darzustellen scheint. Man wird dabei anzunehmen haben, daß der Zerfall des Hexosemoleküls auf dem Wege über seine Veresterung mit Phosphorsäure erfolgt, zumal die Untersuchungen von A. Harden und W. J. Young⁴⁾ sowie von H. v. Euler und D. Johansson⁵⁾ die Äquivalenz zwischen der Menge veresterten Phosphats und der entbundenen Kohlensäure erwiesen haben; auch hat man zufolge der Beobachtungen von H. v. Euler und K. Myrbäck⁶⁾ die Mitwirkung der Ko-Zymase auf eben diese Reaktionsstufe der Gärung, die Veresterung der Hexose mit Phosphorsäure, zu beziehen. Über den weiteren Weg der Spaltung des Hexosemoleküls selbst in Körper

¹⁾ R. Willstätter u. W. Steibelt, H. **115**, 211 (1921); R. Willstätter u. E. Bamann, H., im Druck (Maltose); R. Willstätter u. G. Oppenheimer, H. **118**, 168 (1921/22) (Lactose); R. Willstätter u. Ch. D. Lowry jr., H. **150**, 287 (1925) (Rohrzucker).

²⁾ B. **28**, 984, 3034 (1895); E. Fischer, H. **26**, 60, und zwar S. 72 (1898).

³⁾ B. **55**, 3624 (1922).

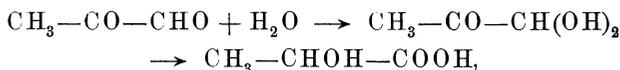
⁴⁾ Proc. Roy. Soc. B **80**, 299 (1908); **81**, 336 (1909).

⁵⁾ H. **85**, 192 (1913).

⁶⁾ H. **139**, 15 (1924).

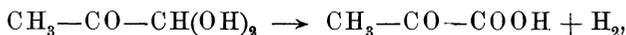
der 3-Kohlenstoffreihe besitzt man indessen noch keine sicheren Anhaltspunkte.

Die Umsetzung des Methylglyoxals kann nach Neuberg unter gewissen Bedingungen durch Wasseranlagerung und innere Disproportionierung zur Milchsäure führen zufolge der Reaktion



ein Vorgang, der vor allem bei dem der Gärung verwandten Kohlehydratabbau im tierischen Muskel hervortritt, sodann bei der Wirkung der milchsäurebildenden Bakterien; für letztere haben die Untersuchungen von A. I. Virtanen¹⁾ gleichfalls die Mitwirkung der Ko-Zymase als unentbehrlich erwiesen, der Abbau führt also auch in diesem Falle über die Stufe des Hexosephosphorsäureesters. Die enge Verwandtschaft andererseits des Kohlehydratabbaus im pflanzlichen und tierischen Organismus, wenigstens in seinen ersten Stadien, geht aus den wichtigen Untersuchungen von O. Meyerhof²⁾ hervor, die über das Vorkommen von Ko-Zymase im Kochsaft der Muskulatur berichten; sie sind mit dem quantitativen Vergleich der Wirkung des Aktivators aus Muskel und Hefe von H. v. Euler und K. Myrbäck³⁾ bestätigt worden. Die Analogie der Reaktionswege in beiden Fällen ergibt sich überdies aus der Übereinstimmung des primären Reaktionsproduktes, des Hexosephosphorsäureesters, den G. Embden⁴⁾ aus Muskelpreßsaft, A. Harden und W. J. Young⁵⁾ sowie C. Neuberg⁶⁾ aus Hefe isoliert und als Fructosediphosphorsäure (Lactacidogen) gekennzeichnet haben.

Die normale Umsetzung des Methylglyoxals, die bei der alkoholischen Gärung eintritt, führt jedoch nach Neuberg mittels der Dehydrierung seines Hydrats zur Brenztraubensäure nach der Gleichung:



wobei der entstehende Wasserstoff von einem im weiteren Reaktionsverlauf gebildeten Produkt, dem Acetaldehyd, aufgenommen wird.

1) H. **138**, 136 (1924); **143**, 71 (1924/25).

2) H. **101**, 165; **102**, 1 (1918); Pflüg. Arch. **170**, 867 (1918).

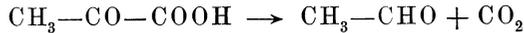
3) H. **133**, 260, und zwar S. 274 (1923/24).

4) H. **93**, 1, 54, 124 (1914) sowie spätere Abhandlungen.

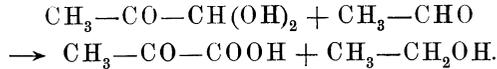
5) Proc. Roy. Soc. B **82**, 321 (1910).

6) Bio. Z. **88**, 432 (1918).

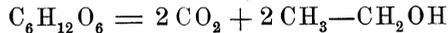
Die Brenztraubensäure wird nämlich, wie Neuberg gezeigt hat, von Hefe glatt und leicht vergoren, sie erfährt eine Abspaltung von Kohlendioxyd, und zwar unter der Wirkung eines die Zymase stets begleitenden Enzyms, der Carboxylase, welcher allgemein die Fähigkeit zur Spaltung von Carbonsäuren in der angeführten Weise zukommt. Dieser Übergang der Brenztraubensäure in Acetaldehyd nach der Gleichung



führt zugleich zur Bildung des für die Dehydrierung des Methylglyoxals erforderlichen Wasserstoffacceptors: die Dismutation der beiden Aldehyde, Methylglyoxal und Acetaldehyd, vollzieht sich nun unter Bildung von Brenztraubensäure und Äthylalkohol nach dem Schema:

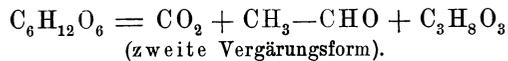


Diese Reaktion verläuft nun infolge der stetigen Neubildung von Acetaldehyd aus Brenztraubensäure als kontinuierlicher Prozeß und es erscheinen so in der Gesamtgleichung der alkoholischen Gärung



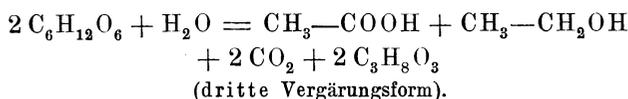
Äthylalkohol und Kohlensäure als die alleinigen Produkte (erste Vergärungsform).

Diese Anschauungen Neubergs über den Mechanismus der alkoholischen Gärung, nach welchen den Zwischenprodukten Brenztraubensäure und Acetaldehyd eine hervorragende Rolle bei der Vergärung zukommt, werden gestützt durch den Befund, daß es gelingt, den intermediär gebildeten Acetaldehyd durch Vornahme der Gärung in alkalischer, sulfithaltiger Lösung abzufangen und die Reaktion damit in andere Bahnen zu leiten. An Stelle des der Reaktion in Form seiner Bisulfitverbindung entzogenen Acetaldehyds tritt in diesem Falle ein anderer Wasserstoffacceptor, aus der 3-Kohlenstoffreihe, vermutlich Methylglyoxal, als dessen Hydrierungsprodukt unter den Endprodukten der Reaktion das Glycerin neben Kohlendioxyd und Acetaldehyd erscheint:



Mit der angeführten zweiten Vergärungsform steht eine dritte Art der Zuckergärung im Einklang, die Neuberg in Gegenwart alkalischer Salze, aber ohne Sulfit, das spezifische Abfangmittel

für Acetaldehyd, beobachtet hat. Der Aldehyd erfährt in diesem Falle eine Disproportionierung zu Essigsäure und Äthylalkohol, so daß der Verlauf der Reaktion, bei welcher auf 2 Mol Glycerin je 1 Mol Alkohol und Essigsäure gebildet wird, nunmehr der Gleichung entspricht:



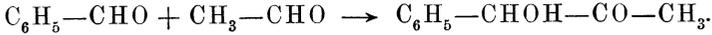
Auch bei einer vierten Form der Vergärung, der sogenannten Buttersäuregärung, die durch gewisse Mikroorganismen ausgelöst wird, stellen nach Neuberg Acetaldehyd und Brenztraubensäure in ähnlicher Weise Durchgangsstufen dar, die Fixierung des intermediär gebildeten Aldehyds ist auch in diesem Falle durchgeführt worden.

Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, daß C. Neuberg und F. Windisch¹⁾ auch für den Mechanismus einer anderen Gärungserscheinung, der sogenannten Essigsäuregärung, die biochemische Oxydation von Äthylalkohol zu Essigsäure durch die Essigsäurebakterien, den Nachweis eines ähnlichen Disproportionierungsvorgangs geführt haben, wie er für die oben angeführten Vergärungsformen kennzeichnend ist. Die Bakterien der Essigsäuregärung, die zur Vergärung von Zuckern nicht befähigt sind, vollziehen die Oxydation des Alkohols zur Säure in zwei verschiedenen Stufen, nämlich durch die Dehydrierung zum Acetaldehyd und durch darauffolgende Dismutation des Aldehyds in Essigsäure und Alkohol; diese Folgerung haben Neuberg und Windisch aus der Beobachtung abgeleitet, daß Acetaldehyd wie auch Brenztraubensäure, diese nach der Decarboxylierung zum Aldehyd, durch die Bakterien keine direkte Oxydation, sondern eine Disproportionierung zu Säure und Alkohol erfahren, welche letzterer sich bei Ausschluß von Sauerstoff nachweisen ließ.

Die wichtigen Betrachtungen Neubergs über den Mechanismus der alkoholischen Gärung haben eine weitere Vertiefung erfahren mit der Beschreibung einer neuartigen enzymatischen Wirkung in den Gärungserregern, deren Beteiligung an dem Gärungsprozeß nach Neuberg die Möglichkeit einer fünften Vergärungsform ergibt. Sie ist gekennzeichnet durch die Synthese von Kohlenstoff-Kohlenstoffbindungen, die nach der Zugabe von Aldehyden zu

¹⁾ Naturw. 13, 993 (1925).

gärenden Zuckerlösungen unter Zusammenschluß zweier Aldehydmoleküle zum Ketonalkohol erfolgt; so entsteht beispielsweise aus zugefügtem Benzaldehyd durch Kondensation mit dem bei der Gärung gebildeten Acetaldehyd ein Körper von der Konstitution eines Phenylacetylcarbinols zufolge der Gleichung:



Die Synthese solcher Verbindungen, die auch bei der zellfreien Gärung, also auf rein enzymatischem Wege erfolgt und die nach Neuberg auf der Wirkung eines neuartigen, Kohlenstoff mit Kohlenstoff verknüpfenden Enzyms, der Carboligase, beruht, läßt erkennen, daß mit den Spaltungsreaktionen, wie sie bei der alkoholischen Gärung eintreten, auch aufbauende Vorgänge eng verknüpft zu sein scheinen, deren physiologische Bedeutung man vielleicht in der Synthese neuen Baumaterials für die Zellen der Mikroorganismen zu suchen haben wird.

Autorenregister.

- Abderhalden**, E. 41, 56, 67, 112, 129, 147, 150, 215.
 — u. **Brahm**, C. 67, 147.
 —, **Caemmerer**, G. und **Pincussohn**, L. 67.
 — u. **Fodor**, A. 46, 148.
 — u. **Glaubach**, S. 215.
 — u. **Goto**, K. 129.
 — u. **Koelker**, A. H. 67, 124, 147.
 —, **Sickel**, H. u. **Ueda**, H. 112.
 — u. **Steinbeck**, E. 128.
 — s. **Fischer**, E. 69, 129, 147, 150.
Abel, E. 199.
Acklin, O. 5.
Adler, L. 143, 184.
Armstrong, E. F. s. **Armstrong**, H. E. 177, 181.
Armstrong, H. E. 53, 114, 216.
 —, **Armstrong**, E. F. u. **Horton**, E. 177, 181.
 —, **Benjamin**, H. S. u. **Horton**, E. 159.
 — und **Horton**, E. 158, 160, 179.
 — s. **Fischer**, E. 53, 181.
Arnheim, F. s. **Rona**, P. 148.
Arrhenius, Sv. 27, 40, 41, 42, 128.
Arthus, M. u. **Pagès** 140.
Asada, K. s. **Kleinmann**, H. 123.
Auld, S. J. M. 179.
- Bach**, A. u. **Chodat**, R. 207, 208.
Baker, J. C. s. **Sherman**, H. C. 186.
 —, J. L. u. **Hulton**, H. F. E. 80, 191.
Baldwin, M. W. s. **Sherman**, H. C. 11, 184.
Bamann, E. s. **Willstätter**, R. 68, 94, 166, 170, 173—177, 217.
Bancels, L. des s. **Henri**, V. 124.
Barendrecht, H. P. 121, 159.
Barthel, Chr. und **Euler**, H. von 5.
Batelli, F. und **Stern**, L. 197, 210.
Baur, E. 4, 5.
Bayliss, W. M. 41, 45, 46, 56, 124.
 — u. **Starling**, E. H. 134.
Bechhold, H. 17.
Benjamin, H. S. s. **Armstrong**, H. E. 159.
Bernard, Cl. 164.
Berthelot, M. 2.
Bertrand, L. G. u. **Thomas**, P. 182.
Berzelius, J. J. 3.
Biedermann, W. 59, 183.
Bien, Z. s. **Rona**, P. 105.
Bierry, H. 58, 164, 183.
 — u. **Giaja**, J. 183.
 —, **Giaja**, J. u. **Henri**, V. 58.
- Bierry**, H., **Henri**, V. u. **Schaeffer**, G. 16.
Blood, A. F. s. **Mendel**, L. S. 141.
Bodenstein, M. u. **Dietz**, W. 52.
Bonem, P. s. **Edlbacher**, S. 154, 155, 156.
Bouchout, E. s. **Wurtz**, A. 141.
Bourquelot, E. 53, 54, 173.
Bradley, H. C. s. **Hertzmann**, A. B. 15.
Brahm, C. s. **Abderhalden**, E. 67, 147.
Bredig, G. 70, 197.
Brown, H. T. u. **Glen-dinning**, A. T. 186.
Brücke, E. 18, 92.
Buchner, E., **Buchner**, H. u. **Hahn**, M. 2, 78, 87, 213.
 —, H. s. **Buchner**, E. 2, 78, 87, 213.
Burian, R. 211.
- Caemmerer**, G. s. **Abderhalden**, E. 61.
Campbell, R. u. **Haworth**, W. N. 178.
Chittenden, R. H. 185.
Chodat, R. s. **Bach**, A. 194, 199, 207.
Chrzaszcz, T. 188.
Clark, E. D. s. **Sherman**, H. C. 183.
 —, M. E. s. **Kastle**, J. H. 164.

- Clementi, A. 154.
 Cohnheim, J. 18, 92, 189.
 —, O. 145.
 Connstein, W. 100.
 —, Hoyer, E. u. Wartenberg, H. 117.
 Coolhaas, C. s. Söhngen, N. L. 216.
 Corvisart 1.
 Cremer, M. 56.
 Croft Hill, A. 50, 53, 176.
 Csanyi, W. s. Willstätter, R. 79, 179, 180, 181.
 Cullen, G. E. s. Slyke, D. D. van 158, 159.

Dakin, H. D. 112.
 — s. Kossel, A. 153.
 Damboviceanu, A. s. Rona, P. 194, 195, 196.
 Danilewsky, A. 18, 92, 189.
 Dauphinée, J. A. s. Hunter, A. 154, 155.
 Davidsohn, H. 11, 66, 102, 107.
 — s. Michaelis, L. 11, 13, 25, 26, 126, 133.
 Dernby, K. G. 24, 144, 145, 148, 149.
 Dietz, W. s. Bodenstein, M. 52.
 Dixon, M. u. Tunnicliffe, H. E. 211.
 — s. Hopkins, F. G. 211.
 Djenab, K. 121.
 Duñaiturria, S. s. Willstätter, R. 137.

Ebstein, W. u. Grützner, P. 57, 123.
 Edlbacher, S. 130, 154.
 — u. Bonem, P. 154, 155, 156.
 Edlbacher, S. u. Röhler, H. 154, 155.
 Effront, J. 188.
 Ehrenberg, R. 4.
 Ehrenreich, M. s. Michaelis, L. 17, 18, 168.
 Einstein, A. 7.
 Ellinghaus, J. s. Steudel, H. 130.
 Elvove, E. s. Kastle, J. H. 109.
 Embden, G. 121, 218.
 Emmerling, O. 53.
 Engler, C. 207.
 — u. Weissberg 207.
 Erbacher, O. s. Willstätter, R. 94.
 Euler, H. von 6, 8, 24, 40, 43, 48, 55, 64, 71, 83, 84, 148, 165, 195, 197, 215, 216.
 — u. Funke, Y. 121.
 — u. Heintze, S. 215.
 — u. Johansson, D. 217.
 — u. Josephson, K. 40, 48, 55, 56, 68, 73, 165, 171, 172.
 — u. Kullberg, S. 121.
 — u. Laurin, J. 32, 43, 44.
 — u. Lövgren, Th. 86, 216.
 — u. Myrbäck, K. 61, 65, 214, 215, 218.
 — u. Nilsson, R. 86, 216.
 — u. Svanberg, O. 26, 48, 64, 65, 163, 164, 169, 171, 185, 186.
 — s. Barthel, Chr. 5.
 Eweyk, C. van s. Rona, P. 182.

Falk, G. s. Mc Guire, Gr. 184.
 Faraday 196.
 Fearon, W. R. 160.
 Felix, K. 130.
 Fermi, C. 124.
 Fernbach, A. 82, 119.
 Fernbach, A. s. Wolff, J. 56, 182.
 Fischer, E. 5, 11, 70, 119, 122, 165, 175, 176, 178, 217.
 — u. Abderhalden, E. 69, 129, 147, 150.
 — u. Armstrong, E. H. 53, 181.
 — u. Lindner, P. 217.
 Fodor, A. 4, 46, 171,
 — s. Abderhalden, E. 46, 148.
 Fosse, R. 157.
 Frankel, E. M. 130, 141.
 Freudenberg, K. 119.
 — u. Vollbrecht, E. 120.
 Freundlich, H. 21, 53.
 Fricke, R. u. Kaja, P. 192.
 Fromme, A. 107.
 Frouin, A. 126.
 Fuchs, W. s. Pringsheim, H. 185.
 Fuld, E. u. Levison, L. A. 123.
 — u. Morawitz, P. 140.
 — u. Spiro, K. 140.
 Funke, Y. s. Euler, H. von 121.

Gambarjan, St. s. Meisenheimer, J. 83.
 Geret, L. s. Hahn, M. 144.
 Giaja, J. s. Bierry, H. 58, 183.
 Gierisch, W. s. Waentig P. 198.
 Gjaldbaek, J. K. s. Henriques, V. 56, 125, 129, 130, 150.
 Glaubach, S. s. Abderhalden, E. 215.
 Glendinning, A. T. s. Brown, H. T. 186.
 Gola, G. 205.
 Goto, K. s. Abderhalden, E. 129.
 Gottschalk, A. s. Steudel, H. 130.

- Graser, J. s. Willstätter, R. 6, 16, 25, 40, 43, 148, 168, 207.
- Grassmann, W. s. Waldschmidt-Leitz, E. 22, 139.
- s. Willstätter, R. 15, 61, 141, 143, 145, 147, 151.
- Green, J. R. 114.
- Grigoriev, O. s. Gromow, T. 215.
- Gromow, T. u. Grigoriev, O. 215.
- Gross, G. 123.
- , R. E. 155.
- Grosser, P. u. Hussler, J. 121.
- Grützner, P. 123.
- s. Ebstein, W. 57, 123.
- Grundherr, G. E. von s. Kuhn, R. 68, 165.
- Guire, Gr. Mc u. Falk, G. 184.
- György, P. s. Rona, P. 158.
- H**aber, F. 53.
- Haehn, H. 212.
- u. Schweigart, H. 58, 183.
- Hahn, A. u. Harpuder, K. 58, 184.
- , M. u. Geret, L. 144.
- s. Buchner, E. 2, 78, 87, 213.
- Haley, D. E. u. Lyman, J. F. 11, 114.
- Hammarsten, O. 57, 92, 131, 132, 140.
- Harden, A. 214.
- u. Young, W. J. 61, 121, 213, 214, 217, 218.
- Harpuder, K. s. Hahn, A. 58, 184.
- Harteneck, A. s. Waldschmidt-Leitz, E. 5, 11, 60, 68, 91, 93, 134, 135, 137, 138, 142, 146, 147, 149, 150.
- Haurowitz, F. u. Petrou, W. 107, 109.
- s. Willstätter, R. 13, 107, 108, 112.
- Haworth, W. N. s. Campbell, R. 178.
- Hedin, S. G. 22, 47.
- Heidenhain, R. 134, 135.
- Heintze, S. s. Euler, H. von 215.
- Heiss, H. s. Willstätter, R. 199.
- Helferich, B. 180.
- Hennichs, S. 195, 197, 198.
- Henri, V. 16, 25, 39, 159.
- u. Bancel, L. des 124.
- s. Bierry, H. 16, 58.
- Henriques, V. u. Gjaldbaek, J. K. 56, 125, 129, 130, 150.
- Hertzmann, A. B. u. Bradley, H. C. 15.
- Herzfeld, E. 4, 5.
- Herzog, R. O. 7, 109, 126, 150, 215.
- u. Margolis, M. 128.
- u. Saladin, O. 216.
- Hesse, A. R. F. s. Willstätter, R. 58, 75, 137, 183, 184, 186, 187, 190, 191.
- Hizume, K. 187.
- Hoff, J. H. van 't 50.
- Holmbergh, O. 184, 187.
- Hopkins, F. G. 211.
- u. Dixon, M. 211.
- Hoppert, C. 153.
- Hoppe-Seyler, F. 2.
- Horton, E. s. Armstrong, H. E. 158, 159, 160, 177, 179, 181.
- Hoyer, E. 98, 116, 117.
- s. Connstein, W. 117.
- Hudson, C. S. 24, 25, 26, 166.
- Hudson, C. S. u. Paine, H. S. 179.
- Hulton, H. F. E. s. Baker, J. L. 80, 191.
- Hunter, A. u. Dauphinée, J. A. 154, 155.
- Hussler, J. s. Grosser, P. 121.
- I**scovesco, H. 16.
- Issajew, W. 24, 195.
- Iwanoff, L. 213.
- J**akoby, M. 156, 158.
- Jalander, Y. W. 51, 116.
- Jansen, B. C. P. 161.
- Johansson, D. s. Euler, H. von 217.
- Johnstone, M. E. s. Kastle, J. H. 109.
- Jonone, R. s. Takeuchi, T. 156.
- Joos, B. s. Karrer, P. 193.
- Josephson, K. 179, 180, 183.
- s. Euler, H. von 40, 48, 55, 56, 68, 73, 165, 171, 172.
- K**aja, P. s. Fricke, R. 192.
- Karczag, L. s. Neuberger, C. 121.
- Karrer, P., Joos, B. u. Staub, M. 193.
- Kastle, J. H. u. Clark, M. E. 164.
- , Johnstone, M. E. u. Elvove, E. 109.
- u. Loevenhart, A. S. 41, 66, 109.
- Kaufmann, W. von u. Lewite, A. 189.
- Kawalki, W. 7.
- Kay, H. 161.
- Kendall, E. C. u. Sherman, H. C. 41, 56, 188.
- s. Sherman, H. C. 183.

- Kjeldahl 41.
 Kleinmann, H. u. Asada, K. 123.
 — s. Rona, P. 123.
 Knaffl-Lenz, E. 109, 110.
 Koelker, A. H. s. Abderhalden, E. 67, 124, 147.
 Kohn, G. s. Pringsheim, H. 192.
 Kossel 'A. u. Dakin, H. D. 153.
 Kraut, H. u. Wenzel, E. 20, 21, 90, 169.
 — s. Willstätter, R. 94, 95.
 Krieble, V. K. 70.
 Kröber, E. 176.
 — s. Lintner, C. J. 41, 176.
 Kühne, W. 132, 134, 146.
 Küttner, S. 128.
 Kuhn, R. 14, 32, 33, 38, 40, 67, 68, 69, 155, 164, 181, 188, 207.
 — u. Grundherr, G. E. von 68, 165.
 — u. Münch, H. 37, 68, 165.
 — u. Sobotka, H. 44, 178.
 — s. Willstätter, R. 6, 16, 22, 25, 40, 43, 69, 72, 73, 75, 148, 163, 164, 168, 174, 178, 179, 181.
 Kullberg, S. s. Euler, H. von 121.
 Kumagawa, H. s. Willstätter, R. 113.
 Kunz, A. s. Zemplén, G. 178.
 Kusnack, W. s. Pringsheim, H. 193.
Langley, J. N. 57.
 Langmuir, J. 18.
 Laurin, J. s. Euler, H. von 32, 43, 44.
 Leibowitz, J. s. Pringsheim, H. 184, 193.
 Levene, P. A. u. Medigreceanu, F. 121.
 Levison, L. A. s. Fuld, E. 123.
 Lewite, A. s. Kaufmann, W. von 189.
 Liebig, J. von 1.
 — u. Wöhler, 1.
 Lindner, P. s. Fischer, E. 217.
 Lintner, C. J. 176, 192.
 — u. Kröber, E. 41, 176.
 Lipschitz, W. 210.
 Loeb, J. 9.
 Löhlein, W. 123.
 Loevenhart, A. S. 111.
 — u. Peirce, G. 66.
 — s. Kastle, J. H. 41, 66, 109.
 Lövgren, St. 157, 159, 160.
 —, Th. s. Euler, H. von 26, 86.
 Loew, O. 193.
 Lowry, Ch. D. jun. s. Willstätter, R. 84, 167, 217.
 Lüers, H. 191.
 — u. Sellner, E. 188, 192.
 — u. Wasmund, W. 11, 41, 184, 185, 186.
 Lundin, H. 143.
 Lyman, J. F. s. Haley, D. E. 11, 114.
Mack, E. u. Villars, D. J. 161.
 Madinaveitia, A. s. Willstätter, R. 197.
 Madsen, Th. u. Walbum, L. E. 42.
 Maquenne, L. 56.
 Margolis, M. s. Herzog, R. O. 128.
 Mayer, A. s. Samec, M. 189.
 Medigreceanu, F. s. Levene, P. A. 121.
 Meisenheimer, J., Gambarjan, St. u. Semper, L. 83, 84.
 Memmen, Fr. s. Willstätter, R. 12, 13, 61, 62, 66, 69, 72, 76, 101, 102, 103, 107, 108, 110, 112, 113.
 Mendel, L. u. Blood, A. F. 141.
 Menten, M. L. s. Michaelis, L. 25—32, 34—36, 38, 40.
 Mett, S. 123.
 Meyerhof, O. 214, 218.
 Michaelis, L. 9, 10, 13, 14, 15, 16, 21, 22, 33, 45, 102, 168.
 — u. Davidsohn, H. 11, 13, 25, 26, 126, 133.
 — u. Ehrenreich, M. 17, 18, 168.
 — u. Menten, M. L. 25—32, 34—36, 38, 40.
 — u. Pechstein, H. 12, 36, 37, 38, 58, 184, 194, 195.
 — u. Rona, P. 11, 17, 37.
 — u. Rothstein, M. 14, 17.
 — s. Rona, P. 102, 173.
 Mitscherlich, E. 3.
 Morawitz, P. 140.
 — s. Fuld, E. 140.
 Morgulis, S. 194, 195, 196.
 Morris, G. H. 175.
 Münch, H. s. Kuhn, R. 37, 68, 165.
 Mutch, N. 153.
 Myrbäck, K. 64, 65, 214, 215, 218.
 — s. Euler, H. von 61, 65.
Nasse, O. 183.
 Neuberg, C. 67, 121, 152, 181, 217—221.

- Neuberg, C. u. Karczag, L. 121.
 — u. Windisch, F. 220.
 Nicloux, M. 41, 116.
 Nilsson, R. s. Euler, H. von 86, 216.
 Nordefeldt, E. 56.
 Northrop, J. H. 15, 122, 127, 133, 136, 149.
- O**holm, L. W. 7.
 Ohlsson, E. 187
 Ohta, K. 180.
 Onodera, N. 158.
 Oppenheimer, C. 53, 149, 150, 151, 210.
 —, Tr. s. Willstätter, R. 88, 173, 176, 178, 179, 181, 217.
- P**agès s. Arthus, M. 140.
 Paine, H. J. s. Hudson, C. S. 179.
 Palitzsch, S. u. Walbum, L. E. 124, 133.
 Parastschuk, S. W. s. Pawlow, J. P. 92.
 Pasteur, L. 2.
 Pawlow, J. P. 82, 126, 131.
 — u. Parastschuk, S. W. 92.
 Payen 1.
 Pechstein, H. s. Michaelis, L. 12, 36, 37, 38, 58, 184, 194, 195.
 Peirce, G. 110.
 — s. Loevenhart, A. S. 66.
 Pekelharing, C. A. 105, 131.
 Persiel, H. s. Willstätter, R. 136.
 Persoz 1.
 Petrow, W. s. Haurowitz, F. 107, 109.
 Pincussohn, L. s. Abderhalden, E. 67.
- Pollak, A. 182.
 Pollinger, A. s. Willstätter, R. 20, 26, 79, 89, 200—204, 206.
 Pottevin, H. 51, 104, 119, 187.
 Pringsheim, H. 187, 189, 193.
 — u. Fuchs, W. 185.
 — u. Kohn, G. 192.
 — u. Kusenack, W. 193.
 — u. Leibowitz, J. 184, 193.
 — u. Reiser, A. 185.
 — u. Schmalz, K. 185.
 — u. Seifert, K. 193.
- R**acke, F. s. Willstätter, R. 18, 22, 79, 87, 163, 165, 166, 168.
 Raper, H. St. u. Wormall, A. 212, 213.
 Reiser, A. s. Pringsheim, H. 185.
 Riehmann, K. s. Willstätter, R. 201.
 Ringer, W. E. 131, 133.
 — u. Trignt, H. van 184.
 Röhler, H. s. Edlbacher, S. 154, 155.
 Rona, P. 66, 102, 113.
 — u. Arnheim, F. 148.
 — u. Bien, Z. 105.
 — u. Damboviceanu 194—196.
 — u. Eweyk, C. van 182.
 — u. György, P. 158.
 — u. Kleinmann, H. 123.
 — u. Michaelis, L. 102, 173.
 — s. Michaelis, L. 11, 17, 37.
 Rosenheim, O. 105.
 Rosenthaler, L. 56, 70.
 Rothstein, M. s. Michaelis, L. 14, 17.
- S**aladin, O. s. Herzog, R. O. 216.
- Salkowski, E. 144.
 Samec, M. u. Mayer, A. 189.
 Schaeffer, G. s. Bierry, H. 16.
 Schäffner, A. s. Waldschmidt-Leitz, E. 22, 94, 129, 139, 146—149.
 Scheele 119.
 Schepowalnikow, N. P. 59, 134.
 Schlatter, G. 5.
 Schlesinger, M. D. s. Sherman, H. C. 184, 186, 188, 190, 192.
 Schmalz, K. s. Pringsheim, H. 185.
 Schmidt, A. 140.
 Schmiedeberg, O. 80, 152.
 Schneider, K. s. Willstätter, R. 65, 84, 166, 167, 169, 170, 172.
 Schrupf, P. 131.
 Schudel, G. s. Willstätter, R. 183.
 Schütz, E. 27, 127.
 —, J. H. 128.
 Schwann, Th. 1, 126.
 Schweigart, H. s. Haehn, H. 58, 183.
 Seifert, K. s. Pringsheim, H. 193.
 Sellner, E. s. Lüers, H. 188, 192.
 Semper, L. s. Meisenheimer, J. 83.
 Senter, G. 66, 195, 197.
 Sherman, H. C. u. Baker, J. C. 186.
 —, Kendall, E. C. u. Clark, E. D. 183.
 — u. Schlesinger, H. D. 184, 186, 188, 190, 192.
 — u. Tanberg, A. P. 192.
 — u. Thomas, A. W. 189.

- Sherman, H. C., Thomas, A. W. u. Baldwin, M. W. 11, 184.
 — s. Kendall, E. C. 41, 56, 188.
 Sickel, H. s. Abderhalden, E. 112.
 Sigmund, W. 114.
 Simons, E. s. Waldschmidt-Leitz, E. 130, 139.
 Sjöberg, K. 184.
 Sjöqvist, J. 128.
 Slator, A. 215.
 Slyke, D. D. van 124.
 — u. Kullen, G. E. 158, 159.
 — u. Zacharias 11, 157, 158.
 Smorodinzew, J. A. 152.
 Sobotka, H. 215.
 — s. Kuhn, R. 44, 178.
 — s. Willstätter, R. 69, 86, 174, 178, 179, 216.
 Söhngen, N. L. u. Coolhaas, C. 216.
 Sörensen, S. P. L. 9, 10, 11, 73, 124, 125, 126, 194.
 Spiro, K. s. Fuld, E. 140.
 Spriggs, E. J. 128.
 Stade, W. 107.
 Starling, E. H. s. Bayliss, W. M. 134.
 Staub, M. s. Karrer, P. 193.
 Steche, O. s. Waentig, P. 198.
 Steibelt, W. s. Willstätter, R. 88, 173, 175, 176, 179, 214, 217.
 Steinbeck, E. s. Abderhalden, E. 128.
 Stern, L. s. Batelli, F. 197, 210.
 Steudel, H., Ellinghaus, J. u. Gottschalk, A. 130.
 Stoecklin, E. de s. Wolff, J. 206.
 Stoll, A. s. Willstätter, R. 118, 199, 200, 202, 203, 205, 206.
 Sullivan, C. O' u. Tompson, F. W. 26, 162, 163.
 Sundberg, C. 131.
 Svanberg, O. s. Euler, H. von 26, 48, 64, 65, 163, 164, 169, 171, 185, 186.
 Syniewski, V. 191.
Tanberg, A. P. s. Sherman, H. C. 192.
 Takeuchi, T. u. Jonone, R. 156.
 Tammann, G. 41, 42, 43, 215.
 Taylor, A. E. 51, 52.
 Thomas, A. W. s. Sherman, H. C. 11, 184, 189.
 Thomas, P. s. Bertrand, G. 182.
 Thunberg, T. 210.
 Tompson, F. W. s. Sullivan, C. O' 26, 162, 163.
 Traube, M. 2.
 Trigt, H. van s. Ringer, W. E. 184.
 Tsukihashi, M. 197.
 Tunnicliffe, H. E. s. Dixon, M. 211.
Ueda, H. s. Abderhalden, E. 112.
Villars, D. S. s. Mack, E. 161.
 Vines, S. H. 141.
 Virtanen, A. I. 218.
 Volhard, F. 107, 123.
 Vollbrecht, E. s. Freudenberg, K. 119.
Waentig, P. u. Gierisch, W. 198.
 — u. Steche, O. 198.
 Walbum, L. E. s. Madsen, Th. 42, 132.
 — s. Palitzsch, S. 124, 133.
 Waldschmidt, W. 123.
 Waldschmidt-Graser, J. 80, 152, 153.
 Waldschmidt-Leitz, E. 7, 11, 12, 60, 61, 62, 76, 133—136, 141.
 — u. Harteneck, A. 5, 11, 60, 68, 91, 93, 134, 135, 137, 138, 142, 146, 147, 149, 150.
 — u. Schäffner, A. 94, 129, 146—149.
 —, Schäffner, A. u. Grassmann, W. 22, 139.
 — u. Simons, E. 130, 139.
 — s. Willstätter, R. 12, 76, 80, 81, 88, 90, 92, 98, 101, 103, 104, 105, 108, 114, 116, 117, 125, 137, 143, 152, 153, 183, 184, 186, 187, 190, 191.
 Warburg, O. 66, 112, 207, 210.
 Wartenberg, H. s. Connstein, W. 117.
 Wasmund, W. s. Lüers, H. 11, 41, 184, 185, 186.
 Wassermann, W. s. Willstätter, R. 18, 19, 20, 169.
 Weber, H. s. Willstätter, R. 200.
 Weisberg s. Engler, C. 207.
 Went, F. A. F. C. 83.
 Wenzel, E. s. Kraut, H. 20, 21, 90, 169.
 — s. Willstätter, R. 167, 170, 172.

- Wester, D. H. 158.
 Wiechowski, W. 153.
 Wieland, H. 194, 207—210.
 Wijsman, H. P. 187.
 Wilhelmy, W. F. 23.
 Willstätter, R. 3, 4, 6, 12, 18, 19, 20, 21, 47, 49, 61, 62, 70, 71, 72, 73, 79, 85, 90, 92, 107, 112, 165, 166, 167, 171, 172.
 — u. Bamann, E. 68, 94, 170, 173—177, 217.
 — u. Csanyi, W. 79, 179, 180, 181.
 —, Graser, J. u. Kuhn, R. 6, 16, 25, 40, 43, 148, 168, 207.
 — u. Grassmann, W. 15, 61, 141, 143, 145, 147, 151.
 —, Haurowitz, F. u. Memmen, Fr. 13, 107, 108, 112.
 — u. Heiss, H. 199.
 — u. Kraut, H. 95.
 — Kraut, H. u. Erbacher, O. 94.
 — u. Kuhn, R. 22, 72, 73, 75, 163, 164, 181.
 —, Kuhn, R. u. Sobotka, H. 69, 174, 178.
 — u. Kumagawa, H. 113.
 — u. Lowry, Ch. D. jun. 217.
 —, Lowry, Ch. D. jun. u. Schneider, K. 84, 167.
 — u. Madinaveitia, A. 197.
 Willstätter, R. u. Memmen, Fr. 12, 66, 69, 72, 102, 103, 107, 108, 110, 111, 113.
 — u. Oppenheimer, Tr. 178, 179, 181, 217.
 —, Oppenheimer, Tr. u. Steibelt, W. 88, 173, 176.
 — u. Persiel, H. 136.
 — u. Pollinger, A. 20, 26, 79, 89, 200—204, 206.
 — u. Racke, F. 18, 22, 79, 87, 163, 165, 166, 168.
 — u. Riehmann, K. 201.
 — u. Schneider, K. 65, 166, 169, 172.
 —, Schneider, K. u. Bamann, E. 166.
 —, — u. Wenzel, E. 167, 170, 172.
 — u. Schudel, G. 183.
 — u. Sobotka, H. 69, 86, 178, 179, 216.
 — u. Steibelt, W. 173, 175, 179, 214, 217.
 — u. Stoll, A. 118, 199, 200, 202, 203, 205, 206.
 — u. Waldschmidt-Leitz, E. 18, 20, 58, 72, 75, 76, 81, 88, 90, 92, 98, 104, 105, 108, 114, 116, 117, 125, 137, 143.
 —, Waldschmidt-Leitz, E. u. Duñaiturria, S. 137.
 —, Waldschmidt-Leitz, E. u. Hesse, A. R. F. 58, 75, 137, 183, 184, 186, 187, 190, 191.
 Willstätter, R., Waldschmidt-Leitz, E. u. Memmen, Fr. 12, 61, 62, 72, 76, 101, 103.
 —, — u. Waldschmidt-Graser, J. 80, 152, 153.
 — u. Wassermann, W. 18, 19, 20, 169.
 — u. Weber, H. 200.
 Windisch, F. s. Neuberg, C. 220.
 Wittich, von 88.
 Wöhler s. Liebig, J. von 1.
 Wohlgemuth, J. 82, 182.
 Wolff, J. u. Fernbach, A. 56, 182.
 — u. Stoecklin, E. de 206.
 Wormall, A. s. Raper, A. St. 212, 213.
 Wortman, J. 83.
 Wroblewski, A. 213.
 Wurtz, A. u. Bouchut, E. 141.
Young, W. Y. s. Harden, A. 213, 214, 217, 218.
Zacharias s. Slyke, D. D. van 11, 157, 158.
 Zemplén, G. u. Kunz, A. 178.
 Zinsser, A. 107.

Sachregister.

- A**ceptor 207.
Adsorbate, komplexe 62.
Adsorbenzen 18, 96.
—, elektropositive 18, 96.
—, elektronegative 18.
—, gekoppelte 62.
—, indifferente 97.
—, Eignung zur Trennung von Enzymen 94.
Adsorption 17, 18.
—, äquivalente 17.
—, Aufladungs- 17.
—, Austausch- 17.
—, auswählende 19, 21, 90.
—, Bedeutung der 19.
—, elektrochemische 17.
—, hydrolytische 17.
—, mechanische 17.
—, als Reinigungsverfahren 90.
—, Trennung der Enzyme durch 91—94.
— und Verdünnung 20.
Adsorptionskurven 21, 90.
Adsorptionsverhalten 16, 18.
— und Reinheitsgrad 19.
— und Assoziationsprodukte 20, 21.
Adsorptionswert 19.
Affinitätskonstante 31, 32.
—, Schwankungen der 33.
— und Bestimmung der Enzyme 33.
Aktivierung 57.
—, ausgleichende 74.
— durch anorganische Ionen 58.
—, spezifische 59.
—, unspezifische 61, 62.
—, —, und Wasserstoffzahl 62, 63.
—, —, und Substrat 62, 63.
Aktivitäts- p_H -kurve 10.
Aktivitäts- p_S -kurve 30.
—, Verschiebung der 38.
Aluminiumhydroxyd 95, 96.
Amygdalase 178.
Amylase, Aktivierung der 58, 59, 183, 185.
—, α - und β - 189.
—, Bestimmung der 182, 183.
—, Kinetik der 185, 186.
—, Masse für 75, 186.
—, Präparate aus Malz 192.
—, p_H -Optimum der 184.
—, Reinigung der 189—191.
—, Vorkommen der 182.
—, Zweienzymtheorie der 187, 188.
Antienzyme 66.
Äquivalentgewicht der Saccharase 65.
Arginase, Bestimmung der 154, 155.
—, Einheit der 155.
—, Kinetik der 155.
—, p_H -Optimum der 155.
—, Spezifität der 156.
—, Vorkommen der 154.
—, Wirkungsweise der 153.
Assoziation mit Begleitstoffen 89, 90.
Autolyse 87, 144.
— und Enzymzerstörung 88.
—, Verfahren der 166.
Autoxydator 207.
Blastolipase 118.
Butyrineinheit 103.
—, scheinbare 108.
Carboligase 221.
Cellobiase 180.
Cellulase 193.
Chlorophyllase, Bestimmung der 119.

- Chlorophyllase, Vorkommen der 118.
 —, Wirkungsweise der 118.
 Chymosin, siehe Lab.
- D**ehydrierung 194.
 —, Wielandsche Theorie der 208, 209.
 — und Zellatmung 209, 210.
 Dialyse 89.
 Dialysierbarkeit 6.
 Diastase, siehe Amylase.
 Diastatische Nachwirkung 185.
 Diffusionsgeschwindigkeit 7.
 Dissoziationskonstante K_M 29.
 — der Saccharase-Glucoseverbindung 36.
 — der Saccharase-Fructoseverbindung 36.
 Dissoziationsrestkurve 13, 30.
- E**lektrodialyse 89.
 Elution 21.
 — und Assoziationsprodukte 21.
 — durch Substrate 22.
 Emulsin, Kinetik des 179.
 —, Masse für 179.
 —, p_H -Optimum des 179.
 —, präparatives Verhalten des 180.
 —, Wirkungsweise des 177, 178.
 Endoenzyme 78.
 Endotryptase, siehe Hefeproteasen.
 Enterokinase, Eigenschaften der 136.
 —, Masse für 76.
 —, Reinigung der 60, 134, 135.
 —, Trennung von Trypsin 134, 135.
 —, Wirkungsweise der 60, 134.
 Entleerung, fraktionierte der Zelle 87.
 Enzyme, Adsorptionsaffinität der 17.
 —, Abtrennung von Vorstufen und Zersetzungsprodukten 91.
 —, Bildung in den Zellen 82.
 —, — bei einzelligen Lebewesen 83.
 —, Definition der 3.
 —, Dissoziation der 13.
 —, Elektrolytnatur der 8 ff.
 —, Extrahierbarkeit der 80.
 —, hydrolysierende 53.
 —, intrazelluläre 6.
 —, Isolierung der 86 ff.
 —, Kinetik der 22.
- Enzyme, Kolloidnatur der 6.
 —, Löslichkeit der 79, 80.
 —, Reinigung der 88 ff.
 —, stoffliche Natur der 3.
 —, synthetisierende 53.
 —, Temperaturinaktivierung der 42.
 —, — und Reinheitsgrad 43.
 —, Trennung durch Adsorption 91.
 Enzymeinheiten 72.
 —, reduzierte 75.
 Enzymsahne 98.
 Enzym-Substratverbindung 27, 29.
 — Bildungsgeschwindigkeit der 34.
 — Dissoziationskonstante der 31.
 — Zerfallsgeschwindigkeit der 34.
 —, — und p_H 41.
 Enzymvermehrung 84, 85, 167.
 Enzymwerte 73.
 — reduzierte 75.
 Enzymwirkung als Adsorptionserscheinung 45, 46.
 — als Ionenreaktion 45.
 — und Oberflächenentwicklung 47, 48.
 — und Reaktionsvermittler 48.
 Erepsin, Identität von Darm- und Pankreas- 147.
 —, Masse für 149.
 —, p_H -Optimum des 148.
 —, Reaktionsverlauf 148.
 —, Reinigung des 149.
 —, Spezifität des 146, 147.
 Essigsäuregärung 220.
 Esterasen, Giftempfindlichkeit der 113, 114.
 —, pflanzliche 114—121.
 —, tierische 101—114.
 —, Wirkung der 100.
 Extraktionsverfahren 88.
 Exoenzyme 78.
- F**ällungsmittel 89.
 fermentatio 1.
 Fermente, siehe Enzyme.
 —, geformte 2.
 —, ungeformte 2.
 Freilegungsverfahren, chemische 79.
 —, enzymatische 79.
 —, mechanische 78, 79.

- Galactosegewöhnung** der Hefe 85, 86, 216.
Gärung, alkoholische, Kinetik der 214, 215.
 — —, limitierte 84.
 — —, Mechanismus der 217—220.
 — —, p_H -Abhängigkeit der 214, 215.
Gleichgewicht, enzymatisches 49—51.
 —, Lage des 51—56.
 —, — Berechnung der 55.
 —, Verschiebung des 52, 53.
Gleichgewichtskonstante und **Substratkonzentration** 52, 53.
Glutathion 211.
Glycerin als Lösungsmittel 88.
Glycerinauszüge aus Pankreas 104, 105.
Grenzabbau, diastatischer 185.
- Halbgärzeit** 214.
Hefeautolysate 166.
Hefeproteasen, p_H -Optima der 144.
 —, Trennung durch Adsorption 145.
Hemicellulasen 193.
Hemmung, Arten der 37, 38.
 —, ausgleichende 74.
Hexosephosphatase 121.
Hexosidasen, Definition der 161.
Histozym, Löslichkeit des 80, 81, 153.
 —, Spezifität des 152, 153.
 —, Kinetik des 153.
 —, Vorkommen des 152.
 —, Wirkungsweise des 152.
- Induktion** der Gärung 214.
Inulinase 192.
Inversionsfähigkeit 83.
Invertin, siehe Saccharase.
- Kaolin** als Adsorbens 96, 97.
Katalase, Bedeutung der 193.
 —, Bestimmung der 194.
 —, Kinetik der 195, 196.
 —, p_H -Optimum der 194.
 —, Masse für 196.
 —, Reinigung der 197, 198.
 —, Wirksamkeit der 197.
 —, Wirkungsweise der 194.
Katalyse durch H-ionen und Enzyme 43, 44.
- Koadsorbenzien** 22.
Koeluenzien 22.
Ko-Zymase 61, 213.
- Lab** 131.
Lactacidogen 121.
Lactase, Kinetik der 181.
 —, Präparatives Verhalten der 181.
 — und **Melibiase** 181.
 —, Vorkommen der 180, 181.
Ladung, elektrische 8 ff.
Leberesterase, Aktivierung und Hemmung der 111.
 —, Kinetik der 109.
 —, p_H -Optimum der 110.
 —, Reinigung der 110, 111.
 —, Stabilität der 110.
Lichenase 193.
Lipase, Spezifität der 69.
 —, Masse für 76, 103.
 —, Löslichkeit der 81.
- Magenlipase**, Messung der 108.
 —, p_H -Abhängigkeit der 13, 107.
 —, Reinigung der 108, 109.
 — und **Pankreaslipase** 107, 108.
Maltase, Vorkommen der 173.
 — der Hefe, Bestimmung der 175.
 — — — und α -Glucosidase 174, 175.
 — — —, Isolierung der 176.
 — — —, Kinetik der 173.
 — — —, Masse für 174.
 — — —, p_H -Optimum der 173.
 — — —, präparatives Verhalten der 177.
Mechanismus der Enzymwirkung 45.
Messung, quantitative 71, 72.
 — und ausgleichende Aktivierung oder Hemmung 74.
 — und Wasserstoffzahl 73.
- Nucleotidase** 121.
- Oxydasen**, Einteilung der 211.
Oxydationstheorie nach Bach 208.
 — nach Warburg 210.
 — nach Wieland 208.
Oxydoredukasen 209.

- Oxygenasen 208.
 Oxyhämoglobin, peroxydatische Wirkung des 206.
- P**ankreaslipase, Adsorptionsverhalten der 106.
 —, Masse für 103.
 —, Messung der 101, 102.
 —, Reaktionen der 107.
 —, Reinigung der 104—106.
 —, Vorkommen der 101.
- Papain, Adsorptionsverhalten des 143.
 —, Aktivierung des 61, 141.
 —, Präparatives Verhalten des 143.
 —, Spezifität des 142.
 —, Vorkommen des 141.
- Parachymosin 132.
- Pepsin, p_{H} -Abhängigkeit des 126, 127.
 —, Präparate des 131.
 —, Reaktionsverlauf des 127, 128.
 —, Vorkommen des 126.
 —, Wirkungen des, synthetische 130.
 —, Wirkungsweise des 129.
- Pepsinogen 126.
- Peptidasen, Bedeutung der 145.
- Peroxydase, Adsorptionsverhalten der 203.
 —, Aktivitätszunahmen von 204.
 —, Bestimmung der 199.
 —, Eisengehalt der 205, 206.
 —, Fällungsreaktionen der 202.
 —, Farbe der 205.
 —, Isolierung der 200—202.
 —, Masse für 200.
 —, Reinheitsgrade von 205.
 —, Vorkommen der 198.
- Perhydridase 208.
- Phytolipase, Masse für 115.
- Phosphatase 120.
 —, Wirkungen der 121.
- Plasteinbildung 130.
- Polyasen, Definition der 161.
- Preßsaft, Darstellung von 87.
- Proenzyme, siehe Zymogene.
- Pro-Kinase 135.
- Propepsin, siehe Pepsinogen.
- Proteasen, Bestimmung der 123—125.
 —, Definition der 122.
 —, Einteilung der 122, 149—153.
- Proteasen aus Samen 143.
 Puffer 9, 10.
 Purinoxidasen 212.
 Purpurogallinzahl 200.
- R**eaktionsgeschwindigkeit und Enzymmenge 26.
 —, Komponenten der 33, 34.
 — und Spaltprodukte 34, 35.
 — und Substratkonzentration 26—29.
- Reaktionsverlauf, bimolekularer 23.
 — monomolekularer 23.
 — der Peptidspaltung 24.
 — der Rohrzuckerhydrolyse 23—25.
 — der Hydroperoxydzersetzung 24.
 — und Wasserstoffzahl 25, 26.
 —, wechselnder 25.
- Reaktionsvermittelnde Moleküle 28.
- Reinigung löslicher Enzyme 90—97.
 — unlöslicher Enzyme 97.
- Ricinuslipase und Keimung 117, 118.
 —, Masse für 115.
 —, Messung der 115.
 —, Reinigung der 98, 115, 116.
 —, Stabilität der 116.
 —, Trockenpräparate von 98.
 —, Wirkungsweise der 114.
- Rohrzuckerhydrolyse, enzymatische, Reaktionsgleichung der 39, 40.
- S**accharase, Adsorptionsverhalten der 168, 169.
 —, Affinitätskonstante der 32.
 —, —, Schwankungen der 33.
 —, Aktivitäts- p_{H} -kurve der 10.
 —, Äquivalentgewicht der 65.
 —, Bildung der 83—85, 167.
 —, Fällung durch Blei, der 168.
 —, Inversionsfähigkeit der 163.
 —, Lösungsvorgang der 165, 166.
 —, Menge-Zeit-Quotient der 163.
 —, p_{H} -Optimum der 164.
 —, Reaktionsgeschwindigkeit der, und Substratkonzentration 26, 29, 30.
 —, Reaktionsgleichung der 25, 39, 40.
 —, Reinigung der 167—171.
 —, Reinheitsgrade der 170, 171.
 —, Spezifität der 164, 165.

- Saccharase, Trennung von Maltase** 170.
 —, Vergiftung der 164, 165.
 —, Vorkommen der 164.
 —, Wirkung der, nach Euler 49.
 — und Züchtung der Hefe 83, 85, 167.
Saccharase-Einheit 163.
Saccharase-Wert 163.
Saccharase-Zeit-Wert 163.
Saccharophosphatase 121.
Schardingersches Enzym 209.
Schützische Regel 27, 127, 128.
Sekretin 132.
Spezifität, enzymatische, absolute 67, 68.
 — des Reaktionsweges 67.
 —, relative 67, 69.
 —, stereochemische 70.
 — tierischer Esterasen 111—114.
 — — —, stereochemische 112, 113.
Spermatolipase 118
Spontanaktivierung 134.
Sulfatase 121.
Synthese, enzymatische 50—56.
 —, asymmetrische 70.
- Takadiastase** 189.
Tannase, Messung der 120.
 —, Spezifität der 120.
 —, Vorkommen der 119.
Teilchengröße 7.
Temperaturkoeffizient 41, 42.
 — bei Säure- und Fermentkatalyse 44.
Thrombin 139, 140.
Thrombokinase 140.
Tonerde, siehe Aluminiumhydroxyd.
Trocknungsverfahren 88.
 — der Pankreasdrüse 104.
Trypsin, Aktivierung des 59, 60, 134.
 —, — —, spontane 135.
 —, Bestimmung des 136.
 —, Kinetik des 133.
 —, Masse für 137.
 —, p_H -Optimum des 133.
 —, Reinigung des 137.
- Trypsin, Spezifität des** 138, 139.
 —, Trennung von Begleitenzymen 137.
 —, Trennung von Erepsin 138.
Trypsinogen 134.
Tyndalleffekt 6.
Tyrosinase 212.
- Ueberführung, elektrische** 15.
 — und Reinheitsgrad 16.
Urease, Kinetik der 159, 160.
 —, p_H -Abhängigkeit der 157, 158.
 — — — und Harnstoffkonzentration 157, 158.
 —, präparatives Verhalten der 161.
 —, Vorkommen der 156.
 —, Wirkungsmechanismus der 160.
Urikasewirkung 212.
- Vergärung, direkte von Disacchariden** 217.
Vergärungsformen nach Neuberg 218, 219.
Vergiftung, reversible 64.
 — durch Schwermetallsalze 64, 65.
Vitalistische Theorie 2.
Vitamin, antineuritische 214.
- Wachstumsfaktoren, als Zymaseaktivatoren** 214.
Wanderung im elektrischen Feld 15.
 — und Reinheitsgrad 15.
Wasserstoffionenkonzentration 9.
 — und Dissoziation der Enzyme 13.
 — und Dissoziation der Substrate 14.
 — und Enzymwirkung 12.
 —, Optimum der 11.
 —, — —, und Reinheitsgrad 12, 13.
 —, Regulatoren der 9, 12.
 — und Zerfallsgeschwindigkeit der Enzym-Substratverbindung 14.
- Zeit-Umsatzkurven** 74.
Zersetzungstheorie von Liebig 1.
Zymase, Aktivierung der 61, 213.
Zymogene 57.

26. Vageler, Dr. P., **Die Bindung des atmosphärischen Stickstoffs in Natur und Technik.** Mit 16 Abbildungen. Geh. 4,50 *M.*
27. Messerschmitt, Prof. Dr. Joh. Bapt., **Die Schwerebestimmung an der Erdoberfläche.** Mit 25 Abbildungen. Geh. 5,— *M.*
28. Bjerknes, Prof. V., **Die Kraftfelder.** Mit 29 Abbildungen. Geh. 7,— *M.*
29. Gutzmann, Prof. Dr. Hermann, **Physiologie der Stimme und Sprache.** Mit 92 zum Teil farbigen Abbildungen. Vergriffen.
30. Mache, Prof. H., und Prof. E. v. Schweidler, **Die atmosphärische Elektrizität.** Methoden und Ergebnisse der modernen luftelektrischen Forschung. Mit 20 Abbildungen. Geh. 6,50 *M.*
31. Eckardt, Dr. Wilh. R., **Das Klimaproblem der geolog. Vergangenheit und historischen Gegenwart.** Mit 18 Abbildungen und 4 Karten. Geh. 6,50 *M.*
32. Jesionek, Prof. Dr. A., **Lichtbiologie.** Die experimentellen Grundlagen der modernen Lichtbehandlung. Geh. 4,50 *M.*
33. Dessau, Prof. Dr. Bernh., **Die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Legierungen.** Mit 82 Abbildungen. Geh. 6,50 *M.*
34. Pohl, Dr. Robert, **Die elektrische Fernübertragung von Bildern.** Mit 25 Abbildungen. Geh. 2,— *M.*, geb. 3,50 *M.*
35. Baedeker, Prof. Dr. K., **Die elektrischen Erscheinungen in metallischen Leitern.** (Leitung, Thermoelktrizität, Galvanomagnetische Effekte, Optik). Mit 25 Abbildungen. Geh. 4,— *M.*
36. Scheel, Prof. Dr. K., **Grundlagen der praktischen Metronomie.** Mit 39 Abbildungen. Geh. 5,— *M.*, geb. 6,50 *M.*
37. Günther, Prof. Dr. S., **Vergleichende Mond- und Erdkunde.** Mit 23 Abbildungen und 4 Tafeln. Geh. 5,— *M.*, geb. 6,50 *M.*
38. Laue, Dr. M. v., **Die Relativitätstheorie.** Erster Band: Das Relativitätsprinzip der Lorentztransformation. 4. verm. Auflage. Mit 25 Abbildungen. *Zweiter Band s. Bd. 68.* Geh. 12,— *M.*
39. Müller, Aloys, **Die philosophischen Probleme der Einsteinschen Relativitätstheorie.** 2. umgearbeitete und erweiterte Auflage des Buches: **Das Problem des absoluten Raumes.** Mit 10 Abbild. Geh. 7,50 *M.*, geb. 9,25 *M.*
40. Schmidt, Ingenieur Fritz, **Die Leuchtgaszerzeugung und die moderne Gasbeleuchtung.** Mit 63 Abbildungen. Geh. 3,— *M.*, geb. 4,50 *M.*
41. Lodge, Sir Oliver, **Der Weltäther.** Deutsch von H. Barkhausen. Mit 17 Abbildungen im Text und einer Tafel. Vergriffen.
42. Lampa, Professor Dr. Anton, **Wechselstrom - Versuche.** Mit 54 Abbildungen. Geh. 6,— *M.*, geb. 7,50 *M.*
43. Markau, Dr. K., **Die Telephonie ohne Draht.** Mit 103 Abbild. Vergriffen.
44. Bernstein, Professor Dr. Julius, **Elektrobiologie.** Die Lehre von den elektrischen Vorgängen im Organismus auf moderner Grundlage dargestellt. Mit 62 Abbildungen. Geh. 6,50 *M.*, geb. 8,— *M.*
45. Pohl, Dr. Robert, **Die Physik der Röntgenstrahlen.** Mit 72 Abbildungen. im Text und auf einer Tafel. Vergriffen.
46. Martens, Prof. Dr. F. F., **Physikalische Grundlagen der Elektrotechnik.** Erster Band: Eigenschaften des magnetischen und elektrischen Feldes. Mit 253 Abbildungen. Vergriffen. *Zweiter Band s. Bd. 55.*
47. Jacobi, Prof. Dr. Arnold, **Mimikry und verwandte Erscheinungen.** Mit 31 zum Teil farbigen Abbildungen. Geh. 8,50 *M.*, geb. 10,— *M.*
48. Meyer, Kirstine, **Die Entwicklung des Temperaturbegriffs im Laufe der Zeiten, sowie dessen Zusammenhang mit den wechselnden Vorstellungen von der Natur der Wärme.** Aus dem Dänischen übersetzt von Irmgard Kolde und mit einem Vorwort von E. Wiedemann. Mit 21 Abbildungen. Geh. 4,50 *M.*, geb. 6,— *M.*
49. Konen, Prof. Dr. H., **Das Leuchten der Gase und Dämpfe mit besonderer Berücksichtigung der Gesetzmäßigkeiten in Spektren.** Mit 33 Abbildungen im Text und einer Tafel. Geh. 13,— *M.*
50. Drude, Prof. Dr. O., **Die Ökologie der Pflanzen.** Mit 80 eingedruckten Abbildungen. Geh. 10,— *M.*, geb. 12,— *M.*