

CHEMIE DER ENZYME

VON

HANS v. EULER

IN DREI TEILEN

I. TEIL:

**ALLGEMEINE CHEMIE
DER ENZYME**



Dritte, nach Schwedischen Vorlesungen
vollständig umgearbeitete Auflage

MIT 50 TEXTFIGUREN UND 1 TAFEL

SPRINGER-VERLAG BERLIN HEIDELBERG GMBH - 1925

VERLAG VON J. F. BERGMANN IN MÜNCHEN

Mikrochemisches Praktikum

Eine Anleitung zur Ausführung der wichtigsten mikrochemischen Handgriffe, Reaktionen und Bestimmungen mit Ausnahme der quantitativen organischen Mikroanalyse

Von

Friedrich Emich

ord. Professor an der Technischen Hochschule Graz, korresp. Mitglied
der Akademie der Wissenschaften Wien

Mit 77 Abbildungen

1924. 6.60 Goldmark

Das steigende Interesse, das namentlich Chemie und Biologie den Mikromethoden entgegenbringt, sowie besonders der Umstand, daß die gegenwärtigen Schwierigkeiten in der Materialbeschaffung speziell den Chemiker häufig zum Arbeiten mit kleinen Substanzmengen veranlassen, wird diesem Buch überall freudige Aufnahme verschaffen, da es zur Zeit, seit das „Lehrbuch“ des Verfassers vergriffen ist, keine andere Anleitung gibt, die annähernd das gesamte Gebiet behandeln würde.

Lehrbuch der physiologischen Chemie

Unter Mitwirkung von Prof. **S. G. Hedin** in Upsala, Prof. **J. E. Johansson**
in Stockholm und Prof. Dr. **T. Thunberg** in Lund

Herausgegeben von

Olof Hammarsten

ehem. Prof. der medizinischen und physiologischen Chemie an der Universität Upsala

Zehnte, gegenüber der neunten unveränderte Auflage

Mit einer Spektraltafel

1923. 18.— Goldmark

Aus den Besprechungen der neunten Auflage:

Das Erscheinen eines neuen Hammarsten ist in den Kreisen der physiologischen Chemiker seit jeher mit Freude und Spannung begrüßt worden, denn dieses Werk, ursprünglich allein aus der Feder des schwedischen Altmeisters, in der neuen Auflage von ihm in Verbindung mit drei hervorragenden schwedischen Fachgelehrten verfaßt, hat seit langem einen fest behaupteten unbestrittenen Platz in jeder physiologisch-chemischen Bücherei inne. Es ist das Standard-Werk, welches in kurzer, klarer Form über alle Fragen Auskunft gibt, alte wie neue in gleich objektiver Weise behandelnd und mit umfassenden Literaturnachweisen belegend. Es bietet dabei für die rasch vorwärts strebende und schnell vergessende Gegenwart den unschätzbaren Vorteil, daß es fest im Boden des klassischen Zeitalters der physiologischen Chemie wurzelt und somit auch das nicht vergißt, was wir diesem verdanken. . . . Während schon früher S. G. Hedin die Neubearbeitung einiger, besonders auch der physikalisch-chemischen Kapitel übernommen hatte, sind in der Neuauflage für die Speziale Kapitel Atmung und Oxydation T. Thunberg-Lund und für Stoffwechsel und Nahrung J. E. Johansson-Stockholm neu eingetreten. Beide haben entsprechend ihrer hohen Bedeutung Kabinettstücke geliefert.

Zeitschrift für angewandte Chemie.

CHEMIE DER ENZYME

VON

HANS v. EULER

IN DREI TEILEN

I. TEIL:

**ALLGEMEINE CHEMIE
DER ENZYME**



Dritte, nach Schwedischen Vorlesungen
vollständig umgearbeitete Auflage

MIT 50 TEXTFIGUREN UND 1 TAFEL

SPRINGER-VERLAG BERLIN HEIDELBERG GMBH 1925

ISBN 978-3-662-34163-6 ISBN 978-3-662-34433-0 (eBook)
DOI 10.1007/978-3-662-34433-0

ALLE RECHTE, INSBESONDERE DAS DER ÜBERSETZUNG IN FREMDE SPRACHEN, VORBEHALTEN.

COPYRIGHT 1925 BY SPRINGER-VERLAG BERLIN HEIDELBERG

URSPRÜNGLICH ERSCHIENEN BEI J. F. BERGMANN IN MÜNCHEN 1925.

MEINER FRAU
BETH v. EULER
DANKBAR GEWIDMET

Aus dem Vorwort zur zweiten Auflage.

Seit dem Erscheinen der ersten deutschen Auflage dieses Buches hat die Enzymchemie nicht nur eine intensive Bearbeitung erfahren, sondern auch eine wesentliche Entwicklung durchgemacht.

Man kann sagen, dass die Enzymchemie gerade jetzt in eine neue Periode eintritt. Während man sich vor 10 Jahren darauf beschränken musste, das in jeder Hinsicht sehr unvollkommene Beobachtungsmaterial zu sammeln und möglichst zu sichten, ist jetzt die Zeit gekommen, in welcher eine theoretische Behandlung möglich zu werden beginnt. Erst auf Grund einer neugewonnenen, verfeinerten und zuverlässigen Methodik ist das dazu erforderliche Material geschaffen worden.

Die Frage, in welchem Umfang die Ergebnisse der allgemeinen Chemie in einer Monographie wie der vorliegenden mitgeteilt werden sollen, wird natürlich von verschiedenen Seiten in ungleichem Sinn beantwortet werden. Die Grundlagen der für die ganze Biologie so wichtigen physikalischen Chemie habe ich vorausgesetzt. Von den speziellen physikalisch-chemischen Tatsachen und Gesetzen durfte in Rücksicht auf den Umfang des Buches nur das erwähnt werden, was schon jetzt zu enzymatischen Tatsachen direkt in Beziehung gebracht werden kann.

Bei der Beschreibung der allgemeinen Eigenschaften der Enzyme liess sich die Besprechung des isoelektrischen Punktes nicht übergehen, welche wiederum eine kurze Darstellung der Dissoziationskurve und der Dissoziationsrestkurve erforderte. Bei der Mitteilung der hieraus gezogenen Folgerungen war ich bestrebt, den hypothetischen Charakter mancher neueren Theorien stark zu betonen. Wenn trotzdem die Theorie der Enzymaktivität und der enzymatischen Reaktionsgeschwindigkeit von L. Michaelis sehr ausführlich wiedergegeben worden ist, so geschah dies teils wegen des Interesses, welches gerade die diesbezüglichen Probleme gegenwärtig für den Enzymforscher besitzen, teils auch, um den der physikalisch-chemischen Forschung fernerstehenden Lesern deutlich zu zeigen, wie wertvoll im Vergleich zu rein qualitativen Vorstellungen die zahlenmässige Durchführung einer Hypothese ist, wenn auch die künftige Forschung, wie vorauszusehen ist, Umbildungen derselben veranlasst.

Schon in diesem Band ist mehrfach betont worden, dass die Voraussetzung für die endgültige Lösung enzymatischer Probleme die Kenntnis der chemischen Zusammensetzung und der Struktur der Enzyme sein muss, und dass ohne diese Kenntnis unseren Ergebnissen immer ein beträchtlicher Grad von Unsicherheit anhaftet.

Stockholm, im Juni 1920.

Hans v. Euler.

Vorwort zur dritten Auflage.

Das Ziel des Buches ist das gleiche geblieben; die Anlage hat insofern eine Erweiterung erfahren, als nach dem II., Speziellen Teil in einem III., abschliessenden Band versucht werden soll, eine zusammenfassende Darstellung der Vorgänge in Organen und Zellen vom enzymchemischen Standpunkt aus zu geben. Die Enzymwirkungen im Organismus sind durch neuere Forschungen schon so mannigfach mit den entsprechenden Vorgängen in vitro verknüpft worden, dass sie in dem vorliegenden Werk, das ein einheitliches Ganzes bilden soll, nicht unberücksichtigt bleiben dürfen.

In der vorhergehenden Auflage wurde die Michaelissche Berechnung der Affinitätskonstanten als ein noch neuer und wenig geprüfter theoretischer Versuch in den Mittelpunkt der Enzymkinetik gestellt. Die Erwartung, dass sich dieser Versuch als besonders entwicklungsfähig und fruchtbar erweisen würde, hat sich voll bestätigt. Die Affinitäten eines Enzyms zu Substrat und Reaktionsprodukten sind für jedes Enzym durch charakteristische Konstanten ausdrückbar und die Erforschung der für diese Affinitäten massgebenden chemischen Strukturen ist eine der wichtigsten Aufgaben.

Die Enzymforschung, die sich in den letzten 4 Jahren rascher entwickelt hat, als früher in Dezennien, verdankt ihre rasche Erweiterung und Vertiefung besonders dem Eindringen der chemischen Methodik; nach den Erfolgen der Willstätterschen Schule wird dies niemand bestreiten wollen. Unsere Einsicht steigt in dem Mass, als wir die Eigenschaften der von zufälligen Begleitern befreiten Enzyme kennen und nach allgemeinen Gesetzen berechnen lernen.

Die chemischen Gesichtspunkte sind also auch in dieser Auflage die leitenden. In einzelnen Fragen habe ich mir von Fachgenossen, unter denen ich besonders die Herren Donnan, Fähræus, Hammarsten, Hedin, Neuberg, Svedberg, Thunberg und Willstätter dankbar erwähne, Rat erholen dürfen, und wie früher richte ich an alle Leser die Bitte, mich auf Mängel und Lücken in der Darstellung aufmerksam zu machen. Für die wertvolle und wirksame Hilfe bei der Niederschrift wie bei vorausgegangenen Untersuchungen habe ich auch hier meinen Mitarbeitern Karl Josephson und Karl Myrbäck herzlich zu danken.

Stockholm, im November 1924.

Hans v. Euler.

Inhalt.

	Seite
Einleitung	1
1. Kap. Allgemeines über die Darstellung, Reinigung und Aufbewahrung von Enzympräparaten und über ihre Charakterisierung	6
A. Abscheidung enzymhaltiger Säfte aus tierischem und pflanzlichem Material	6
B. Dauerpräparate	10
C. Ausfällung und Reinigung	10
D. Aufbewahrung von Enzymlösungen. Ihre Haltbarkeit	15
E. Die zahlenmässige Charakterisierung von Enzympräparaten	16
2. Kap. Die Enzyme als Elektrolyte	19
A. Elektrolytische Dissoziations-Gleichgewichte	19
1. Salze (starke Elektrolyte)	20
2. Schwache Säuren und Basen	21
3. Das Wasser	24
4. Amphotere Elektrolyte	26
5. Die Dissoziationsrestkurve	29
6. Der isoelektrische Punkt	35
B. Eigenschaften der Ionen in wässriger Lösung	36
1. Die Ladung und Beweglichkeit der Ionen und elektrisch geladenen Teilchen	36
2. Hydratation der Ionen	41
3. Innere Reibung	43
C. Gleichgewicht zwischen mehreren Elektrolyten	48
1. Zwei binäre Elektrolyte mit einem gemeinsamen Ion	48
2. Zwei binäre Elektrolyte mit lauter verschiedenen Ionen	51
3. Hydrolyse	52
4. Indikatoren	57
D. Abhängigkeit der Enzymwirkungen von der Acidität des Reaktionssystems .	62
Die saure Dissoziation der Saccharase und der Saccharase-Rohrzucker-Verbindung	67
Anhang. Heterogene Gleichgewichte; Löslichkeit von Elektrolyten	74
3. Kap. Die Enzyme als Kolloide	78
A. Allgemeines	79
B. Osmotischer Druck	81
1. Direkte Messungen	82
2. Indirekte Methoden zur Bestimmung des osmotischen Druckes	84
3. Teilchengrösse. Ultramikroskopie	86
C. Freie Diffusion	88
D. Oberflächenenergie. Capillarerscheinungen	92
E. Zeitliche Änderung der Oberfläche; „Altern“ hydrophiler Sole	97
F. Adsorption (Sorption)	98
Adsorption der Enzyme	106
G. Ionengleichgewicht an Membranen (Donnan-Effekt)	116
H. Ausfällung von Kolloiden	120
1. Ausfällung von Nichtelektrolyten und hydrophilen Kolloiden durch Salze	120
2. Gegenseitige Fällung von Kolloiden	123

	Seite
4. Kap. Allgemeine chemische Kinetik der Enzymreaktionen	128
A. Die theoretischen Grundlagen der enzymatischen Dynamik	129
1. Katalyse durch Säuren und Basen	131
2. Katalysen durch Enzyme	134
B. Verbindung des Enzyms mit Substrat und Reaktionsprodukten. Theoretische Folgerungen aus diesen Annahmen	139
1. Ältere Arbeiten	139
2. Berechnungen von L. Michaelis	141
3. Neue Versuche über die Affinität zwischen Enzym und Substrat	150
4. Die bisher gemessenen Werte von K_M	151
5. Affinität zwischen Enzym und Reaktionsprodukten bzw. zwischen Enzym und anderen Substanzen	152
C. Die Reaktionsgleichung der enzymatischen Rohrzuckerspaltung nach Michaelis	156
D. Gegenseitige Beeinflussung mehrerer Reaktionen (Reaktionen mit Folge- wirkungen).	165
1. Parallelreaktionen	166
2. Stufenweise Reaktionen	167
3. Reaktionen, welche durch einen Zwischenkörper, bzw. durch einen Katalysator verknüpft werden können	168
E. Beziehungen zwischen enzymatischen und nicht enzymatischen Katalysen .	171
5. Kap. Aktivatoren und Paralysatoren (Gifte); Co-Enzyme. Enzym-Destruktoren	176
A. Systematik	176
B. Hemmungen und Aktivierungen an isolierten, gelösten Enzymen	177
1. Reversible Beeinflussungen der Enzymwirkungen	177
2. Irreversible Inaktivierungen der Enzyme durch Zusätze fremder Stoffe . .	212
C. Hemmungen und Aktivierungen durch chemisch unbekannte Stoffe	218
D. Hemmungen und Aktivierungen von Enzymreaktionen in Zellen	226
1. Anorganische Salze	227
2. Organische Stoffe	228
Einfluss organischer Lösungs-, Extraktions- und Fällungsmittel auf Enzyme	235
E. Zusammenfassung	242
6. Kap. Einfluss der Temperatur und Strahlung auf enzymatische Reaktionen .	244
A. Einleitung: Temperaturkoeffizienten nicht enzymatischer Reaktionen	244
B. Die Temperaturstabilität der Enzyme	246
1. Die für Enzymreaktionen wesentlichen Temperatureinflüsse	246
2. Der zeitliche Verlauf der Inaktivierung der Enzyme	248
3. Abhängigkeit der Temperaturempfindlichkeit der Enzyme von der Acidität	254
4. Schutzwirkungen	256
5. Vorläufige Angaben zum Vergleich der Stabilität der verschiedenen Enzyme	259
6. Abhängigkeit des Inaktivierungskoeffizienten k_c von der Temperatur . .	261
7. Anormale Änderungen der Enzymstabilität (k_c) mit der Temperatur . . .	265
8. Steigerung der Wirksamkeit enzymhaltigen Materials durch Erhitzen . .	268
9. Temperatureinflüsse auf die Affinität zwischen Enzym und Substrat . .	270
10. Stabilität trockener Enzympräparate	271
11. Tötungstemperaturen	272
C. Temperaturkoeffizienten enzymatischer Reaktionen	275
1. Ältere Arbeiten	275
2. Neuere Messungen	276
D. Einfluss von Strahlungen auf Enzyme und Enzymreaktionen	282
1. Strahlen des sichtbaren Spektrums (370—640 $\mu\mu$)	284
2. Ultraviolette Strahlen	286
3. Röntgenstrahlen	288
4. Strahlung radioaktiver Elemente	290
5. Sekundärstrahlung	293

	Seite
7. Kap. Gleichgewichte und Endzustände bei enzymatischen Reaktionen. Enzymatische Synthesen	295
A. Umkehrbare Reaktionen	295
Einige Differenzen zwischen enzymatischem und nicht enzymatischem Gleichgewicht	296
Einfluss der Spaltprodukte auf den Endzustand	298
B. Endzustände und stationäre Zustände	302
C. Enzymatische Gleichgewichte	305
1. Gleichung für das enzymatische Gleichgewicht unter Berücksichtigung der Affinitäten des Enzyms zu den Reaktionskomponenten	305
2. Prüfung der Gleichgewichtsgleichungen am System β -Methylglucosid, Glucose, Methylalkohol und Wasser	306
3. Beziehung zwischen den Affinitätskonstanten eines Enzyms zum Substrat und zu den Reaktionsprodukten	311
D. Enzymatische Synthesen	313
1. Synthese von Estern und Fetten	313
2. Synthese von Glucosiden und Galaktosiden	314
3. Synthese von Hexose-Phosphorsäure-Estern	317
4. Synthese von Biosen	319
5. Synthese höherer Kohlehydrate	320
6. Synthese der Carbamidgruppe $\text{RNH} \cdot \text{CO} \cdot \text{R}'$	321
8. Kap. Wärmetönung und Energieumwandlung bei enzymatischen Vorgängen	325
9. Kap. Spezifische Wirkungen von Enzymen in vitro	340
Chemische Spezifität	341
A. Verhalten einzelner Enzyme zu Substraten verschiedener Zusammensetzung und Struktur	341
1. Ältere Arbeiten und wichtigere empirische Ergebnisse	342
2. Zur Theorie der chemischen Enzymspezifität (R. Kuhn)	349
3. Neuere experimentelle Resultate über Struktur-Spezifität bei Enzymwirkungen	354
B. Verhalten der Enzyme zu stereoisomeren Substanzen, besonders optischen Antipoden	358
1. Allgemeines über asymmetrische Reaktionen	358
2. Asymmetrische Spaltung durch Enzyme	364
3. Asymmetrische Synthesen	373
4. Asymmetrische Vorgänge und Gleichgewichte bei umkehrbaren Reaktionen	375
Biologische Spezifität	379
C. Wirkungen an fremden, besonders zellfremden und blutfremden Substraten	385
D. Antienzyme (Enzym-Antikörper)	390
10. Kap. Enzymbildung in der Zelle	396
A. Die Abhängigkeit des Saccharasegehaltes der Hefe vom Zucker und vom N-Gehalt der Nährlösung	397
B. Vergärung der Galaktose durch vorbehandelte Hefe	406

Zeitschriften, welche stark abgekürzt zitiert werden.

- Am. chem. Soc.: Journal american chemical Society (Easton, P.).
Ann. de Chim.: Annales de Chimie (Paris).
Ann. d. Phys.: Annalen der Physik (Berlin).
Ann. Inst. Pasteur: Annales de l'Institut Pasteur (Paris).
Biochem. Jl: Biochemical Journal (Cambridge, London).
Biochem. Zs: Biochemische Zeitschrift (Berlin).
Biochem. Zbl.: Biochemisches Zentralblatt (Berlin).
Berl. klin. Woch.: Berliner klinische Wochenschrift.
Bull. Coll. Agr. Tokyo: Bulletin of the College of Agriculture of the Imperial University (Tokyo).
C. r.: Comptes rendus de l'Académie des Sciences (Paris).
Chem. Ber.: Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (Berlin).
Fermentf.: Fermentforschung (Wien, Halle).
Fortschr. Röntg.: Fortschritte auf dem Gebiete der Röntgenstrahlen (Hamburg).
H.: Hoppe-Seylers Zeitschrift für physiologische Chemie (Berlin, Heidelberg).
Helv.: Helvetica Chimica Acta, Schweiz.
Hofm. Beitr.; Hofmeisters Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie.
Jl Chem. Soc.: Journal of the Chemical Society (London).
Jl Gen. Physiol.: Journal of General Physiology (New York).
Jl de Pharm. et de Chim.: Journal de Pharmacie et de Chimie (Paris).
Jl Biol. Chem.: Journal of Biological Chemistry (New York).
Jl of Physiol: Journal of Physiology (London).
Koll. Zs: Kolloid Zeitschrift (Dresden, Leipzig).
Lieb. Ann.: Liebigs Annalen der Chemie (Leipzig, Tübingen).
Medd. Carlsb.-Lab.: Meddelelser fra Carlsberg-Laboratoriet (Kopenhagen).
Medd. Nobel-Inst.: Meddelanden från K. Svenska Vetenskaps-Akademiens Nobel-Institut.
Pflüg. Arch.: Pflügers Archiv für die gesamte Physiologie (Bonn).
Phil. Mag.: Philosophical Magazine (London).
Phil. Trans.: Philosophical Transactions of the Royal Society of London (London).
Proc. Roy. Soc.: Proceedings of the Royal Society (London).
R. A. d. Lincei: Rendiconti della R. Accademia dei Lincei (Rom).
Rec. Trav. Chim. Pay. Bas: Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas et de la Belgique (Leiden).
Skand. Arch. Physiol.: Skandinavisches Archiv für Physiologie (Helsingfors).
Soc. Biol.: Comptes rendus de la Société Biologique (Paris).
Strahlenther.: Strahlentherapie (Berlin, Wien).
Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi: K. Svenska Vetenskaps-Akademiens Arkiv för Kemi, Mineralogi och Geologi (Stockholm).
Zs f. Elektrochem.: Zeitschrift für Elektrochemie (Leipzig, Dresden).
Zs f. physik. Chem.: Zeitschrift für physikalische Chemie (Leipzig).
Zs klin. Med.: Zeitschrift für klinische Medizin (Berlin).
Zbl. f. Bakt.: Zentralblatt für Bakteriologie usw. (Jena).
-

Einleitung.

Als Enzyme oder ungeformte Fermente bezeichnet man dem Tier- oder Pflanzenreich angehörende Stoffe von unbekannter Zusammensetzung und Konstitution, welche zunächst im Organismus, sodann aber auch unabhängig von dem Organ bzw. der Zelle, welcher sie entstammen, chemische Reaktionen beschleunigen. Der Begriff Enzym fällt hiernach unter den viel umfassenderen Begriff Katalysator.

Unter Katalysator verstehen wir einen Stoff, der, ohne durch die beschleunigte Reaktion selbst verbraucht zu werden, bzw. ohne in den Endprodukten der Reaktion zu erscheinen, die Geschwindigkeit ändert, mit welcher ein chemisches System seinem Endzustand zustrebt. Enzyme sind aber — wenigstens bei dem bis jetzt erreichten Grad der Reinheit — selten ideale Katalysatoren. Eine Grenze zwischen diesen Stoffen und idealen Katalysatoren würde sich schwer ziehen lassen; sie würde stark von den gewählten Versuchsbedingungen abhängen.

Indessen zeigt die Literatur gerade der letzten Jahre, dass eine gewisse Abgrenzung des Begriffes Enzym wünschenswert ist; und so wird man diejenigen Stoffe prinzipiell nicht zu den Enzymen rechnen, welche gerade durch die Reaktion, an welcher sie mitwirken, nach stöchiometrischen Verhältnissen verbraucht werden.

Bei nicht enzymatischen Katalysen ist die Menge der reaktionsbeschleunigenden Substanz meist klein im Verhältnis zu derjenigen des umgesetzten Stoffes — ein idealer Katalysator sollte ja die Umsetzung unbegrenzter Mengen von „Substrat“ beschleunigen können. Viele Enzyme üben tatsächlich schon in geringen Quantitäten sehr grosse Wirkungen aus; oft ist aber ihre Tätigkeit zeitlich begrenzt und geht nicht über einen gewissen stofflichen Umsatz hinaus; es beruht dies, wie wir später sehen werden, auf mehreren Ursachen: Einerseits verlaufen zahlreiche Reaktionen an sich nicht vollständig in einer Richtung, sondern streben einer Gleichgewichtslage zu; andererseits werden alle diesbezüglich untersuchten Enzyme von Substrat und von Reaktionsprodukten gebunden, und schliesslich werden die Enzyme oft während der Reaktion mehr oder weniger vollständig zerstört. Als charakteristisch für Enzyme wird meist der Umstand angesehen, dass sie durch längeres oder kürzeres Erhitzen ihrer Lösungen auf höhere Temperatur, etwa 80°,

unwirksam werden. Bindend ist dieses Kriterium nicht, wie denn überhaupt zwischen anorganischen Katalysatoren und Enzymen prinzipielle Unterschiede nicht bestehen. Ob man für einen reaktionsbeschleunigenden Bestandteil eines Organes, der chemisch aufgeklärt oder mit einem bekannten Stoff identifiziert ist, den Namen „Enzym“ noch beibehalten will, oder ob man es vorzieht, auf den wissenschaftlich fester stehenden Begriff Katalysator zurückzugehen, ist lediglich Sache der Übereinkunft. Wie aber die Definition gewählt wird, ist von untergeordneter Bedeutung; sind wir doch vom Ziel, der chemischen Aufklärung der Enzyme, in vielen Fällen noch so weit entfernt¹⁾, dass der Begriff Enzym noch lange bestehen bleiben wird.

Die Grenze, welche die Enzyme von den Toxinen trennt, ist ebenfalls einigermassen willkürlich. Die Herkunft aus dem lebenden Organismus, die Fähigkeit Antikörper zu bilden und andere Eigenschaften, sowie auch wohl ihre Wirkungsweise, sind beiden Stoffgruppen gemeinsam. Andererseits sind die Toxine durch ihre Giftwirkung ziemlich scharf charakterisiert; vermutlich gehören verschiedene Toxine ganz verschiedenen Körperklassen an. Wir müssen von der Behandlung dieses umfangreichen Gebietes um so eher absehen, als sich die Chemie der Toxine in neuerer Zeit zu einem besonderen Wissenszweig entwickelt hat.

Ungleich wichtiger als die Beantwortung der Frage, wie die Enzyme abzugrenzen sind, ist die Aufgabe, die physikalischen und chemischen Eigenschaften der typischen Repräsentanten dieser merkwürdigen Stoffe festzustellen.

Als Ziel schwebt uns natürlich die exakte Beschreibung der einzelnen Enzyme durch chemische Formeln und durch die an den reinen Substanzen gewonnenen charakteristischen Konstanten vor. Man darf sich nicht verhehlen, dass die Enzymologie auf unsicherem Boden steht, solange die Konstitution der Enzyme nicht aufgeklärt ist, wie denn überhaupt Messungen, auch physikalisch-chemischer Art, mit chemisch ungenügend definiertem Material nur mit grösster Vorsicht zu weitergehenden Schlussfolgerungen verwandt werden dürfen. Zunächst ist es für den Forscher von grösster Bedeutung, sich über den Reinheitsgrad der Enzympräparate klar zu sein, und in erster Linie sind hierzu chemische Arbeiten erforderlich.

Aber auch die physikalisch-chemischen Untersuchungen haben schon wichtige Anhaltspunkte für das Verständnis der Enzyme geliefert.

Von vornherein war zu erwarten, dass die elektrolytische Dissoziationstheorie sich auch in der Physiologie, welche sich ja vorwiegend mit verdünnten Lösungen von Elektrolyten beschäftigt, als besonders fruchtbar erweisen würde. Während anfangs die richtige Anwendung dieser Lehre auf biologische Fragen Schwierigkeiten gemacht hat, sind gerade in den

¹⁾ Sehr bemerkenswerte, vorläufige Angaben über die Zusammensetzung einer Peroxydase verdankt man Willstätter, Stoll und Pollinger. Lieb. Ann. 416, 21; 1918. — 422, 47; 1921. — 430, 269; 1923.

letzten 15 Jahren in der Enzymologie wieder bemerkenswerte Erfolge durch elektrochemische Messmethoden und durch die theoretische Behandlung der Enzyme als Elektrolyte erzielt worden. Den einschlägigen, sehr wertvollen Arbeiten wurde deswegen ein besonderes Kapitel „Die Enzyme als Elektrolyte“ gewidmet.

Der Verlauf enzymatischer Reaktionen wird in hohem Grad durch die Acidität des Mediums beeinflusst. Dass man nunmehr begonnen hat, diesen Umstand gebührend zu beachten und die Acidität durch einwandfreie und einfache Methoden zu messen ist das Verdienst von Sørensen und von Michaelis; in Amerika hat Mansfield Clark durch eigene Arbeiten und durch eine ausgezeichnete Monographie¹⁾ zur Verbreitung sachgemässer Aciditätsbestimmungen viel beigetragen. Die Dynamik der Enzymreaktionen ist durch die Berücksichtigung der Acidität wesentlich geklärt worden, und zahlreiche ältere, irrtümliche und unzureichend definierte Angaben können jetzt ausgeschieden werden.

Man hat früher nicht selten erwogen, ob die Enzyme sich im Zustand der echten Lösung befinden, oder ob sie zu den Kolloiden gehören; in dieser Hinsicht können sich Enzyme sowohl dem einen als dem anderen Grenzfall nähern, und es tritt uns die Aufgabe entgegen, ihren Dispersitätsgrad und die Molekulargröße zu bestimmen. Kriterien bilden hierbei die ultramikroskopischen Beobachtungen, die Adsorptionerscheinungen, die Diffusion, auch wohl das Verhalten im elektrischen Feld. Im allgemeinen werden wir wohl die Enzyme zu den hochmolekularen Körpern bzw. zu den Kolloiden zu rechnen haben, und die Besonderheiten dieser Stoffe verdienen also gewiss die Aufmerksamkeit des Enzymforschers.

Hier tritt uns allerdings die Frage entgegen, welche Bestandteile der mit den gegenwärtigen Methoden möglichst gereinigten Enzympräparate dem Enzym eigentlich angehören und welche Gruppen für die enzymatische Wirkung zufällig oder unwesentlich sind. Gerade auf dieses Problem wird die Enzymforschung in nächster Zeit ihre besondere Aufmerksamkeit zu richten haben. Dass eine Reaktion durch Enzymhomologe von quantitativ verschiedener Wirksamkeit katalysiert werden kann, wird durch die Ergebnisse der letzten Jahre nahegelegt.

Willstätter nimmt an, dass das Molekül eines Enzyms aus einem kolloiden Träger und einer rein chemisch wirkenden aktiven Gruppe besteht. Bei mehreren Enzymen spricht eine Reihe von Tatsachen für eine solche Scheidung des chemisch wirkenden und des kolloiden Teiles; ob dieselbe allgemein zutrifft, muss erst die weitere Entwicklung der Enzymchemie zeigen²⁾.

¹⁾ Mansfield Clark, *The Determination of Hydrogen Ions*. Baltimore. 2. Aufl. 1923.

²⁾ Siehe hierzu Euler und Josephson, *Chem. Ber.* 56, 1749 u. zw. 1752; 1923. — H. 133, 1923.

Haben wir nun im Kapitel 2 und 3 die Enzyme als Elektrolyte und als Kolloide betrachtet, so wenden wir uns im Kapitel 4 der Frage zu: In welcher Weise wird eine Reaktion durch ein Enzym ausgelöst bzw. beschleunigt, und wie verlaufen die enzymatischen Reaktionen?

Wir werden uns in erster Linie die Gesetze der allgemeinen chemischen Dynamik vergegenwärtigen, welche für die enzymatischen Reaktionen in Betracht kommen, insbesondere aber die Resultate, welche sich aus dem Studium der Katalysatoren ergeben haben. Der Vergleich der nicht enzymatischen Katalysen mit den Fermentreaktionen wird uns dann zeigen, dass wir es in beiden Fällen mit denselben Vorgängen zu tun haben, und dass die Abweichungen, welche viele Enzymreaktionen von den bekannten Schulfällen der chemischen Dynamik aufweisen, sich ungezwungen durch die Besonderheiten der enzymatischen Katalysatoren erklären lassen. An der Annahme, dass Enzym und Substrat zu mehr oder weniger festen Komplexen zusammentreten, welche als die „aktiven“ Moleküle zu betrachten sind, also die Reaktionen vermitteln, halten wir um so mehr fest, als dieselbe unserer allgemeinen Auffassung von der Rolle der Katalysatoren entspricht.

Überblickt man die Entwicklung, welche die Enzymologie in diesem Jahrhundert, besonders in dessen ersten Dezennium durchgemacht hat, so will es scheinen, dass die vielen reaktionskinetischen, speziellen Untersuchungen, in denen festgestellt werden sollte, welche Reaktionsformel für den einen oder anderen Vorgang passt, keine eigentliche Vermehrung unserer Einsicht in die betreffenden Enzymwirkungen gebracht hätten. Der Grund liegt in der Vernachlässigung der chemischen Seite des Reaktionsverlaufes. Der Einfluss der Acidität und die Mitwirkung spezieller Hilfsstoffe war übersehen worden, der Gang der Umsetzung über Zwischenprodukte war unbeachtet geblieben, und so stand die mathematische Behandlung vielfach ohne experimentell zureichende Grundlagen.

Seitdem durch die Arbeiten von Harden und Young das Co-Enzym der „Zymase“ entdeckt war, ist die Rolle der spezifischen Aktivatoren mehrfach Gegenstand der Forschung gewesen; allgemein lässt sich über die zweifellos sehr wichtige Rolle derselben, wie auch der Kinasen, noch wenig sagen; sie dürften meist nach stöchiometrischen Beziehungen aktivieren; wir werden diese Stoffe hauptsächlich im speziellen Teil des Buches zu besprechen haben.

Unter den allgemeineren Aktivatoren und Hemmungskörpern sind die als Elektrolyte fungierenden Säuren und Basen die wichtigsten; ihre Wirkungsweise wird im Kapitel 2 behandelt werden. Bemerkenswerte Regelmässigkeiten haben sich ferner hinsichtlich des Einflusses der Konfiguration auf die Hemmung der Enzymwirkungen ergeben. Über die Einwirkung der Gifte sind wir jetzt einerseits so weit orientiert, dass wir für enzymatische Untersuchungen verschiedener Art gegen Bakterieninfektion wirksame,

dem Ferment gegenüber aber unschädliche Stoffe angeben können, und dadurch vor Täuschungen, welche ungenügende Desinfektion bei enzymologischen Arbeiten so oft veranlasst hat, sicherer sind. Andererseits hat sich das quantitative Studium der Giftwirkungen, besonders der reversibeln Metall-Inaktivierungen durch Schwermetallsalze als ein wertvolles Hilfsmittel zum Eindringen in die Chemie der Enzyme erwiesen. Dagegen bedarf die Wirkung der Anästhetika (Toluol, Äther, Chloroform) auf die Gärungs- und Atmungsenzyme in chemischer Hinsicht noch dringend der Aufklärung.

Der Einfluss der Temperatur lässt sich für jedes Enzym und für jede enzymatische Reaktion exakter festlegen, als man nach der älteren Literatur annehmen durfte, und man wird nun die früheren Angaben über eine „Tötungstemperatur“ und „Optimaltemperatur“, welche je nach der Zeit der Einwirkung ganz verschieden ausfallen mussten, durch physikalisch-chemisch gut definierte Konstanten zu ergänzen suchen.

Das Sonnenlicht, besonders dessen ultravioletter Teil, greift zweifellos in die Bildung und Wirkung der Enzyme des Pflanzen- und Tierkörpers wesentlich ein, aber die experimentelle und theoretische Forschung — eine Prüfung des Einsteinschen Gesetzes wäre hier von hohem Interesse — steht hier noch in den ersten Anfängen, ebenso wie hinsichtlich der Rolle der Röntgenstrahlen und der Strahlung radioaktiver Elemente bei biochemischen Vorgängen.

Von grösster biologischer Bedeutung sind ohne Zweifel die enzymatischen Synthesen. Seitdem vor etwa 20 Jahren durch Croft Hill die ersten Erfolge erzielt waren, sind weitere wesentliche Fortschritte gemacht worden, unter welchen nur die enzymatische Bildung von Fruktosediphosphorsäure (Harden und Young, L. Iwanoff) und die Synthesen von Biosen und Glukosiden durch Bourquelot und seine Mitarbeiter erwähnt seien.

Für die allgemeine Chemie sind diese Vorgänge um so wichtiger, als die Enzyme bekanntlich gegenüber der sterischen Konfiguration der Substrate äusserst empfindlich sind und asymmetrische Produkte entstehen lassen. Die Enzyme setzen uns somit in den Stand, asymmetrische Synthesen auszuführen. Andererseits scheint eine Sichtung der Literatur hier besonders geboten, denn mehr als eine Angabe über gelungene enzymatische Eiweiss-synthesen hat der eingehenderen Kritik nicht standhalten können.

Den Abschluss des allgemeinen Teiles bildet eine Übersicht über die wichtigsten Tatsachen, welche hinsichtlich der Spezifität der Enzymwirkungen gefunden worden sind, und welche mit Recht die grösste Aufmerksamkeit sowohl der Mediziner wie der Biochemiker erregt haben.

1. Kapitel.

Allgemeines über die Darstellung, Reinigung¹⁾ und Aufbewahrung von Enzympräparaten und über ihre Charakterisierung²⁾.

Die Kenntnis der Enzymreaktionen leidet in hohem Grade an dem Übelstand, dass wir über die Zusammensetzung der Enzyme noch nichts wissen, und uns deswegen über die chemischen Einzelvorgänge, welche bei ihrer Wirkung in Betracht kommen, keine Vorstellung bilden können. Um so mehr wird es notwendig, alle die Einflüsse experimentell aufzusuchen und kennen zu lernen, welche sich bei enzymatischen Reaktionen geltend machen, wenn wir nicht Gefahr laufen wollen, den sicheren Boden für die theoretische Behandlung des Gebietes zu verlieren.

Insbesondere möchte der Verf. auch jetzt, wie schon in der vorhergehenden Auflage dieses Buches, betonen, dass der Reinigung und chemischen Charakterisierung der Enzympräparate, welche zu physikalisch-chemischen Messungen verwendet werden sollen, gar nicht genug Aufmerksamkeit gewidmet werden kann.

Dieses Kapitel soll nur einen Überblick über die wichtigsten, allgemeinen Methoden zur Gewinnung und Reinigung von Enzymen bieten. Bezüglich der Anwendungsformen dieser Methoden verweisen wir — um Wiederholungen zu vermeiden — auf den II. Teil dieses Werkes, wo bei der Beschreibung der einzelnen Enzyme die speziellen präparativen Arbeitsweisen angegeben werden.

A. Abscheidung enzymhaltiger Säfte aus tierischem und pflanzlichem Material.

In den Flüssigkeiten, Säften und Sekreten des tierischen und pflanzlichen Organismus können die Enzyme direkt in vitro nachgewiesen und studiert werden, und lassen sich daraus ohne weiteres, allerdings stark unreinigt, in fester Form gewinnen; so kann beispielsweise die Amylase aus

¹⁾ Siehe hierzu den zusammenfassenden Vortrag von Willstätter, Chem. Ber. 55, 3601; 1922.

²⁾ Euler und Josephson, Chem. Ber. 56, 1749; 1923. — Willstätter und Kuhn, Chem. Ber. 56, 509; 1923.

dem Speichel und das Pepsin aus dem Magensaft direkt mit Alkohol ausgefällt werden.

Aus Organen, Geweben und Zellen werden Enzyme etwas umständlicher gewonnen, und zwar:

1. durch Auspressen,
2. durch Extrahieren mit Lösungsmitteln, bzw. Lösungsmittelgemischen.

Geht man von tierischen Organen aus, so müssen dieselben vorher von Blut befreit werden, und zwar geschieht dies am besten in der Weise, dass man das betreffende Tier vor Entnahme des Organs aus einer Arterie entblutet, und durch die Jugularvene gleichzeitig die entsprechende Menge physiologischer Kochsalzlösung einführt, bis die der Arterie entströmende Flüssigkeit nur wenig rote Blutkörperchen mehr enthält¹⁾.

Das Auspressen der Gewebe geschieht in der Regel nach eingehender mechanischer Zerkleinerung des Materials mittels Hackmaschinen, Quetschmaschinen, Pulvermühlen u. dgl. Die so zerkleinerte Masse wird weiter zerrieben, oft mit Sand, wobei die Zellen mehr oder weniger vollständig zertrümmert werden, so dass ihr flüssiger Inhalt frei wird, und durch Absaugen oder Abpressen, zuweilen unter hohen Drucken, gewonnen werden kann.

Bei Organen von Tieren und höheren Pflanzen ist dieses Verfahren meist leicht auszuführen, bei Hefen und anderen Mikroorganismen bot hingegen die Zertrümmerung der Zellen früher Schwierigkeiten, welche bekanntlich die Entdeckung der Gärungsenzyme lange Zeit aufgehalten haben, bis E. u. H. Buchner und M. Hahn²⁾ fanden, dass man durch Anwendung von Kieselgur beim Zerreiben und durch Auspressen der Masse mit einer hydraulischen Presse einen gärkräftigen Saft erhalten kann.

Eine weitere Methode zur Zertrümmerung der Zellen stammt von Rowland³⁾.

Gegebenenfalls wird das Material durch Erstarrenlassen bei tiefer Temperatur gehärtet; für Bakterien haben Macfadyen und Rowland⁴⁾ diese Methode eingeführt, für tierische Organe ist von Kossel⁵⁾ ein sehr brauchbares Verfahren angegeben worden.

Nicht selten wird die Gewinnung des Zellinhaltes erleichtert, wenn man die Zellen vorher abtötet. Diese Abtötung kann durch solche Protoplasma-gifte geschehen, welche die Enzyme nicht angreifen, am besten aber dadurch, dass man das Material zuerst entwässert, und erst dann nach Zusatz von Wasser oder Salzlösung die Auspressung oder Extraktion vornimmt (E. Fischer, v. Lebedew, Jacoby u. a.).

Dieses Verfahren ist besonders zur Gewinnung von Enzymen aus Hefen und Bakterien vielfach angewandt worden, sei es, dass man das Zellmaterial direkt an der Luft oder im Vakuum trocknet — hierzu eignet sich manch-

¹⁾ Vgl. hierzu Franz Müller, Die künstliche Durchblutung resp. Durchspülung von Organen. Abderhaldens Handbuch, 3, 321, 1910.

²⁾ E. Buchner, H. Buchner und M. Hahn, Die Zymasegärung. München 1903. Auf die Buchner-Hahnsche Methode kommen wir im zweiten Band dieses Werkes noch zurück.

³⁾ Rowland, JI Physiol., 27, 53; 1901.

⁴⁾ Macfadyen und Rowland, Zentralbl. f. Bakteriologie, 34, 765; 1903.

⁵⁾ Kossel, H. 33, 5; 1901.

mal eine Apparatur¹⁾, wie sie bei der Krause-Trocknung der Milch zur Anwendung kommt²⁾ — sei es, dass man ihm durch Alkohol das Wasser entzieht, und die Zellen dadurch tötet, wie dies z. B. Osborne bei seiner Methode zur Gewinnung der Saccharase getan hat.

Sehr wesentlich zur Gewinnung qualitativ und quantitativ guter Ausbeuten ist das Entfetten des getrockneten Organbreies (siehe z. B. die Darstellung von Pankreaslipase nach Willstätter, H. 125, 133).

Zur Darstellung von Enzympräparaten aus tierischen Organen haben Wiechowski³⁾ und Wiener⁴⁾ ein Verfahren ausgearbeitet. Es besteht darin, dass man die gut zerkleinerte Organmasse durch ein feines Sieb treibt und dann in dünner Schicht auf Glasplatten in warmem und trockenem Luftstrom möglichst schnell trocknet. Die getrocknete Haut wird abgeschabt und mit Toluol in einer Pulvermühle gut gemahlen. Die feine Suspension wird durch Absaugen weiter gereinigt, bis die in Toluol löslichen Lipide usw. entfernt sind. Das vom Toluol befreite feine Pulver soll alle Enzyme unverändert enthalten, und ist jedenfalls in trockenem Zustand sehr beständig. Die Enzyme werden durch Extraktion mit Wasser wieder in Lösung gebracht.

Was das Extrahieren der Enzyme aus tierischen und pflanzlichen Organen betrifft, so kommen natürlich nur solche Flüssigkeiten in Betracht, welche das betreffende Enzym zu lösen vermögen; meistens handelt es sich um Wasser bzw. sehr verdünnte wässrige Lösungen von Salzen, Säuren oder Basen, oder um Glycerin.

Während wässrige Lösungen ausser dem Enzym grosse Mengen von anderen Stoffen, besonders Eiweisskörper und ihre Spaltprodukte sowie Kohlehydrate, aufnehmen, löst Glycerin diese Stoffe in viel geringerem Grade, so dass gleichzeitig eine verhältnismässig reine Lösung erhalten wird.

Als dritte Methode, Enzyme aus einzelligen Organismen zu gewinnen, ist die Plasmolyse derselben vorgeschlagen worden, und dürfte manchmal Dienste leisten, wenn die direkte Extraktion sich schwer ausführen lässt oder Autolyse die zu studierenden Zellenzyme zerstört. So hat Verf.⁵⁾ mit Dernby von dieser Methode zum Studium der Hefenproteinasen Gebrauch gemacht.

Auch das Ausspritzen einer Bakterienemulsion aus Hochdruckgefässen ist vorgeschlagen worden; dabei sollen die Zellen durch die plötzliche Druckänderung gesprengt werden.

Nicht alle Enzyme sind in Wasser oder wässrigen Medien löslich, und auch diejenigen, welche klare wässrige Lösungen bilden, zeigen bei näherer Untersuchung sehr verschiedene Dispersitätsgrade. Auch ein und dasselbe Enzym wird sowohl innerhalb als ausserhalb der lebenden Zelle, ebenso wie andere Emulsionskolloide, mit verschiedenen Dispersitätsgraden auftreten und aktiv sein können; darauf deuten die Wirksamkeitserhöhungen, welche man zuweilen durch kurzdauernde Erwärmung an Enzymlösungen beobachtet.

¹⁾ Salomonson und Euler, Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi 8, Nr. 24; 1922.

²⁾ G. A. Krause, D. R. P. Kl. 12 a, Nr. 297388; 1918.

³⁾ Wiechowski, Hofm. Beitr. 9, 233; 1907. — Siehe die Zusammenstellung dieses Autors in Abderhaldens Handbuch, 1. Aufl. Bd. 3, 282; 1910.

⁴⁾ Wiechowski und Wiener, Hofm. Beitr. 9, 247; 1907.

⁵⁾ Euler und Dernby, H. 83, 408; 1914.

Vielfach ist der Grund, weshalb die Enzyme überhaupt nicht oder nicht direkt extrahiert werden können, darin zu suchen, dass dieselben an andere Zellbestandteile mehr oder weniger fest gebunden sind, eventuell Bestandteile grösserer Molekularkomplexe ausmachen. Oft können solche Enzymgruppen durch Trocknen oder durch andere Massnahmen von diesen Zellbestandteilen getrennt werden, zuweilen gelingt es, Eiweissstoffe, welche einem Enzym fest anhaften, durch zugesetzte Enzyme¹⁾ oder durch rasche Autolyse²⁾ unter Zusatz von Toluol usw. zu entfernen; ein gutes Beispiel bietet die Saccharase (vgl. II. Teil, 2. Aufl., S. 172).

Wie Verf. bemerkt hat, scheint die Extraktionsfähigkeit von intrazellulären Enzymen in einem nahen Zusammenhang zu stehen mit ihrer Empfindlichkeit gegen Protoplasmagifte, was dahin gedeutet wurde, dass diese Enzyme in dem Grade von Protoplasmagiften gehemmt (vergiftet) werden, als sie noch einen Bestandteil des Protoplasmas ausmachen³⁾. Indessen sind diese Verhältnisse noch bei weitem nicht endgültig aufgeklärt.

Die früher übliche Unterscheidung der Enzyme in Endo-Enzyme und Ekto-Enzyme ist nie auf exakte Kriterien gegründet gewesen und wird am besten aufgegeben.

Gewinnung von Verdauungssäften.

Allgemeine, ausserordentlich wertvolle Methoden zur Gewinnung von Sekretionsenzymen aus den Verdauungsdrüsen verdankt man Pawlow⁴⁾, London und ihren Schülern. Durch diese Methoden gelingt es nicht nur grössere Mengen der Sekrete des Magens, des Darms und anderer Organe gänzlich frei von Verdauungssubstrat zu erhalten, sondern auch die Bedingungen der Enzymsekretion eingehend zu studieren.

Die Grundlagen der hier in Betracht kommenden Methodik stammen von Thiry (1864) und von Heidenhain (1879), welche die sezernierende Oberfläche operativ isolierten. Im Jahre 1889 führte Pawlow mit Frau Schumow-Simanowski an einem Hunde, der eine gewöhnliche Magenfistel besass, die Operation der Ösophagotomie aus, d. h. sie durchschnitt die Speiseröhre am Halse und heilten ihre beiden Stümpfe gesondert in die Winkel der Hautwunde ein. Hierdurch wurde eine vollständige anatomische Trennung der Mund- und Magenhöhle erhalten. „An solchen Tieren kann man folgendes interessante Experiment anstellen: Wenn man dem Hunde Fleisch zu fressen gibt, so fällt es natürlich durch den oberen Abschnitt der Speiseröhre wieder heraus; aus dem gänzlich leeren, vorher mit Wasser rein ausgespülten Magen beginnt aber eine ergiebige Sekretion von vollkommen reinem Magensaft, die so lange andauert, als das Tier Fleisch frisst, und sogar noch einige Zeit länger.“

Auf diese Weise kann man mit Leichtigkeit Hunderte von Kubikzentimetern Magensaft erhalten.

¹⁾ Siehe Euler und Myrbäck, Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi 8, Nr. 17; 1922.

²⁾ Hudson und Paine, Amer. Chem. Soc. 32, 774; 1910. — 36, 1566; 1914. — Willstätter und Racke, Lieb. Ann. 425, 1; 1921.

³⁾ Euler und B. af Ugglas, H. 70, 279; 1910.

⁴⁾ Pawlow, Die Arbeit der Verdauungsdrüsen. Deutsch von Walther. München. Bergmann, 1898.

London hat die Pawlowsche Methodik der Sekretgewinnung besonders in operativer Hinsicht erweitert und verbessert und zum Studium der Sekretion der Verdauungsenzyme ein neues Prinzip angegeben. Da die nähere Beschreibung dieser Methodik nicht im Rahmen dieses Buches liegt, sei auf die zusammenfassende Darstellung dieses Forschers in Abderhaldens Handbuch verwiesen¹⁾.

B. Dauerpräparate.

Zuweilen bieten die Versuche, gewisse Enzyme aus Mikroorganismen zu isolieren, unüberwindliche Schwierigkeiten, so ist es z. B. Buchner selbst mit dem Presssaftverfahren weder gelungen, die Enzyme der Milchsäuregärung aus Milchsäurebakterien²⁾, noch die Alkoholoxydase aus Essigsäurebakterien³⁾ von der Zellsubstanz zu trennen.

In solchen Fällen kann man die betreffenden Enzymwirkungen als solche wenigstens von den übrigen vitalen Vorgängen der lebenden Zelle scheiden, indem man die Zelle tötet, ohne das Enzym zu zerstören. Dies geschieht nach Albert, Buchner und Rapp⁴⁾ durch Herstellung sogenannter Dauerpräparate.

Das Prinzip, nach welchem sich lebende Mikroorganismen in Dauerpräparate verwandeln lassen, besteht darin, das Protoplasma durch einen so kurzdauernden und chemisch verhältnismässig neutralen Eingriff abzutöten, dass eine Zerstörung an den Enzymen nicht (oder wenigstens nicht vollkommen) zustande kommt. Hierzu eignet sich eine kurze Behandlung der Zellen mit Aceton oder mit absolutem Alkohol⁴⁾.

Indessen muss hierzu schon an dieser Stelle bemerkt werden — wir werden später ausführlicher auf diesen Punkt zurückkommen —, dass schwer von der Zelle abtrennbare Enzyme, wie diejenigen der alkoholischen Gärung, durch die Tötung der Zellen zum allergrössten Teil, vermutlich soweit sie an das Plasma gebunden sind, dauernd inaktiviert werden. Hierauf hat zuerst Verf. mit B. v. Euler-af Ugglas⁵⁾ aufmerksam gemacht, und bald darauf sind auch Rubner⁶⁾ und Giaja zum gleichen Ergebnis gekommen. Dauerpräparate enthalten übrigens die Zellen in sehr verschiedenem Zustand.

C. Ausfällung und Reinigung.

In den meisten Fällen wird die erste Reinigung der Enzyme durch fraktionierte Fällung der enzymatischen Flüssigkeiten vorgenommen.

¹⁾ London, Operative Technik zum Studium der Verdauung und der Resorption. Abderhaldens Handbuch 3, 75; 1910.

²⁾ E. Buchner und Meisenheimer, Chem. Ber. 36, 634; 1903. — R. O. Herzog, H. 37, 381; 1903.

³⁾ E. Buchner und Gaunt, Lieb. Ann. 349, 140; 1906.

⁴⁾ Siehe E. Buchner, H. Buchner und M. Hahn, Zymasegärung. S. 247 u. ff.

⁵⁾ Euler und af Ugglas, H. 70, 279; 1910. — Euler und Kullberg, H. 73, 85; 1911.

⁶⁾ Rubner, Arch. f. Anat. u. Phys. Suppl. Bd. 1912.

Aussalzen. Aus Enzymlösungen, welche genuine Eiweissstoffe enthalten, kann man letztere oft mit Erfolg fraktioniert „aussalzen“, sei es durch Ammoniumsulfat, Magnesiumsulfat, Natriumchlorid, sei es durch einen anderen Elektrolyten, der die „aussalzende Wirkung“ zeigt, die im 3. Kapitel näher behandelt ist. Die dazu erforderliche, grosse Menge des zugesetzten Salzes muss dann durch Dialyse entfernt werden; während derselben wird aber oft ein erheblicher Teil des Enzyms unwirksam.

Herstellung des Aciditätsoptimums der Fällung. Es ist deswegen von entschiedenem Vorteil, wenn es manchmal gelingt, einen grösseren Teil der Eiweissstoffe in der Weise auszufällen, dass man durch geeignete Zusätze von Säuren (oder Alkalien) in der Lösung die Acidität der maximalen Fällung herstellt, welche meist beim isoelektrischen Punkt liegt. So lässt sich z. B. nach Angabe von Meisenheimer Hefepresssaft durch Zusatz von Salzsäure weitgehend reinigen¹⁾.

Organische Fällungsmittel. Das am häufigsten angewandte Abscheidungs- mittel für Enzyme ist der Äthylalkohol. Derselbe fällt zwar einerseits erst in sehr hoher Konzentration Enzyme vollständig, und schlägt andererseits auch viele gleichzeitig gelöste Stoffe, besonders Eiweisskörper, nieder. Da die Proteine aber durch die Alkoholfällung zum Teil ihre Wasserlöslichkeit verlieren, so liegt in der wiederholten Alkoholfällung eine Reinigung.

Der Alkohol bietet aber auch den Vorteil, dass er leicht aus dem Enzympräparat wieder entfernenbar ist, und keine tiefergreifenden chemischen Veränderungen in den Enzymlösungen hervorruft, wenn unter geeigneten Bedingungen gearbeitet wird. Viele Enzyme vertragen recht erhebliche Mengen von Alkohol auch während längerer Zeit, und manche können sogar in einem Lösungsmittel, das etwa 35% Alkohol enthält, noch eine starke enzymatische Wirksamkeit entfalten, wie im Kapitel 5 näher belegt werden wird. Immerhin ist bei präparativen Arbeiten zu beobachten, dass diese Toleranz nicht allgemein ist, dass vielmehr einige Enzyme, wie z. B. Saccharase, besonders gegen wässrigen Alkohol recht empfindlich sind²⁾. Man kürzt deswegen die Berührung des Enzyms mit dem wässrigen Alkohol nach Möglichkeit ab, indem man denselben durch absoluten Alkohol oder Alkohol-Äther ersetzt, welcher dann leicht entfernt werden kann. Nicht selten bietet es Vorteile, den Alkohol durch Aceton zu ersetzen.

Adsorptionsreinigung. Oft gelingt es, Enzyme von ihren Verunreinigungen durch geeignete Adsorptionsmittel zu trennen, und zwar indem man entweder die Enzyme oder die Verunreinigungen adsorbiert.

¹⁾ Meisenheimer, Gambarjan und Semper, *Biochem. Zs* 54, 108; 1913.

²⁾ Hudson und Paine, *Jl Amer. Chem. Soc.* 32, 1350; 1910. — Euler, Josephson und Myrbäck, *H. 130 (Kossel-Festschrift)* 87, 1923.

Am häufigsten trifft man bei Reinigungsarbeiten auf Adsorptionsverbindungen zwischen Enzym und Eiweiss. Man kann in diesen Fällen das Eiweiss durch Autolyse zerstören, falls das Enzym bei der Autolyse erhalten bleibt, oder die Adsorptionsverbindung durch Zusätze von Säuren oder Basen zerlegen, indem man die Eiweisskomponente in Eiweissalze überführt¹⁾.

Enzyme lassen sich zuweilen an andere kolloidal gelöste oder suspendierte Stoffe binden, z. B. an unlösliche Hydroxyde oder schwerlösliche Salze, besonders von Aluminium, Eisen, Blei und Uranyl. Es ist kaum zweifelhaft, dass es sich hier meist um chemische Bindungen handelt. Da die Adsorptionswirkung der Grösse der Oberfläche proportional ist, sind frisch gefällte Niederschläge, weil sie kurz nach der Entstehung einen hohen Dispersitätsgrad haben, besonders wirksam²⁾.

Mit Calciumphosphatniederschlägen hat E. Brücke³⁾ schon 1861 Pepsin gereinigt. Auch Cholesterin ist von Brücke zur Fällung von Pepsin verwendet worden, und eine ähnliche Wirkung wurde mit Lecithin erzielt.

Trennungen von Enzymen durch Adsorption sind früher nur in wenigen Fällen systematisch versucht worden, zuerst von Danilewsky und J. Cohnheim sowie 1872 von O. Hammarsten (siehe Kap. 3).

„Die Entwicklung der Adsorptionsmethoden gewann einen bedeutenden Antrieb durch die Untersuchungen von L. Michaelis und M. Ehrenreich⁴⁾ „Über die Adsorptionsanalyse der Fermente“, neben denen die etwa gleichzeitigen Studien von H. Iscovesco⁵⁾ hervorzuheben sind. Michaelis und Ehrenreich untersuchten die unspezifische Adsorption der Enzyme, und zwar die elektrochemische. Durch Anwendung derjenigen Adsorbentien, die unter allen Bedingungen entschiedene und einsinnige Ladungen tragen, wählten Michaelis und Ehrenreich solche Fälle der Adsorption aus, in denen die entgegengesetzte elektrische Ladung von Adsorbens und Adsorbendum massgebend ist. Dabei wurde festgestellt, „dass alle Substanzen, die durch Kaolin adsorbiert werden können, Basen sein müssen, alle Substanzen, die durch Tonerde adsorbiert werden können, Säuren sein müssen“. Auf Grund dieses Leitsatzes liess sich die elektrochemische Natur der untersuchten Fermente mit Leichtigkeit feststellen, was ohne quantitative Bestimmung, nur auf Grund von Schätzungen geschah.“

Dieser Leitsatz wurde auch nicht selten benützt, bis Willstätter, der in einer Reihe ausgezeichneter Arbeiten die Adsorptionsreinigung zu einer der fruchtbarsten Methoden der Enzymchemie gemacht hat, mit Racke am Beispiel des Invertins zeigen konnte, dass die Befunde von Michaelis nicht

¹⁾ Vgl. hierzu Willstätter und Stell, Lieb. Ann. 416, 21; 1918.

²⁾ Euler und Nilsson, H. 131, 107; 1923 u. 134, 22; 1924.

³⁾ v. Brücke, Sitzungsber. d. Akad. d. Wiss. Wien (pathol.-physiol. Kl.), 43, 601; 1861.

⁴⁾ Michaelis und Ehrenreich, Biochem. Zs 10, 283; 1908. — Michaelis, Biochem. Zs 7, 488 f. und 12, 26; 1908.

⁵⁾ Iscovesco, Soc. biol. JI, 770 und 861; 1907. — Biochem. Zs 24, 53; 1910.

für die Enzyme selbst gelten, sondern für ihre Aggregate mit begleitenden Stoffen. Demgemäss ändert sich, wie Willstätter fand, allgemein das Verhalten der Enzyme zu den Sorptionsmitteln mit ihrem Reinheitsgrad.

Die Einzelheiten der Willstätterschen Sorptionsmethoden werden im 3. Kapitel eingehend zu besprechen sein. Hier sei nur noch nach Willstätter auf die Bedeutung der Adsorptionsmethoden hingewiesen: „Es gibt daher nur eine einzige allgemeine Methode für die Isolierung der Enzyme, die Anwendung der auf kleinen Affinitätsbeträgen, auf Affinitätsresten beruhenden Adsorptionsvorgänge.“

Dialyse. Will man die Enzyme in Presssäften oder Extrakten ohne vorhergehende Ausfällung direkt verwenden, so kann man letztere durch Dialyse von einem beträchtlichen Anteil der Verunreinigungen befreien. Häufiger wird die Dialyse in einem späteren Stadium des Reinigungsverfahrens vorgenommen.

Willstätter und Stoll¹⁾ haben bei ihren erfolgreichen Versuchen zur Darstellung hochwertiger Peroxydasepräparate aus Meerrettichwurzeln mit der Dialyse begonnen, um das Material, bevor ihm das Enzym entzogen wird, von Salzen, Zucker usw. zu befreien.

Bemerkenswert für präparative Arbeiten ist übrigens der Zusatz von Säuren beim erwähnten Dialysierverfahren, durch welche hochmolekulare Substanzen in leichter diffundierende umgewandelt werden²⁾.

Wie im Abschnitt E des 3. Kapitels gezeigt wird, vermögen die Enzyme, schon wegen ihrer bedeutenden Molekulargrösse, im allgemeinen nicht oder nur in geringem Grad Membranen, Kollodiumhäutchen und dergleichen zu durchdringen, während gleichzeitig gelöste Begleitstoffe von geringerer Molekulargrösse, wie Salze, Zucker, Aminosäuren, in das den Dialysator umgebende Wasser austreten können.

Dialysatoren, welche sich zur Reinigung von Enzymlösungen eignen, sind in grösserer Anzahl beschrieben worden. Das älteste Modell, ein beiderseits offenes, zylindrisches Gefäss, unten mit einer Membran verschlossen und in ein grösseres Wasserbad eingesenkt, stammt von Graham. — Bei der Konstruktion wirksamer Dialysatoren wird man immer die Bepflügelung der Membran mit dem reinen Wasser möglichst intensiv machen; dies wird z. B. in dem von Zsigmondy angegebenen Sterndialysator³⁾ angestrebt.

Andererseits wählt man die durchlässige Oberfläche möglichst gross im Verhältnis zum Volumen der dialysierenden Lösung, um einen schnellen Austritt aller diffusiblen Substanzen in das umgebende Wasser zu ermöglichen; dieses Prinzip führt zur Anwendung von Dialysierschläuchen und Röhren. Man hängt diese Schläuche in hohe Glaszylinder und umspült sie darin mit einem kontinuierlichen Wasserstrom eventuell bei 0°.

¹⁾ Willstätter und Stoll, Lieb. Ann. 416, 21; 1918.

²⁾ Bezügl. des Einflusses der Acidität auf die Dialyse, siehe 3. Kap., Abschn. E.

³⁾ Zsigmondy und Heyer, Zs anorg. Chem. 68, 169; 1910. — Zsigmondy und Bachmann, ebenda, 103, 119; 1918.

Als Material für Dialysatoren hat man zuerst tierische Blasen und besonders Pergament angewandt, auch Amnionhäute sind vorgeschlagen worden (v. Calcar). — Dünne Gelatineschichten eignen sich zuweilen gut zu Fraktionierungen durch Filtration, wenn sie in ein festeres Material eingelegt werden. So haben Harden und Young¹⁾ Chamberlandkerzen nach dem Vorgang von Martin²⁾ mit einer Gelatineschicht versehen und zur Trennung von Zymase und Co-Enzym benutzt.

Praktische Anwendung bei neueren Reinigungsarbeiten an Enzymen haben die von Willstätter³⁾ empfohlenen sog. Fischblasen gefunden.

Dialysierschläuche, die zur Reinigung salzhaltiger Enzymlösungen sehr brauchbar sind, lassen sich leicht aus Kollodium herstellen⁴⁾. Sie sind von Moore und Roaf, Lillie und dann von Sørensen sowie vom Verf. und Mitarbeitern mit Erfolg angewandt worden.

Auch mittels einfacher Filtration durch Kollodiummembranen lassen sich die Kolloide und Krystalloide oft gut voneinander trennen. Dazu sind mehrere recht brauchbare Verfahren und Apparate angegeben worden, von denen das Ultrafilter von Wo. Ostwald⁵⁾, das man sich jederzeit im Laboratorium herstellen kann, und das Membranfilter von Zsigmondy und Jander⁶⁾ besonders erwähnt seien.

Auch zur Druckfiltration nach Sørensen⁷⁾ eignen sich Kollodiumschläuche am besten. Reinigung durch Elektro-Dialyse: Siehe Fricke und Kaja, Chem. Ber. 57.

Zahlreiche der vorgeschlagenen Filtersubstanzen sind Adsorptionsmittel für Enzyme und demgemäss bei enzymatischen Arbeiten mit Berücksichtigung dieses Umstandes anzuwenden. Dies gilt z. B. für Pascuccis Cholesterin- und Lecithin-Filter (diese Stoffe imprägniert in feinen Seidenstoff).

Siehe ferner den Abschnitt „Filtration von Enzymen“ im 3. Kapitel.

Endlich muss noch darauf hingewiesen werden, dass wir durch die hier angeführten Reinigungsmethoden die Enzyme von Beimengungen um so leichter befreien können, je stärker dieselben sich chemisch oder physikalisch von den Enzymen unterscheiden. Am schwierigsten wird die Aufgabe sein, das aktive Enzym von seiner inaktiven Form, wie sie etwa bei der Erhitzung entsteht, zu trennen, sofern das Enzym hierbei nur wenig verändert, isomerisiert oder entlaktonisiert wird. In diesem Fall würde die schliessliche Reinigung nur durch Herstellung einer für die aktive Form charakteristischen schwerlöslichen Verbindung erfolgen können.

¹⁾ Harden und Young, Proc. Roy. Soc. B. 78, 369; 1906.

²⁾ Martin, JI Physiol. 20, 364; 1896.

³⁾ Willstätter und Racke, Lieb. Ann. 425, 1; 1920/21. — 437, 111; 1921/22.

⁴⁾ Die erste Verwendung von Kollodiumschläuchen stammt von Malfitano, C. r. 139, 1221; 1904.

⁵⁾ Wo. Ostwald, Kolloid-Zs 22, 72; 1918. — Vgl. Paul, Vortr. auf der 24. Hauptversammlung d. Bunsengesellschaft, Berlin 1918.

⁶⁾ Zsigmondy und Jander, Die chemische Analyse mit Membranfiltern. Hannover 1919. Die Filter sind von der Chem. Fabrik de Haen, Seelze b. Hannover, zu beziehen.

⁷⁾ S. P. L. Sørensen, H. 106, 1; 1919.

D. Aufbewahrung von Enzymlösungen. Ihre Haltbarkeit.

Als vollkommen trockene, fettfreie Pulver sind die meisten Enzympräparate bei Zimmertemperatur im Dunkeln so gut wie unbegrenzt haltbar, d. h. sie verändern ihre Wirksamkeit in Monaten, sogar Jahren nicht merklich. Auch zeigen Trockenpräparate, die stundenlang bis auf 100° erhitzt worden waren, bei nachfolgender Auflösung und Verwendung keine oder geringe Veränderung ihrer normalen katalytischen Kraft¹⁾.

Gelöste Enzyme besitzen hingegen eine viel geringere Beständigkeit, welche übrigens bei den verschiedenen Enzymen recht ungleich ist.

Stets nimmt die Haltbarkeit sehr stark mit steigender Temperatur ab; innerhalb 50°—80° setzt in den rein wässrigen Lösungen eine rapide Inaktivierung ein, welche in Zeiten von 1—5 Stunden die Enzymwirkung vollständig zerstört²⁾. Die Stabilität der gelösten Enzyme lässt sich zahlenmässig genau bestimmen; wir werden die Messungen der Inaktivierungskoeffizienten im 6. Kapitel dieses Buches eingehend behandeln.

Von grösstem Einfluss auf die Haltbarkeit der Enzymlösungen ist ihre Konzentration an freien H- resp. HO-Ionen. So ist beispielsweise Saccharase bei 15° und bei $p_H = 5$, also in einer 0,00001-normalen Lösung freier H-Ionen, wenigstens in unreinem Zustand, so gut wie unbegrenzt haltbar, während in einer gleich verdünnten Lösung freier HO-Ionen die Inaktivierung in kurzer Zeit erfolgt. Bei hochgereinigten Lösungen ist die Stabilität oft herabgesetzt. Bei der Saccharase fällt die Acidität der maximalen Haltbarkeit mit der Acidität des Wirkungsoptimums zusammen. Inwieweit eine solche Beziehung allgemeiner gilt, ist bis jetzt noch nicht bekannt.

In enzymreichen Presssäften und Organextrakten können die verschiedenen Enzyme einander angreifen, wodurch sich die geringe Haltbarkeit solcher Säfte oder Extrakte erklärt. Für den Hefepresssaft ist das Spiel der Enzyme von Buchner und seinen Mitarbeitern³⁾ näher untersucht worden, nachdem Harden und Young⁴⁾ in einer grundlegenden Arbeit gezeigt hatten, dass die Abnahme der Gärkraft des Hefepresssaftes in erster Linie auf der Zerstörung des von diesen Forschern entdeckten Co-Enzymes beruht, eines Stoffes, der sich andererseits wieder von Enzymen durch seine grössere Wärmebeständigkeit unterscheidet.

Presssäfte und konzentrierte Extrakte verlieren ferner oft dadurch ihre wirksamen Enzyme, dass diese von allmählich ausfallendem Eiweiss mitgerissen werden. Eine möglichst weitgehende Euteiweissung des zu untersuchenden Saftes unter geeigneten Bedingungen ist auch aus diesem Grund zu empfehlen.

¹⁾ Siehe z. B. Euler, Josephson und Myrbäck, H. 130 (Kossel-Festschr.) 87; 1923.

²⁾ Zu den sehr seltenen Ausnahmen gehört vielleicht die Lecithinase; ich verweise auf den 1. Abschnitt des II. Teiles.

³⁾ Buchner und Haehn, Biochem. Zs 19, 191; 1909 und 26, 171; 1910.

⁴⁾ Harden und Young, Proc. Roy. Soc. B. 77, 405; 1906 und 78, 369; 1906.

Schliesslich ist es notwendig zu betonen, dass Enzymlösungen vor der Einwirkung von Bakterien und Schimmelpilzen geschützt werden müssen, was in der Regel durch Sättigung der Lösungen mit Toluol oder Chloroform leicht und vollständig geschehen kann, während Sublimat und andere Schwermetallsalze vermieden werden müssen, da sie die Enzyme selbst schon in kleinsten Mengen stark inaktivieren.

Sehr haltbar sind viele Enzyme in Glycerinlösung. Besonders für proteolytische Enzyme eignet sich das genannte Lösungsmittel ganz vorzüglich, um so mehr als diese Enzyme, wie schon erwähnt, aus tierischen Sekretionsorganen sehr gut mit Glycerin extrahiert werden können. Auch zur Plasmolyse von Zellen zwecks Gewinnung intracellulärer Enzyme ist Glycerin vorgeschlagen worden.

Glykol hat sich als Ersatz von Glycerin in den von Willstätter und vom Verf. untersuchten Fällen nicht als geeignet erwiesen.

E. Die zahlenmässige Charakterisierung von Enzympräparaten.

Da wir bis jetzt ein Enzym nur aus seinen katalytischen Wirkungen beurteilen können, so ist die wesentlichste Eigenschaft eines Enzympräparates seine Aktivität, also seine unter bestimmten Bedingungen gemessene Wirksamkeit per Gewichtseinheit. Diese Bedingungen müssen so exakt als möglich ausgedrückt werden, so dass es jedem Experimentator möglich gemacht wird, die Aktivitätsmessungen zu wiederholen und seine Präparate mit älteren, bereits definierten zu vergleichen.

Erst wenn wir von einem Enzympräparat wissen, welche Aktivität (Wirkung per g) es unter genau bestimmten äusseren Umständen zeigt, haben wir zum Vergleich mit anderen Präparaten einen Ausgangspunkt, und können über ein so definiertes Präparat Angaben hinsichtlich anderer Eigenschaften, wie Elementarzusammensetzung, Farbenreaktionen usw. machen, aus welchen tatsächlich Schlüsse gezogen werden können. Analytische Angaben über Enzympräparate ohne Feststellung ihrer Aktivität und der Konzentration der untersuchten Lösungen sind — wie schon früher betont wurde¹⁾ — für die wissenschaftliche Forschung ohne Wert.

Zur Ermittlung und Beschreibung von Reinigungsverfahren wird man nach jeder entscheidenden Operation die Ausbeute an Enzympräparat und die Aktivität desselben angeben, wie dies zuerst in den Arbeiten von Willstätter²⁾, von Euler und ihren Mitarbeitern³⁾ geschehen ist.

In einzelnen Fällen gelingt es, das eine oder andere Enzym in den lebenden Zellen selbst nach aussen vollständig zur Wirkung zu bringen und

¹⁾ Euler und Svanberg, H. 107, 269; 1919.

²⁾ Vgl. die Angabe der Menge-Wert-Produkte, l. c. S. 28.

³⁾ Euler und Cramér, H. 88, 430 u. zw. 437; 1914. — Euler und Svanberg, H. 106, 201; 1919.

so Aufschluss wenigstens über den relativen Enzymgehalt der Zellen zu erhalten. Dies ist z. B. bei der Sâccharase der Kulturhefen, keineswegs aber allgemein der Fall, wie die Untersuchung der Maltase¹⁾ gezeigt hat.

Man ermittelt in solchen Zellen, welche ein Enzym quantitativ zur Wirkung kommen lassen, die Reaktionskonstante, welche sich in einer Zellaufschlemmung ergibt, und bestimmt in der Thoma-Zeisschen Rechenkammer die Zellenzahl, woraus sich die Wirksamkeit per Zelle ergibt²⁾.

In welcher Weise die Aktivität bei den verschiedenen Enzymen gemessen und ausgedrückt werden muss, darüber lassen sich noch keine endgültigen Regeln aufstellen, da die Enzyme hinsichtlich ihrer Wirkungsgesetze vielfach voneinander abweichen. Im Anschluss an die Besprechung der Kinetik der Enzyme werden wir im 4. Kapitel auf die Bezeichnung der Aktivität von Enzympräparaten und auf ihre sonstige Charakterisierung noch zurückkommen müssen. Ferner wird im II. Band dieses Werkes bei jedem Enzym erwähnt, welches zur Zeit der einfachste und genaueste zahlenmässige Ausdruck seiner Wirksamkeit ist; wenn möglich, ist ein theoretisch begründeter, auf seine Konstanz experimentell geprüfter Reaktionskoeffizient zu verwenden.

Die katalytische Wirkung einer Enzymlösung (unabhängig von ihrem Reinheitsgrad) misst man am besten durch die mit ihr unter festgelegten Bedingungen ermittelten Reaktionskonstante k und in Enzym-Einheiten³⁾. Ferner scheint es am zweckmässigsten, die Aktivität von Enzympräparaten in der Art zu bezeichnen⁴⁾, wie wir sie für Saccharase und für das Stärke-verzuckernde Enzym vorgeschlagen haben, also, wenn $k \cdot g$ Substrat konstant ist, durch den Ausdruck:

$$Xf = \frac{k \cdot g \text{ Substrat}}{g \text{ Enzympräparat}}$$

Gilt hingegen die theoretisch einfachste Beziehung, dass k von der Substrat-Konzentration unabhängig ist, so sei:

$$Xf = \frac{k}{g \text{ Enzympräparat}}$$

In den speziellen Fällen sind natürlich die Grenzen und Bedingungen der Gültigkeit der Beziehungen anzugeben. Die Reaktionskonstante wird immer bei optimaler Acidität⁵⁾ und in der Regel bei optimaler Aktivator-Konzentration anzugeben sein und zwar zweckmässig bei 18° bzw. 20° oder bei 37°, so dass Xf dann für diese Temperaturen gilt.

¹⁾ Willstätter und Steibelt, H. 111, 157; 1920.

²⁾ Euler und Cramér, H. 88, 430 u. zw. 437; 1914. — Euler und Svanberg, H. 106, 201; 1919.

³⁾ Euler und Svanberg, H. 107, 269; 1919. — Willstätter und Steibelt, H. 111, 157; 1920. — Willstätter und Waldschmidt-Leitz, H. 125, 132; 1923.

⁴⁾ Euler und Josephson, Chem. Ber. 56, 1749; 1923.

⁵⁾ Über die Sicherheit der Grundlagen siehe Kap. 2.

Die Bezeichnung Xf wurde so gewählt, dass f die enzymatische Fähigkeit des betr. enzymatischen Bestandteils ausdrücken soll (f ist der Anfangsbuchstabe dieses Begriffes in den meisten Kultursprachen: Fähigkeit, faculty, schwed. förmåga usw.); für die speziellen Enzyme — abgesehen von den Bezeichnungen If und Sf — ist soweit möglich der Anfangsbuchstabe des Enzyms zu wählen, also etwa Uf für Urease, Lf für Lipase oder, um Verwechslungen zu vermeiden, die Anfangsilbe, also Kat. f für Katalase statt Kf.

In analoger Weise ist die Wirksamkeit spezifischer Co-Enzyme zu bezeichnen, wie dies neuerdings von Euler und Myrbäck¹⁾ geschehen ist.

Hat man nun die enzymatische Katalyse einer Synthese zu messen, wie etwa bei der durch Nordefeldt nunmehr weitgehend gereinigten Oxynitrilese, so wird man die synthetische Wirkung geeignet durch die Bezeichnung syn f kennzeichnen und dieselbe ebenfalls durch die Reaktionskonstante k (der Synthese) messen, so dass demgemäss für die Oxynitrilese (Nitrilese) gelten würde:

$$N_{\text{syn f}} = \frac{k}{g \text{ Enzympräparat}}$$

Über Gleichgewichte siehe 7. Kapitel.

Der erwähnte allgemeine Vorschlag zur Bezeichnung der enzymatischen Wirksamkeit eines Präparates lässt sich ohne weiteres nur auf diejenigen Fälle anwenden, in welchen die Reaktionsgeschwindigkeit durch eine Reaktionskonstante dargestellt werden kann — die wichtigste Reaktion, bei welcher dies nicht zutrifft, ist wohl die alkoholische Gärung. Für diesen Vorgang hat Willstätter und Steibelt²⁾ die Bestimmung der „Halbgärzeit“ vorgeschlagen, also der Zeit, welche erforderlich ist, um unter gewissen Bedingungen die Hälfte der theoretisch möglichen Menge CO₂ zu entwickeln. In manchen Fällen wird es vielleicht von Vorteil sein, einen kleineren Bruchteil der theoretischen Menge als die Hälfte, etwa 1/10 oder 1/20 in Betracht zu ziehen und so ein exaktes, durch Nebenreaktionen nicht gestörtes Mass für die Anfangsgeschwindigkeit zu gewinnen oder diese durch das Verhältnis ccm CO₂ : Zeit anzugeben.

Zur Charakteristik eines Enzyms ist die Angabe von Xf durch diejenige der Affinitätskonstante zu ergänzen. Die früher vorgeschlagene Bezeichnung K_M (Michaelis-Konstante) wird von nun an am besten als Affinitätskonstante [nicht wie z. B. von Euler und Myrbäck früher als Dissoziationskonstante³⁾] verwendet, also

$$K_M = \frac{[\text{Enzymsubstrat}]}{[\text{Enzym}] \times [\text{Substrat}]}$$

Vgl. hierzu Kap. 4.

¹⁾ Euler und Myrbäck, H. 136, 107; 1924.

²⁾ Willstätter und Steibelt, H. 115, 211; 1921.

³⁾ Die Dissoziationskonstante des Enzymsubstrats wird zweckmässig mit K_m bezeichnet. Es gilt also K_m = 1/K_M.

2. Kapitel.

Die Enzyme als Elektrolyte.

A. Elektrolytische Dissoziations-Gleichgewichte.

Nachdem van't Hoff die Gasgesetze auf Lösungen ausgedehnt hatte, gelang es Arrhenius der älteren Annahme von der Existenz freier Ionen einen so gefestigten und vertieften Inhalt zu geben, dass durch die Darstellung der elektrolytischen Dissoziationshypothese im Jahr 1887 zwei grosse Tat-sachengebiete miteinander verbunden wurden, nämlich die Abweichungen der Elektrolyte von den osmotischen Lösungsgesetzen (den van't Hoff'schen Koeffizienten i) und die elektrische Leitfähigkeit dieser Stoffe in Lösung bzw. ihr Dissoziationsgrad γ . Arrhenius stellte die beiden Grössen i und γ in die einfache Beziehung:

$$i = 1 + \gamma \quad \dots \dots \dots (1a)$$

Den Dissoziationsgrad γ eines Elektrolyten bei gegebener Verdünnung v setzte Arrhenius gleich dem Verhältnis zwischen der Leitfähigkeit bei dieser Verdünnung \mathcal{A}_v und derjenigen bei unendlicher Verdünnung, \mathcal{A}_∞ . Die Grundlage der Arrheniusschen Theorie bildet demgemäss der Satz:

$$\gamma = \frac{\mathcal{A}_v}{\mathcal{A}_\infty} \quad \dots \dots \dots (1b)$$

Das Gleichgewicht zwischen der Konzentration der Ionen in einer Lösung und des nicht dissoziierten Anteils eines Elektrolyten wurde nach dem Massenwirkungsgesetz berechnet, somit wurde die Gültigkeit der Gleichung angenommen:

$$\text{Dissoziationskonstante } K = \frac{[I]^2}{[U]} = \frac{[I]^2}{[T] - [I]} = \frac{\gamma^2}{(1 - \gamma)v} \quad \dots \dots \dots (2)$$

Hier bedeutet

[I] die Konzentration eines Ions eines binären Elektrolyten,

[U] die Konzentration des undissoziierten Anteiles,

[T] die Totalkonzentration des Elektrolyten,

γ , wie immer, den Dissoziationsgrad und

v das Volumen, in welchem 1 g-Molekül des Elektrolyten gelöst ist.

Dass bei starken Elektrolyten der nach (2) berechnete Dissoziationskoeffizient K keine konstante, von der Verdünnung unabhängige Grösse darstellt,

war schon lange bekannt, und diese Tatsache ist mehrfach zum Ausgangspunkt theoretischer Entwicklungen gemacht worden¹⁾. Aber erst in neuester Zeit konnte unter Berücksichtigung der zwischen Ionen wirksamen elektrostatischen Kräfte eine Lösungstheorie für Elektrolyte aufgestellt werden, welche bei weiterer Entwicklung vielleicht berufen ist, an Stelle der klassischen Dissoziationstheorie zu treten [Bjerrum²⁾, Debye³⁾].

Da diese neue Theorie aber erst im Entwurf vorliegt und weder ausgedehntere Anwendungen noch eingehendere experimentelle Prüfungen erfahren hat, muss sich die folgende Darstellung noch an die klassische Theorie anschliessen. Statt des Dissoziationsgrades führt Bjerrum drei Abweichungsfaktoren ein: Den osmotischen Faktor, den Leitfähigkeitsfaktor und den Aktivitätsfaktor.

1. Salze (starke Elektrolyte).

Für die Werte, welche man bei der Berechnung des Dissoziationsgrades von Salzen, starken Säuren und Basen bei wechselnden Verdünnungen nach Arrhenius (1b) erhält, gibt folgende Tabelle Beispiele:

Konzentration g Mol./Liter	Dissoziationsgrad in %			
	HCl	NaOH	KNO ₃	KAc
1,00	79	77	64	63
0,10	92	88	84	83
0,01	99	99	98	97

Versucht man mit diesen Zahlen im Sinne der Arrheniusschen Theorie nach (2) das Gleichgewicht zwischen Ionen und nicht dissoziierten Molekülen zu berechnen, so erhält man, wie bereits erwähnt, ganz unbefriedigende Resultate.

Von Rudolphi, van't Hoff, Kohlrausch und Nernst sind andere Formeln angegeben bzw. abgeleitet worden, auf die einzugehen hier zu weit führen würde.

Bjerrum hat zuerst klar ausgesprochen und begründet, dass bei den starken Elektrolyten von einem Gleichgewicht zwischen dissoziierten und nicht dissoziierten Molekülen überhaupt nichts bemerkbar ist, dass vielmehr gute Gründe bestehen, solche Elektrolyte bis zu grossen Konzentrationen als vollständig in Ionen zerfallen anzusehen.

„In neuerer Zeit — schreiben Debye und Hückel (l. c.) — hat sich unter dem Einflusse von Bjerrum der Eindruck befestigt, dass die Berücksichtigung der elektrostatischen Kräfte, welche die Ionen aufeinander ausüben und welche infolge der relativ enormen Grösse des elektrischen Elementarquantums stark ins Gewicht fallen sollen, die gesuchte Erklärung liefern muss. Von solchen Kräften ist in der klassischen Theorie nicht die Rede, sie behandelt vielmehr die Ionen als voneinander ganz unabhängige Bestandteile.“

¹⁾ Sutherland, Phil. Mag. 14. 1; 1907. — Milner, Phil. Mag. 23, 551; 1912 und 25, 743; 1913. — Gosh, JI Chem. Soc. 113, 449—790; 1918. — Zs physik. Chem. 98, 211; 1921.

²⁾ Bjerrum, Proc. Int. Congr. appl. Chem. X. 1909.

³⁾ Debye und Hückel, Physik. Zs 24, 185 und 800; 1923. — Debye, 25, 97; 1924.

Debye und Hückel stellen in ihrer ersten Mitteilung als Gesamtergebnis fest, „dass die Ansicht, wonach die starken Elektrolyte vollständig dissoziiert sind, sich vollständig bewährt“¹⁾.

2. Schwache Säuren und Basen.

Während starke binäre Elektrolyte in wässrigen Lösungen vollständig dissoziiert sind, beträgt der dissoziierte Anteil γ von schwachen Säuren und Basen bei Verdünnung von beispielsweise 1 g Mol per Liter weniger als 1%.

Als Beispiel dafür, wie der Dissoziationsgrad eines schwachen Elektrolyten mit der Verdünnung wächst, geben wir in folgender Tabelle für Essigsäure die Werte von γ an. Die Tabelle enthält ausserdem noch die Werte für das molekulare Leitvermögen Λ , aus welchem γ nach der Formel (1b) $\gamma = \Lambda_v / \Lambda_\infty$ berechnet ist. Die Werte von γ für $v = 10000$ bis 500000 sind aus der Dissoziationskonstante der Essigsäure $K = 0,0000177$ zurückberechnet²⁾.

Verdünnung v Liter	Normalität	Λ_v gef.	Temperatur 18°	
			γ	$[H^+] \times 10^6$
10	0,100	4,6	0,0132	1320
20	0,050	6,48	0,0186	930
100	0,0100	14,3	0,0412	412
500	0,0020	30,2	0,0868	174
1 000	0,0010	41,0	0,1180	118
10 000	0,0001	—	0,3414	34
100 000	0,00001	—	0,7120	7,1
500 000	0,000002	—	0,9070	1,8

In der Figur 1 b sehen wir die Beziehung zwischen Verdünnung (Volumen) und Dissoziationsgrad graphisch dargestellt.

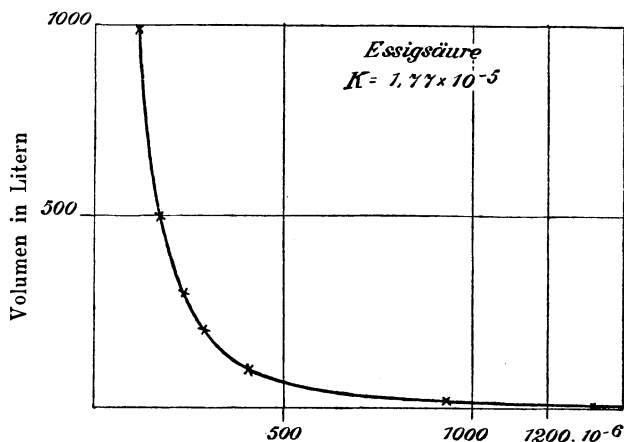


Fig. 1a. Konzentration der H⁺-Ionen.

¹⁾ S. a. Bjerrum, Zs f. Elektroch. 24, 231; 1918 u. Zs f. anorg. Chem. 109, 275; 1920.

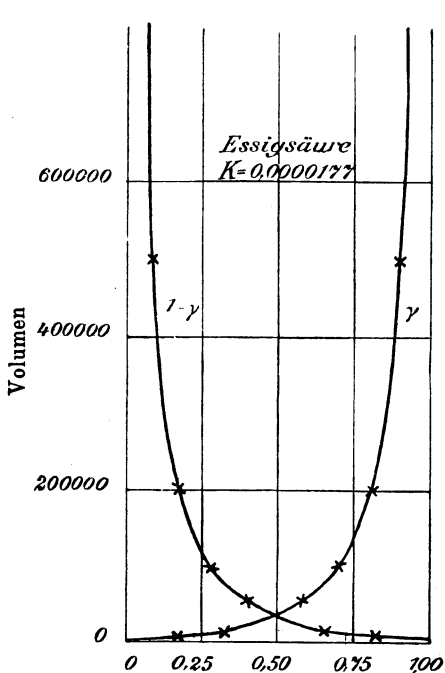
²⁾ Der angegebene Mittelwert $K = 1,77 \cdot 10^{-5} = 10^{-4,752}$ stimmt sehr gut mit dem Ergebnis der von Schreiner (Zs f. anorg. Chem. 115, 181 u. zw. 186; 1921) auf Veranlassung von Bjerrum vorgenommenen Neuberechnung.

Wir setzen voraus, dass das Massenwirkungsgesetz auf schwache binäre Elektrolyte angewandt werden kann¹⁾.

Betrachten wir als Elektrolyten z. B. Essigsäure, und bedeutet [A'] die Konzentration der Anionen der Essigsäure, und [H'] die Konzentration der Wasserstoffionen, so ist, da [H'] = [A'],

$$K = \frac{[H'] \cdot [A']}{[T] - [A']} \dots \dots \dots (2a)$$

In der folgenden Tabelle geben wir die Dissoziationskonstanten einiger biochemisch interessanter, schwacher und sehr schwacher Säuren an:



Milchsäure ²⁾	$K = 1,47 \cdot 10^{-4}$
Essigsäure	$1,77 \cdot 10^{-5}$
Kohlensäure ³⁾	$4,4 \cdot 10^{-7}$
Phenol ⁴⁾	$5,8 \cdot 10^{-11}$
Fructose ⁵⁾	$8,8 \cdot 10^{-13}$
Glucose ⁵⁾	$6,6 \cdot 10^{-13}$
Maltose ⁵⁾	$9,0 \cdot 10^{-13}$
Lactose ⁶⁾	$6,0 \cdot 10^{-13}$
Rohrzucker ⁶⁾	$2,4 \cdot 10^{-13}$
Formaldehyd ⁷⁾ (0°)	$1,4 \cdot 10^{-14}$
Acetaldehyd ⁸⁾ (0°)	$0,7 \cdot 10^{-14}$
α -Methylglucosid	$1,97 \cdot 10^{-14}$
Glycerin ⁶⁾	$7 \cdot 10^{-15}$

Im Anschluss hieran seien auch 2 Basen erwähnt:

Ammoniak	$K = 1,77 \cdot 10^{-5}$
Harnstoff	$= 1,2 \cdot 10^{-14}$

Die Zahlen gelten (abgesehen vom Formaldehyd und Acetaldehyd) für die Temperatur von 18°. Die Änderung der Dissoziationskonstante mit der Temperatur ist bei verschiedenen Stoffen sehr verschieden; Essigsäure ändert sich

zwischen 0° und 40° höchstens mit 2%, sehr schwache Elektrolyte haben dagegen oft starke Temperaturkoeffizienten.

Über Dissoziationskonstanten von Indicatoren siehe S. 58.

Enthalten die Lösungen schwacher Säuren und Basen gleichzeitig Neutralsalze, wie NaCl oder K₂SO₄, so ergeben sich die Dissoziations-

¹⁾ Eine starke Beeinflussung durch die verhältnismässig kleine Ionenkonzentration ist nicht wahrscheinlich.

²⁾ van Dam, Biochem. Zs 87, 107; 1918.

³⁾ Michaelis und Rona, Biochem. Zs 67, 182; 1914.

⁴⁾ Michaelis und Rona, Biochem. Zs 49, 232; 1912.

⁵⁾ Michaelis, Biochem. Zs 65, 360; 1914.

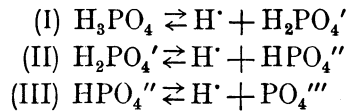
⁶⁾ Michaelis und Rona, Biochem. Zs 49, 232; 1912.

⁷⁾ Euler, Chem. Ber. 38, 2733; 1905 und 39, 36; 1906.

⁸⁾ Euler, Chem. Ber. 39, 344; 1906. Dasselbst auch die Dissoziationskonstante der Fructose und Glucose für 0°.

konstanten derselben grösser [nach Bjerrums Terminologie wird die „Aktivität“ der Säure-Ionen erhöht¹⁾]. Damit hängt der „Salzfehler“ der Indicatoren zusammen (Sörensen und Palitzsch 1910. — Kolthoff, l. c. S. 88).

Ternäre und höhere Elektrolyte. Bei mehrbasischen Säuren findet eine Dissoziation in mehreren Stufen statt. So treten bei der Orthophosphorsäure folgende Gleichgewichte auf:

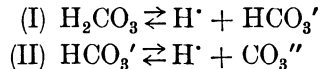


Die Dissoziation gemäss der ersten Gleichung ist so gross, dass K_1 sich, wie bei starken Säuren überhaupt, nicht berechnen lässt.

Für die Stufe (II) der Dissoziation ist nach Walker und Abbot bei 18° $K_2 = 2,0 \cdot 10^{-7}$; $\text{H}_2\text{PO}_4'$ ist also schwächer als Essigsäure.

Die Dissoziation nach Gleichung (III) ist sehr schwach, noch schwächer als bei Phenol, $K_3 = \text{ca. } 10^{-12}$. Wir werden auf die etwas komplizierten Dissoziationsverhältnisse der Phosphorsäure noch (S. 31) zurückkommen.

Dissoziation der Kohlensäure. Scheinbare und wahre Dissoziationskonstante. Als zweibasische Säure besitzt die Kohlensäure 2 Dissoziationskonstanten, welche den Gleichungen entsprechen:



Nun ist die freie Säure H_2CO_3 in wässriger Lösung weitgehend gespalten in CO_2 und H_2O , und steht mit diesen Molekülen bzw. — da $[\text{H}_2\text{O}]$ als konstant anzusehen ist — mit CO_2 im Gleichgewicht:

$$\frac{[\text{H}_2\text{CO}_3]}{[\text{CO}_2]} = K_h.$$

Für die Dissoziation (I) gilt die Gleichung:

$$\frac{[\text{H}^+] \cdot [\text{HCO}_3']}{[\text{H}_2\text{CO}_3]} = K_1.$$

Gemäss obiger Gleichung können wir statt $[\text{H}_2\text{CO}_3]$ setzen: $K_h \cdot [\text{CO}_2]$, und erhalten:

$$\frac{[\text{H}^+] \cdot [\text{HCO}_3']}{[\text{CO}_2]} = K_1 K_h = K.$$

K bezeichnet also hier die scheinbare Dissoziationskonstante: ihr Wert wurde von Michaelis und Rona zu $4,40 \cdot 10^{-7}$ ermittelt²⁾.

¹⁾ Vgl. Schreiner, Zs anorg. Chem. 115/181; 1921.

²⁾ Die wahre Dissoziationskonstante K_1 (siehe oben) der Kohlensäure ist nach Thiel (Chem. Ber. 47, 945; 1914) viel grösser, nämlich wenigstens $5 \cdot 10^{-4}$, also — wie auch zu erwarten, da Kohlensäure = Oxyameisensäure ist — weit grösser als die der Ameisensäure.

Auch die für Ammoniak in der Tabelle S. 22 angegebene Dissoziationskonstante ist die scheinbare; die Beziehung derselben zur wahren Konstanten ist die gleiche, wie bei der Kohlensäure.

Über die Dissoziationsverhältnisse bei zweibasischen Säuren siehe Bjerrum, Zs physik. Chem. 106; 1923.

3. Das Wasser.

Wir setzen als bekannt voraus, dass das Wasser elektrolytisch in H- und HO-Ionen dissoziiert ist. Bezüglich der Messung dieser wichtigen Dissoziation sei auf die Lehrbücher der physikalischen Chemie und auf die Monographie von Lundén¹⁾ verwiesen.

Man pflegt für das Wasser nicht die Dissoziationskonstante anzugeben, also nicht

$$\frac{[H'] [HO']}{[H_2O]},$$

wo mit [] die Konzentrationen bezeichnet werden, und $[H_2O] = 55,43$ die Anzahl Moleküle im Liter Wasser bedeutet; vielmehr gibt man fast stets das sog. „Ionenprodukt“ $[H'] \cdot [HO']$ des Wassers an und bezeichnet dieses mit K_w .

Nach dem Gesetz der Massenwirkung muss nämlich in jeder verdünnten wässrigen Lösung bei bestimmter Temperatur $\frac{[H'] [HO']}{[H_2O]}$ konstant sein und, da $[H_2O]$ konstant ist, folglich auch gelten:

$$K_w = [H'] [HO'] = \text{konst.} \dots \dots \dots (3)$$

Das Produkt K_w ist schon in der ersten Zeit der Dissoziationstheorie sowohl durch Bestimmungen des Hydrolysegrades (Arrhenius, Bredig, Noyes; Lundén u. a.) als durch elektrische Messungen (Kohlrausch-Heydweiller, Ostwald, Nernst) ermittelt worden, wobei sich eine sehr bemerkenswerte Übereinstimmung in den Ergebnissen der verschiedenen Messmethoden gezeigt hat. Mit der Methode der Konzentrationsketten sind später sehr genaue Messungen von Sörensen²⁾ und von Michaelis³⁾ angestellt worden. Die folgende Tabelle gibt eine Zusammenstellung der Resultate von Kohlrausch, Lundén und Michaelis für mehrere Temperaturen.

Ionenprodukt des Wassers.

Die Zahlen sind mit 10^{-14} multipliziert.

Autor	Methode	Temperatur				
		0°	10°	18°	25°	40°
Kohlrausch	Leitfähigk. d. Wassers	0,12	0,31	0,64	1,11	3,26
Lundén	Hydrolyse	0,12	0,31	0,62	1,05	2,94
Michaelis	Konzentrations-Ketten	—	—	0,74	1,27	3,80

¹⁾ Lundén, Affinitätsmessungen an schwachen Säuren und Basen. Dissertation, Stockholm 1908. — Samml. chem. und chem.-techn. Vorträge. Stuttgart 1908.

²⁾ Sörensen, Biochem. Zs 21, 131; 1909.

³⁾ Michaelis, Die Wasserstoffionen-Konzentration. 2. Aufl. Berlin, 1922.

Sørensen hatte mit der Methode der Konzentrationsketten für 18° gefunden: $K_w = 0,73 \cdot 10^{-14}$.

Drückt man die wahrscheinlichsten Werte des Ionenproduktes des Wassers in Dissoziationsexponenten aus, so erhält man:

Temperatur	0°	18°	25°	40°
Dissoziationsexponent	14,93	14,18	13,90	13,42

Neutralität. Eine Lösung, welche ebenso viele H- wie HO-Ionen enthält, nennen wir neutral. Die Konzentrationen der H- und HO-Ionen sind aus der obigen Tabelle zu entnehmen; es sind die Wurzeln der dort für das Ionenprodukt angegebenen Werte.

Bei 18° ist also in einer neutralen Lösung nach Sørensen

$$[\text{HO}'] = [\text{H}'] = 0,85 \cdot 10^{-7}; \log [\text{H}'] = -7,07 \text{ oder } \text{pH} = 7,07.$$

Durch diese Bedingung ist die Neutralität einer verdünnten Lösung eindeutig und zureichend definiert.

Aus den für K_w gewonnenen Zahlenwerten ist es also möglich, die Hydroxylionen-Konzentration $[\text{HO}']$ einer Lösung zu berechnen, wenn die Konzentration der Wasserstoffionen, $[\text{H}']$, bekannt ist.

Von erheblichem Interesse ist auch die Dissoziationskonstante des Äthylalkohols in H^+ und $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}'$. Im Laboratorium von Lewis haben neuerdings Danner und Hildebrand¹⁾ diese Dissoziation zu bestimmen versucht und kommen durch elektrometrische Messungen zu einem Dissoziationsgrad, welcher etwa $1/100$ desjenigen des Wassers beträgt.

Bezeichnungsweise für die Acidität einer Lösung.

Aus Gründen der Zweckmässigkeit wird man, soweit als möglich, immer die Wasserstoffionen-Konzentration einer Lösung angeben, auch dann, wenn die Lösung alkalisch reagiert.

Nach einem Vorschlag von Sørensen bezeichnet man die Konzentration der Wasserstoffionen dadurch, dass man den dekadischen Logarithmus (also die Potenz von 10) ihres Normalitätsfaktors angibt, und zwar unter Fortlassung des negativen Vorzeichens, da ja, im Gebiet der Biochemie wenigstens, ein positives Vorzeichen nie in Betracht kommt. Diese Zahl nennt Sørensen „Wasserstoffionenexponent“ oder kurzweg „Wasserstoffexponent“, und bezeichnet sie mit pH .

Nach der erwähnten, nunmehr allgemein gebräuchlichen Bezeichnungsweise wird also bei

$[\text{H}'] = 0,01$	oder	$1 \cdot 10^{-2}$	$\text{pH} = 2,00$
$[\text{H}'] = 0,005$	„	$5 \cdot 10^{-3}$	$\text{pH} = 2,30$
$[\text{H}'] = 0,000\,000\,085$	„	$0,85 \cdot 10^{-7}$	$\text{pH} = 7,07.$

¹⁾ Danner und Hildebrand, JI Am. Chem. Soc. 44, 2832; 1922.

Da ferner

$$[H^+][HO'] \text{ für } 18^\circ = 0,73 \cdot 10^{-14},$$

so wird,

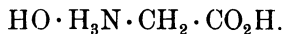
$$\text{wenn } [HO'] = 10^{-3}, \text{ also } [H^+] = 0,73 \cdot 10^{-11} \quad p_H = 11,14.$$

In diesem Zusammenhang wollen wir die Aciditäten einiger biologisch und enzymologisch wichtigen Flüssigkeiten angeben:

Flüssigkeit	[H ⁺]	p _H	Autor
Venöses Blut (Mensch) (37°)	4,5 · 10 ⁻⁸	7,35	Hasselbalch ¹⁾
Arter. Blut (Mensch) (37°)	3,5 · 10 ⁻⁸	7,45	"
Harn	10 ⁻⁵ —10 ⁻⁷	5—7	Michaelis, Monogr.
Kuhmilch	1,4—3,2 · 10 ⁻⁷	6,9—6,5	van Dam ²⁾
"	2,69 · 10 ⁻⁷	6,57	Davidsohn ³⁾
"	3,2 · 10 ⁻⁷	6,51	Svanberg ⁴⁾
Frauenmilch	1 · 10 ⁻⁷	7,0	Davidsohn ³⁾
"	6,4 · 10 ⁻⁸	7,2	A. Szili ⁵⁾
"	2,2 · 10 ⁻⁸	7,66	Foà ⁶⁾
Muskelsaft	1 · 10 ⁻⁷	7,0	
Magensaft	1,7 · 10 ⁻²	1,77	Michaelis u. Davidsohn ⁷⁾
Speichel (18°)	1,2 · 10 ⁻⁷	6,9	Michaelis u. Pechstein ⁸⁾

4. Amphotere Elektrolyte.

Unter amphoteren Elektrolyten oder Ampholyten versteht man bekanntlich solche Stoffe, welche vermöge verschiedener Gruppen ihres Moleküls als Säuren und als Basen fungieren⁹⁾. Sie spalten (in dissoziierenden Lösungsmitteln) sowohl H- als HO-Ionen ab. Die hier in Betracht kommende Klasse der Ampholyte kann durch das Schema HO·R·H dargestellt werden; das einfachste Beispiel ist Glykokoll



¹⁾ Hasselbalch, Biochem. Zs 49, 451; 1913. — Siehe auch Michaelis, Monogr. S. 99 u. ff. Die ersten brauchbaren Resultate verdankt man Höber, Pflüg. Arch. 81, 522; 1900 und 99, 572; 1903.

²⁾ van Dam, H. 58, 295; 1908.

³⁾ Davidsohn, Zs f. Kinderheilk. 9, 11; 1913.

⁴⁾ Svanberg, Dissertation, Stockholm 1918.

⁵⁾ Szili, Biochem. Zs 84, 194; 1917.

⁶⁾ Foà, Arch. di fisiol. 3, 369; 1906.

⁷⁾ Michaelis und Davidsohn, Zs f. exp. Path. u. Ther. 8, 2; 1910.

⁸⁾ Michaelis und Pechstein, Biochem. Zs 59, 77; 1914.

⁹⁾ Literatur: Bredig, Zs f. Elektrotech. 6, 33; 1899 u. Chem. Ber. 37, 4140; 1904. — Walker, Zs f. physik. Chem. 49, 82; 1904. — 51, 708; 1905. — 57, 600; 1906. — Lundén, Affinitätsmessungen, Dissertation, Stockholm 1908 u. Samml. Ahrens, 1908. Dasselbst eine Zusammenstellung der Dissoziationskonstanten. Wir folgen zunächst der Darstellung dieses Verfassers bzw. Walkers.

Für die folgenden Rechnungen führen wir nachstehende Bezeichnungen ein :

Moleküle und Ionen . . .	HORH	'R'	HR'	'ROH	H'	HO'
Konzentrations-Bezeichnung	$\underbrace{e \quad f}_{e + f = u}$		d	c	a	b

Das Molekül R könnte als ein inneres Salz aufgefasst werden, entstanden durch innere Neutralisation: $HO \cdot R \cdot H = R + H_2O$, oder (vgl. S. 33) als ein durch die Dissoziationen: $'ROH \rightleftharpoons 'R + HO'$ und $HR' \rightleftharpoons H' + 'R'$ gebildetes Molekül angesehen werden. Welche von diesen Auffassungen man annehmen will, ist für die folgenden Rechnungen ganz gleichgültig.

Nach dem Gesetz der Massenwirkung haben wir:

Gleichgewichte	Gleichungen
$H' + HO' \rightleftharpoons H_2O$	$a \cdot b = K_w \quad$ (Am 1)
$HO' + HR' \rightleftharpoons HROH$	$b \cdot d = K_b' \cdot e \quad$ (Am 2)
$H' + 'ROH \rightleftharpoons HROH$	$a \cdot c = K_a' \cdot e \quad$ (Am 3)
$HR' + 'ROH \rightleftharpoons 2'R' + H_2O$	$c \cdot d = Q \cdot f^2 \quad$ (Am 4)
	$b \cdot d = K_b \cdot u \quad$ (Am 5)
	$a \cdot c = K_a \cdot u \quad$ (Am 6)

Die totale Konzentration $A = e + f + d + c = u + d + c \quad . .$ (Am 7)

Die Bedingung für elektrische Neutralität ist

$$a + d = b + c \quad$$
 (Am 8)

K_a und K_b sind die experimentell bestimmbaren Dissoziationskonstanten (als Säure und Base). Die „wahren“ Dissoziationskonstanten K_a' und K_b' können nicht aus Leitfähigkeitsmessungen oder Hydrolysenmessungen berechnet werden (vgl. was oben über Kohlensäure gesagt wurde). Aus den Gleichungen (Am 1—4) folgt

$$K_w = \frac{K_a' \cdot K_b' \cdot e^2}{Q \cdot f^2}.$$

Das Verhältnis e/f und folglich auch e/u ist also von der Verdünnung unabhängig; hieraus folgt, dass die experimentell bestimmbaren Dissoziationskonstanten K_a und K_b auch von der Verdünnung unabhängig sind, und also wirkliche Konstanten darstellen. Aus den Gleichungen (Am 1, 5, 6) folgt

$$d = \frac{K_b}{K_w} \cdot u \cdot a \quad$$
 (Am 9)

$$c = \frac{K_a}{K_w} \cdot u \cdot b \quad$$
 (Am 10)

und aus (Am 8, 9, 10)

$$a = \sqrt{\frac{K_w + K_a \cdot u}{1 + \frac{K_b}{K_w} \cdot u}} \quad$$
 (Am 11)

Aus den Konstanten K_a und K_b kann man durch sukzessive Annäherung die Ionenkonzentrationen a , b , c , d berechnen oder umgekehrt aus diesen Ionenkonzentrationen (die mittels Messungen der Leitfähigkeit oder der Katalyse bestimmbar sind) die Konstanten. In erster Annäherung setzt man nämlich u (Konzentration der undissoziierten Substanz) gleich A (die totale Konzentration). Bei der Berechnung der folgenden Tabelle durch Walker¹⁾ genügte gewöhnlich der zweite Näherungswert, bei welchem für u der bei der ersten Berechnung erhaltene Wert angenommen wurde.

$$K_a = 10^{-5}.$$

Die Zahlen für a und d sind mit 10^5 multipliziert.

$\frac{K_b}{K_w}$	0		1		10		100		1000	
v	a	d	a	d	a	d	a	d	a	d
1	316	0	224	223	95,3	934	31,5	2960	9,99	8330
10	100	0	95	8,5	70,5	69,0	30,1	283	9,94	830
100	31,2	0	31,0	0,3	29,7	2,9	22,0	20,6	9,44	79
1000	9,5	0	9,5	0,0	9,4	0,1	9,06	0,8	6,73	5,5

Aus diesen Zahlen können folgende Schlüsse gezogen werden:

1. Die H^+ -Konzentration sinkt bei gegebener Verdünnung mit steigender Basenkonstante (K_b).

2. Die HR^+ -Konzentration nimmt viel schneller als die H^+ -Konzentration mit der Verdünnung ab.

3. Für grössere Werte von K_b ist die H^+ -Konzentration beinahe unabhängig von der Verdünnung.

4. Bei amphoteren Elektrolyten ist die Acidität (bzw. die Basizität) stark vermindert. Für $K_a = 10^{-5}$ und $K_b = 10^{-11}$ ist bei $v = 10$ die H^+ -Konzentration nur ein Zehntel von der einer einfachen Säure mit derselben Dissoziationskonstanten, obwohl der Wert von K_a noch 1000000-mal grösser ist als K_b .

Wir geben hier die Dissoziationskonstanten einiger Ampholyte für 25° an, sowie die isoelektrischen Punkte nach Michaelis (siehe Abschnitt 5, S. 35).

Amphoterer Elektrolyt	Säure-dissoziationskonstante K_a	Basendissoziationskonstante K_b		Autor	Isoelektrischer Punkt
		Erste	Zweite		
Glykokoll . . .	$1,8 \times 10^{-10}$	$2,7 \times 10^{-12}$	—	Winkelblech ²⁾	$2,6 \cdot 10^{-7}$
Alanin	$1,9 \times 10^{-10}$	$5,1 \times 10^{-12}$	—		$1,9 \cdot 10^{-7}$
Leucin	$1,8 \times 10^{-10}$	$2,3 \times 10^{-12}$	—		$2,9 \cdot 10^{-7}$
Lysin	1×10^{-11}	$\geq 1 \times 10^{-7}$	$1,1 \times 10^{-12}$	Kanitz ³⁾	$6,2 \cdot 10^{-8}$
Arginin	$< 1 \times 10^{-14}$	$> 1 \times 10^{-7}$	$2,2 \times 10^{-12}$		
Histidin	$2,2 \times 10^{-9}$	$5,7 \times 10^{-9}$	5×10^{-13}		

¹⁾ Walker, Zs f. physik. Chem. 49, 82; 1904.

²⁾ Winkelblech, Zs f. physik. Chem. 36, 546; 1901.

³⁾ Kanitz, H. 47, 476; 1906.

Amphoterer Elektrolyt	Säure-dissoziationskonstante K_a	Basendissoziationskonstante K_b		Autor	Isoelektrischer Punkt
		Erste	Zweite		
Phenylalanin . . .	$2,5 \times 10^{-9}$	$1,3 \times 10^{-12}$	—	} Kanitz ¹⁾	$4,4 \cdot 10^{-6}$
Thyrosin . . .	4×10^{-9}	$2,6 \times 10^{-12}$	—		} Euler ²⁾ Dernby ³⁾
Glycylglycin . . .	$1,8 \times 10^{-8}$	2×10^{-11}	—	} Euler ²⁾	
" . . .	—	$1,6 \times 10^{-11}$	—		} Euler ²⁾
Leucylglycin . . .	$1,5 \times 10^{-8}$	3×10^{-11}	—		
Alanylglycin . . .	$1,8 \times 10^{-8}$	2×10^{-11}	—		

Neuere wertvolle Messungen an Aminosäuren und Polypeptiden verdankt man L. J. Harris (Proc. Roy. Soc. B. 95; 1923).

5. Die Dissoziationsrestkurve.

Bei seinen Arbeiten über die elektrolytische Dissoziation der Enzyme hat Michaelis den Dissoziationsrest vielfach mit Erfolg zu Berechnungen verwendet, und wir wollen nun diese Grösse in engem Anschluss an Michaelis⁴⁾ näher besprechen.

Die S. 19 angegebene Formel gibt uns den Dissoziationsgrad als Funktion der Gesamtkonzentration des Elektrolyten an.

Nun kann man den Dissoziationsgrad γ einer Säure auch als Funktion von $[H^+]$ ausdrücken: dann ist

$$\gamma = \frac{K}{K + [H^+]} = \frac{1}{1 + \frac{[H^+]}{K}} \dots \dots \dots (4)$$

Diese Funktion ist für Essigsäure in Figur 2 dargestellt; zum Vergleich ist diese Beziehung auch für eine stärkere und eine schwächere Säure ($K = 1 \cdot 10^{-4}$ und $1 \cdot 10^{-7}$) angegeben⁵⁾.

K bezeichnen wir als den Parameter dieser Funktion.

In manchen Fällen ist es einfacher, mit dem undissoziierten Teil des Elektrolyten, $1 - \gamma = \varrho$, dem „Dissoziationsrest“ zu rechnen.

Es ist dann für eine Säure

$$\varrho = 1 - \frac{K}{K + [H^+]} = \frac{[H^+]}{K + [H^+]} = \frac{1}{1 + \frac{K}{[H^+]}} \dots \dots \dots (5)$$

Ebenso ist für eine Base $\varrho = \frac{1}{1 + \frac{K}{[HO^+]}} \dots \dots \dots (5b)$

¹⁾ Kanitz, Pflüg. Arch. 118, 539; 1907.
²⁾ Euler, H. 51, 219; 1907.
³⁾ Dernby, Medd. Carlsb. Lab. 11, 239; 1916. Die Säuredissoziationskonstante für 18° gibt Dernby zu $3,3 \cdot 10^{-9}$ an.
⁴⁾ Michaelis, Bioch. Zs 33, 182; 1911.
⁵⁾ Man ersieht aus den Kurven der Figur 2 die Bedeutung der Dissoziationskonstante: Sie ist bei halber Dissoziation ($\gamma = 0,5$) gleich der Konzentration $[H^+]$.

Für den speziellen Fall $[H'] = K$ wird $\varrho = 0,5$. Umgekehrt, für $\varrho = 0,5$ wird stets $[H'] = K$ (5c)

Statt wie in (4) bzw. in Fig. 2 den Dissoziationsgrad in seiner Abhängigkeit von $[H']$ darzustellen, wollen wir nun den Logarithmus von $[H']$ in die Betrachtung einführen.

Bezeichnen wir nach Michaelis $[H']$ mit h , so erhalten wir aus (4)

$$\gamma = \frac{K}{K + h} = \frac{K}{K + 10^{-pH}}, \dots \dots \dots (6)$$

wo p den Modul der dekadischen Logarithmen, 2,303, bezeichnet.

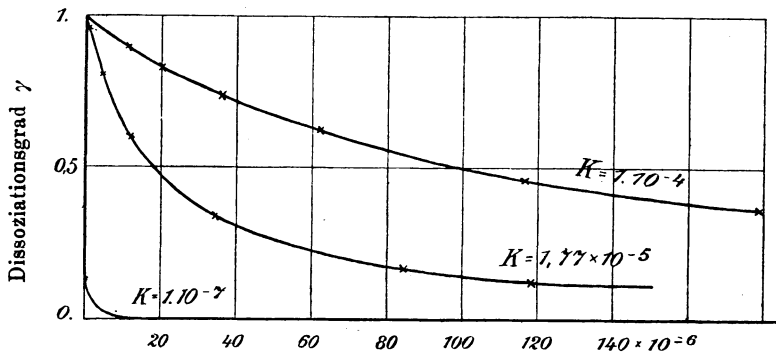


Fig. 2. Konzentration der H-Ionen.

In analoger Weise erhalten wir für

$$\varrho = 1 - \gamma = \frac{h}{K + h} = \frac{1}{\frac{K}{h} + 1} = \frac{10^{-pH}}{K + 10^{-pH}} \dots \dots \dots (7)$$

Graphisch erhalten wir in Figur 3 die folgenden Kurven.

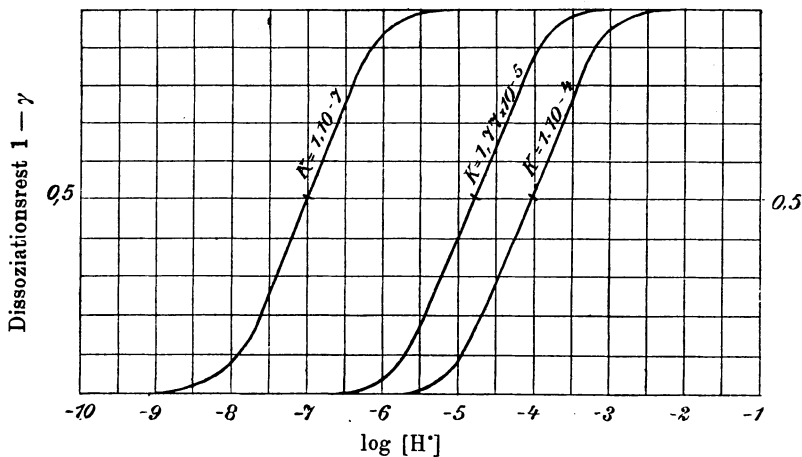


Fig. 3. Ordinate ist im Verhältnis zu Abszisse 5 mal vergrößert.

Wir sehen aus der Figur 3, dass Anfang und Ende eine Asymptote zur Abszisse bzw. zu einer zur Abszisse parallelen Linie ist. Der mittlere Teil der

Kurve ist eine annähernd gerade Linie, welche die Ordinate unter einem charakteristischen Winkel schneidet. Die Mitte dieser geraden Strecke enthält den Wendepunkt der Kurve.

Anwendung der Formeln (4) und (5) auf mehrbasische Säuren.

Für die Aufgabe, den Dissoziationsgrad einer mehrbasischen Säure bei einem gegebenen Wert von $[H^*]$ zu bestimmen, hat Michaelis folgende Lösung angegeben: Angenommen, es soll für Phosphorsäure bei $[H^*] = 10^{-7}$ der Quotient

$$\frac{[HPO_4'']}{[H_3PO_4] + [H_2PO_4'] + [HPO_4''] + [PO_4''']}$$

ermittelt werden.

Das Molekül H_3PO_4 kann niemals in erheblicher Menge existieren, da es als starke Säure unter allen Umständen im Sinne der Gleichung $H_3PO_4 = H^* + H_2PO_4'$ weitgehend dissoziiert ist. Andererseits können wir die Menge des PO_4''' aus den Gleichungen (II) und (III) S. 23 abschätzen. Unter Anwendung der Bedingung (5c) finden wir, dass der dritte Dissoziationsgrad

$$\gamma_3 = \frac{[PO_4''']}{[HPO_4''] + [PO_4''']}$$

den Wert 0,5 annimmt, wenn $[H^*] = K$, also wenn $[H^*] = 10^{-12}$. Bei 10^{-10} muss dann γ_3 schon recht klein sein, und bei 10^{-7} ist es vollkommen zu vernachlässigen. Die gesamte gelöste Phosphorsäure besteht also bei $[H^*] = 10^{-7}$ nur aus HPO_4'' - und H_2PO_4' -Ionen. Wir können also in obiger Gleichung die beiden Molekülarten H_3PO_4 und PO_4''' vernachlässigen, und der obige Quotient lässt sich daher mit Hilfe der zweiten Dissoziationskonstante K_2 berechnen: Es ist für 18° (annähernd)

$$\frac{[HPO_4'']}{[H_3PO_4] + [H_2PO_4'] + [HPO_4''] + [PO_4''']} = \frac{K_2}{K_2 + [H^*]} = \frac{2 \cdot 10^{-7}}{2 \cdot 10^{-7} + 10^{-7}} = \frac{2}{3}$$

In manchen Fällen ist es zweckmässig, den Dissoziationsgrad mehrbasischer Säuren folgendermassen zu definieren: der primäre Dissoziationsgrad γ_1 einer zweiwertigen Säure ist das Verhältnis der einfach geladenen Ionen zur Gesamtmenge der Säure; der sekundäre Dissoziationsgrad γ_2 ist das Verhältnis der doppelt geladenen Ionen zur Gesamtmenge Säure.

Zur Berechnung dreibasischer Säuren siehe auch D. D. van Slyke (Jl. Biol. Chem. 53, 269; 1922).

Anwendung der Formeln (4) und (5) auf amphotere Elektrolyte.

Wegen der Bedeutung der Formeln (4) und (5) für die Enzymchemie muss ihre Anwendung auf die theoretische Behandlung der Ampholyte hier ausführlich referiert werden¹⁾.

Wir beginnen mit der Betrachtung des Dissoziationsrestes, der als das Verhältnis des undissoziierten Anteiles u zur Gesamtmenge A des Ampholyten definiert wird.

¹⁾ Michaelis, Biochem. Zs 33, 182; 1911.

Der Ampholyt tritt

1. als Anion auf; wir wollen dessen Konzentration, wie S. 27, mit $[\text{ROH}]$ und die Dissoziationskonstante mit K_a bezeichnen;

2. als Kation; die Konzentration sei wieder $[\text{HR}']$ und die Konstante K_b .

Dann wird

$$\varrho = \frac{[u]}{[A]} = \frac{[A] - [\text{ROH}] - [\text{HR}']}{[A]} \dots \dots \dots (8)$$

Der Dissoziationsgrad muss 1. in bezug auf die Anionen, 2. in bezug auf die Kationen angegeben werden.

Es soll hier damit wieder das Verhältnis der Ionen (Anionen bzw. Kationen) zur Gesamtmenge des Ampholyten verstanden werden.

Es gelten also nach dem Massenwirkungsgesetz die Gleichungen:

$$[\text{H}'] [\text{ROH}] = K_a \cdot u$$

$$[\text{HR}'] [\text{HO}'] = K_b \cdot u.$$

Also ist

$$[\text{ROH}] = K_a \cdot \frac{u}{[\text{H}']}$$

und

$$[\text{HR}'] = K_b \cdot \frac{u}{[\text{HO}']},$$

somit

$$[u] = [A] - [\text{HR}'] - [\text{ROH}] = [A] - \frac{K_a [u]}{[\text{H}']} - \frac{K_b [u]}{[\text{HO}']},$$

Hieraus folgt:

$$[u] = \frac{[A]}{1 + \frac{K_a}{[\text{H}']} + \frac{K_b}{[\text{HO}']}},$$

und der gesuchte Wert

$$\varrho = \frac{[u]}{[A]} = \frac{1}{1 + \frac{K_a}{[\text{H}']} + \frac{K_b}{[\text{HO}']}} \dots \dots \dots (9)$$

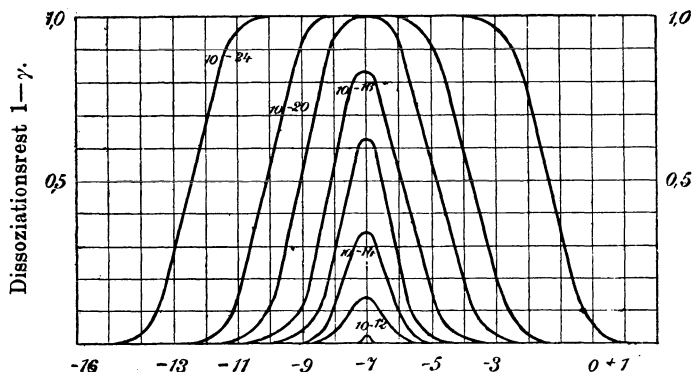
Durch Einsetzen von $\frac{K_w}{[\text{H}']}$ statt $[\text{HO}']$ erhalten wir schliesslich:

$$\varrho = \frac{1}{1 + \frac{K_a}{[\text{H}']} + \frac{K_b}{K_w} \cdot [\text{H}']} \dots \dots \dots (10)$$

Diese Gleichung stellt den Dissoziationsrest eindeutig als Funktion der Wasserstoffionenkonzentration dar.

Wählen wir nun wieder für die graphische Darstellung nicht $[\text{H}']$, sondern $\log [\text{H}']$, so gelangen wir zu den folgenden Dissoziationsrestkurven für Ampholyte.

„Je nach der Grösse der beiden Dissoziationskonstanten eines Ampholyten werden nun die Einzelheiten dieser Kurve in charakteristischer Weise verändert, und zwar ist das massgebende Moment das Produkt $K_a \cdot K_b$ (Fig. 4). Ist dieses im Vergleich zu K_w sehr klein, also etwa 10^{-30} , so erstreckt sich die Maximumerhebung der Kurve über ein sehr weites Gebiet. Wird $K_a \cdot K_b$ grösser, etwa 10^{-18} , so wird die Erhebungszone der Kurve immer kleiner, so dass man einen Maximumpunkt deutlich erkennen kann. Bei noch weiterer Vergrösserung von $K_a \cdot K_b$, wenn dieser Wert etwa $= K_w = 10^{-14}$ wird, erhebt sich dieser Maximumpunkt immer weniger; solche Ampholyte, und auch solche mit noch grösserem $K_a \cdot K_b$, scheinen aber in der Natur nicht vorzukommen.“

Fig. 4. $\log [H^+]$.

Bjerrum¹⁾ hat neuerdings versucht, die Annahme einzuführen, dass die undissoziierten Moleküle einer typischen Gruppe der Ampholyte, nämlich der Aminosäuren, gleichzeitig positiv und negativ geladen sind und hat auf dieser Grundlage die Dissoziationskonstanten der Aminosäuren zahlenmässig berechnet.

Nach der älteren Anschauung existiert eine Aminosäure $H_2N \cdot R \cdot COOH$ in drei Formen:

als Kation	$^+H_2N \cdot R \cdot COOH$,
als ungeladenes Molekül	$H_2N \cdot R \cdot COOH$
und als Anion	$H_2N \cdot R \cdot COO^-$.

Das Verhältnis zwischen diesen drei Formen variiert mit der H-Ionen-Konzentration h der Lösung. Es seien ^+A , A und A^- die Konzentrationen dieser Formen und H^+ , bzw. OH^- die Konzentrationen der Wasserstoffionen und Hydroxylionen. Unter diesen Umständen wird die Säuredissoziationskonstante k_a definiert durch

$$\frac{A^- \cdot H^+}{A} = k_a$$

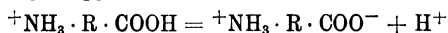
und die Basendissoziationskonstante k_b , durch

$$\frac{^+A \cdot OH^-}{A} = k_b.$$

Nach der neuen Anschauung existiert eine Aminosäure in Lösung, wie oben, teils als Kation $^+NH_3 \cdot R \cdot COOH$, bzw. Anion $NH_2 \cdot R \cdot COO^-$, ausserdem aber als Zwitterion

¹⁾ Bjerrum, Zs physik. Chem. 104, 147; 1923.

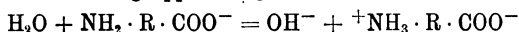
$^+\text{NH}_3 \cdot \text{R} \cdot \text{COO}^-$. Wir wollen die Konzentration der letzten Form mit $^+\text{A}^-$ bezeichnen¹⁾. Die Dissoziation der Carboxylgruppe erfolgt dann nach der Gleichung:



und für die entsprechende Säuredissoziationskonstante K_s gilt

$$\frac{^+\text{A}^- \cdot \text{H}^+}{^+\text{A}} = K_s.$$

Die Dissoziation der Aminogruppe erfolgt nach



und für die entsprechende Basendissoziationskonstante K_B gilt

$$\frac{^+\text{A}^- \cdot \text{OH}^-}{\text{A}^-} = K_B.$$

Kennt man die alten k_a - und k_b -Werte, so ist es leicht, die neuen Dissoziationskonstanten K_s und K_B zu berechnen, denn A der alten Vorstellung ist gleich $^+\text{A}^-$ der neuen; aus den 4 angegebenen Gleichungen erhält man daher:

$$K_s = \frac{K_w}{k_b}, \quad K_B = \frac{K_w}{k_a} \quad (5)$$

Hier bedeutet K_w die Dissoziationskonstante des Wassers.

Wenn eine Säure oder Base die Dissoziationskonstante K besitzt, so ist bekanntlich die Hydrolysenkonstante ihrer Salze gleich $\frac{K_w}{K}$. Aus den letzten Gleichungen geht also hervor, dass K_s , die neue für die Carboxylgruppe charakteristische Dissoziationskonstante, identisch ist mit der Hydrolysenkonstante, die der alten Basendissoziationskonstante k_b entspricht, und ferner, dass K_B , die neue für die Aminogruppe charakteristische Dissoziationskonstante identisch ist mit der Hydrolysenkonstante, die der alten Säuredissoziationskonstante k_a entspricht. Durch die geänderte Auffassung der Konstitution des Aminosäuremoleküls wird die Konstante, die früher die Funktion der Aminogruppe darstellte, zu einer für die Carboxylgruppe charakteristischen Konstante und umgekehrt.

Betrachtet man nun die Zahlenwerte der alten und der neuen Säurekonstanten, so besitzen die meisten aliphatischen Aminosäuren Säurekonstanten von etwa 10^{-8} bis 10^{-10} . „Diese Werte sind aber sehr unwahrscheinlich; denn diese Säuren sind alle (mit Ausnahme von Taurin) Carbonsäuren, und die meisten der bekannten Carbonsäuren haben Säurekonstanten von der Größenordnung 10^{-2} bis 10^{-5} . . . Nach der neueren Anschauungsweise erhalten die Säurekonstanten Werte von etwa $10^{-1,5}$ bis $10^{-3,5}$. Diese Werte liegen zwar etwas höher als diejenigen, welche man gewöhnlich bei Carbonsäuren begegnet; eine gewisse Verstärkung der Säurefunktion der Carboxylgruppe ist aber bei diesen Aminosäuren auch zu erwarten. Wenn man das Dissoziationsschema der Essigsäure mit dem der Carboxylgruppe des Glycins vergleicht, so wird sogleich ersichtlich, dass die positiv geladene Ammoniumgruppe des Glycins durch die elektrische Abstossung die Abspaltung des Wasserstoffions erleichtern und so die Acidität der Carboxylgruppe erhöhen muss.“

Die weitere Prüfung und Entwicklung der erwähnten Auffassung ist vielleicht für die physikalische Chemie der Eiweisskörper und Enzyme, welche wohl zum Teil als Ampholyte anzusehen sind, nicht ohne Bedeutung.

¹⁾ In Übereinstimmung mit der Hypothese, nach welcher Neutralsalze, wie NaCl, NH_4NO_3 , vollständig ionisiert sind, berücksichtigen wir nicht die Form



und in Einklang mit den herrschenden Anschauungen nehmen wir an, dass die Hydratation von $-\text{NH}_2$ zu $-\text{NH}_3 \cdot \text{OH}$ gering ist.

6. Der isoelektrische Punkt.

Für amphotere Elektrolyte kann eine Acidität ermittelt werden, bei welcher diese Stoffe gleichmässig zum negativen und zum positiven Pol wandern; sie bilden dann also ebenso viele positiv wie negativ geladene Moleküle, sie sind bei dieser Acidität „isoelektrisch“¹⁾. Mit anderen Worten: Beim isoelektrischen Punkt bildet ein Ampholyt ebensoviel Anionen als Kationen. Die Lage des isoelektrischen Punktes ist nun folgendermassen definiert:

$$K_a u = [H'] \cdot [ROH] \quad \dots \dots \dots \quad (I. 1)$$

$$K_b u = [HO'] \cdot [HR'] \quad \dots \dots \dots \quad (I. 2)$$

Durch Division:

$$\frac{K_a}{K_b} = \frac{[H']}{[HO']} \cdot \frac{[ROH]}{[HR']} \quad \dots \dots \dots \quad (I. 3)$$

Da nun im isoelektrischen Punkt $[ROH] = [HR']$ ist, so erhalten wir als Bedingung für diesen Punkt²⁾:

$$\frac{[H']}{[HO']} = \frac{K_a}{K_b} \quad \dots \dots \dots \quad (11)$$

Aus (I. 1) und (I. 2) folgt ferner³⁾:

$$\frac{[ROH] + [HR']}{u} = \frac{K_a}{[H']} + \frac{K_b}{[HO']} = \frac{K_a}{[H']} + \frac{K_b [H']}{K_w}$$

Setzen wir

$$\frac{[ROH] + [HR']}{u} = \frac{1}{z},$$

so ergibt sich durch Differentiation nach $[H']$:

$$\frac{d\left(\frac{1}{z}\right)}{d[H']} = -\frac{K_a}{[H']^2} + \frac{K_b}{K_w}$$

Als Minimumbedingung erhalten wir:

$$-\frac{K_a}{[H']^2} + \frac{K_b}{K_w} = 0,$$

oder

$$\frac{K_a}{K_b} = \frac{[H']^2}{K_w} \quad \text{bzw.} \quad [H'] = \sqrt{\frac{K_a}{K_b} \cdot K_w} \quad \dots \dots \dots \quad (12)$$

Da $\frac{[H']}{K_w} = \frac{1}{[HO']}$, so ist $\frac{K_a}{K_b} = \frac{[H']}{[HO']}$ die Minimumbedingung⁴⁾. Dies ist aber gleichzeitig die Gleichung (11) des isoelektrischen Punktes. Folglich ist die Summe der Ionen eines Ampholyten ein Minimum, wenn

¹⁾ Die Bezeichnung „isoelektrischer Punkt“ stammt von Hardy, die exakte Definition und das nähere Studium des isoelektrischen Punktes verdankt man Michaelis.

²⁾ Michaelis, Biochem. Zs 19, 181; 1909.

³⁾ Michaelis und Mostynski, Biochem. Zs 24, 79; 1910.

⁴⁾ Da der 2. Differentialquotient einen positiven Wert hat, so liegt hier wirklich ein Minimum und kein Maximum vor. Vgl. hierzu Michaelis, Monogr. 2. Aufl. S. 121 ff.

die Acidität der Lösung den isoelektrischen Punkt darstellt. Dabei sind hier Zwitterionen und Salzbildung nicht berücksichtigt.

Für einige Aminosäuren und Dipeptide haben wir schon S. 28 und 29 die isoelektrischen Punkte angegeben. Die von Michaelis für einige Eiweisskörper nach einer anderen Methode erhaltenen Werte findet man S. 37 mitgeteilt. Eine Ableitung der Formel für den isoelektrischen Punkt von Ampholyten mit mehreren sauren und basischen Gruppen haben Levene und Simms¹⁾ gegeben.

B. Eigenschaften der Ionen in wässriger Lösung.

1. Die Ladung und Beweglichkeit der Ionen und elektrisch geladenen Teilchen.

Die Ladung der Ionen ist bekanntlich durch die Elektronen bedingt, und zwar sind es die Elektronen der äussersten Schale, welche für die elektro-chemischen Eigenschaften zunächst in Betracht kommen. Positive Elemente geben leicht ein negatives Elektron ab und besitzen dann die der abgegebenen Zahl negativer Elektronen entsprechenden positiven Elektrizitätsmengen, 96 450 Coulomb per g Äquivalent. Negative Elemente, z. B. Halogene haben die Tendenz, ihre äussere Elektronenhülle mit Elektronen zu ergänzen und die entsprechenden negativen Ladungen aufzunehmen.

Unter dem Einfluss des elektrischen Potentialgefälles wandern die positiv geladenen Ionen (Kationen) bekanntlich zum negativen Pol, die negativ geladenen Ionen zum positiven Pol. Diese Ionenwanderung lässt sich bei gefärbten Ionen, wie z. B. dem Anion des Kaliumpermanganats, sehr einfach in einem von Nernst²⁾ angegebenen Apparat zeigen und messen.

Beträgt das Potentialgefälle 1 Volt per cm, so nehmen die nachstehenden Ionen bei 18° und unendlicher Verdünnung folgende Geschwindigkeiten an:

H	0,00326 cm/sek.	HO	0,00180 cm/sek.
K	0,00067 "	Cl	0,00068 "
Na	0,00045 "	$\frac{1}{2}$ SO ₄	0,00071 "
Ag	0,00056 "	CH ₃ COO	0,00042 "

Amphotere Elektrolyte, beispielsweise Glykokoll, wandern, je nachdem sie an eine Säure oder Base gebunden sind und demgemäss eine positive oder negative Ladung tragen, zum negativen oder positiven Pol. Das gleiche gilt für Eiweiss, welches sich also durch wechselweise Zusätze von Säuren und Basen umladen lässt³⁾.

Michaelis, welcher 1909 eine Reihe von Versuchen mit dialysiertem Serumalbumin angestellt hat⁴⁾, fand bei gut erhaltener neutraler Reaktion in allen Teilen der Lösung stets eine eindeutige anodische Wanderung.

¹⁾ Levene und Simms, Biol. Chem. 55, 801; 1923.

²⁾ Nernst, Zs f. Elektroch. 3, 308; 1909.

³⁾ Hardy, Jl of Physiol. 24, 288; 1899. — Pauli, Hofm. Beitr. 7, 531; 1906.

⁴⁾ Michaelis, Biochem. Zs 19, 181; 1909.

„Sobald die Flüssigkeit nur mit 0,0001 Vol. Essigsäure versetzt wurde, wanderte es einsinnig rein kathodisch. Wir können also zwischen der neutralen Reaktion des Wassers ($p_H = 7$) und der Reaktion dieser Essigsäurelösung (p_H etwa 5) einen Aciditätsgrad von etwa $p_H = 6$ interpolieren, bei dem das Eiweiss isoelektrisch ist.“

Es zeigte sich im isoelektrischen Punkt nicht etwa ein Stillstand des Eiweisses, sondern eine beiderseitige Wanderung. Bei der isoelektrischen Reaktion fehlt also nicht die Ladung des Eiweisses, sondern es sind gleich viel positive wie negative Teilchen vorhanden.

Aus den S. 35 angegebenen Beziehungen (I. 1 u. 2) ergab sich

$$\frac{K_a}{K_b} = \frac{[H^+]}{[HO^+]} \dots \dots \dots (11)$$

Diesen Bruch hat Michaelis „relative Acidität“ genannt.

In der folgenden Reihe von Arbeiten hat Michaelis mit seinen Mitarbeitern den isoelektrischen Punkt bzw. den Punkt gleicher anodischer und kathodischer Wanderung [Umkehrpunkt¹⁾] für Eiweissstoffe²⁾ bestimmt.

Autoren	Literatur	Eiweisskörper	Elektr. Umkehrpunkt 18°
Rona u. M.	Biochem. Zs 28, 193; 1910	Serumglobulin	$0,36 \cdot 10^{-5}$
		Gliadin	$5,9 \cdot 10^{-10}$
		Edestin	$1,3 \cdot 10^{-6}$
M. u. Takahashi	29, 439; 1910	Stromasubst. d. Blutes	$1 \cdot 10^{-5}$
		Oxyhämoglobin	$1,8 \cdot 10^{-7}$
M. u. Davidsohn	33, 456; 1911	Denat. Serumalbumin	$0,4 \cdot 10^{-5}$
M. u. Grineff	41, 373; 1912	Natives Serumalbumin	$2 \cdot 10^{-5}$
		Gelatine	$2,5 \cdot 10^{-5}$
M. u. Pechstein	47, 260; 1912	Casein	$2,5 \cdot 10^{-5}$

Andererseits lässt sich aus der Wanderungsrichtung eines chemisch unbekanntem reinen Stoffes ersehen, ob derselbe als Säure oder Base fungiert oder als Ampholyt auftreten kann.

Die Versuche wurden mit einem Apparat von folgender Form³⁾ ange stellt, bei welchem die Reaktionsänderung an den Polen durch Verwendung unpolarisierbarer Elektroden vermieden wird.

Verbesserte Formen für Apparate zur Bestimmung der Wanderungs richtung von Kolloiden haben Northrop⁴⁾ und Pauli⁵⁾ angegeben. Manche

¹⁾ Es empfiehlt sich, den experimentell bestimmten Umkehrpunkt der Überführung von dem isoelektrischen Punkt, der durch die Gleichung (11) definiert ist, streng zu unterscheiden.

²⁾ Der amphotere Charakter der Eiweisskörper war schon früher bekannt. Vgl. Sjöqvist, Skand. Arch. f. Physiol. 5, 317; 1895. — Bredig, Zs f. Elektroch. 6, 33; 1899.

³⁾ Landsteiner u. W. Pauli, 25. Kongr. f. inn. Med. Wien 1908, S. 57.

⁴⁾ Northrop, Jl Gen. Physiol. 4, 629; 1921. — Kunitz, 6, 413; 1924.

⁵⁾ Pauli, Kolloidchemie der Eiweisskörper. Steinkopff 1920.

Apparate sind auch zur Reinigung von Enzymen durch Elektrodialyse und Elektro-Osmose sehr brauchbar¹⁾.

Die Anordnung von Michaelis²⁾ zur Untersuchung der Saccharase war folgende:

(110 Volt, 0,0005 Amp. — Temp. 18°):

Kathode aus Zn	1 Zn SO ₄ -Lösung	2 Wasser	3 Enzym	4 Wasser	5 Zn SO ₄ -Lösung	Anode aus Zn
----------------	---------------------------------	-------------	------------	-------------	---------------------------------	--------------

Nach Beendigung des Stromdurchgangs (24 St.) wird der Inhalt von 2 und 4 auf Saccharase untersucht³⁾.

Auch in ausgesprochen saurer Lösung wanderte die (ungereinigte) Saccharase noch anodisch (vgl. S. 39).

Beim Pepsin fanden Michaelis und Davidsohn⁴⁾ ziemlich verwickelte Verhältnisse; nach ihren Angaben besteht im Aciditätsbereich $9,9 \cdot 10^{-3}$ bis $1,2 \cdot 10^{-3}$ doppelsinnige Wanderung des Pepsins. Den isoelektrischen Punkt nahmen sie in der Mitte dieses Bereichs, bei $p_H = 5,5 \cdot 10^{-3}$ an.

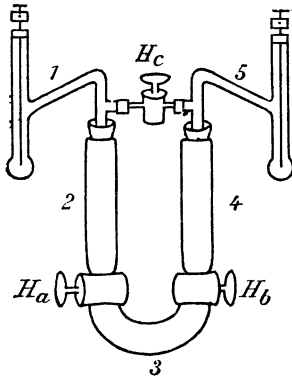


Fig. 5.

Maassstab 1:4.

Indessen zeigten Pekelharing und Ringer⁵⁾, dass mit reinerem Pepsin nur anodische Wanderung erhalten wird, dass aber Zusätze von Casein und Serumalbumin zu Pepsinlösungen diese Erscheinung dadurch beeinflussen, dass diese Eiweissstoffe das Enzym bei ihrer Wanderung zur Kathode mitführen. Auch Albumosen und Peptone wirken in ähnlicher Weise: bei steigenden Zusätzen dieser Stoffe hat das Pepsin immer mehr die Neigung zur Kathode zu wandern, ohne rein kathodisch zu werden.

Bereits in der vorhergehenden Auflage dieses Buches hat der Verf. betont, „dass Moleküle von nicht besonders ausgesprochenem elektrochemischem Charakter, welche mit Elektrolyten irgendwie verbunden sind, die Wanderungs-

¹⁾ Willstätter und Schneider, H. 133, 193, und zwar 208; 1924. — Dreizellen- und Fünfzellen-Apparate, bezogen von den Deutschen Ton- und Steinzeugwerken, Berlin-Charlottenburg, haben neuerdings Fricke und Kaja (Chem. Ber. 57, 310; 1924) zur Reinigung von Amylase verwendet.

²⁾ Michaelis, Biochem. Zs 16, 81; 1909 und 19, 181; 1909. Die in ersterer Arbeit vorgeschlagene Anordnung mit Zn-Elektroden dürfte vor der Elektrode Cu-CuCl₂ vorzuziehen sein, um Verunreinigungen des Enzyms durch die giftigen Cu⁺⁺-Ionen sicher zu vermeiden.

³⁾ Die Wirksamkeit der Flüssigkeit 3 ist nicht mitgeteilt, so dass die relative Menge des überführten Enzyms nicht entnommen werden kann. Offenbar ist die Wanderung der Saccharase unter diesen Umständen recht gering. Eine Modifikation, welche die Kataphorese grösserer Stoffmengen ermöglicht, und seine Prüfung an definierten Proteinen wäre, wie schon in der 2. Aufl. betont wurde, sehr erwünscht.

⁴⁾ Michaelis und Davidsohn, Biochem. Zs 28, 1; 1910. — H. 76, 385; 1912.

⁵⁾ Pekelharing und Ringer, H. 75, 282; 1911.

richtung der letzteren annehmen können, wodurch leicht Fehlschlüsse entstehen“. Ganz besonders gilt dieses Bedenken, wenn es sich um kolloide Ampholyte als Lösungskomponenten handelt. Nach Michaelis und Davidsohn kann man zwar den Satz ableiten, „dass ein Kolloid den isoelektrischen Punkt eines zweiten gleichzeitig in Lösung befindlichen Kolloids nicht ändert, wofern nicht eine nachweisliche chemische Affinität der beiden Kolloide zueinander besteht“¹⁾. Solche Affinitäten sind sehr oft wirksam.

Neuerdings haben nun auch Versuche von Willstätter, Graser und Kuhn²⁾ gezeigt, dass die Wanderungsrichtung eines Enzyms, und zwar der Saccharase, sich nach einer gewissen Reinigung umkehrt; die nach Reinigung mit Tonerde durch Kaolin adsorbierbare Saccharase zeigt bei der Kataphorese kathodische Wanderung.

Die von Willstätter (l. c. S. 76) angegebene Tabelle (Auszug unten) lässt erkennen, „wie mit zunehmender Reinheit des Invertins der übergeführte Anteil zunimmt. Bei annähernd gleicher Aktivität der Mittelflüssigkeit sind in einem Hefeautolysat (Beisp. 1) in 70 Stunden nur 0,8% des Enzyms zur Anode gewandert, während vom Präparat mit dem Zeitwert 1 (Beisp. 10) schon nach 19 Stunden 1,44% im Anoden- und 2,30% im Kathodengefäss nachgewiesen werden konnten“.

Spannung 220 Volt. — Volumen des Mittelgefässes + Hahnbohrungen = 30,6 cm.

Zusammensetzung der Mittel- und Seitenflüssigkeiten; Angabe der p _H	Stromdurchgang in Stunden	Nulldrehungszeiten			Wanderung in % zur	
		Anode	Mitte	Kathode	Anode	Kathode
1. Autolysat (1 Hefe + 2 Wasser + Toluol)	70	775	6,18	∞	0,80	0,00
2. Präparat aus pankreasentl. Hefe. Zeitwert 1,0 in destilliertes Wasser; p _H = 6	19	347	5,0	217	1,44	2,30

Aus den erwähnten Erfahrungen an Pepsin und Saccharase geht hervor, dass Versuche, die an Enzymen von unbekanntem und geringem Reinheitsgrad angestellt sind, nur mit grösster Vorsicht zur Beurteilung des elektrochemischen Charakters dieser Stoffe verwendet werden dürfen³⁾. Die Angaben der folgenden Tabelle S. 40 können deswegen nur zu einer gewissen Orientierung und als Unterlagen für weitere Versuche dienen.

Wie schon in der vorhergehenden Auflage betont, stellt sich die Überführung der Enzyme und der Eiweisskörper im elektrischen Potentialgefälle

¹⁾ Vergl. auch Michaelis und Rothstein, Biochem. Zs 110, 217 und zwar 221; 1920.

²⁾ Willstätter, Graser und Kuhn, H. 123, 1, und zwar 73; 1922.

³⁾ Vergl. Euler und Josephson, H. 133, 279; 1924.

durchaus als die Wanderung elektrolytischer Ionen — meist von amphoterem Charakter — dar. Wir haben, mit anderen Worten, eine kontinuierliche Reihe von den einatomigen Ionen bis zu den hochmolekularen Kolloiden, welche letztere oft den durch schwache Affinitätsbeträge gebundenen H- oder OH-Ionen — seltener Metall- oder Metalloid-Ionen — ihre Ladung verdanken. Diese stetige Reihe führt über die Kolloide hinaus zu den suspendierten Teilchen, bei welchen die Bindung der aufladenden Ionen oft der Sorption zugeschrieben wird. Indessen wird sich die Anlagerung dieser Ionen stets auf eine chemische Bindung zurückführen lassen, so dass „Adsorptionsbindungen“ von Ionen an feste oder kolloide Teile nicht als besondere Fälle behandelt zu werden brauchen. Es handelt sich durchweg um Salzbildung und dementsprechende Ionisierung, sei es am gelösten Molekül, sei es an einer Oberfläche (Phasengrenze).

Enzym	pH	Wanderungs-Richtung	Verfasser und Schriftsteller
Hefen-Maltase	6,1—6,8	anodisch	Michaelis und Rona, Bio. Zs 57, 70; 1913.
Malz-Amylase (Präparat Grübler)	Lösung schwach sauer	kathodisch	} Michaelis, Bio. Zs 17, 231; 1909.
	Lösung schwach alkalisch	anodisch	
Trypsin (Pancreat. puriss. Rhen.)	5,4—4,1	anodisch	} Michaelis und Davidsohn, Bio. Zs 30, 481; 1911.
	ab 3,71	kathodisch	
Leber-Katalase	5,8—5,6	rein anodisch	} Michaelis und Pechstein, Bio. Zs 53, 320; 1913.
	5,4—5,2	anod.-kathodisch	
	5,1—3,9	rein kathodisch	
Serum-Butyrase	} ab 6	} anodisch	} Michaelis und Bien, Bio. Zs 59, 100; 1914. 64, 13; 1914.
Pankreas-Butyrase			

Kataphorese.

Anhangsweise wollen wir nun noch die Wanderung fester Stoffe im elektrischen Feld kurz besprechen. Man bezeichnet diese Überführung bekanntlich als Kataphorese.

Fein verteilte, in einem flüssigen Medium unlösliche Materie zeigt allgemein gegen die Flüssigkeit eine bestimmte Ladung und wird deshalb im elektrischen Potentialgefälle bewegt. Die Theorie dieser Bewegung ist in Anlehnung an v. Helmholtz durch v. Smoluchowski gegeben worden. Die Geschwindigkeit u suspendierter Teilchen ist von ihrer Grösse unabhängig. Dies geht aus einer von Perrin¹⁾ aufgestellten Formel hervor:

$$u = \frac{\varepsilon \cdot H \cdot D}{4\pi \cdot \eta}$$

¹⁾ Perrin, C. r., 136, 1388 und 137, 513; 1903. — JI chim. phys. 2, 601; 1904 und 3, 50; 1905.

Hier ist: ε = die Potentialdifferenz an der Grenze zwischen fester Substanz und Flüssigkeit,
 H = das Potentialgefälle, in welchem sich die Teilchen bewegen,
 D = die Dielektrizitätskonstante der Flüssigkeit,
 η = die innere Reibung.

Die Potentialdifferenz ε ergibt sich aus einer elektrischen Doppelschicht im Sinne der Nernstschen Theorie der elektromotorischen Kräfte, und zwar entsteht diese Doppelschicht entweder aus der verschiedenen Lösungstension der Ionen des reinen Stoffes, etwa eines schwer löslichen Hydroxyds, oder aber durch Umsetzung zwischen gelösten Stoffen und festen Körpern bzw. durch Bindung einer Ionenart (meist H- oder OH-Ionen)¹).

Durch die Art der Doppelschicht (die positive Ladung aussen oder innen) ist der Ladungssinn der Teilchen im Medium bestimmt.

Der Ladungssinn der überwiegenden Mehrzahl der daraufhin untersuchten festen Stoffe ist in Wasser negativ, denn sie werden durch den Strom zum positiven Pol getrieben, wandern mit anderen Worten anodisch.

Den Vorgang, welcher dem eben besprochenen entgegengesetzt ist, also die Bewegung einer Flüssigkeit im elektrischen Feld durch ein Kapillarrohr oder ein System von Kapillarröhren (poröse Masse) nennt man Endosmose. Dieselbe ist von G. Wiedemann und später von Coehn²) eingehend studiert worden, welcher zuerst den Einfluss der Dielektrizitätskonstante auf die Endosmose gefunden hat.

Für die Enzymchemie kommt dieses Erscheinungsgebiet direkt nicht in Betracht, wohl aber für die Physiologie; man findet eine übersichtliche Darstellung in den Werken von Höber, Physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe, 5. Aufl., 1924, von Freundlich, 3. Aufl., 1923 und von Michaelis, Die Wasserstoffionenkonzentration, 2. Aufl., I. T., S. 249.

2. Hydratation der Ionen.

In der IONENTHEORIE ist der Grundgedanke, welcher der alten Hydrattheorie zugrunde lag, in einer neuen Form wieder aufgetaucht. Zahlreiche voneinander unabhängige Tatsachen weisen darauf hin, dass die elektrolytischen Ionen, die zunächst als elektrisch geladene Metallatome aufgefasst wurden, in Verbindung mit Molekülen des Lösungsmittels stehen. Eine Tatsachengruppe, welche hierfür spricht, werden wir im nächsten Abschnitt kennen lernen, nämlich die Abhängigkeit der Koeffizienten der inneren Reibung der Ionen von ihrer Wanderungsgeschwindigkeit. Als eine starke Stütze für die Annahme von Ionenhydraten wurde ferner die von Kohl-

¹) Siehe auch eine Untersuchung von J. Loeb (Jl Gen. Phys. 5, 109; 1922) über das Verhalten von Kollodiumteilchen bei der Kataphorese.

²) Coehn, Ann. d. Phys. 64. 217; 1898 und 30. 777; 1909.

rausch¹⁾ gefundene Beziehung angesehen, dass der Temperaturkoeffizient der Leitfähigkeit bei unendlicher Verdünnung für verschiedene Elektrolyte annähernd gleich ist und mit dem Temperaturkoeffizienten der inneren Reibung des Wassers quantitativ übereinstimmt. Auch der Umstand, dass z. B. die Silberionen gleiche Wanderungsgeschwindigkeit zeigen wie die Ionen $(\text{NH}_3)_2\text{Ag}^+$, spricht für die genannte Annahme.

In manchen Fällen mag überhaupt das Lösungsmittel Komplexe bestimmter Zusammensetzung mit den Ionen bilden.

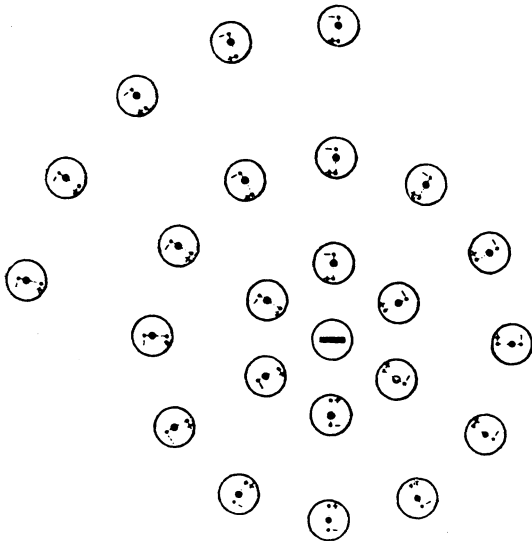


Fig. 6.

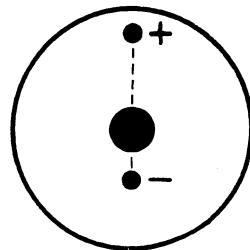


Fig. 6a.

Im allgemeinen dürften aber die absoluten Zahlen der mit Ionen verbundenen Wassermoleküle, welche einige Autoren gefunden haben, nicht die von ihnen angenommene Bedeutung besitzen.

Zu folgenden relativen Werten ist Nernst nach einer von ihm angegebenen Methode gelangt:

(Die an 1 Wasserstoffion gebundene Anzahl Wassermoleküle ist willkürlich gleich 1 gesetzt.)

H'	K'	Na'	Li'	Cl'
1	5	8	14	4

Bjerrum gibt folgende Werte an:

H	Cl	K
8	2	0

Abgesehen von besonderen Ionenhydraten wird man nach den Anschauungen der modernen Lösungstheorien die Hydratation der Ionen im wesentlichen als eine Folge des von den Ionen ausgehenden elektrischen Kraftfeldes

¹⁾ Kohlrausch, Sitzungsber. Preuss. Akad. d. Wiss. 1902, 572.

ansehen. Die Wassermoleküle haben nach Debye¹⁾, Born²⁾, Fajans³⁾ u. a. den Charakter von Dipolen.

Unter dem Einfluss der elektrischen Ladung ihres Ions werden nun die Wassermoleküle, welche sich nach der grundlegenden Arbeit von Drude und Nernst im Zustand der Elektrostriktion befinden, polarisiert, indem ihr entgegengesetzter Pol vom Ion angezogen, ihr gleichmässiger Pol abgestossen wird. Demgemäss lassen sich die Verhältnisse in der unmittelbaren Umgebung eines in sehr verdünnter Lösung befindlichen Ions durch nebenstehendes Schema (Fig. 6) darstellen.

Starke Hydratation macht sich offenbar bei den Eiweisskörpern geltend [Pauli⁴⁾], worauf schon die bekannten Quellungserscheinungen bei Gelatine usw. (übrigens auch bei anderen Emulsionskolloiden) hindeuten.

Aus den von Miss Chick gefundenen Zahlen für innere Reibung hat Arrhenius berechnet, dass von 1 g verschiedener Proteine bei 25° 0,7 bis 2,2 g Wasser gebunden werden, worauf wir im nächsten Abschnitt zurückkommen.

Offenbar verdient die Frage, in welchem besonderen Zustand sich das an amphotere Kolloide gebundene Wasser befindet, besonders auch, wie gross das Ionenprodukt dieses Wassers ist, eine eingehende Bearbeitung.

3. Innere Reibung.

Für die innere Reibung⁵⁾ verdünnter Lösungen eines Stoffes hat Arrhenius⁶⁾ 1887 die Formel aufgestellt⁷⁾:

$$\eta(x) = \eta^x \dots \dots \dots (R\ 1)$$

bzw. für Lösungen von 2 Stoffen:

$$\eta(x, y) = \eta_1^x \eta_2^y \dots \dots \dots (R\ 2)$$

oder in anderer Form

$$\log \eta(x, y) = x \log \eta_1 + y \log \eta_2,$$

wo $\eta(x)$ und $\eta(x, y)$ die spez. innere Reibung einer Lösung von 1 bzw. 2

¹⁾ Debye, Physikal. Zs 13, 97; 1912.

²⁾ Born, Zs f. Physik 1, 247; 1920.

³⁾ Fajans, Verh. d. deutschen physik. Ges. 21, 539, 549 u. 709; 1919.

⁴⁾ Pauli und Handovsky, Bioch. Zs 18, 340; 1909 und 24, 239; 1910.

⁵⁾ Da wir es bei der Behandlung enzymchemischer Probleme nur mit der inneren Reibung wässriger Lösungen oder Systeme zu tun haben, so können wir uns auf die Betrachtung der relativen oder spezifischen inneren Reibung beschränken, welche das Verhältnis zwischen der Viskosität einer Lösung und derjenigen des reinen Wassers ausdrückt. (Während die Viskosität die Dimension $\text{cm}^{-1} \text{g sec}^{-1}$ hat, ist die spez. innere Reibung eine unbenannte Zahl.)

⁶⁾ Arrhenius, Zs f. physik. Chem. 1, 285; 1887.

⁷⁾ Eine theoretische Begründung der logarithmischen Formel hat Lees, Phil. Mag. (6) 128; 1901 geliefert. Siehe auch Arrhenius, Biochem. JI 11, 112; 1917.

Einstein hat 1906 (1911) eine Formel abgeleitet von der Form:

$$\eta = \eta_0 (1 + 2,5 \varphi)$$

wo φ das Gesamtvolumen der in der Volumeneinheit suspendierten Substanz ist. Siehe Ann. Phys. 19, 289; 1906 und Berichtigung 34, 591; 1911.

Stoffen, x und y Konzentrationen, η_1 und η_2 spez. Reibungskonstanten der einzeln gelösten Stoffe bezeichnen.

Schon die alten Daten von Arrhenius, Reyher, Wagner, Kanitz u. a. liessen eine gewisse Additivität der Ionen binärer Salze hervortreten.

Verf.¹⁾ konnte 1897 zeigen,

1. dass die Konstante der inneren Reibung eines Salzes sich darstellen lässt durch die Formel:

$$\eta = \eta_s^x \eta_A^y \eta_K^y, \quad \dots \quad (R\ 3)$$

wenn man mit η_s die Reibungskonstante des nicht dissoziierten Anteils, mit x dessen Konzentration, mit η_A und y bzw. η_K und y die gleichen Grössen für Anion und Kation bezeichnet;

2. dass die Reibungskoeffizienten η_A und η_K der elementaren Ionen sich quantitativ aus den Wanderungsgeschwindigkeiten U bzw. V des Anions A und Kations K berechnen lassen nach der Formel:

$$(\eta_A - 0,68) \cdot U = \text{Konst. bzw. } (\eta_K - 0,68) \cdot V = \text{Konst.} \quad \dots \quad (R\ 4)$$

Salz	Reibungskonstanten 1 g.-Mol. im Liter	γ	Zur Berechnung angewandt	Berechnet für 1 g.-Ion im Liter
KCl	0,9872	0,75	—	K = 0,962 Cl = 0,962
NaCl	1,0973	0,67	Cl = 0,962	Na = 1,091
LiCl	1,1423	0,60	Cl = 0,962	Li = 1,150
KNO ₃	0,9753	0,65	K = 0,962	NO ₃ = 0,919
AgNO ₃	1,0576	0,58	NO ₃ = 0,927	Ag = 1,059
HCl	1,0671	0,80	Cl = 0,962	H = 1,085

Die Regel besitzt zwei vollständige Ausnahmen, die H' und die HO' -Ionen, und diesen Umstand habe ich darauf zurückgeführt, dass die Ionen, mit Ausnahme²⁾ von H' und HO' hydratisiert sind (vgl. S. 42); ferner dürfte die jetzt angenommene Wanderungsgeschwindigkeit für H' - und HO' -Ionen nur die scheinbare Wanderungsgeschwindigkeit darstellen, welche sich durch den Austausch mit den Molekülen des Wassers zu gross ergibt; aus obiger Formel (R 3) erhält man die Werte 52 bzw. 43.

Aus den Reibungskonstanten der übrigen Ionen hat dann Verf. folgende Schlüsse gezogen:

Die Ionen vergrössern primär (wie jede Molekülart) die innere Reibung des Wassers um so mehr, je kleiner ihre Wanderungsgeschwindigkeit ist.

Die elektrische Ladung der Ionen bewirkt eine Kompression (Elektrostriktion) des Wassers, wodurch dessen Reibung vermindert wird.

¹⁾ Euler, Zs f. physik. Chem. 25, 536; 1898.

²⁾ Der von mir 1898 gezogene Schluss, dass die Ionen H^+ und OH^- nicht hydratisiert sind, hat seither mehrere Bestätigungen erfahren; siehe z. B. Born, Zs f. Physik 1, 247; 1920. — Remy, Zs f. physik. Chem. 89, 467; 1915.

Je nachdem der erste oder zweite Einfluss überwiegt, wird der Reibungskoeffizient grösser oder kleiner als 1. Unter dem zweiten Einfluss allein würde eine 1-n-Ionenlösung den Koeffizienten 0,68 besitzen.

Die Beziehung zwischen Reibungskonstanten und Wanderungsgeschwindigkeiten geht aus untenstehender Figur 7 hervor.

Nachdem zufolge Bjerrums, Goshs und Debyes übereinstimmenden Annahmen bzw. Ergebnissen die Salze in 1-n-Lösungen praktisch vollständig dissoziiert sind, muss sowohl die Berechnung der Werte η_A und η_K als auch die Deutung der Ergebnisse, besonders des Ionenkoeffizienten 0,68, modifiziert werden.

Über die Viskosität amphoterer molekulardisperser Elektrolyte, nämlich aliphatischer Aminosäuren, hat in neuerer Zeit G. Hedestrand¹⁾ eine eingehende Untersuchung veröffentlicht, aus welcher hervorgeht, dass diese Stoffe im isoelektrischen Punkt ein Minimum der inneren Reibung besitzen.

Was dann die hochmolekulare Ampholyte betrifft, so liegt bezüglich der verschiedenen Klassen der Proteine bereits ein umfangreiches Material vor.

Die wichtigste Tatsache ist — wie gleich vorausgenommen sei — die starke Erhöhung der inneren Reibung verdünnter Eiweisslösungen bei Zusatz von Säuren oder Basen, also bei der Bildung von Eiweissalzen.

Die ersten Angaben haben Laqueur und Sackur²⁾ über Casein gemacht; ausgedehntere Untersuchungen bezüglich Serumalbumin stammen von W. Pauli und seinen Mitarbeitern, besonders Handovsky³⁾.

Es ergab sich bald, dass hier die Acidität der Lösung von ganz wesentlichem Einfluss ist, und besonders konnten Michaelis und Mostynski⁴⁾

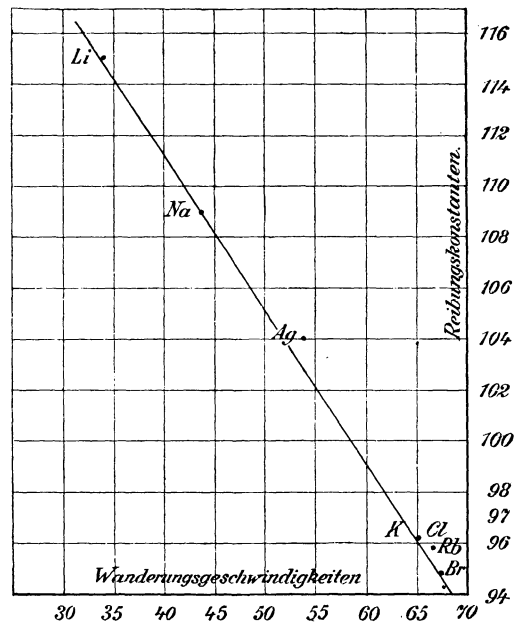


Fig. 7.

¹⁾ Hedestrand, Zs anorg. Chem. 124, 153; 1922. — Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi 8, 1; 1921.

²⁾ Laqueur und Sackur, Hofm. Beitr. 3, 193; 1903.

³⁾ Pauli und Handovsky, Biochem. Zs 18, 340; 1909 u. 24, 239; 1916. — Pauli u. Falck, Biochem. Zs 47, 269 1912.

⁴⁾ Michaelis und Mostynski, Biochem. Zs 25, 401 1910. — Siehe auch W. Pauli, Kolloid-Zs 12, 222; 1913.

zeigen, dass die innere Reibung des gelösten Serumalbumins beim Umkehrpunkt der Wanderung (vgl. S. 37) ein Minimum besitzt. Aminosäuren zeigen, wie erwähnt, ein solches Minimum bei dem nach Formel (12) Seite 35 definierten isoelektrischen Punkt. Dieser Regel dürfte eine allgemeine Gültigkeit zukommen und wir können die Sachlage so zusammenfassen, dass ein Ampholyt beim Minimum der Ionisierung, wo er auch am wenigsten hydratisiert ist, sich mehr den Suspensionskolloiden nähert, während die ausgesprochen hydrophil-kolloiden Eiweissionen mit ihrer weitgehenden Hydratation die Reibung der Lösungen besonders stark vergrössern. Schon Laqueur und Sackur, sowie Hardy¹⁾ haben die grosse innere Reibung von Eiweissionen auf die Hydratation dieser Ionen zurückgeführt.

Übrigens steigt mit der Ionisation der Dispersitätsgrad, ein Umstand, der an sich die Vergrösserung der inneren Reibung zur Folge hat.

Zu dem Einfluss der Acidität addiert sich dann noch die Einwirkung der Neutralsalze auf die innere Reibung der Proteine und macht die Verhältnisse recht kompliziert.

Neuere Versuche über die innere Reibung von Eiweissstoffen hat Miss H. Chick²⁾ mit Mitarbeitern³⁾ und allein⁴⁾ angestellt und hat das Ziffermaterial nach einer Formel von Hatschek berechnet⁵⁾.

Ein Anschluss an die Formel (R 1) wird nur erreicht, wenn man annimmt, dass die gelösten Eiweissmoleküle zu einem bestimmten Grad hydratisiert sind, und zwar wurde durch Ausprobieren die beste Übereinstimmung gefunden unter der Annahme, dass 1 g Eiweiss (je nach der Natur des Proteins) zwischen 0,7 und 2,2 g Wasser bindet. Um eine Vorstellung von der Grösse der spez. inneren Reibung von Eiweisslösungen zu geben, führen wir hier einen Auszug aus einer Versuchsreihe von Chick und die Berechnung nach Arrhenius an:

Viscosität von Eialbumin bei 25°.

1 g Eialbumin bindet 0,7 g Wasser.

Proz.	η	Mol. Konz.	η ber.	Differenz in Proz.
28,15	9,99	54,09	10,05	+ 0,6
24,33	5,81	41,55	5,86	+ 0,8
14,53	2,21	19,30	2,27	+ 2,9
8,88	1,57	10,45	1,56	- 0,6
3,02	1,22	3,18	1,15	- 6,6

¹⁾ Hardy, *Jl of Physiol.* 33, 251; 1905.

²⁾ Hariette Chick und Ch. J. Martin, *Kolloid-Zs* 11, 102; 1912.

³⁾ Hariette Chick und E. Lubrzynska, *Bioch. Jl* 8, 59; 1914.

⁴⁾ Hariette Chick, *Bioch. Jl* 8, 261; 1914.

⁵⁾ Siehe auch Arrhenius, *Medd. Nobel-Inst.* 3, Nr. 13; 1916 und 3, Nr. 21; 1917. *Bioch. Jl* 11, 112; 1917.

Die Zahlen der vorletzten Spalte sind folgendermassen berechnet: Miss Chick gibt die Zusammensetzung der Lösungen in Gewichtsprozenten an. Danach befinden sich in 100 g Lösung p g Eiweiss und $(100-p)$ g Wasser. Wenn nun jedes g Eiweiss n g Wasser bindet, so beträgt das Gewicht des freien Wassers $100 - (1+n)p$. Da die Eiweissmoleküle im Vergleich zu den Wassermolekülen gross sind, kann man mit genügender Annäherung die molekulare Konzentration der Zahl $p : [100 - (1+n)p]$ proportional setzen. Für Eieralbumin ergibt sich nun der beste Anschluss unter der Annahme $n = 0,7$.

Inwieweit sich aus Reibungsmessungen an genau isoelektrischen Lösungen einfachere Beziehungen ergeben hätten, lässt sich noch nicht sagen.

Schliesslich sind hier noch die umfangreichen Arbeiten von Jacques Loeb an Gelatine, Casein und Albumin besonders zu erwähnen. Auf Grund einer eingehenden theoretischen Bearbeitung der Eiweisskörper als Kolloide, auf welche hier verwiesen sei¹⁾, kommt Loeb zu folgendem Resultat (i. c. S. 291): „Wo die Konzentration der Wasserstoffionen, die Wertigkeit der Ionen und die Konzentration der Salze die Viscosität der Eiweisslösungen in ähnlicher Weise beeinflussen wie den osmotischen Druck, ist diese Beeinflussung der Viscosität in Wirklichkeit ein Einfluss der Elektrolyte auf die Quellung der in der Lösung vorhandenen festen, submikroskopischen Eiweissteilchen“.

Enzyme waren bisher nicht so weitgehend gereinigt, dass eine Untersuchung der inneren Reibung ihrer Lösungen angezeigt gewesen wäre. In letzter Zeit wurden von Euler und Josephson an hochgereinigter Saccharase ($If = 245$) Viscositätsmessungen angestellt.

In der folgenden Tabelle finden wir die Zeiten angegeben, welche verliefen, während die Flüssigkeit von der einen Marke bis zur anderen ausfloss. Mit jeder Lösung wurden 5 Bestimmungen angestellt. Zum Vergleich führten wir entsprechende Messungen mit destilliertem Wasser aus. In der letzten Spalte finden wir die relativen Werte der Viscosität, wobei die Viscosität des Wassers = 1 gesetzt ist.

P _H	Zeit in Sekunden					Mittel	Rel. Viscosität	
	Dest. Wasser	84,9	84,9	84,6	84,9			84,7
2,71		110,4	110,8	111,6	110,9	111,3	111,0	1,310
4,05		110,6	110,8	110,7	110,8	110,6	110,7	1,306
4,50		109,8	110,0	110,2	110,8	110,2	110,2	1,300
5,37		120,8	120,0	119,0	119,7	120,0	119,9	1,414
5,78		147,3	146,2	147,2	146,9	146,0	146,7	1,730
6,50		125,4	126,3	126,2	127,3	127,6	126,6	1,493
7,0		118,6	117,5	117,0	118,5	117,7	117,9	1,300

Fig. 8 S. 48 zeigt deutlich, dass die Viscosität von höheren Aciditäten bis $p_H = ca. 4,5$ etwas abfällt, von $p_H = 5$ an steigt, bei $p_H = 6$ ein Maximum erreicht und dann wieder sinkt. Der isoelektrische Punkt der Saccharase dürfte also bei der Acidität des Viscositätsminimums ($p_H = 4,5-5$) liegen.

¹⁾ Loeb, Proteins and the Theory of Colloidal Behavior. New York, 1922. — Siehe auch die zahlreichen Mitteilungen Loeb's in JI of Gen. Physiology 1-5; 1918-22.

Mit steigender Temperatur nimmt die spez. innere Reibung in den meisten Fällen stark ab. In Übereinstimmung hiermit ergibt sich der aus Miss Chicks Zahlen berechnete Wert für n (g gebundenes Wasser per g Eiweiss), welcher bei 25° laut obiger Tabelle zu 0,7 gefunden wurde, bei 0° zu 1,33. Auch Chick und Martin haben die starke Abnahme der spez. inneren Reibung bei Natriumcaseinat auf eine Wasserabspaltung zurückgeführt.

C. Gleichgewicht zwischen mehreren Elektrolyten.

1. Zwei binäre Elektrolyte mit einem gemeinsamen Ion.

Wird in der verdünnten Lösung eines Elektrolyten, beispielsweise der Essigsäure, ein Salz derselben, z. B. Natriumacetat, aufgelöst, so wird dadurch die Konzentration des gemeinsamen Ions, hier des Acetat-Ions, dem Massenwirkungsgesetz zufolge, geändert.

Unter allen Umständen — auch in Gegenwart von Acetat — muss für die Lösung der Essigsäure die Gleichung (2a) gelten:

$$K = \frac{[H^+][Ac']}{[CH_3COOH]}$$

wo mit [] die Konzentration der betreffenden Molekularart bezeichnet wird. Das zugesetzte Acetat können wir in erster Annäherung als völlig dissoziiert in Rechnung

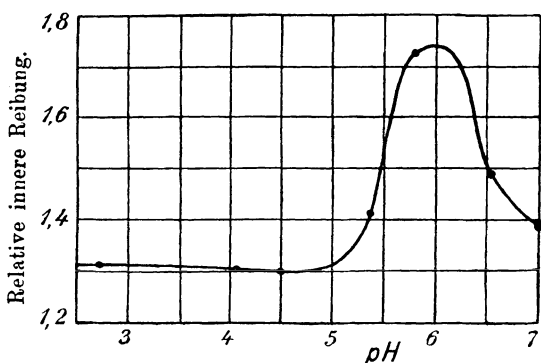


Fig. 8.

setzen, und somit wird seine Gesamtkonzentration gleich derjenigen des Acetations.

Die Dissoziation der an sich schon schwachen Essigsäure (vgl. S. 21) wird durch den Zusatz des Acetats noch weiter verringert, so dass der dissoziierte Anteil nur einen unbedeutenden Bruchteil der Gesamtmenge ausmacht.

Wir nehmen ein Zifferbeispiel: Die Konzentration der Essigsäure sei in reiner wässriger Lösung 0,10 norm. Der Dissoziationsgrad in dieser Verdünnung ist (vgl. S. 21) 0,0132, und es ist somit

$$[H^+] = [Ac'] = 0,10 \times 1,32 \cdot 10^{-2} = 1,32 \cdot 10^{-3} \text{ oder } p_H = 2,88.$$

Nach S. 21 finden wir die Dissoziationskonstante $K = 0,0000177$.

Wir setzen nun, ohne die Konzentration der Essigsäure zu ändern, so viel Natriumacetat zu, dass die Lösung in bezug auf dieses Salz ebenfalls 0,10 norm. wird. In erster Annäherung ist dann auch die Konzentration der Acetationen 0,10 n.

Für das neue Gleichgewicht gilt dann die Beziehung:

$$[H^+] \times 0,10 = 0,0000177 (0,10 - [H^+]) \dots \dots \dots (G. 1)$$

Hieraus¹⁾ ergibt sich: $[H^+] = 1,77 \cdot 10^{-5}$ oder $p_H = 4,75$.

Aus der obigen Gleichung (2a, Essigsäure) erhalten wir also

$$[H^+] = \frac{K \cdot [CH_3COOH]}{[Ac]} = K \cdot \frac{\text{Gesamt-Essigsäure}}{\text{Gesamt-Natriumacetat}} \quad \text{(G. 2)}$$

woraus hervorgeht, wie die Konzentration der Wasserstoffionen im Essigsäure-Acetatgemisch durch die Dissoziationskonstante der Essigsäure und durch das Verhältnis der Essigsäurekonzentration zur Acetatkonzentration bestimmt ist.

Standard-Gemische und Puffer für p_H -Bestimmungen.

Wir haben es also in der Hand, durch Zusätze von Acetat zu Essigsäurelösungen eine grosse Reihe von Lösungen mit genau definierten H^+ -Konzentrationen herzustellen. Diese und ähnliche Mischungen werden als Standardlösungen zur Messung von H^+ -Konzentrationen benutzt.

Michaelis²⁾ gibt folgende Tabelle, die nach der Formel (G. 2) ausgerechnet ist und also angenäherte Werte enthält.

$\frac{[CH_3COOH]}{[NaAc]}$	$[H^+]$	p_H	$\frac{[CH_3COOH]}{[NaAc]}$	$[H^+]$	p_H
$32/1$	$5,76 \cdot 10^{-4}$	3,24	$1/2$	$0,90 \cdot 10^{-5}$	5,05
$16/1$	$2,88 \cdot 10^{-4}$	3,54	$1/4$	$0,45 \cdot 10^{-5}$	5,35
$8/1$	$1,44 \cdot 10^{-4}$	3,84	$1/8$	$0,22 \cdot 10^{-5}$	5,66
$4/1$	$0,72 \cdot 10^{-4}$	4,14	$1/16$	$0,11 \cdot 10^{-5}$	5,96
$2/1$	$0,36 \cdot 10^{-4}$	4,44	$1/32$	$0,56 \cdot 10^{-6}$	6,25
$1/1$	$1,80 \cdot 10^{-5}$	4,74	$1/64$	$0,28 \cdot 10^{-6}$	6,55

Für reine Essigsäurelösungen sind die entsprechenden Zahlen:

Normalität	$[H^+]$	p_H
1,0	$0,42 \cdot 10^{-2}$	2,38
0,1	$0,13 \cdot 10^{-2}$	2,89
0,01	$0,42 \cdot 10^{-3}$	3,38
0,001	$0,13 \cdot 10^{-3}$	3,89

Man sieht, dass man durch den Zusatz des Acetats die p_H -Werte in weiteren Grenzen verändern kann, als es durch Verdünnung der freien Säure praktisch möglich ist.

Abgesehen hiervon hat die Herstellung einer bestimmten H^+ -Konzentration durch Gemische vom Typus Essigsäure-Natriumacetat auch noch einen weiteren Vorteil.

Bringen wir eine — nicht allzu grosse — Menge einer Base in das System Essigsäure-Acetat, so wird allerdings, wie beim Zusatz zu reiner

¹⁾ Berücksichtigt man bei einer genaueren Ausrechnung (nach Arrhenius) den Dissoziationsgrad des Acetats, welcher 0,83 beträgt, so ergibt obige Rechnung

$$[H^+] \times 0,083 = 0,000177 \quad (0,10 - [H^+])$$

$$[H^+] = 0,000213 = 2,13 \cdot 10^{-5} \text{ oder } p_H = 4,67.$$

²⁾ Michaelis, Abderhaldens Handb. 3, 1337; 1910.

Essigsäurelösung eine gewisse Menge der Essigsäure durch Neutralisation verbraucht, aber die H⁺-Ionen nehmen keineswegs proportional mit der zugesetzten Menge freier Base ab, sondern viel weniger; dies ist aus der Tabelle leicht zu ersehen, wenn wir etwa den Fall ins Auge fassen, dass im Essigsäure-Acetatgemisch $\frac{1}{1}$ durch Zusatz von Salzsäure oder Natronlauge etwa das Verhältnis $\frac{2}{1}$ bzw. $\frac{1}{2}$ eintritt. Dann ändert sich p_H nur von 4,74 auf 4,44 bzw. 5,05. Die undissoziierten Anteile der Säure bilden in solchen Gemischen gewissermassen eine Reserve für die Nachlieferung von H⁺-Ionen.

Diese Säure-Salzgemische stellen also „Puffer“ oder „Regulatoren“ gegen Aciditätsstörungen dar.

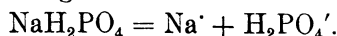
Für den obigen Sonderfall ersieht man die Variationsgrenzen aus der Tabelle; sie erstrecken sich von p_H = 3,2—6,5.

Ein ganz entsprechendes Puffersystem lässt sich durch Mischung von Ammoniak und Ammoniumchlorid herstellen; die Grenzen sind (für 18°) p_H = 8—11.

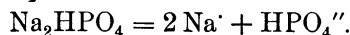
Das am häufigsten anwendbare und angewandte Puffersystem ist die Mischung von primärem und sekundärem Phosphat. Diese Lösungen sind von Sørensen sehr genau geeicht worden.

Michaëlis berechnet die Wasserstoffionen-Konzentrationen von Phosphatgemischen folgendermassen:

Für primäres Phosphat gilt:



Für sekundäres Phosphat:



Wir haben also in einem Gemisch von primärem und sekundärem Phosphat fast genau so viel einwertige Phosphorsäure-Ionen H₂PO₄' als wir primäres Phosphat darin gelöst haben, und so viel zweiwertige Phosphorsäure-Ionen HPO₄'' als wir sekundäres Phosphat gelöst haben. Nun besteht folgende Beziehung zwischen H⁺ und den beiden genannten Phosphationen:

$$[\text{H}^+][\text{HPO}_4''] = K_2 [\text{H}_2\text{PO}_4'] \text{ oder}$$

$$[\text{H}^+] = K_2 \frac{[\text{H}_2\text{PO}_4']}{[\text{HPO}_4'']}$$

$$\text{Für } 18^\circ \text{ ist angenähert } K_2 = 2,0 \times 10^{-7}$$

$$\text{„ } 37^\circ \text{ „ „ } K_2 = 2,4 \times 10^{-7}$$

Es ist also für 18°:

$$[\text{H}^+] = 2,0 \times 10^{-7} \frac{\text{prim. Phosphat}}{\text{sek. Phosphat}}$$

In praktischer Hinsicht muss hierzu allerdings bemerkt werden, dass die käuflichen primären und sekundären Phosphate selten ganz rein sind. Zur Herstellung von Standardlösungen geeignete Präparate werden von der Firma Kahlbaum, Adlershof („nach Sørensen“) geliefert.

Die folgende Figur 9 ist der grundlegenden Arbeit von Sørensen (1909) entnommen. Die entsprechende Tabelle findet man S. 56.

Die drei erwähnten Puffergemische haben also folgende Wirkungsbereiche:

	pH
Essigsäure + Acetat	3,2— 6,5
Prim. Phosphat + sek. Phosphat	4,5— 9,2
Ammoniak + Ammoniumchlorid	8 —11

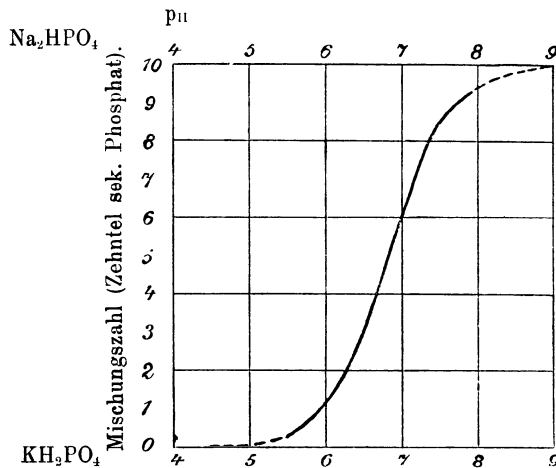


Fig. 9. Die Kurve bezieht sich auf PO₄-Konzentrationen 0,3 molar.

Sørensen hat noch andere Puffermischungen angegeben und ausgewertet, nämlich:

	pH
Glykokoll + Salzsäure	1,1— 3,7
Natriumcitrat + Salzsäure	1,1— 4,9
Natriumcitrat + Natronlauge	4,9— 6,8
Borat + Salzsäure	7,6— 9,2
Borat + Natronlauge	9,2—11,5
Glykokoll + Natronlauge	8,2—13

Bezüglich aller Einzelheiten über Darstellung und Gebrauch von Pufferlösungen sei auf die Monographien von Sørensen (1912), Michaelis (2. Aufl., 1922) und Clark (2. ed., 1923), sowie eine Arbeit von D. D. van Slyke¹⁾ verwiesen.

2. Zwei binäre Elektrolyte mit lauter verschiedenen Ionen.

Mischt man mässig verdünnte Lösungen zweier Salze, B₁S₁ und B₂S₂, welche kein Ion gemeinsam haben, so entstehen dabei auch die beiden anderen möglichen Salze B₁S₂ und B₂S₁; also setzt sich z. B. NaCl mit KNO₃ teilweise zu NaNO₃ und KCl um. Zwischen zwei derartigen Salzen ist der Umsatz gering, da sie sich ja zum grössten Teil als freie Ionen in Lösung befinden.

¹⁾ D. D. van Slyke, Jl Biol. Chem. 52, 525; 1922.

Da bei chemischen Umsetzungen jedes Salz proportional mit der Konzentration seines dissoziierten Anteiles wirkt, also proportional mit dem Produkt aus Gesamtkonzentration und Dissoziationsgrad, so lässt sich leicht zeigen, dass für das Gleichgewicht folgendes Gesetz gilt, wo $[E_1]$, $[E_2]$, $[E_3]$ und $[E_4]$ die Konzentrationen der erwähnten vier Salze bezeichnen und γ_1 , γ_2 , γ_3 und γ_4 die entsprechenden Dissoziationsgrade:

$$\gamma_1 [E_1] \cdot \gamma_4 [E_4] = \gamma_2 [E_2] \cdot \gamma_3 [E_3] \dots \dots \dots (13)$$

Das Problem, wie sich zwei Salzpaare umsetzen, wird hierdurch berechenbar. Für sehr verdünnte Lösungen erledigt sich die Frage, welche Salzpaare sich in der Lösung befinden, damit, dass (so gut wie) ausschliesslich die entsprechenden freien Ionen vorhanden sind.

Verteilung einer Base zwischen zwei Säuren. Setzen wir zu einer verdünnten Lösung von Natriumacetat eine gewisse Menge Cyanwasserstoffsäure, so entstehen in geringer Menge Natriumcyanid und freie Essigsäure. Um zu ermitteln, wie sich das Natrium zwischen die Blausäure und die Essigsäure verteilt, können wir die obige Formel anwenden und erhalten:

$$\gamma_1 [\text{NaAc}] \cdot \gamma_4 [\text{HCN}] = \gamma_2 [\text{NaCN}] \cdot \gamma_3 [\text{HAc}]$$

Nun sind die beiden Neutralsalze Natriumcyanid und Natriumacetat ungefähr gleich stark dissoziiert, dagegen ist die Essigsäure viel stärker als die Blausäure; hieraus folgt, dass die Konzentration der freien Blausäure im Gleichgewicht diejenige der freien Essigsäure bedeutend übertreffen muss. Mit anderen Worten: Die Cyanwasserstoffsäure ist nicht imstande in erheblichem Grade die Essigsäure aus ihren Salzen zu verdrängen.

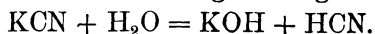
Allgemein gilt also: Eine schwache Säure zur äquivalenten Menge Salz einer bedeutend stärkeren Säure zugesetzt, ruft nur einen geringen Umsatz hervor. Bringt man dagegen zum Salz einer schwächeren Säure eine stärkere, also etwa Salzsäure zu Natriumacetat, so wird die Essigsäure zum grössten Teil aus ihren Salzen vertrieben.

3. Hydrolyse.

a) Binäre Salze.

Wir können die Hydrolyse als einen speziellen, für unsere künftigen Betrachtungen im Bereich der Enzymologie übrigens sehr wichtigen Fall eines Ionengleichgewichtes auffassen, in welchem das Wasser die Rolle einer Säure bzw. Base spielt, welche mit einer anderen um eine Base bzw. Säure konkurriert.

In einer Lösung von Cyankalium z. B. hat das Wasser, dessen Ionenprodukt nach S. 25 bei 18° $0,73 \cdot 10^{-14}$ beträgt, mit der Blausäure zu konkurrieren, deren Dissoziationskonstante etwa $4,7 \cdot 10^{-10}$ ist, und das Wasser wird nach Formel (13), somit in nachweisbarem Grad, die Blausäure aus ihren Salzen vertreiben, gemäss der Reaktionsgleichung:



Die Lösung muss somit ausser der aufgelösten Menge Cyankalium noch äquivalente Mengen der starken Base Kaliumhydroxyd und der schwachen Cyanwasserstoffsäure enthalten; dadurch entsteht ein erheblicher Überschuss an Hydroxylionen, so dass die Lösung alkalisch reagiert. Aus analogem Grunde reagieren alle stöchiometrisch neutralen Salze schwacher Basen mit starken Säuren sauer, wie z. B. Eisenchlorid, FeCl_3 , und Anilinchlorhydrat.

Es ist leicht ersichtlich, dass die als Hydrolyse bezeichnete, umkehrbare Spaltung eines Salzes in Säure und Base um so vollständiger sein muss, je schwächer die beiden Komponenten des Salzes sind. So ist z. B. Cyankalium bedeutend mehr hydrolysiert als Kaliumacetat, dessen Hydrolyse bei gewöhnlicher Temperatur eben noch messbar ist.

Wie sich leicht aus den Gleichungen 2a und 3 herleiten lässt und auch von Walker experimentell bewiesen wurde, gilt für die Hydrolyse von Salzen, welche aus einem starken und einem schwachen Elektrolyten bestehen:

$$\frac{[\text{Säure}][\text{Base}]}{[\text{Salz}]} = K, \dots \dots \dots (14a)$$

wenn [] wie immer die Konzentrationen der betr. Stoffe bezeichnen. Dagegen folgt die Hydrolyse eines Salzes, welches aus zwei schwachen Elektrolyten besteht, also etwa Ammoniumacetat, der Gleichung:

$$\frac{[\text{Säure}][\text{Base}]}{[\text{diss. Salz}]^2} = K = \frac{K_w}{K_a \cdot K_b}, \dots \dots \dots (14b)$$

wenn K_a bzw. K_b die Dissoziationskonstante von Säure und Base ist.

Im Gegensatz zum ersterwähnten Fall tritt also hier die Salzkonzentration im Quadrat auf, und demgemäss ist die Hydrolyse eines solchen Salzes wie Ammoniumacetat von der Verdünnung unabhängig, während die Hydrolyse eines Salzes wie Natriumacetat oder Anilinchlorhydrat mit steigender Verdünnung wächst.

Folgende Zahlen geben eine konkrete Vorstellung von der Grösse der Hydrolyse der Alkalisalze einiger schwachen Säuren in 0,1-norm. Lösung bei 25°.

Salz	Hydrolysegrad	Dissoziationskonstante der Säure
Natrium-Saccharat	60,0%	$1,85 \cdot 10^{-13}$
Kalium-Phenolat	3,05%	$1,3 \cdot 10^{-10}$
Kalium-Cyanid	1,12%	$7,2 \cdot 10^{-10}$
Natrium-Acetat	0,008%	$1,8 \cdot 10^{-5}$

Mit der Verdünnung ändert sich Kaliumphenolat folgendermassen:

Verdünnung	Hydrolysegrad
0,10 norm.	3,05%
0,010	9,3
0,001	27

Eine ausgezeichnete Darstellung der hydrolytischen Gleichgewichte hat Bjerrum in seiner Monographie: „Die acidimetrische und alkalimetrische

Titration“ (Stuttgart 1914) gegeben. Er berechnet (unter der Voraussetzung, dass alle Salze vollständig elektrolytisch dissoziiert sind) die Hydrolysegrade von Salzen, die aus einem starken und einem schwachen Elektrolyten bestehen. Eine sehr zweckmässige Umrechnung dieser Tabelle hat Michaelis (Wasserstoffionen-Konzentration, 2. Aufl. 1922, S. 77) vorgenommen, indem er für die Lösung eines Salzes aus einer schwachen Base und einer starken Säure die p_H -Werte angibt.

K der schwachen Base	Konzentration des Salzes			
	1 n	0,1 n	0,01 n	0,001 n
10^{-4}	5	5,5	6	7,0
10^{-6}	4	4,5	5	6,0
10^{-8}	3	3,5	4	4,5
10^{-10}	2	2,5	3	3,6
10^{-13}	1,02	1,6	2,2	3,0

Umgekehrt haben Euler und E. Rudberg¹⁾ die Konzentrationen der Salze tabelliert, welches bei verschiedenen Konzentrationen einer äusserst schwachen Base und einer starken Säure (HCl) entstehen. Ich lasse sie, etwas erweitert, folgen.

Dissoziationskonstante der Base	Konzentration der Base		
	0,05	0,10	0,2 n
	HCl = 0,05 n.		
10^{-17}	$2,5 \cdot 10^{-8}$	$5 \cdot 10^{-6}$	10^{-5}
10^{-19}	$2,5 \cdot 10^{-8}$	$5 \cdot 10^{-8}$	10^{-7}
10^{-20}	$2,5 \cdot 10^{-9}$	$5 \cdot 10^{-9}$	10^{-8}
	HCl = 0,10 n.		
10^{-17}	$5 \cdot 10^{-6}$	10^{-5}	$2 \cdot 10^{-5}$
10^{-19}	$5 \cdot 10^{-8}$	10^{-7}	$2 \cdot 10^{-7}$
10^{-20}	$5 \cdot 10^{-9}$	10^{-8}	$2 \cdot 10^{-8}$
	HCl = 0,20 n.		
10^{-17}	10^{-5}	$2 \cdot 10^{-5}$	$4 \cdot 10^{-5}$
10^{-19}	10^{-7}	$2 \cdot 10^{-7}$	$4 \cdot 10^{-7}$
10^{-20}	10^{-8}	$2 \cdot 10^{-8}$	$4 \cdot 10^{-8}$

Ternäre und quaternäre Salze. Die Verhältnisse liegen hier nicht so einfach wie bei den binären Salzen. Hier interessieren uns in erster Linie die Carbonate und Phosphate. Die Dissoziationskonstanten der beiden entsprechenden Säuren haben wir bereits S. 23 u. 31 kennengelernt.

Es betrug die Dissoziationskonstante der Kohlensäure nach Michaelis und Rona $4,4 \cdot 10^{-7}$, demgemäss ist Natriumcarbonat in mittlerer Verdünnung mässig hydrolysiert (in 0,10-norm. Lösung bei 25° zu 3,2%).

¹⁾ Euler und Rudberg, Zs f. anorg. Chem. 127, 244; 1923.

Entsprechend der sehr geringen Konstanten ($K_3 = 10^{-12}$) des Dissoziationsgleichgewichtes III



ist tertiäres Natriumphosphat Na_3PO_4 in verdünnter Lösung fast vollständig in NaOH und Na_2HPO_4 hydrolysiert.

Eine eingehendere Behandlung der physiologisch interessanten Gemische von Kohlensäure und Carbonat sowie von Phosphorsäure und Phosphat verdankt man L. J. Henderson¹⁾.

Henderson geht hierbei vom Prinzip der isohydrischen Lösungen²⁾ aus; nach demselben tritt beim Mischen zweier Lösungen, welche ein gemeinsames Ion in derselben Konzentration enthalten, keine Änderung in der Konzentration dieses gemeinsamen Ions ein.

Nach Walker und Abbot gelten die Gleichungen³⁾:

$$\frac{[\text{H}^+][\text{HCO}_3']}{[\text{H}_2\text{CO}_3]} = 3 \cdot 10^{-7} \quad \text{und} \quad \frac{[\text{H}^+][\text{HPO}_4'']}{[\text{H}_2\text{PO}_4']} = 2 \cdot 10^{-7}.$$

„Es ist nun offenbar, dass in einer Lösung, welche z. B. Kohlensäure und Natriumcarbonat enthält, die Konzentration der nicht dissoziierten Kohlensäure H_2CO_3 fast genau gleich der absoluten Menge der freien Kohlensäure der Lösung ist, während andererseits, wenn die vorhandene Bicarbonatmenge nicht unendlich klein ist, alle HCO_3' -Ionen aus der Dissoziation der letzteren (stark dissoziierten) Substanz hervorgehen werden, und demgemäss wird ihre Konzentration fast proportional der Konzentration des dissoziierten Bicarbonats sein, die in einer 0,1-norm. Lösung etwa 80% der gesamten Bicarbonatkonzentration beträgt.“

Die obige linke Gleichung kann man folgendermassen umformen:

$$[\text{H}^+] = \frac{[\text{H}_2\text{CO}_3] \cdot 3 \cdot 10^{-7}}{[\text{HCO}_3']} = \frac{[\text{H}_2\text{CO}_3] \cdot 3 \cdot 10^{-7}}{0,80 \cdot [\text{NaHCO}_3]}.$$

Mit Hilfe dieser Gleichung kann das Gleichgewicht in Carbonatlösungen (bei Zimmertemperatur) leicht für jede Wasserstoffionen-Konzentration berechnet werden. Wollen wir z. B. dieses Gleichgewicht bei der H^+ -Konzentration $1 \cdot 10^{-7}$ kennen lernen — was etwa der Neutralität bei 24° entspricht — so setzen wir:

$$\frac{[\text{H}_2\text{CO}_3] \cdot 3 \cdot 10^{-7}}{0,80 \cdot [\text{NaHCO}_3]} = 1 \cdot 10^{-7},$$

woraus sich ergibt:

$$\frac{[\text{H}_2\text{CO}_3]}{[\text{NaHCO}_3]} = \frac{0,8}{3} = \frac{1}{3,75}.$$

¹⁾ L. J. Henderson, *Ergebn. d. Physiol.* 8, 254; 1909.

²⁾ Arrhenius, *Theorie der isohydrischen Lösungen.* *Zs f. physik. Chem.* 2, 284; 1888.

³⁾ Über den Zahlenwert der zweiten Dissoziationskonstanten K_2 der Phosphorsäure siehe Prideaux and Ward, *Jl Chem. Soc.* 125, 423; 1924.

Bei $p_H = 7$ enthält also die besprochene Carbonatlösung etwa 3,8 mal so viel Natriumcarbonat als Kohlensäure. Offenbar können die Konzentrationen der beiden Substanzen stark variiert werden, wenn nur das Verhältnis gleich bleibt, ohne dass p_H sich wesentlich ändert.

Die hauptsächlichste Ungenauigkeit der Rechnung rührt davon her, dass der Dissoziationsgrad des Natriumcarbonats sich etwas mit der Konzentration ändert.

Eine ganz analoge Überlegung kann man für Phosphatmischungen hinsichtlich des Quotienten

$$\frac{\text{NaH}_2\text{PO}_4}{\text{Na}_2\text{HPO}_4}$$

anstellen.

Wie schon S. 50 bemerkt wurde, haben sich Mischungen aus sekundärem und primärem Phosphat als besonders geeignete „Puffer“ erwiesen. Wir fügen hier noch einen Auszug aus der Standard-Tabelle von Sörensen für 18° bei und verweisen auf die S. 51 mitgeteilte Fig. 9.

Zusammensetzung der Mischung			p_H
—	10 ccm prim. Phosphat		4,49 ₄
1 ccm sek. Phosphat	+ 9 „ „		5,90 ₆
2 „ „	+ 8 „ „		6,23 ₉
3 „ „	+ 7 „ „		6,46 ₉
4 „ „	+ 6 „ „		6,64 ₃
5 „ „	+ 5 „ „		6,81 ₃
6 „ „	+ 4 „ „		6,97 ₉
7 „ „	+ 3 „ „		7,16 ₈
8 „ „	+ 2 „ „		7,38 ₁
9 „ „	+ 1 „ „		7,73 ₁
10 „ „	— —		9,18 ₂

Unter den von Clark und Lubs angegebenen Standard-Puffer-Mischungen ist die Borsäure-KCl-NaOH-Kombination besonders empfehlenswert.

Auf 200 ccm verdünnte Mischung aus

50 ccm m/5 H_3BO_3 , m/5 KCl und x ccm m/5 NaOH

pH	ccm m/5 NaOH
7,8	2,61
8,0	3,97
8,2	5,90
8,4	8,50
20° 8,6	12,00
8,8	16,30
9,0	21,30
9,2	26,70
9,4	32,00
9,6	36,85
9,8	40,80
10,0	43,90

Fig. 10 (S. 57) nach Clark und Lubs gilt für 50 ccm 0,2 m. H_3BO_3 + 0,2 m. KCl + x ccm 0,2 m. NaOH verdünnt auf 200 ccm.

Um den Einfluss der Temperatur auf den Hydrolysegrad klarzustellen, gehen wir auf die S. 53 gegebene Formel (14b) für die Hydrolysekonstante K zurück:

$$K = \frac{K_w}{K_a K_b}.$$

Die Änderung der Hydrolysekonstante K ist also offenbar bestimmt durch die Temperaturkoeffizienten der drei beteiligten Dissoziationskonstanten. Nun ist bekannt (vgl. S. 24), dass K_w stark mit der Temperatur steigt. Die Dissoziationskonstanten der starken und mässig starken Elektrolyte besitzen im allgemeinen einen geringen Temperaturkoeffizienten, demgemäss steigt die Hydrolyse von Salzen wie Natriumacetat erheblich mit der Temperatur.

Nur bei sehr schwachen Säuren und Basen, wie z. B. Harnstoff ($K = 10^{-14}$), ist der Temperatureinfluss auf die Dissoziation von etwa gleicher Grössenordnung wie beim Wasser. Da sich in diesem Fall der Quotient K_w/K_b wenig mit der Temperatur ändert, so ist die Hydrolyse eines Salzes wie Harnstoffchlorid von der Temperatur fast unabhängig.

4. Indikatoren.

Aus den für hydrolytische Gleichgewichte gefundenen Beziehungen lässt sich auch das Verhalten derjenigen Indikatoren

ableiten, mit welchen der Neutralisationsvorgang verfolgt, bzw. der Grad der Acidität (oder Alkalinität) einer Lösung gemessen werden kann. Diese Indikatoren sind nämlich durchgehends schwache oder sehr schwache Elektrolyte, teils Basen, teils Ampholyte, teils Säuren; zu den letzteren gehören u. a. Rosolsäure, die Nitrophenole und Phenolphthalein.

Setzt man eine geringe Menge von Phenolphthalein zu einer Salzsäurelösung, so wird durch die stark dissoziierte Salzsäure, selbst wenn diese verdünnt ist, die Dissoziation der sehr schwachen (zweibasischen) Säure Phenolphthalein so vollständig zurückgedrängt, dass praktisch keine Phenolphthalein-ionen in der Lösung bleiben, sondern nur undissoziiertes, farbloses Phenolphthalein. Setzt man nun Natronlauge zu, so wird dieselbe nach dem auf S. 52 besprochenen Gesetz von der starken Salzsäure vollständig in Anspruch genommen, und die sehr viel schwächere Indicatorsäure gelangt erst dann zur Salzbildung, wenn die Salzsäure vollständig neutralisiert ist; erst dann bindet Phenolphthalein das Alkali, und zwar zwei Äquivalente. Das Anion des Dinatriumphenolphthaleins ist intensiv rot, und da Alkalisalze stets stark dissoziiert sind, tritt eine annähernd so grosse Menge von roten Ionen auf, als der Menge von Dinatriumphenolphthalein entspricht. (Mit dieser

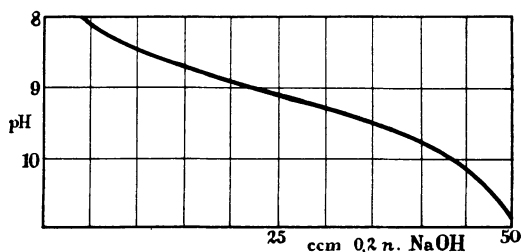


Fig. 10.

Bildung von roten Anionen ist tatsächlich eine Konstitutions- bzw. Bindungs-Verschiebung im Molekül verknüpft, welche als die nächste Ursache der Farbänderung anzusprechen ist; ähnliches dürfte bei den meisten Indicatoren der Fall sein, wodurch aber die obige Auffassung der Indicatoren als schwache Säuren und Basen im wesentlichen nicht geändert wird.) Durch den scharfen Anstieg der Konzentration der Indicatorionen wird im besprochenen Fall der Übergang sauer-neutral-alkalisch sehr deutlich bemerkbar, und eine solche scharfe Änderung ist bei jeder Titration anzustreben.

Aus obiger Darstellung wird auch die Tatsache verständlich, dass der Farbenübergang unscharf wird, wenn wir eine schwache Base, etwa Ammoniak, in Gegenwart von Phenolphthalein titrieren: Ist nämlich die Lösung neutral geworden und setzen wir weitere Mengen Ammoniak zu, so bildet sich nun allerdings Ammonium- und Diammonium-Phenolphthalein; indessen sind diese Salze, da sie sowohl aus einer schwachen Base als aus einer sehr schwachen Säure bestehen, so weitgehend in freies Phenolphthalein und freies Ammoniak hydrolysiert, dass es eines erheblichen Überschusses von Ammoniak bedarf, um die Konzentration der Phenolphthaleinionen auf einen merklichen Betrag zu bringen. Während dieses Zusatzes vertieft sich erst allmählich die rote Farbe der Lösung von schwach Rosa bis Rot; der Übergang ist unscharf. Man wird also bei der massanalytischen Bestimmung von Ammoniak Phenolphthalein nicht benutzen, und allgemein lässt sich sagen, dass man zur Titration schwacher Basen sehr schwache Indicatorsäuren nicht verwenden darf, sondern vielmehr möglichst starke, sofern dieselben nur viel schwächer sind als die bei der Titration beteiligte Säure; eine derartige Indicatorsäure ist z. B. p-Nitrophenol (Dissoziationskonstante $K = 7 \cdot 10^{-8}$ bei 25°). Diese Säure ist vielmal stärker als Phenolphthalein (K etwa $2 \cdot 10^{-10}$) und somit sind ihre Salze erheblich weniger hydrolysiert; selbst eine schwache Base ruft also sofort die Bildung wahrnehmbarer Mengen der gelben Nitrophenol-Ionen hervor.

Andererseits ist die Anwendung eines so schwach sauren Indicators, wie Phenolphthalein, notwendig, wenn es sich um die Titration schwacher, also organischer Säuren handelt. Anderenfalls würde nämlich der Indicator mit der zu titrierenden Säure schon vor deren vollständiger Neutralisation konkurrieren und somit Indicatorionen bilden können.

Über die Acidität, bei welcher die Farbumschläge der Indicatoren eintreten, geben die „Indicatorreihen“ Auskunft, deren erste von Sallessky und Fels¹⁾ auf Veranlassung von Nernst aufgestellt wurde.

Wir geben einen Auszug aus der von Sørensen sehr exakt gearbeiteten Indicatorreihe wieder:

¹⁾ Sallessky, Zs f. Elektrotech. 10, 204; 1904. — Fels, ebenda, S. 208.

Auszug aus der Tabelle VI von Sörensen, *Ergebn. d. Physiologie*, 12, 1912.

Bei Tr. ist die Tropfenzahl angegeben.

Indicatoren	Der Umschlagbereich												Herstellung der Indicatorlösung												
	pH																								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12													
Methylviolett	Starke Lösung 8-3 Tr.		Schw. Lösung 10-4 Tr.												Starke Lösung: 0,5 g in 1 l Wasser Schwache Lösung: 0,1 g in 1 l Wasser										
Mauvein	Starke Lösng. 8-3 Tr.		Schw. Lösng. 10-4 Tr.												Starke Lösung: 0,5 g in 1 l Wasser Schwache Lösung: 0,1 g in 1 l Wasser										
p-Benzolsulfon- säure-azo-diphenyl- amin			5-3 Tr.												3mal aus Wasser umkrystallisiert 0,1 g in 1 l Wasser										
m-Benzolsulfon- säure-azo-diphenyl- amin			5-3 Tr.												3mal aus Wasser umkrystallisiert 0,1 g in 1 l Wasser										
Benzol-azo-dime- thyl-anilin					0-5 Tr.												3mal aus absolutem Alkohol umkrystalli- siert. 0,1 g in 1 cem 0,1 n HCl + 800 cem Alkohol + 199 cem Wasser								
p-Benzolsulfon- säure-azo-dime- thyl-anilin					5-3 Tr.												Handelsware; 3mal aus Wasser umkry- stallisiert; 0,1 g in 1 l Wasser								
p-Benzolsulfon- säure-azo- α -naph- thylamin							12-8 Tr.												0,1 g in 600 cem Alkohol + 400 cem Wasser						
o-Benzolcarbon- säure-azo-dime- thylanilin							4-2 Tr.												0,1 g in 300 cem Alkohol + 200 cem Wasser						
p-Nitrophenol							20-3 Tr.												0,4 g in 60 cem Alkohol + 940 cem Wasser						
Neutralrot									20-10 Tr.												0,1 g in 500 cem Alkohol + 500 cem Wasser				
Rosolsäure									15-6 Tr.												0,4 g in 400 cem Alkohol + 600 cem Wasser				
p-Benzolsulfon- säure-azo- α -naph- thol									10-4 Tr.												0,1 g in 1 l Wasser				
α -Naphtholphthalein									12-4 Tr.												0,1 g in 150 cem Alkohol + 100 cem Wasser				
Phenolphthalein									20-3 Tr.												0,5 g in 500 cem Alkohol + 500 cem Wasser				
Thymolphthalein									10-3 Tr.												0,4 g in 500 cem Alkohol + 500 cem Wasser				
p-Nitrobenzol-azo- salicylsäure											10-5 Tr.												0,1 g in 1 l Wasser		
p-Benzolsulfon- säure-azo-resorzin													10-5 Tr.												0,1 g in 1 l Wasser

Ferner haben Clark und Lubs eine Anzahl sehr brauchbarer Indicatoren der Phthaleinreihe angegeben.

Auch die Tabelle dieser Autoren sei hier vollständig mitgeteilt:

Tabelle nach Clark und Lubs, Journ. of Bact. 2, 1; 1917.

Rationeller Name	Gewöhnliche Bezeichnung	Konzentr. %	Farben-Umschlag	p _H -Gebiet
Thymol-sulfo-phthalein (saurer Gebiet)	Thymolblau	0,04	rot-gelb	1,2—2,8
Tetra-bromo-phenol-sulfo-phthalein	Bromphenolblau	0,04	gelb-blau	3,0—4,6
o-Carboxy-benzol-azo-dimethyl-anilin	Methylrot	0,02	rot-gelb	4,4—6,0
o-Carboxy-benzol-azo-dipropyl-anilin	Propylrot	0,02	rot-gelb	4,8—6,4
Di-bromo-o-kresol-sulfo-phthalein	Bromkresol-purpur	0,04	gelb-purpur	5,2—6,8
Dibromo-thymol sulfo-phthalein	Bromthymolblau	0,04	gelb-blau	6,0—7,6
Phenol-sulfo-phthalein	Phenolrot	0,02	gelb-rot	6,8—8,4
o-Kresol-sulfo-phthalein	Kresolrot	0,02	gelb-rot	7,2—8,8
Thymol-sulfo-phthalein (alkalisches Gebiet)	Thymolblau	0,04	gelb-blau	8,0—9,6
o-Kresol-phthalein	Kresolphthalein	0,02	farblos rot	8,2—9,8

Nicht alle Farbstoffe mit Farbenumschlag bei der Salzbildung eignen sich zur Bestimmung der p_H-Werte. Besonders die Gegenwart von Eiweissstoffen kann den Umschlagepunkt recht erheblich verändern, und ähnliche Verschiebungen können, wie Michaelis und Rona fanden, bei manchen Indicatoren durch Neutralsalze veranlasst werden (Salzfehler).

Auf die Beobachtung der Farbenschläge von Indicatoren hat Sörensen eine Methode zur Bestimmung der Acidität von Lösungen gegründet. Diese von ihm besonders genau ausgearbeitete Methode ist nicht nur in der Originalmitteilung beschrieben, sondern auch von diesem Forscher 1912 zusammenfassend hergestellt worden. Es erscheint also überflüssig, die methodischen Einzelheiten hier wiederzugeben.

Eine zweite Methode, Indicatoren zu Aciditätsmessungen anzuwenden, ist von Michaelis¹⁾ ausgearbeitet worden. Sie beruht auf der colorimetrischen Feststellung des Farbgrades einfarbiger Indicatoren, indem man ausprobiert, welche relativen Indicatormengen man braucht, um einer Laugenlösung und der unbekanntem Lösung die gleiche Farbtiefe zu erteilen.

Durch colorimetrische Vergleichung der erhaltenen Farbtiefe mit der bei extrem alkalischer Reaktion erreichbaren maximalen Farbtiefe bei gleicher Farbstoffmenge erfährt man den „Farbgrad“ F, d. h. den Dissoziationsgrad γ der Indicatorsäure in der zu untersuchenden Lösung. Aus diesem kann man $[H^+] = h$ berechnen mit der Formel

¹⁾ Michaelis und Gyemant, Biochem. Zs 109, 166; 1920. — Michaelis und Krüger, Biochem. Zs 119, 307; 1921. Nach einer prinzipiell ähnlichen Methode hat auch Gillespie gearbeitet (Soil Science, 9, 115; 1920 und JI Amer. Chem. Soc. 42, 742; 1920).

$$h = K \cdot \frac{1-\gamma}{\gamma} \text{ oder } p_H = p_K + \log \frac{\gamma}{1-\gamma}$$

wo p_K den negativen Logarithmus der Dissoziationskonstanten des Indicators bedeutet.

Von Michaelis¹⁾ ist besonders die Serie ausgearbeitet worden, welche aus den Indicators p-Nitrophenol, α -Dinitrophenol (1, 2, 4), β -Dinitrophenol (1, 2, 6), und γ -Dinitrophenol besteht und in dem weiten Aciditätsbereich $p_H = 3 - 9$ sehr genaue Messungen gestattet. In dieser Mitteilung sind auch Messungen trüber Flüssigkeiten, Salzfehler usw. besprochen.

Indicator	Farbe	Anwendungsbereich p_H
β -Dinitrophenol	gelb	1,7 — 4,4
α -Dinitrophenol	„	2,0 — 4,7
p-Nitrophenol	„	4,7 — 7,9
m Nitrophenol	„	6,3 — 9,0
Phenolphthaleïn	rot	8,5 — 10,5
m-Nitrobenzolasozalizylsäure	gelb	10 — 12

Die Werte für p_K ergeben sich aus folgender Tabelle nach Michaelis.

	β -Dinitrophenol	α -Dinitrophenol	p-Nitrophenol	m-Nitrophenol
0°	3,79	4,16	7,39	8,55
10°	3,74	4,11	7,27	8,43
18°	3,69	4,06	7,18	8,35
20°	3,68	4,05	7,16	8,32
30°	3,62	3,99	7,04	8,21
40°	3,56	3,93	6,93	8,09

Im übrigen sei auf die schon zitierte Monographie Wasserstoffionen-Konzentration, Tl. I, 2. Aufl. 1922 verwiesen, sowie auf das ebenfalls sehr empfehlenswerte Werk von W. M. Clark, The Determination of Hydrogen Ions (Baltimore 1921), in welchem der Verfasser auch bemerkenswerte eigene Beiträge zur Methodik der Aciditätsmessungen beschreibt.

In beiden Büchern findet man auch alle erforderlichen theoretischen und experimentellen Hinweise zum praktischen Arbeiten mit der elektrometrischen Methode zur Bestimmung der Wasserstoff-Ionen-Konzentration, welche sich auf die Nernstsche Theorie der Gasketten gründet.

Diese elektrometrische Messung der Acidität ist jedenfalls als die Standard-Methode zu betrachten, welche in allen Fällen²⁾, wo es auf grösste Genauigkeit ankommt, Anwendung finden muss.

¹⁾ Michaelis und Gyemant, Biochem. Zs 109, 165; 1920. — Michaelis und Krüger, Biochem. Zs 119, 307; 1921.

²⁾ Gegenwart von CO_2 macht gewisse Vorsichtsmassregeln nötig; Gegenwart von verdünntem NH_3 in noch höherem Grade, weil es die Elektroden vergiftet; NH_3 in grösseren Konzentrationen und SH_2 schliessen die Verwendung von Gasketten mit Platinelektroden überhaupt aus. Über die Verwendung der Chinhydron-Elektrode siehe u. a. S. P. L. und Marg. Sørensen, Ann. Chim. 1921. — Harris, JI Chem. Soc. 123; 1923. — Bülmann, Trans. Faraday Soc. 19; 1924.

Speziell der Gebrauch der Farbenindikatoren ist von J. M. Kolthoff sehr übersichtlich dargestellt worden (Berlin 1921).

Pufferung.

Aus Abschnitt C S. 49—51 geht hervor, dass das Wesen und der Wert eines Puffers darin besteht, dass er Lösungen bei Zusatz von Säuren oder Basen vor starken Aciditätsänderungen schützt. Setzen wir zu einer Lösung, welche Natriumacetat und Essigsäure enthält, eine (relativ zum Natriumacetat kleine) Menge Salzsäure, so wird der grösste Teil der Wasserstoffionen der Salzsäure zu ihrem Umsatz mit Natriumacetat verbraucht und kommt also nicht zur Geltung. Der Grad, in welchem eine Lösung bei Zuführung von H- oder OH-Ionen durch ihre Puffer gegen Aciditätsänderungen geschützt ist, spielt offenbar in Säften und Organflüssigkeiten, in welchen schon kleine Aciditätsänderungen wesentliche Wirkungen im Gefolge haben, eine grosse Rolle. Auf die Notwendigkeit eines Masses für den Grad des Aciditätsschutzes oder der „Pufferung“ haben Koppel und Spiro¹⁾ aufmerksam gemacht. Sie haben auch die Pufferwirkung (Einwirkung von „Moderatoren“) eingehend theoretisch behandelt. Als Mass der Pufferung wird man mit Koppel und Spiro für kleine Säurezusätze geeignet den Quotienten

$$\frac{dS}{dpH}$$

einführen, wo dS die zugesetzte Säuremenge bedeutet und dp_H die durch sie veranlasste Aciditätsänderung in der Sörensenschen Einheit.

Wie leicht abgeleitet werden kann, ist die Pufferwirkung eines Säure-Salzgemisches von der Natur (Dissoziationskonstanten) der Säure unabhängig. In jedem solchen Gemisch liegt das Maximum der Pufferwirkung bei einer Mischung von gleichen Teilen Säure und Salz; demgemäss liegt das Maximum der Pufferwirkung in einem für jedes Puffersystem verschiedenen p_H.

Michaelis hat (Monogr. S. 91) für den reziproken Wert der Pufferung die Bezeichnung „Nachgiebigkeit“ einer Lösung vorgeschlagen.

D. Abhängigkeit der Enzymwirkungen von der Acidität des Reaktionssystemes.

Während man bei einzelnen enzymatischen Reaktionen, wie z. B. bei der Pepsin-Wirkung, schon lange erkannt hat, dass die Acidität von grösster Bedeutung für den Verlauf des Vorgangs ist, wurde im allgemeinen dem Aciditäts- bzw. Alkalitätsgrad der Enzymlösungen bis vor etwa 10 Jahren viel zu wenig Beachtung geschenkt. Nehmen wir als Beispiel ein verhältnismässig so häufig bearbeitetes Enzym wie die Saccharase, so haben allerdings

¹⁾ M. Koppel und Spiro, *Bioch. Zs* 65, 409; 1914.

Kjeldahl (1881), O'Sullivan und Tompson, sowie Fernbach (1890) bei ihren grundlegenden Versuchen eine optimale Acidität ermittelt und eingehalten. Bei späteren experimentellen und theoretischen Arbeiten ist indessen dieser Umstand vernachlässigt worden, und erst Hudson¹⁾ hat dann wieder auf die wichtige Rolle der H-Ionen bei der Saccharase-Wirkung aufmerksam gemacht, welche dann kurz darauf für eine grössere Zahl von Enzymreaktionen eingehend von Sørensen 1909 bearbeitet wurde.

Sørensen und Michaelis verdankt man besonders noch die Ausarbeitung der gegenwärtigen Methodik der Aciditätsmessungen bei Enzymreaktionen.

Nachdem in früheren Arbeiten meist die „Titrationsacidität“ gemessen worden war, hob Sørensen die Konzentration der Wasserstoff- bzw. Hydroxyl-Ionen als den massgebenden Faktor hervor²⁾.

Sørensen hat 1909 zunächst die Wirkung der Hefensaccharase bei wechselnder Konzentration der Wasserstoffionen experimentell untersucht, und zwar bei 52°. Wir geben die graphische Darstellung seiner vier ersten Versuchsreihen wieder (Bioch. Zs 21, S. 268).

Man ersieht ohne weiteres die starke Abhängigkeit der invertierenden Wirkung von der Acidität. Ferner zeigt sich, dass die Saccharasespaltung des Rohrzuckers innerhalb der recht weitgehend variierten Versuchsbedingungen, auf welche wir noch zurückkommen, in solchen Lösungen am grössten ist, deren Wasserstoffionen-Konzentration bei 18° dem Wert $p_H = 4,4 - 4,6$ entspricht. Die optimale Zone ist übrigens ziemlich breit, sie erstreckt sich von etwa $p_H = 3,5 - 5,5$.

Bei der von Sørensen gewählten Versuchstemperatur kommt schon bei H-Konzentrationen, die vom Optimum nicht weit entfernt liegen, die irreversible Zerstörung des Enzyms in Betracht. Es ist deswegen, wie dieser

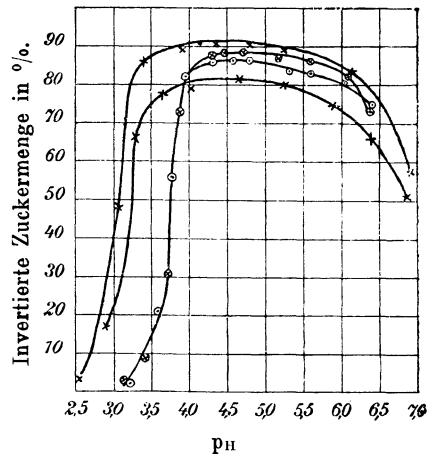


Fig. 11.

50 ccm ca. 10% iger Rohrzuckerlösung
 + a (wechselnd von 0 bis 35) ccm
 0,02 · n H₂SO₄ mit Puffer
 + (35 - a) ccm Wasser
 + 10 ccm Saccharaselösung.

¹⁾ Hudson, JI Amer. Chem. Soc. 30, 1160, 1564; 1908.

²⁾ Ansätze in dieser Richtung hat bereits A. Kanitz gemacht (H. 37, 75; 1903). — Verf. hat 1907 (Euler, H. 51, 219) bei einer Untersuchung über Erepsin-Verdauung von Dipeptiden das vom Substrat und vom Enzympräparat gebundene Alkali ermittelt und die Konzentration des freien Alkalis berechnet; sie wurde zu 0,000012 angegeben, entsprechend $p_H = 8,6$ (wenn für 37° $K_w = 3,1 \cdot 10^{-14}$ gesetzt wird). Rona und Arnheim (H. 57, 84; 1913) kommen durch ihre viel eingehenderen Versuche für 38° zum Wert $p_H = 8,3$. Berücksichtigt man meine unzureichende Versuchsmethodik, so ist die Übereinstimmung recht befriedigend. Der nby (Inaug.-Dissert. Stockholm 1917) gibt den etwas kleineren Wert $p_H = 7,9$ an.

Forscher in Übereinstimmung mit Michaelis bemerkt, vorzuziehen, bei Bestimmungen der optimalen H⁺-Konzentration eine niedrigere Versuchstemperatur zu wählen.

Dies haben Michaelis und seine Mitarbeiter getan, denen wir eine Reihe von Untersuchungen über den Einfluss der H⁺- und HO⁻-Ionen auf die wichtigsten Enzyme verdanken.

Später wurde die Aciditätskurve auch mit gereinigter Saccharase festgelegt, und zwar von Euler und Myrbäck¹⁾ und fast gleichzeitig von Willstätter, Graser und Kuhn²⁾. In der Fig. 12 ist die von Michaelis und Davidsohn erhaltene Kurve ausgezogen, während die Ergebnisse zweier Versuchsreihen von Myrbäck durch Punkte bzw. durch Vierecke bezeichnet sind; die gleiche gute Übereinstimmung mit den älteren Werten zeigen die von Willstätter gewonnenen. Vergleicht man die Wasserstoffzahl, bei der das Enzym 50% der maximalen Wirkung aufweist, so findet Willstätter $1,7 \cdot 10^{-7}$ in ziemlich guter Übereinstimmung mit Michaelis ($3 \cdot 10^{-7}$) und den Stockholmer Messungen ($2 \cdot 10^{-7}$).

In ähnlicher Weise sind in den letzten 12 Jahren die Aciditäts-Optima fast aller eingehender bekannten Enzyme festgelegt worden. Ihre Kenntnis ist für die quantitative Beurteilung enzymatischer Wirkungen unumgänglich notwendig. Indessen darf andererseits nicht ausser acht gelassen werden, dass diese Aciditäts-Optima von der Gegenwart und Konzentration anderer Lösungsbestandteile, besonders anwesender Salze und sonstiger Aktivatoren abhängig sind²⁾, ferner auch vom Substrat, wenn verschiedene Substrate in Betracht kommen können, so dass man richtiger vom Aciditäts-Optimum einer enzymatischen Reaktion, als von demjenigen eines Enzyms spricht.

Was zunächst das am eingehendsten untersuchte Enzym, die Saccharase, betrifft, so haben Michaelis und Davidsohn ihre Versuche bei 22,3° in 4%iger Rohrzuckerlösung ausgeführt, welche durch verschiedene Säuren und Puffer (vgl. S. 50) auf wechselnden H⁺-Konzentrationen gehalten wurde.

Die genannten Forscher stellten sich die Aufgabe, für jede beliebige H⁺-Konzentration denjenigen Bruchteil des gesamten Enzyms zu bestimmen, der wirklich wirksam ist.

Führen wir nach Michaelis folgende Bezeichnungen ein:

Φ_{\max} = Gesamtmenge Enzym, die bei optimalem p_H zur Wirkung kommt,
 Φ = Enzymmenge, die bei einem beliebigen Wert von p_H wirksam ist, so soll $\Phi : \Phi_{\max}$ als Funktion von p_H dargestellt werden.

Um die wirksame Enzymmenge zahlenmässig darzustellen, werden die Zeiten verglichen, die zur Erreichung eines bestimmten Umsatzes erforderlich sind; diesen ist die wirksame Enzymmenge umgekehrt proportional. (Die

¹⁾ Euler und Myrbäck, H. 120, 61; 1922.

²⁾ Willstätter, Graser und Kuhn, H. 123, 1; 1922.

Tatsache, dass die Form der Umsatzkurve von der H^+ -Konzentration allgemein abhängig ist, wird im 4. Kapitel näher besprochen.)

Michaelis und Davidsohn¹⁾ haben also für eine beliebige H^+ -Konzentration den Umsatz als Funktion der Zeit experimentell festgestellt, und betrachten die erhaltene Kurve als Standardkurve. Dann stellen sie bei gegebener Acidität für die Zeiten t_1 , t_2 usw. den zugehörigen Umsatz x_1 , x_2 usw. fest, und suchen auf der Standardkurve diejenigen Zeiten T_1 , T_2 , die den Umsätzen x_1 , x_2 ebenfalls entsprechen. Die Quotienten $\frac{T_1}{t_1}$, $\frac{T_2}{t_2}$ usw., welche die relativen Umsatzgeschwindigkeiten angeben, sind dann ein Mass für die wirksame Enzymmenge Φ , bezogen auf die des Standardversuches.

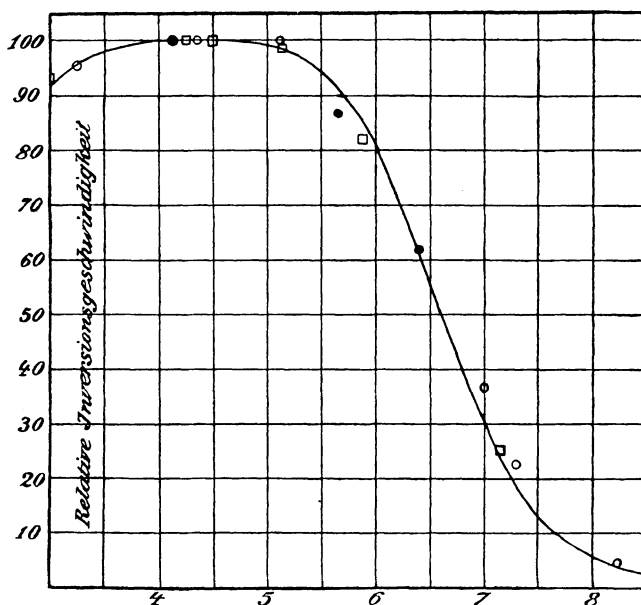


Fig. 12.

In vorstehender Figur_i ist die relative Umsatzgeschwindigkeit als Ordinate, p_H als Abszisse aufgetragen.

Ein Vergleich mit der Fig. 11 zeigt, dass auch hier die „optimale Zone“ zwischen $p_H = 3,5$ und $5,5$ liegt.

Sehen wir zunächst von dem punktierten (rechten) Teil der Kurve ab, so erinnert ihre Form an die Dissoziationskurve einer schwachen Base. Michaelis hat denn auch gleich den Schluss gezogen, dass die obige Figur 12 eine dieser Kurven darstellt, und dass demgemäss die Saccharase eine Säure oder eine Base oder ein Ampholyt ist.

Nun hatten Überführungsversuche von Michaelis gezeigt, dass die von ihm benutzten Saccharasepräparate, welche ja, dem damaligen Stand der

¹⁾ Michaelis und Davidsohn, Biochem. Zs 35, 386; 1911.

Forschung entsprechend, noch sehr verunreinigt waren, in schwach saurer Lösung zur Anode wandern, also selbst wie eine Säure, negativ geladen sind, und dass sie von elektropositiven Adsorptionsmitteln gut, von elektro-negativen fast gar nicht adsorbiert wird. Demgemäss wurde die Entscheidung getroffen, dass die obige Figur die Dissoziationsrestkurve der als Säure fungierenden Saccharase enthält. Der wirksame Anteil des Enzyms wurde also als ihr elektrolytischer Dissoziationsrest angesehen; mit anderen Worten:

Der elektrolytisch nichtdissoziierte Anteil der Saccharase war somit der enzymatisch wirksame.

Diese erste von Michaelis gegebene Theorie der Abhängigkeit der Inversion von der Acidität wurde später auf Grund neuer Versuche von Michaelis und Menten sowie von Michaelis und Rothstein vom genannten Autor selbst modifiziert, indem er die Theorie folgendermassen formulierte: „Invertase vereint sich mit Rohrzucker zu einer Verbindung, welche eine Säure ist. Die undissoziierten Moleküle dieser Säure zerfallen spontan in monomolekularen Reaktionen. Der Parameter der Geschwindigkeits- p_H -Kurve ist die Säuredissoziationskonstante dieser Saccharose-Invertaseverbindung.“ Nach Michaelis ist also der alkalische Zweig der p_H -Kurve die Dissoziationsrestkurve der als Säure fungierenden Saccharose-Invertaseverbindung. Die (Säure-) Dissoziationskonstante dieser Verbindung würde $K_a = 3 \cdot 10^{-7}$ betragen.

Diese Theorie von Michaelis kann so gekennzeichnet werden, dass die Wasserstoffionen das elektrolytische Dissoziationsgleichgewicht der Enzyme bestimmen und damit die Konzentrationen der reaktionsfähigen Molekülarten ändern.

Willstätter und Kuhn¹⁾ haben die Michaelissche Theorie kritisiert und kommen zum Ergebnis, dass „das Wesen der h-Wirkung nicht in einer Änderung des Gleichgewichts zwischen Enzym und Zucker gesucht werden kann“. Das Wesen der h-Wirkung liegt dagegen nach Willstätter und Kuhn darin, dass „die Wasserstoffionen die Zerfallsgeschwindigkeit des Saccharase-Saccharosekomplexes bestimmen“. Die Autoren haben aber ihre Auffassung, wie diese Geschwindigkeitsänderung eintritt, nicht näher präzisiert.

Allerdings kann der Verlauf des alkalischen Teiles der Aciditätskurve vollkommen auf den Umstand zurückgeführt werden, dass die H-Ionen das Gleichgewicht zwischen den verschiedenen in einer Lösung von Rohrzucker und Saccharase vorkommenden Molekülarten beeinflussen [Euler, Josephson und Myrbäck²⁾].

Im folgenden werden diese Berechnungen wiedergegeben:

¹⁾ Kuhn, H. 125, 28 u. zw. 49; 1923.

²⁾ Euler, Josephson u. Myrbäck, H. 134, 39; 1924.

Die saure Dissoziation der Saccharase und der Saccharase-Rohrzucker-Verbindung.

Bei der Betrachtung der enzymatischen Rohrzuckerinversion kommen folgende Molekülararten in Betracht:

HES = undissoziierte Enzym-Substrat-Verbindung,

ES = Anionen der obigen Verbindung,

HE = freie Saccharase,

E = Anionen der freien Saccharase,

H = Wasserstoffionen,

S = Rohrzucker. Eine Dissoziation desselben braucht hier nicht berücksichtigt zu werden.

Wir können dann folgende Gleichgewichtsbeziehungen aufstellen:

$$\frac{[\text{HE}] \cdot [\text{S}]}{[\text{HES}]} = K_m \quad \dots \quad (1)$$

$$\frac{[\text{H}'] \cdot [\text{ES}]}{[\text{HES}]} = K_a \quad \dots \quad (2)$$

$$\frac{[\text{H}'] \cdot [\text{E}']}{[\text{HE}]} = K_a^I \quad \dots \quad (3)$$

Wegen des amphoteren Charakters der Saccharase und somit auch der Verbindung Saccharase-Rohrzucker wäre letztere Molekülarart eigentlich zu schreiben: $\text{H} \cdot \text{HO} \cdot \text{E} \cdot \text{S}$, und die entsprechenden Dissoziationen der Verbindung und des Enzyms als Base wären einzuführen. Da wir aber hier nur das p_{H} -Gebiet 4,5—9 behandeln, so kommt die basische Dissoziation hier nicht in Betracht, und die Bezeichnungen der Molekülararten sind dementsprechend vereinfacht worden.

Eine analoge Gleichung wie für die freie Saccharase muss auch für ihre Anionen gelten:

$$\frac{[\text{E}'] \cdot [\text{S}]}{[\text{ES}]} = K_m^I \quad \dots \quad (4)$$

Aus den Gleichungen (1), (2), (3) finden wir

$$\frac{[\text{E}'] \cdot [\text{S}]}{[\text{ES}]} = K_m \cdot \frac{K_a^I}{K_a} \quad \dots \quad (5)$$

und es muss also gelten $K_m^I \cdot K_m = K_a^I \cdot K_a$. Da im hier behandelten p_{H} -Gebiet nach experimentellem Befund K_m (resp. K_M) wenigstens nahezu unabhängig von p_{H} ist, so haben wir in diesem Gebiet für die Ionen 'E' die gleiche Affinität anzunehmen wie für die freie Saccharase HE und wir können also setzen:

$$K_m^I = K_m \quad \text{und} \quad K_a^I = K_a.$$

Somit sollten die freie Saccharase und die Saccharose-Saccharaseverbindung Säuren von derselben Stärke sein. Die Anlagerung des Rohrzuckers ($K_a = \text{rund } 10^{-13}$) an die Saccharase bedingt somit eine unmerkliche Änderung in den sauren Eigenschaften der Saccharase, deren saure Dissoziations-

konstanten den Wert $K_a = \text{rund } 10^{-7}$ (also von übereinstimmender Grössenordnung wie der von Michaelis früher angenommene Wert) betragen dürfte. (Siehe weiter unten über die amphoteren Eigenschaften der Saccharase.)

Wenn man eine Salzbildung der Molekülarart HES auch an der Rohrzuckerkomponente in Betracht zieht, könnte auch ein zweites Anion ES' auftreten. Im folgenden wird aber nur mit einer Ionenart ES gerechnet. Es wird also ES' = 'ES angenommen. Ferner wird einstweilen über die relativen Werte von K_m , K_m^I , K_a und K_a^I keine Annahme gemacht.

Mit Σ bezeichnen wir die gesamte Konzentration des Enzyms in Lösung; oder

$$\Sigma = [\text{HES}] + [\text{HE}] + [\text{E}] + [\text{ES}] \quad \dots \quad (7)$$

Wir können nun für jede Substrat-Konzentration und für jeden Wert von $[\text{H}^+]$, welcher Aciditäten auf der alkalischen Seite des Optimums oder richtiger des isoelektrischen Punktes betrifft, berechnen, ein wie grosser Teil des Enzyms in Form der oben angeführten vier Molekülararten vorkommt.

Wir finden

$$[\text{HES}] = \Sigma \cdot \frac{[\text{H}^+] \cdot [\text{S}]}{[\text{H}^+] \cdot [\text{S}] + K_a [\text{S}] + K_m [\text{H}^+] + K_m \cdot K_a^I} \quad \dots \quad (8)$$

$$[\text{HE}] = [\text{HES}] \cdot \frac{K_m}{[\text{S}]} \quad \dots \quad (9)$$

$$[\text{'ES}] = [\text{HES}] \cdot \frac{K_a}{[\text{H}^+]} \quad \dots \quad (10)$$

$$[\text{E}] = [\text{HES}] \cdot \frac{K_a \cdot K_m^I}{[\text{H}^+] \cdot [\text{S}]} = [\text{HES}] \cdot \frac{K_a^I \cdot K_m}{[\text{H}^+] \cdot [\text{S}]} \quad \dots \quad (11)$$

Von diesen Gleichungen verdient (8) besondere Beachtung, da sie gestattet, die Konzentration der freien Moleküle Enzymssubstrat zu berechnen, oder wie von Michaelis angenommen wird, die Molekülarart, welche dem Zerfall unterliegt. Mit anderen Worten: Diese Gleichung (8) gibt die Beziehung an, welche zwischen der Inversionsgeschwindigkeit der Acidität und der Substratkonzentration bestehen muss.

Bei der Prüfung der Theorie wurden folgende Werte für die in der Formel vorkommenden Konstanten eingeführt $K_a = K_a^I = 3 \cdot 10^{-7}$, $K_m = 2 \cdot 10^{-2}$. Es zeigt sich nun, dass bei Einsetzen verschiedener Werte von $[\text{S}]$ in allen Fällen tatsächlich sehr genau dieselbe theoretische Aktivitäts- p_H -Kurve erhalten wird, die Konzentration des Substrates mag einen beliebigen Wert zwischen $2 \cdot 10^{-1}$ und $5 \cdot 10^{-3}$, also zwischen den bei der experimentellen Prüfung der Aktivitätskurve benutzten Rohrzuckerkonzentrationen annehmen. Der Verlauf der theoretisch berechneten Kurve stimmte tatsächlich auch sehr nahe überein mit dem der experimentell gefundenen. Die Theorie ist somit imstande, die gefundenen Einflüsse der Acidität auf die Inversions-Geschwindigkeit vollkommen zu beschreiben.

Nach Ansicht des Verfassers besteht also das Wesen der h-Wirkung in Änderungen der Gleichgewichte zwischen den verschiedenen Molekül- und Ionenarten, welche in der Lösung der Saccharase und des Rohrzuckers vorhanden sind. Jedenfalls kann diese Deutung des Phänomens gegenwärtig als die beste betrachtet werden.

Die hier dargestellten Betrachtungen beziehen sich nur auf die alkalische Seite der Kurve. Den sauren Zweig der Kurve suchten Michaelis und Davidsohn durch die Annahme einer basischen Dissoziation der Saccharase zu erklären. Aus den Versuchen von Josephson¹⁾ geht aber hervor, dass die Affinität zwischen der Saccharase und dem Rohrzucker in diesem Gebiet von der Acidität abhängig ist. Die Verhältnisse liegen also hier anders als im oben besprochenen p_H -Gebiet ($p_H = 4,5 - 9$). Wenn auch die basische Dissoziation einen Einfluss auf die Inversionsgeschwindigkeit ausüben mag, scheint die verminderte Inversionsgeschwindigkeit bei den höheren Aciditäten doch in erster Linie durch die Affinitätsänderung veranlasst zu sein (über die Affinitätsverhältnisse der Saccharase siehe Kap. 4).

Die Messungen und Berechnungen der Dissoziationsverhältnisse der Saccharase sind hier als Beispiel eingehend besprochen worden.

Für die übrigen bereits in analoger Weise bearbeiteten Enzyme müssen die Einzelheiten der Untersuchungen auf den speziellen Teil dieses Werkes verspart werden.

Vor kurzem hat Northrop²⁾ versucht, die Dissociationsverhältnisse des Trypsins auf Grund des Donnan-Effektes aufzuklären (vgl. hierzu Kap. 3), und kommt zum auffallenden Resultat, dass Trypsin in Lösungen von $p_H = 10 - 2$ ein positives monovalentes Ion bildet und somit eine starke Base wäre. In Anbetracht der in diesem Fall ziemlich verwickelten Verhältnisse müssen Prüfungen mit anderer Methodik und mit weitgehend gereinigtem Trypsin erfolgen.

Pepsin dürfte eine ziemlich starke Säure sein, wie dies besonders aus den Versuchen von Pekelharing und Ringer hervorgeht (H. 75 u. Arch. Neerl. Physiol.) Eine exakte Berechnung der Dissoziationskonstanten K_a wird dadurch erschwert, dass auch das Substrat durch die Acidität der Lösung beeinflusst wird.

In der folgenden Tabelle sollen die experimentell gefundenen Aciditäts-optima zusammengestellt werden.

Die aus diesen experimentellen Ergebnissen von Michaelis berechneten Dissoziationskonstanten der Enzyme und seine Angaben über die wirksamen Molekülarten sind wegen des hypothetischen Charakters dieser Berechnungen in diese Tabelle nicht aufgenommen.

¹⁾ Josephson, H. 134, 50; 1924.

²⁾ Northrop, JI Gen. Physiol. 6, 337; 1924.

Enzym	Bemerkung	Aciditäts- Opt. d Wirk- samkeit	Autor	Schriftstelle	Weitere Literatur
Lipasen	Pankreas	8	Davidsohn	Bio Zs 45, 284; 1912	Takata, Bio- chem. JI (Japan) 1, 107; 1922
	menschl. Serum	8		Rona u. Bien	
	Frauenmilch	8			
	Darm, Säugling	8,5			
	Magen, Säugling	5—4			
ungereinigt { Serum	8	Rona u. Pavlovič	Bio Zs 134, 108; 1923	Rona, Bio Zs 33, 413; 1911 Rona u. Bien (Pankreas v. Rind) Bio Zs 64, 13; 1914	
gereinigt {	Pankreas (Mensch u. Hund)	6,95—8	Willstätter, Waldschmidt- Leitz u. Memmen	Bio Zs 125, 93 u. 132; 1923	Willstätter u. Memmen H. 129, 1; 1923
	Schweine-Pankreas	(8—9) abhängig v. Aktiva- toren	Willstätter u. Memmen	H. 133, 229; 1924	
	Lipase aus Pankreas u. Magen des Schweines	8—9			
In höheren Pflanzen	aus Ricinus	4,7—5,0	Haley u. Lyman	Jl Am. Chem. Soc. 43, 2664; 1921	Die aus Jalanders Zahlen (Bio Zs 36) berechnete Acidität 3,7 bis 2,9 ist zu hoch
	Acetatpuffer (0,5—0,1 norm.)	5,0	Willstätter u. Waldschmidt Leitz	H. 134, 161; 1924	
In Bakterien	Streptokokken	9	Stevens	Jl exp. Med. 35	
Amylasen	Chlorid-A. 6,7 Nitrat-A. 6,9 Phosphat, Sulfat, Acetat-A. 6,1—6,2	6	Michaelis u. Pechstein	Bio Zs 59, 77; 1914	
In höheren Tieren	Pankreas	6,8	Sherman, Thomas, Baldwin	Jl Am. Chem. Soc. 41, 231; 1919.	
	"	6,8	Willstätter, Waldschmidt- Leitz, Hesse	H. 126, 143; 1923	
	Speichel	6,5 (PO ₄ - Puffer)	Hahn u. Michaelis	Zs Biol. 73, 10; 1921	
	"	6,5	Ernström	H. 119, 190; 1921	
	Leber	6,9 (0,3 u. PO ₄ - Puffer)	O. Holmbergh	H. 134, 68; 1924	Michaelis, (Monogr.) 6,5—7
In höheren Pflanzen	Malz	5,0	Euler u. Svanberg	H. 112, 193; 1921	
	"	4,9	Adler	Bio Zs 77	
	Kartoffel	6—7 (?)	Falk	Jl Gen. Phy- siol. 2	
	Grünalgen .	4,2	Sjöberg	Fermentf. 4, 97; 1921	

Enzym	Bemerkung	Aciditäts- Opt d Wirk- samkeit	Autor	Schriftstelle	Weitere Literatur
	Bohnen	5	Sjöberg	Bio Zs 133, 218; 1922	
	Aspergillus oryzae	4,8	Sherman, Thomas, Baldwin	Jl Am. Chem. Soc. 41, 231; 1919	Funke, Akad. v. Wet. Amsterdam 31
Maltase resp. α -Methyl- Glucosidase	aus Bierhefe	6,2—6,8	Rona u. Michaelis	Bio Zs 57, 70; 1913; 58, 148; 1913	
		6,8	Willstätter, Kuhn u. Sobotka	H. 134, 224; 1924	Willstätter u. Steibelt, H. 115, 199; 1921
Saccharase In tier. Organen	Darm (Mensch)	5—7	Euler u. Svanberg	H. 115, 43; 1921	
In höheren Pflanzen	Kartoffel	4	Falk	Jl Gen. Phy- siol. 2	
In Hefen	52,1°	4,4—4,6	Sörensen	Bio Zs 21, 131; 1909	
	22,3°	4,2	Michaelis u. Davidsohn	Bio Zs 35, 386; 1911	Euler u. Myr- bäck, H. 120, 61; 1922 Euler, Joseph- son u. Myr- bäck, H. 134 u. Josephson H. 134; 1924
	in frischen Hefe- zellen	4,2—5,2	Euler u. Emberg	Zs f. Biol. 69, 349; 1919	
In Taka-Diastase		5,0—5,5	Kuhn	H. 129, 57 1923	
In Penicillium glaucum Bakterien		5	Euler, Josephson u. Söderling Avery, Cullen, Stevens	H. 136 Jl exp. Med. 32, 1920; 35, 1922	
Lactase	in Emulsin	4,2—4,6	Willstätter u. Csányi	H. 117, 172; 1921	
	in Milchzuckerhefen	7	Willstätter u. Oppenheimer	H. 118, 168; 1922	
β -Glucosidase	Substr. Salicin	4,4	Vulquin	Soc. Biol. 70 270, 763; 1911	E. Fischer, H. 107, 176; 1919. Ver- schiedene β -Glucoside, Mittel 5
		4,7	Helferich	H. 117, 159; 1921	
	Substr. β -Methyl- glucosid	4,4	Willstätter u. Csányi	H. 117, 172; 1921	Willstätter u. Oppen- heimer, H. 121, 183; 1922. Ver- schiedene β -Glucoside, 4,4—5,3.
Pectase	in natürl. Frucht- säften der Beeren v. Ribes	4,3	Euler u. Svanberg	Bio Zs 100, 271; 1919	

Enzym	Bemerkung	Aciditäts- Opt. d. Wirk- samkeit	Autor	Schriftstelle	Weitere Literatur
Oxynitrilese	Mandeln	5,1—5,4	Nordefeldt	Bio Zs 118, 131; noch nicht ver- öffentlicher Versuch	
Desamidasen (Hefe)	37°. Asparagin	7,6—8,0	Euler	Unveröffentl. Versuche	
Urease	pH-Optimum ändert sich etwas mit der Harnstoff-Konz.	7,2—7,5	D. D. van Slyke u. Zacharias	Biol. Chem. 19, 181; 1914	Lövgren, Bio Zs 119, 215; 1921 u. 137, 206; 1923 Rona u. György, Bio Zs 111, 115; 1920
Magen-Pepsin	Verdauung von Acidalbumin bei 37°	1,6—1,8	Sörensen	Bio Zs 21, 131; 1909	Michaelis u. Davidsohn, Zs exp.Path. u. Ther. 8, 2; 1910; Opt. 1, 82
	Verdauung von Edestin bei 37°	1,4	Michaelis u. Mendelsohn	Bio Zs 65, 1; 1914	Ringer, Arch. Néerl. Physiol. Ferner H. 95 u. Koll.Zs 19
	Eier-Albumin	2,2—2,5	Northrop	Jl Gen. Phy- siol. 2, 113; 1920. — 3, 211; 1920	Okada, Bio- chemische JI 10
	Gelatine	2—2,8			
	Serum-Albumin	20	Gyemant	Bio Zs 105	
Hydrolyt. Bestandt. des Chymosins	Substr. Casein	5	van Dam	H. 61, 147; 1909	
Pankreas- Trypsin	verschiedene Substrate	7,4—10	Northrop	Jl Gen. Phy- siol. 5, 263; 1922	
	Gelatine	8,2—8,7	Waldschmidt- Leitz	H. 132, 181; 1924	
Pankreatin(Trypsin- Erepsin-Mischung)	Peptonspaltung 37°. Formolmethode	8	Michaelis u. Davidsohn	Bio Zs 36, 280; 1911	
	37°	8	Kurt Meyer	Bio Zs 32, 274; 1911	Palitzsch u. Walbum, Bio Zs 47, 1 1912; Opt. 9,7
Tryptase (aus Rindsdarm)	Casein 37°	9	Hedin	H. 130, 45; 1923	
Erepsin (aus Schweinsdarm)	Substr. Glycylglycin 37°	8,6	Euler	H. 51, 213; 1907	
(aus Hundsdarm)	Pepton 38°	7,8	Rona u. Arnheim	Bio Zs 57, 84; 1913	
(aus Hefepresssaft)	Glycylglycin 37°	7,8	Dernby	Medd. Carlsb. Lab. 11, 139; 1916	

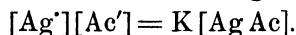
Enzym	Bemerkung	Aciditäts- Opt. d. Wirk- samkeit	Autor	Schriftstelle	Weitere Literatur
Proteolyt. Enzyme im Autolyse-Saft d. Hefe(Enzymgemisch nach Vines	Setzt sich nach Dernby zusammen aus: Pepsin Opt. 4,5 Tryptase " 7,0 Ereptase " 7,8	6	Dernby	Inaug.-Diss. Stockholm 1917	
Proteolyt. Enzyme im Hefe-Mazera- tionssaft	Spaltung von Poly- peptiden. Opt. nach Abderhalden und Fodor abhängig von Substrat	6,7—8,5(?)	Abderhalden u. Fodor	Fermentf. 1, 533; 1916 Siehe hierzu Dernby, l. c.	
Proteolyt. Enzyme im Autolysesaft v. tier. Geweben und Leukozyten	Setzt sich nach Dernby zusammen aus: Pepsin Opt. 3,0—3,5 Trypsin Opt. 7,8 Erepsin " 7,8	etwa 5,6	Dernby	Jl Biol.Chem. 35, 181; 1918	
Proteolyt. Enzyme verschied. Organe			Hedin		
Pferdenieren	a) Casein b) Pepton	4,3—5,6 7,8		H. 122, 30; 1922	
Lymphdrüsen	a) Casein b) Casein c) Pepton	5,5 9—10 8		H. 125, 289; 1923	
Milz	a) Casein b) Casein c) Pepton	etwa 5,4 8,8 7,5—8,5		Biol. Chem. 54, 177; 1922	
Chymosin	Optimum der Lab- fällung des Caseins in Gegenwart v. Ca	6,4—6,0	Michaelis u. Mendelsohn	Bio Zs 58, 305; 1914	
		5 (?)	van Dam	H. 64, 316; 1910	
	Umwandl. Casein in Paracasein	6,0—6,4	Rona u. Gabbe	Bio Zs 134, 39; 1922	
Enzym-Komplex der alkohol. Gärung	in lebender Hefe ohne Stickstoff- nahrung. 28°	4,5—5,5	Euler u. Heintze	Sv.Vet.Akad. Arkiv f. Kemi 7, 21; 1919 H. 108, 165; 1919	Euler u. S. Karlsson, Bio Zs 130, 550; 1920
	mit Hefenwasser (Co-Enzym u. Stick- stoffnahrung). 28°	4,5—6,5			
in Trockenhefe		6,2—6,8	Euler u. Myrbäck	H. 131, 179; 1923	
Hefen-Phosphatase	Substr.: alle Zymohehexosen	6,2—6,6	Euler u. Nordlund	H. 116, 229; 1921	
Katalase	(Leber) 0°	7	Sörensen	Bio Zs 21, 131; 1909	Hennichs, Bio Zs 145, 286; 1924
	18°. Abhängig von Neutralsalzen	etwa 7	Michaelis u. Pechstein	Bio Zs 53, 320; 1913	
	(Leber)	etwa 7	Rona u. Damboviceanu	Bio Zs 134, 20; 1922	

Anhang.

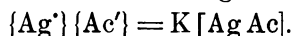
Heterogene Gleichgewichte: Löslichkeit von Elektrolyten.

Wir betrachten ein Salz, das sich in fester Form in Berührung mit seiner gesättigten Lösung befindet. Man bezeichnet das feste Salz in diesem Fall als Bodenkörper.

Für die gesättigte wässrige Lösung eines schwerlöslichen Salzes, z. B. Silberacetat, gilt, wie immer, die Dissoziationsgleichung:



Setzt man so viel Na-Acetat hinzu, dass die Konzentration der Acetationen verzehnfacht wird, so tritt ein neues Gleichgewicht ein:



Die (sehr geringe) Konzentration des nicht dissoziierten Silberacetates muss unverändert bleiben, da die Lösung in beiden Fällen in bezug auf diese Moleküart gesättigt ist. Diese konstante Silberacetatkonzentration muss dem Massenwirkungsgesetz zufolge immer mit demselben Ionenprodukt im Gleichgewicht stehen, welche Werte auch die einzelnen Ionenkonzentrationen annehmen mögen. Wird somit, wie in unserem Beispiel, die Konzentration $[\text{Ac}']$ verzehnfacht, so ist die Folge, dass $[\text{Ag}']$ auf den zehnten Teil seines früheren Wertes sinkt, was nur dadurch möglich ist, dass die übrigen $\frac{9}{10}$ der Silberionen, d. h. der grösste Teil der gesamten gelösten Ag Menge als Silberacetat ausgefällt wird.

Wir können somit aus dem Gesagten den allgemeinen Schluss ziehen, dass das Löslichkeitsprodukt schwerlöslicher Salze konstant ist¹⁾.

Grundsätzlich in der gleichen Weise lässt sich natürlich das Gleichgewicht zwischen der Lösung einer Säure (oder Base) und dem entsprechenden Bodenkörper behandeln.

Eine Fällung tritt also (wenn Übersättigung vermieden wird) immer ein, sobald für eine elektrisch neutrale Moleküart der Wert des zugehörigen Ionenproduktes überschritten wird.

Etwas abweichend von den erwähnten einfachsten Fällen stellen sich die Lösungsverhältnisse bei amphoteren Elektrolyten. Wir greifen auf die Gleichung (12) S. 35 zurück, welche die Beziehung zwischen der Konzentration der Wasserstoffionen und dem isoelektrischen Punkt angibt.

Die Löslichkeit eines jeden Elektrolyten muss bestimmt sein durch die Löslichkeit seines nicht dissoziierten Anteiles. So ist z. B. die Löslichkeit des Silberacetates offenbar deswegen so gering, weil der nicht dissoziierte Anteil eine sehr begrenzte Löslichkeit besitzt, während wir ja, wie bekannt, sowohl Silberionen (z. B. in Silbernitrat), als Acetationen (z. B. in Na-Acetat) in weit höherem Grad in Lösung zu bringen vermögen.

¹⁾ Nernst, Zs f. physik. Chem. 4, 372; 1890.

Die gesamte Löslichkeit eines Elektrolyten setzt sich also zusammen aus der Löslichkeit des nicht dissoziierten Anteils und der Konzentration seiner Ionen. Das gleiche gilt von einem amphoteren Elektrolyten, wo die Löslichkeit L gegeben ist durch die Löslichkeit $l_{\text{undiss.}}$ und durch die Konzentration des Anions $[A]$ und des Kations $[K]$, so dass

$$L = l_{\text{undiss.}} + [A] + [K].$$

Nun haben wir Seite 35 gesehen, dass beim isoelektrischen Punkt die Summe $[A] + [K]$ ein Minimum ist. Da $l_{\text{undiss.}}$ konstant ist, folgt hieraus, dass die Löslichkeit der amphoteren Elektrolyte beim isoelektrischen Punkt ein Minimum wird. Versuche von Michaelis und Davidsohn¹⁾ haben dies experimentell bewiesen. Aus der genannten Arbeit führen wir folgende für p-Aminobenzoesäure geltende Zahlen an:

$[H^+]$	$4,3 \cdot 10^{-6}$	$3,2 \cdot 10^{-5}$	$6,9 \cdot 10^{-5}$	$1,6 \cdot 10^{-4}$	$3,0 \cdot 10^{-4}$
Krystallisation ist deutlich:	gar nicht	gar nicht	nach 3 Min.	nach 1 Min.	gar nicht

Aus den Dissoziationskonstanten der p-Aminobenzoesäure

$$K_a = 1,21 \cdot 10^{-5} \text{ (eigentl. für } 25^{\circ}, \text{ angenähert für } 18^{\circ})$$

$$K_b = 2,33 \cdot 10^{-12}$$

berechnet sich der isoelektrische Punkt zu $[H^+] = 1,7 \cdot 10^{-4}$; damit stimmt der oben gefundene Wert (nach 1 Min.) $1,6 \cdot 10^{-4}$ befriedigend überein.

Das Produkt $K_a \cdot K_b$ beträgt für p-Aminobenzoesäure $3 \cdot 10^{-17}$.

Das Minimum der Löslichkeit fällt nur dann so scharf aus, wenn das Produkt $K_a \cdot K_b$ Werte von etwa 10^{-17} erreicht oder übersteigt. Bei kleinerem Produkt wird das Minimum immer unschärfer. So zeigte z. B. Tyrosin mit dem Produkt (vgl. S. 29)

$$K_a \cdot K_b = 1 \cdot 10^{-20}$$

ein sehr flaches, unscharfes Minimum.

In Gegenwart von Neutralsalzen machen sich ausser der oben erwähnten Löslichkeitserniedrigung noch weitere Löslichkeitsänderungen geltend.

Aussalzung. Nichtelektrolyte, deren osmotischer Druck nach dem Grundsatz der unabhängigen Partialdrucke in verdünnter Lösung von der Gegenwart anderer gelöster Substanzen unabhängig sein sollte, werden durch mässig konzentrierte Elektrolyte ausgesalzen. Es lassen sich hierbei die Ionen hinsichtlich ihrer aussalzenden Wirkung in eine bestimmte Reihenfolge einordnen, auf welche wir im folgenden Kapitel zurückkommen.

Auch auf den nicht dissoziierten Anteil schwacher Elektrolyte, sowohl einfacher als amphoterer, macht sich diese Ionenwirkung geltend.

¹⁾ Michaelis und Davidsohn, Biochem. Zs 30, 143; 1910.

Bei amphoteren Elektrolyten tritt aber ausserdem noch eine Wechselwirkung mit Salzen auf, welche eine Löslichkeitserhöhung bewirkt.

Verfasser hat bereits 1905 Lundén¹⁾ veranlasst, die Löslichkeit von Aminobenzoesäure in verschiedenen Salzlösungen zu untersuchen, um eine Analogie mit der Löslichkeit von Eiweisskörpern in Salzlösungen zu finden. Eine solche Analogie hat sich auch tatsächlich gezeigt. Die Ergebnisse von Lundén gehen aus den Kurven der Figur 13 hervor, deren Form dadurch bestimmt ist, dass sich zunächst die löslichkeitserhöhende Wirkung, in grösseren Salzkonzentrationen aber die Aussalzung der amphoteren Elektrolyte geltend macht.

In späteren, eingehenden Arbeiten von Pfeiffer und seinen Mitarbeitern²⁾

ist eine grössere Anzahl von Aminosäuren in dieser Hinsicht experimentell untersucht worden.

Die bei Ampholyten beobachteten Löslichkeitserniedrigungen sind offenbar nichts anderes als Spezialfälle des bei Nicht-Elektrolyten oder schwachen Elektrolyten eintretenden Aussalzen; in welchen Fällen die Löslichkeitserhöhung bei Ampholyten überwiegt, ist noch nicht festgestellt³⁾. Vermutlich spielt der Abstand der beiden Dipole im Molekül des Ampholyten sowie die Löslichkeit des letzteren beim iso-elektrischen Punkt und beim Neutralpunkt eine Rolle.

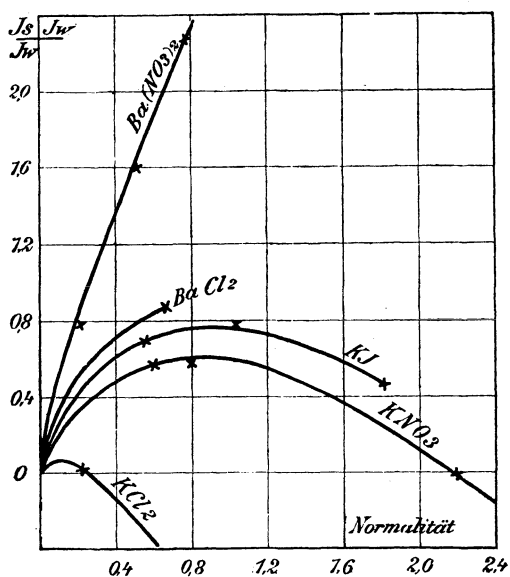


Fig. 13.

Was das Verhalten von Eiweissstoffen betrifft, so kann auf die Originalarbeiten und die Monographie von Robertson⁴⁾ verwiesen werden. Von Ryd⁵⁾ wurde die Löslichkeit des Caseins in Salzlösungen bei gegebener H⁺-Konzentration untersucht, und auch hier superponieren sich die beiden zuletzt genannten Salzwirkungen, wie die Kurve Fig. 14 zeigt, die übrigens noch einer genaueren Bearbeitung bedarf.

¹⁾ Lundén, Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi 2, Nr. 11; 1905. — Siehe auch Euler, H. 97, 291; 1916.

²⁾ Pfeiffer und Würgler, H. 97, 128; 1916. — Pfeiffer und Wittka, Chem. Ber. 48, 1041 u. 1289; 1915. — Pfeiffer u. Angern, H. 133, 180; 1924.

³⁾ Siehe hierzu Euler u. Karin Rudberg, H. 140, 113; 1924.

⁴⁾ Robertson, JI Biol. Chem. 4, 35; 1907 und Physik. Chem. d. Proteine. Deutsch. v. Wynken, Dresden 1912.

⁵⁾ Ryd, Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi 7, Nr. 1; 1917.

In diesem Zusammenhang sei auch noch erwähnt, dass Neutralsalze, soviel aus ihrer katalytischen Wirkung geschlossen werden kann, das Ionenprodukt des Wassers erhöhen. Auf die Folgerungen, die sich hieraus für die Löslichkeit der amphoteren Elektrolyte ergeben, kann hier nicht näher eingegangen werden.

Direkte Beziehungen der hier beschriebenen Löslichkeitserscheinungen zur Enzymchemie bestehen nur insofern, als bei einer Reihe von Enzym-

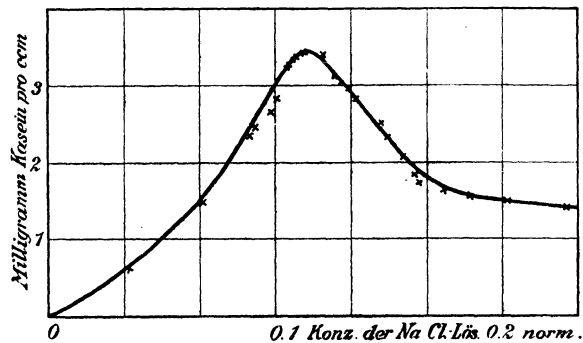


Fig. 14.

wirkungen Auflösung oder Ausfällung von Eiweisskörpern eintreten, und insofern für die rationelle Reinigung von Enzympräparaten die Kenntnis der Löslichkeitsänderungen von Wichtigkeit ist. Wir können uns demgemäss hier auf das hinsichtlich elektrochemischer Einflüsse Gesagte beschränken. Auf Kolloidfällungen kommen wir im 3. Kapitel dieses Bandes noch zurück.

Der Temperatureinfluss auf die Ausfällung (Koagulation) der Eiweissstoffe wird im 6. Kapitel behandelt.

3. Kapitel.

Die Enzyme als Kolloide.

Wir haben im vorhergehenden Kapitel gesehen, dass die Behandlung der Enzyme als Elektrolyte zu wichtigen Folgerungen und schliesslich zu einer quantitativ prüfaren Theorie der Enzymwirkungen geführt hat. Die Theorie von Michaelis hat zahlreiche systematische Untersuchungen angebahnt und neue wesentliche Tatsachen und Beziehungen kennen gelehrt; ein grosser heuristischer Wert kann ihr nicht abgesprochen werden, wenn sie auch in gewissen Teilen modifiziert werden musste und vielleicht noch weiterer Ergänzungen bedarf.

Einen Einfluss von ähnlicher Bedeutung hat die Kolloidchemie für die Lehre von den Enzymen noch nicht gehabt. Die Behandlung von enzymatischen Flüssigkeiten als grobdisperse, heterogene Systeme hat bis jetzt die Enzymforschung nicht wesentlich weiter geführt¹⁾, so zahlreich auch, besonders in einer kürzlich verflossenen Periode, die Versuche waren, die Kinetik der Enzymreaktionen auf die Reaktionskinetik der heterogenen Systeme aufzubauen.

In Kapitel 2 und 3 ist besonderer Wert auf die Feststellung gelegt worden, wie weit man mit der Anwendung der Lösungsgesetze kommt, bzw. wo tatsächlich die Anwendung derselben nicht mehr weiter führt, und wo also Beziehungen zu anderen Tatsachengebieten gesucht werden müssen. Solange die Gesetze der Lösungstheorien sich auch hier fruchtbar erweisen, wird man mit denselben konsequent weiter arbeiten, ohne dabei die Ergebnisse der Kolloidchemie ausser acht zu lassen.

Die Lage ist meiner Ansicht nach hier ähnlich wie in der Eiweisschemie, über die sich S. P. L. Sørensen²⁾ sehr treffend ausgesprochen hat. „Was Albuminlösungen und gewiss auch was viele andere typische emulsoide Lösungen betrifft,“ schreibt dieser Forscher, „ist ein (solcher) Vergleich der Eigenschaften der kolloiden Lösungen und derjenigen einer echten Lösung für das Verständnis des Charakters der kolloiden Lösung von grösstem Belang“.

¹⁾ Es braucht kaum erwähnt zu werden, dass makroheterogene Enzymsysteme, wie sie z. B. bei der von Bodenstein studierten Esterspaltung durch Pankreaslipase vorlagen, nach den für makroheterogene Systeme geltenden Gesetzen berechnet werden müssen, wie dies ja von Bodenstein in sachgemässer Weise geschehen ist. (Siehe Zs f. Elektrochem. 12, 605; 1906.)

²⁾ Sørensen, H. 103, 7; 1918.

Demgemäss sind auch die amphoteren Kolloide bereits z. T. im vorhergehenden Kapitel im Anschluss an die molekulardispersen Ampholyte, die einfachen Aminosäuren, besprochen worden.

Immerhin ist es nach dem gegenwärtigen Stand der Forschung wahrscheinlich, dass viele Enzyme entweder selbst im kolloiden Zustande auftreten, oder mit kolloiden Stoffen aufs engste verknüpft sind. Die Kenntnis des Verhaltens von hochmolekularen Stoffen bzw. von Stoffen geringen Dispersitätsgrades ist für die Erforschung und die Kenntnis der Enzyme von wesentlicher Bedeutung, und es ist deswegen den hierher gehörenden Problemen eine eingehende Besprechung gewidmet worden¹⁾.

A. Allgemeines.

Beginn der Kolloidchemie. Schon um die Mitte des vorigen Jahrhunderts wurde die Erkenntnis gewonnen, dass der Lösungszustand, in welchem sich eine Substanz befindet, ihr ganzes physikalisches Verhalten wesentlich beeinflusst.

Allmählich konnten dann die Besonderheiten der kolloidalen Lösungen fester gekennzeichnet werden, besonders seit die osmotischen Eigenschaften der „Krystalloide“ erforscht waren; aber erst in den letzten Dezennien setzte die systematische Forschungsarbeit im Gebiet der Kolloide ein, alsbald mächtig gefördert einerseits durch das von Zsigmondy und Siedentopf konstruierte Ultramikroskop, andererseits durch theoretische Arbeiten, besonders durch v. Smoluchowskys und Einsteins Berechnungen der Brownschen Molekularbewegung.

Bekanntlich war es Graham²⁾, welcher zuerst die Kolloide und Krystalloide als „zwei Welten der Materie“ scharf unterschied, sie besonders durch ihre verschiedene Fähigkeit zur Diffusion charakterisierend. Dieser Scheidung ist dann eine feinere Systematik gefolgt, welche den Dispersitätsgrad als wesentliches Einteilungsprinzip benutzt. Wir wissen heute, dass kontinuierliche Übergänge existieren von Systemen, welche noch makroskopisch oder mikroskopisch als Suspensionen zu erkennen sind, zu einer Reihe von Systemen, deren Heterogenität erst im Ultramikroskop erkannt wird, und schliesslich zu den wirklich optisch leeren, echten Lösungen, welche als Endglieder dieser Reihe auch als „molekulardisperse Systeme“ bezeichnet werden.

Die kolloid gelösten Stoffe werden erst im Ultramikroskop als Submikronen oder (indirekt) als Amikronen erkannt. Der Durchmesser der Submikronen liegt etwa zwischen $15\ \mu\mu$ und $5\ \mu\mu$. Man nähert sich damit dem Durchmesser der einfachen Moleküle (für Rohrzucker etwa $1\ \mu\mu$).

In diesem Zusammenhang sei auf die dankenswerte Kritik der noch

¹⁾ Siehe hierzu ferner Michaelis, Biochem. Zs 103, 225; 1920. — Ferner die Arbeiten von Northrop in J1 Gen. Physiol. 2—6. — Hitchcock, ebenda 5, 333; 1923.

²⁾ Graham, Phil. Trans. Roy. Soc. London, 151, 183; 1861.

vielfach unrichtig gebrauchten Begriffe „kolloide Lösung“ und „krystalloide Lösung“ hingewiesen, welche Zsigmondy¹⁾ vor einigen Jahren gegeben hat.

„Wir dürfen — schreibt dieser Forscher — die Lösungen nicht mehr als homogene Mischungen usw. definieren, sondern müssen, einerseits um Missverständnissen vorzubeugen, andererseits um das als wesentlich erkannte Merkmal aufrecht zu erhalten, eine vorsichtigere Ausdrucksweise anwenden.“

Zsigmondy schlägt folgende Definition vor:

„Die Lösungen sind homogen erscheinende Mischungen (Gemenge, Phasen usw.) verschiedener Stoffe;“ oder die Diskontinuität direkt hervorhebend: „Die Lösungen sind räumlich diskontinuierliche, aber homogen erscheinende Mischungen.“

In der Terminologie Wolfgang Ostwalds könnte man etwa sagen: „Die Lösungen sind feinst disperse Systeme“, wobei durch das Wort „disperse Systeme“ die Inhomogenität zum Ausdruck gebracht wird.

Brownsche Bewegung. Der kontinuierlichen Reihe zwischen echten Suspensionen und einfachen Molekülen, welche sich hinsichtlich der Dispersität der Materie bzw. der Grösse der Teilchen aufstellen lässt, entspricht eine ebensolche Kontinuität hinsichtlich der Bewegung der Teilchen. Bekanntlich ist es Einstein und v. Smoluchowsky gelungen, aus der kinetischen Gastheorie die Gesetze der sog. „Brownschen Bewegung“ abzuleiten, der nunmehr viel studierten Erscheinung, welche R. Brown 1827 an in Wasser suspendierten Pflanzenpollen zuerst beobachtet hatte; eine experimentelle Bestätigung und wesentliche Erweiterung dieses wichtigen theoretischen Ergebnisses verdankt man Perrin²⁾ und Svedberg³⁾.

Perrin konnte ferner den strengen Nachweis führen, dass die Verteilung der Partikeln in einer Suspension mit den Gesetzen des osmotischen Druckes bzw. den Gasgesetzen in voller Übereinstimmung steht.

Einteilung der Kolloide. Zahlreiche Untersuchungen an wässrigen Lösungen haben dazu geführt, zwei Gruppen von Kolloiden zu unterscheiden.

Die Glieder der ersten Gruppe stehen in naher chemischer Beziehung zu ihrem Lösungs- bzw. Dispersionsmittel und sind gerade dadurch charakterisiert. Man bezeichnet diese Stoffe nach Perrin als hydrophile oder allgemeiner als lyophile Kolloide oder Emulsionskolloide (Wo. Ostwald) oder Emulsoide (v. Weimarn.)

Dieser Gruppe werden die Stoffe gegenübergestellt, welche sich in ihrem Verhalten den Suspensionen anschliessen und keine eigentlich chemischen Verbindungen mit den Dispersionsmitteln eingehen, sondern im wesentlichen nur physikalische Beziehungen zu demselben besitzen. Sie werden meist als

¹⁾ Zsigmondy, Kolloid-Zs 26, 1; 1920.

²⁾ Perrin, C. r. 146, 967 u. 147, 530; 1908. — 149, 549; 1909.

³⁾ Svedberg, Zs f. physik. Chem. 57, 105; 1909. — Zs f. Elektroch. 12, 853 u. 909; 1906. — 73, 547 u. 74, 738; 1910.

lyphobe bzw. hydrophobe Kolloide oder nach Höber als Suspensionskolloide bezeichnet. Gekennzeichnet sind dieselben noch dadurch, dass sie die innere Reibung des Dispersionsmittels nur wenig ändern, und dass sie schon durch sehr kleine Konzentrationen von Elektrolyten gefällt werden. Die Beziehung der lyophoben Kolloide zum Dispersionsmittel scheint eine verhältnismässig geringe Rolle zu spielen.

Während die kolloiden Metalle, Metallsulfide und Metallhydroxyde typische Repräsentanten der hydrophoben Kolloide sind, gehört die überwiegende Mehrzahl der biochemisch interessanten Kolloide, Eiweisskörper, hochkondensierte Kohlehydrate usw. zur Gruppe der hydrophilen Kolloide. Bei der elektrolytischen Dissoziation nimmt im allgemeinen der hydrophile Charakter zu; sehr auffallend z. B. beim Casein.

Auch die Enzyme, über deren chemische Zusammensetzung man bis jetzt allerdings noch im unklaren ist, sind, soweit sie überhaupt kolloide Eigenschaften besitzen, zu den hydrophilen Kolloiden zu zählen.

Wir können deshalb in der folgenden Darstellung von einer näheren Besprechung der hydrophilen Kolloide, welche in das Gebiet der anorganischen und rein physikalischen Chemie gehören, absehen, und um so eingehender die Eigenschaften der hydrophoben Kolloide und ihre Beziehungen zu den in echter Lösung befindlichen Stoffen vergleichen.

B. Osmotischer Druck.

Bekanntlich hat van't Hoff 1885 die Gasgesetze auf die in Lösung befindlichen Körper ausgedehnt.

Der osmotische Druck einer gelösten Substanz in einem beliebigen Lösungsmittel ist genau so gross wie der Druck, welchen diese Substanz bei gleicher molekularer Beschaffenheit im gleichen Volum und bei gleicher Temperatur als Gas ausüben würde.

Perrin¹⁾ konnte 1908 den grundlegenden Nachweis führen, dass die Verteilung der Partikeln in einer Suspension mit den Gesetzen des osmotischen Druckes in voller Übereinstimmung steht.

Es ist einleuchtend, dass dieses Gesetz ganz besonders für die physiologischen und biochemischen Vorgänge, welche meist in verdünnter Lösung verlaufen, von grundlegender Bedeutung werden musste. Auch für unsere speziellen Aufgaben ist die Kenntnis der Lehre vom osmotischen Druck unerlässlich. Da es aber nicht unsere Aufgabe sein kann, in dieser Monographie die Grundlage dieser Lehre auseinander zu setzen, so müssen wir auf die

¹⁾ Perrin, C. r. 146, 967 u. 147, 530; 1908. — 149, 549; 1909.

physikalisch-chemische Literatur verweisen, ganz besonders auf das Lehrbuch von Nernst¹⁾.

Es mag schon hier hervorgehoben werden, dass die Gasgesetze wie die Gesetze des osmotischen Druckes Grenzgeseetze sind, welche erst bei grosser Verdünnung streng gültig werden. Besonders gilt dies von der Proportionalität zwischen dem Druck und der Masse per Volumeneinheit, welche gewöhnlich als Konzentration bezeichnet wird.

Schon bei reinen Gasen macht sich von mittleren Drucken an das Eigenvolumen der Gasmoleküle geltend. In noch höherem Grade ist dies bei gelösten Stoffen der Fall. Es hat sich gezeigt, dass schon in mässigen Verdünnungen der osmotische Druck rascher steigt, als die in der Volumeneinheit der Lösung gelöste Substanzmenge. Deswegen haben schon zahlreiche Forscher, z. B. Morse, Frazer und Dunbar²⁾ und neuerdings Sørensen³⁾ die Gewichtsmenge gelösten Stoffes nicht auf die Volumeneinheit der Lösung bezogen, sondern auf die Volumeneinheit des Lösungsmittels, bzw. dasjenige Volumen, welches 100 g des Lösungsmittels enthält.

Unter den mannigfachen Abweichungen hochmolekularer Stoffe von den theoretisch zu erwartenden osmotischen Drucken seien hier nur diejenigen erwähnt, welche kolloide Elektrolyte betreffen. Nach Bayliss⁴⁾, sowie Donnan und Harris⁵⁾ zeigt z. B. Kongorot, das Natriumsalz der Kongosäure, einen abnormen Druck, welcher 3—10% hinter dem für den undissoziierten Zustand berechneten zurückbleibt. In neuester Zeit hat Einar Hammarsten⁶⁾ ähnliche, interessante Fälle bei den Nukleinsäuren gefunden.

Die bis jetzt gegebenen Erklärungen des Phänomens, dass der osmotische Druck durch die Aggregation ebenso stark verringert als er durch die elektrolytische Dissoziation vergrössert wird, hält Einar Hammarsten für wenig befriedigend. Jedenfalls sind sie weiterer Prüfung wert. — Andererseits kann man solche Systeme als heterogene auffassen; in der Phase des kolloiden Elektrolyten hat das kleine Ion (Na, H usw.) eine gewisse Beweglichkeit und nimmt also am Elektrizitätstransport teil; dagegen kann es sich ausserhalb der Phasengrenze osmotisch nicht oder nur in begrenztem Umfang betätigen.

1. Direkte Messungen.

Die direkten Messungen des osmotischen Druckes gelingen unter Anwendung von sog. semipermeablen Membranen, im allgemeinen von Schichten, welche — durchlässig für das Lösungsmittel — dem gelösten Stoff keinen Durchgang gestatten. Die direkten Messungen des osmotischen Drucks hat Pfeffer schon 1877 durchgeführt. Wenn auch solche Messungen nicht zu den leichteren Aufgaben der physikalischen Chemie gehören, so sind sie

¹⁾ Nernst, Theoretische Chemie. Stuttgart, 8—10. Aufl. 1921.

²⁾ Morse, Frazer und Dunbar, Amer. Chem. JI 38, 175; 1907.

³⁾ Sørensen, H. 103, 1; 1918.

⁴⁾ Bayliss, Koll. Zs 6, 23; 1910.

⁵⁾ Donnan und Harris, Transact. Chem. Soc. 99, 2, 1554; 1911.

⁶⁾ E. Hammarsten, Biochem. Zs 144, 383; 1924.

gegenwärtig doch bis zu ziemlich hohen Drucken ausgedehnt und mit erheblicher Genauigkeit durchgeführt worden¹⁾.

Die experimentellen Schwierigkeiten liegen in der Herstellung von Wänden, welche tatsächlich für den gelösten Stoff undurchlässig sind.

Bei direkten Messungen des osmotischen Druckes an Stoffen von höherem Molekulargewicht, etwa von 300 ab, hat sich im allgemeinen Kollodium als gutes Material für Membranen erwiesen (vgl. aber Abschn. F).

Andererseits wird bei höher-molekularen Stoffen, wie leicht ersichtlich, die Grösse des osmotischen Druckes verhältnismässig gering, weshalb an die Genauigkeit der Druckmessungen hohe Anforderungen gestellt werden müssen. Immerhin sind durch solche direkte Messungen sehr exakte Resultate erhalten worden, so z. B. von H. N. Morse und seinen Mitarbeitern²⁾ an Zuckerarten.

S. P. L. Sørensen³⁾ hat bei seinen ausgezeichneten Untersuchungen an Proteinen mit J. A. Christiansen einen Osmometer konstruiert, durch welchen der Gegendruck bestimmt wird, welcher auf die Innenflüssigkeit des Osmometers ausgeübt werden muss, um den osmotischen Druck der Lösung zu kompensieren.

Da bei einem Gegendruck, welcher kleiner als der osmotische Druck der Innenflüssigkeit ist, Aussenflüssigkeit durch die Membran in die Innenflüssigkeit stetig hineinströmt, während ein Gegendruck, der grösser als der osmotische Druck der Innenflüssigkeit ist, eine entgegengerichtete Bewegung der Flüssigkeit hervorruft, so ist bei diesem Verfahren die Aufgabe demnach, den Gegendruck zu bestimmen, bei welchem keine Strömung zwischen der Innen- und der Aussenflüssigkeit stattfindet, indem dieser Gegendruck dem osmotischen Druck der Innenflüssigkeit gleich ist.

Dieses Prinzip wurde zum erstenmal von G. Tammann⁴⁾ bei einigen Bestimmungen des osmotischen Druckes von Rohrzucker angewandt und später von Berkeley und E. G. J. Hartley⁵⁾ in ihrem verbesserten Apparat zur Bestimmung des osmotischen Druckes von Zuckerarten benützt.

Das Osmometer (Fig. 15) besteht aus einem Kollodiumsäckchen A, welches ca. 15 cm lang ist und an einem Glaskragen B angebracht ist, in dessen Hals ein geschliffenes Glasrohr wasserdicht hineinpasst. Dieses verjüngt sich über den Schliff in ein Capillarrohr, welches mit einer Marke auf dem Glaskragen als Null punkt in Millimeter geteilt ist. Das Capillar-

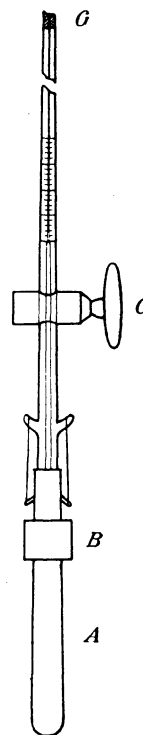


Fig. 15.

¹⁾ Eine Übersicht über die Methoden zur Bestimmung des osmotischen Druckes findet man bei Cohen und Commelin (Zs f. physik. Chem 64, 1; 1903) und A. Findley, Der osmotische Druck. Deutsch von Szivessy. Dresden 1914.

²⁾ H. N. Morse, The osmotic pressure of aqueous solutions, Washington 1914.

³⁾ Sørensen, H. 106, 1; 1919.

⁴⁾ G. Tammann, Zs f. physik. Chem. 9, 97; 18 90.

⁵⁾ Berkeley und Hartley, Phil. Trans. (London) A. 206, 481; 1906.

rohr ist mit einem Glashahn C versehen, mittels welchem der Raum unter demselben abgesperrt werden kann. Einzelheiten im Original (l. c. S. 43 u. ff.).

Das Osmometer befindet sich nebst Rührapparat und Beckmannthermometer in einem unversilberten Dewar-Gefäss, welches, umgeben von einem Zylinderglas, in einen Wasserthermostaten eingesenkt ist. Bei G kann das Osmometer mit dem Gegendruckapparat verbunden werden.

Was die absolute Grösse des osmotischen Druckes von Lösungen betrifft, so ergibt ja die Anwendung des Avogadro'schen Gesetzes auf Lösungen, dass ein g-Molekül eines Stoffes, gelöst bei 0° in einem Liter Wasser, 22,412 Atm. erzeugt. Demgemäss übt eine 1%ige Lösung eines Stoffes vom Mol.-Gew. 46 bei 0° einen osmotischen Druck von 4,88 Atm. aus.

Eine 1%ige Lösung von Rohrzucker vom Mol.-Gew. 342 entspricht nach den Messungen, welche Pfeffer mit Ferrocyanokupfermembranen anstellte, bei 15,5° einem Druck von 0,684 Atm., während ein Polypeptid vom Mol.-Gew. 1000 bei der gleichen Temperatur nur einen Druck von 0,23 Atm. hervorruft.

Mit seinem oben erwähnten Osmometer hat Sørensen das Mol.-Gew. von Eieralbumin zu 34 000 gefunden.

Viel einfacher in der Ausführung als die Messungen mit Osmometern sind die indirekten Messungen des osmotischen Druckes, welche als Methoden für Molekulargewichtsbestimmungen zur grössten Präzision ausgearbeitet worden sind.

2. Indirekte Methoden zur Bestimmung des osmotischen Druckes.

Molekulargewichtsbestimmungen.

Bekanntlich wird der Dampfdruck einer Flüssigkeit durch Auflösung eines Stoffes in derselben erniedrigt. Diese Dampfdruckerniedrigung ist proportional der in der Volumeinheit gelösten Anzahl Moleküle.

Es lässt sich leicht beweisen, dass Lösungen beliebiger Stoffe im gleichen Lösungsmittel isosmotisch sind, wenn sie gleichen Dampfdruck besitzen.

Messungen der Dampfdruckerniedrigungen werden zur Bestimmung von Molekulargewichten verhältnismässig selten ausgeführt. Nur wenn es darauf ankommt, Molekulargewichte bei einer bestimmten Temperatur, etwa 18° oder 37°, zu ermitteln, wird man auf diese Methode zurückgreifen.

Statt die Drucke zu bestimmen, unter welchen das Lösungsmittel und die Lösung den gleichen Siedepunkt haben, ermittelt man die Siedetemperaturen, welche die beiden Flüssigkeiten bei gleichem Druck, nämlich Atmosphärendruck, zeigen.

Während der Siedepunkt des reinen Wassers bei 760 mm Hg 100° beträgt, tritt in einer Lösung das Sieden, d. h. das Überschreiten des Atmosphärendrucks, bei 100° noch nicht ein, sondern erst bei einer höheren Temperatur. Der Siedepunkt wird also durch Auflösung eines Stoffes im Lösungsmittel erhöht und zwar, wie besonders von Beckmann nachgewiesen wurde, proportional der Anzahl in der Volumeinheit gelöster Moleküle.

Ein g-Molekül, abgekürzt Mol, einer beliebigen normalen Substanz in 1 Liter Wasser erhöht den Siedepunkt des Wassers um $0,52^{\circ}$.

Aus den Siedepunktserhöhungen kann man direkt die Konzentration der gelösten Moleküle berechnen, und, wenn das Gewicht der gelösten Substanz bekannt ist, das Molekulargewicht derselben.

Einen Mikroapparat hat Pregl¹⁾ angegeben.

Gefrierpunktsbestimmungen. Mit noch grösserer Genauigkeit und verhältnismässig einfach können Molekulargewichte aus den Gefrierpunkten von Lösungen ermittelt werden.

Der Gefrierpunkt einer Lösung ist zu definieren als der Temperaturpunkt, bei welchem die Lösung mit dem festen Lösungsmittel im Gleichgewicht ist. In diesem Punkt müssen Lösung und festes Lösungsmittel gleichen Dampfdruck besitzen.

Aus dem Satz, dass äquimolekulare Lösungen beliebiger Stoffe im gleichen Lösungsmittel gleichen Dampfdruck besitzen (isotonisch sind), folgt somit, dass isotonische Lösungen gleiche Gefrierpunkte zeigen müssen. Dies findet man in der Tat durch die Messungen von Raoult und zahlreichen anderen Forschern bestätigt. Das Molekulargewicht M einer gelösten Substanz ergibt sich aus der Beziehung

$$M = E \frac{m}{t}, \dots \dots \dots (16)$$

wo

- m die Anzahl g Substanz bezeichnet, die in 100 g Lösungsmittel gelöst sind,
- t die Gefrierpunktserniedrigung in Celsiusgraden,
- E die molekulare Gefrierpunktserniedrigung; dieselbe beträgt für Wasser $18,4^{\circ}$.

Die mit den Beckmannschen Apparaten leicht zu erreichende Genauigkeit beträgt etwa $0,005 - 0,002^{\circ}$. Hausrath²⁾ gelang es, Gefrierpunkte bis auf $0,00001^{\circ}$ zu bestimmen. Wegen der Technik der Gefrierpunktsbestimmungen sei besonders auf eine Untersuchung von Nernst und Abegg³⁾ verwiesen, im übrigen auf das bekannte Hand- und Hilfsbuch zur Ausführung physiko-chemischer Messungen von Ostwald-Luther. Für Messungen an kleinen Flüssigkeitsmengen eignet sich ein Apparat von Dekhuyzen⁴⁾.

Bei Bestimmungen des osmotischen Druckes aus dem Gefrierpunkt von physiologischen Lösungen muss berücksichtigt werden, dass durch diese Messungen der Zustand der Lösung bei einer Temperatur ermittelt wird, welcher von der meist zu berücksichtigenden Körpertemperatur von 37° weit entfernt ist. Was sämtliche Methoden zur Molekulargewichtsbestimmung durch direkte oder indirekte Messung des osmotischen Druckes betrifft, so ergeben die-

¹⁾ Pregl, Die quantitative organische Mikroanalyse. 2. Aufl. Berlin 1923.

²⁾ Hausrath, Ann. d. Phys. (4) 9, 522; 1902.

³⁾ Nernst und Abegg, Zs f. physik. Chem. 15, 681; 1894.

⁴⁾ Dekhuyzen, Biochem. Zs 11, 346; 1908.

selben die Zahl der selbständigen Moleküle per Volumeinheit. Arbeitet man mit einer dissoziierbaren oder assoziierbaren Substanz und kennt ihr einfachstes Molekulargewicht, so erfährt man also durch eine Messung des osmotischen Druckes oder des Gefrierpunktes usw. den Dissoziationsgrad der Substanz in der betreffenden Lösung, bzw. das „scheinbare Molekulargewicht“ oder das relative mittlere Teilchengewicht, bezogen auf $O_2 = 32$.

Will man mit den drei genannten Methoden, Dampfdruckerniedrigung, Siedepunktserhöhung und Gefrierpunktserniedrigung, Molekulargewichte hochmolekularer Stoffe bestimmen, so ist zu berücksichtigen, dass schon relativ geringe Verunreinigungen durch Stoffe von niedrigem Molekulargewicht, besonders einfache Elektrolyte, die Resultate sehr stark beeinflussen, und nicht selten eine bedeutend grössere Gefrierpunktserniedrigung hervorrufen, als der zu messende Stoff selbst. Bei der Untersuchung von Kolloiden ist dieser Umstand um so störender, als viele dieser Stoffe Elektrolyte genügend fest binden, um eine Reinigung sehr zu erschweren. In dieser Hinsicht bietet die Molekulargewichtsbestimmung durch Messung des Diffusionskoeffizienten (vergl. S. 89) erhebliche Vorteile.

Zur Beurteilung der Genauigkeit, mit welcher Molekulargewichte durch direkte Messungen des osmotischen Druckes bestimmt werden können, mag hier an einen Hinweis von Nernst (Lehrbuch, 8. Aufl., S. 149) erinnert werden. Wie sich durch eine einfache thermodynamische Ableitung zeigen lässt, ist der osmotische Druck P einer Lösung mit der Gefrierpunktserniedrigung t der Lösung durch die Gleichung verknüpft:

$$P = 12,05 t \text{ Atm.}$$

Hiernach entspricht eine Gefrierpunktserniedrigung von $0,001^\circ$ einem Druck von $0,012 \text{ Atm.} = 9,1 \text{ mm Hg}$, eine Grösse, welche sich gut mit einer Genauigkeit von etwa 1% bestimmen lässt.

Für die Bestimmung des osmotischen Druckes von Kolloiden stellen sich die Methoden der direkten Druckmessung im Vergleich zu Gefrierpunktmessungen insofern noch günstiger, als Membranen gewählt werden können, welche für die den Gefrierpunkt stark beeinflussenden niedrigmolekularen Verunreinigungen durchlässig sind, und hauptsächlich die Kolloide zurückhalten, wodurch die methodischen Fehler zum Teil vermieden werden.

3. Teilchengrösse. Ultramikroskopie.

Der Grad des gegenseitigen Zusammenschlusses der Moleküle eines Stoffes zu höheren Aggregaten und der Grad der gleichzeitigen Verbindung mit dem verteilenden Medium bildet das wesentlichste Merkmal der kolloiden Stoffe, oder richtiger, des kolloiden Zustandes dieser Stoffe. Demgemäss war es für die Erforschung der Kolloide von allerhöchster Bedeutung, dass eine Methode geschaffen wurde, welche gestattete, die Grösse von Molekular-

aggregaten innerhalb eines weiten und interessanten Bereiches mit grosser Genauigkeit festzustellen. Die bedeutenden Fortschritte, welche die Kolloidchemie der letzten 17 Jahre aufzuweisen hat, verdankt man in erster Linie dem Ultramikroskop von Siedentopf und Zsigmondy¹⁾.

Durch diesen Apparat ist man imstande, die Teilchen, welche unter der Auflösungsgränze der Mikroskopobjektive liegen, in günstigen Fällen, nämlich dann, wenn zwischen dem Brechungsexponenten des verteilten (dispersen) Körpers und dem des Dispersionsmittels ein starker Unterschied besteht, bis zu einem unteren Durchmesser von $4 \mu\mu$ einzeln zu erkennen. Bei organischen Kolloiden, welche uns hier besonders beschäftigen, ist allerdings die Gränze zwischen den sog. Submikronen und Amikronen höher; viele dieser Kolloide werden schon bei etwa $40\text{--}50 \mu\mu$ amikroskopisch, entsprechend den geringen Unterschieden im Brechungsindex. Zum Vergleich sei der Durchmesser einer Molekel, z. B. von CO_2 erwähnt, dieselbe beträgt $0,3 \mu\mu$.

Ultramikroskopische Messungen werden auch in der Enzymchemie noch wesentliche Fortschritte bringen. Die Technik dieser Messungen zu beschreiben liegt nicht im Rahmen dieses Buches, und es soll deshalb auf die Monographien von Zsigmondy²⁾ „Kolloidchemie“ (2. Aufl. Leipzig 1923) und von Svedberg „Colloid Chemistry“ (Amer. Chem. Soc. Monogr., 1924) verwiesen werden.

Unter gewissen Voraussetzungen kann man die Teilchengrösse durch Zählung der in einem bestimmten Volumen der Flüssigkeit enthaltenen Submikronen bestimmen, nämlich dann, wenn alle Teilchen einander gleich sind, nur aus der dispersen Substanz bestehen (also kein Dispersionsmittel enthalten) und annähernd Würfelgestalt besitzen. Dann gilt für den Durchmesser l die Formel:

$$l = \sqrt[3]{\frac{A}{s \cdot n}}$$

Es bedeutet:

A Masse der zerteilten (dispersen) Substanz per Volumeinheit,
 n Zahl der Submikronen in derselben,
 s spez. Gewicht der dispersen Substanz.

Für die ultramikroskopische Messung der Teilchengrösse von hydrophilen Kolloiden liegt leider noch keine eingehender durchgearbeitete Methode³⁾ vor; eine solche wäre für die Enzymchemie wie für die Eiweisschemie sehr erwünscht.

Nach dem Vorgang von Zsigmondy wird in der Tafel I das Grössenverhältnis verschiedener mikroskopischer, ultramikroskopischer und amikroskopischer Teilchen bis herunter zur molekularen Dispersion zur Anschauung gebracht.

¹⁾ Siedentopf und Zsigmondy, *Drudes Ann. d. Phys.* (4) 10, 1; 1903.

²⁾ Siehe auch spätere Arbeiten dieses Forschers, besonders *Physik. Zs* 14, 975; 1913.

³⁾ Siehe Svedberg, *Colloid Chemistry* (1924).

Im Anschluss hieran seien die neuerdings mit grosser Genauigkeit festgestellten Werte für die absolute Masse der Moleküle bzw. die Zahl der Moleküle eines g-Moleküls nach Nernst¹⁾ angegeben.

$$\text{Anzahl Moleküle eines g-Moleküls}^2) \quad N_0 = 6,06 \cdot 10^{23}$$

$$\text{Anzahl Moleküle im ccm eines Idealgases (0°, 760 mm)} \quad N = 2,71 \cdot 10^{19}$$

$$\text{Masse eines einzelnen Moleküls vom Mol. Gew. M} \quad m = \frac{M}{6,06} \cdot 10^{-23} \text{ g.}$$

C. Freie Diffusion.

Schichtet man reines Wasser über eine wässrige Zuckerlösung ohne Zwischenschaltung einer trennenden Membran, so stellt sich im Verlauf einer gewissen Zeit in der gesamten Flüssigkeit die gleiche Konzentration her; diesen Konzentrationsausgleich bezeichnet man als Diffusion, oder, um ihn von dem entsprechenden Vorgang bei Gasen zu unterscheiden, als Hydrodiffusion.

Auf die Erkenntnis, dass der osmotische Druck die treibende Kraft der Diffusion ist, hat Nernst³⁾ 1888 seine Theorie aufgebaut, welche auch für die Entwicklung der Lehre von den elektromotorischen Kräften grundlegend geworden ist.

Einem von Fick aufgestellten Gesetz zufolge ist die Stoffmenge ds , welche in der Zeit dt durch den Querschnitt q eines Diffusionszylinders diffundiert, dem Konzentrationsgefälle dc/dx proportional. Bezeichnen wir mit K die Kraft, welche auf eine in Lösung befindliche g-Molekel wirken muss, damit dieselbe sich mit der Geschwindigkeit 1 cm/Sek. bewege, so ist

$$s = - \frac{q \cdot t \cdot dp}{K \cdot dx}; \quad \dots \dots \dots (17)$$

s = die Substanzmenge in g-Molekeln, welche durch den Querschnitt q in der Zeit t hindurchwandert, wenn zwei um 1 cm abstehende Schichten die Konzentrationsverschiedenheit 1 aufweisen (dp/dx = osmot. Druckgefälle).

Da in normalen Fällen, wo keine Polymerisation des aufgelösten Stoffes eintritt, der osmotische Druck p der Konzentration c proportional ist, also

$$p = p_0 c,$$

wo p_0 den Druck einer Lösung von der Konzentration 1 bedeutet, so ergibt sich aus (17)

$$s = - \frac{q \cdot t \cdot p_0}{K} \frac{dc}{dx}, \quad \dots \dots \dots (18)$$

und, da K in verdünnter Lösung von der Konzentration unabhängig ist,

$$\text{die Konstante } D' = \frac{p_0}{K} \text{ cm}^2 \text{ Sek.}^{-1} \quad \dots \dots \dots (19)$$

¹⁾ Nernst, Lehrbuch, 8.—10. Aufl. 1921, S. 509.

²⁾ Millikan, Phil. Mag. (6) 34; 1917. — Westgren, Zs. anorg. Chem. 93; 1915.

³⁾ Nernst, Zs f. physik. Chem. 2, 613; 1888.

Um eine zweckmässigere Einheit zu erhalten, wählt man als Zeiteinheit nicht Sekunden, sondern Tage, multipliziert also D' mit 86400.

$D' \cdot 86400 = D$ bezeichnet man als Diffusionskoeffizienten oder Diffusionskonstante.

Da p_0 bekannt ist, kann man K in absoluten Einheiten berechnen, wobei sich für die Reibungskräfte, welche durch die Diffusion eines Stoffes wie Rohrzucker überwunden werden müssen, Kräfte von der Grössenordnung 10^9 Kg ergeben.

Schon aus den von Nernst berechneten Zahlen ging hervor, dass diese Reibungswiderstände mit steigender Molekulargrösse zunehmen.

Diffusionskonstante und Molekulargewicht. Bekanntlich ist die Ausströmungsgeschwindigkeit von Gasen aus engen Öffnungen umgekehrt proportional den Quadratwurzeln aus ihren Molekulargewichten. (Exner.)

Hüfner¹⁾ hat 1897 gefunden, dass die gleiche Beziehung auch für die Hydrodiffusion von in Wasser gelösten Gasen gilt, und etwa gleichzeitig gelang es Verf.²⁾ zu zeigen, dass sich diese Regel keineswegs auf Gase beschränkt, sondern dass hier eine allgemeinere Beziehung zwischen Diffusionskonstante und Molekulargewicht des gelösten Stoffes vorliegt, dass also für gelöste Moleküle

$$D \sqrt{M} = \text{konst.} \quad \dots \quad (20)$$

Diese Gesetzmässigkeit ist später von Öholm³⁾ eingehend geprüft worden, und es ergab sich, dass dieselbe wenigstens für nahe verwandte Substanzen mit recht grosser Genauigkeit gilt. Das Mittel der Werte $D \sqrt{M}$ beträgt bei 20° recht angenähert 7.

Bestimmung des Molekulargewichtes aus der Beziehung

$$D \sqrt{M} = \text{konst.}$$

Die eben genannte Beziehung gestattet offenbar, Molekulargewichte gelöster Stoffe zu bestimmen, wenigstens insoweit der Wert des Produktes bekannt ist oder annähernd geschätzt werden kann. Diese Methode hat gerade für die Molekulargewichtsbestimmung an Enzymen den Vorzug, dass sie anwendbar ist, auch wenn die zu untersuchende Substanz nicht isoliert ist, sofern ihr nur gleichzeitig gelöste Stoffe nicht anhaften.

Die eventuelle Beeinflussung des Resultates ist jedenfalls von einer ganz anderen Grössenordnung als bei der Molekulargewichtsbestimmung durch Messung des osmotischen Druckes oder des Gefrierpunktes. Bei Anwendung letzterer Methoden üben nämlich gleichzeitig gelöste Verunreinigungen durch Salze oder andere Stoffe von niedrigem Molekulargewicht einen Einfluss aus,

¹⁾ Hüfner, Wied. Ann. 60, 134; 1897.

²⁾ Euler, Wied. Ann. 63, 273; 1897.

³⁾ Öholm, Zs f. physik. Chem. 70, 378; 1910. — Medd. Vet. Akad. Nobel-Inst. 2, Nr. 26; 1913.

welcher denjenigen des zu untersuchenden Kolloides weit übertrifft, da ja die Summe aller gelösten Moleküle bestimmt wird. Bei der Diffusionsmethode kommt hingegen nur der zu bestimmende Stoff zur Analyse. Andere Stoffe wirken auf das Ergebnis nur insofern ein, als sie die innere Reibung der Lösung oder den Partialdruck der zu messenden Substanz etwas vergrössern. In verdünnter Lösung ist aber das Gesetz der unabhängigen Partialdrucke mit genügender Annäherung gültig, und wegen der inneren Reibung der Lösung kann eine Korrektion angebracht werden.

Wesentlich ist natürlich, dass die zu messende Substanz nicht etwa mit gleichzeitig gelösten Molekülen, wie Eiweisskörpern, Verbindungen eingeht; daher ist eine möglichst weitgehende Reinigung der Enzymlösungen anzustreben. Hat man über den Grad dieser Bindung keine experimentellen Anhaltspunkte, so sind die an kolloiden Stoffen gewonnenen Ergebnisse jedenfalls unsicher.

Ferner ist man über den Wert von $D\sqrt{M}$ für Stoffe von hohem Molekulargewicht noch nicht genügend unterrichtet, so dass einstweilen nur angenäherte Werte für das Molekulargewicht kolloider Stoffe erhalten werden.

Arrhenius¹⁾ hat durch die Diffusionsmethode Molekulargewichte von Toxinen bestimmt und ist zu sehr hohen Zahlen gelangt.

Ferner hat Herzog²⁾ nach einer ähnlichen Methode aus der Diffusionskonstanten eines Eieralbumins ein Molekulargewicht von 20000 für diesen Stoff angegeben und weiters die Diffusionskonstanten von Ovomukoid und Klupeinsulfat bestimmt. Inwieweit die in dieser Arbeit angegebenen Diffusionskonstanten mehrerer Enzyme (Pepsin, Lab, Saccharase, Emulsin, Trypsin und Pankreatin) sich verwerten lassen, erscheint fraglich, da, wie bereits früher hervorgehoben wurde, wenigstens einige der angeführten Enzyme durch das als Sperrflüssigkeit verwendete Quecksilber sehr erheblich geschädigt werden.

Eingehende Untersuchungen der Diffusion hochaktiver Enzympräparate unter Berücksichtigung des Einflusses gleichzeitig gelöster Stoffe, ferner der Acidität und wesentlicher Aktivatoren wären sehr erwünscht.

Euler und Kullberg³⁾ hatten an ihrem besten Saccharasepräparate ($\pm 0^\circ = 12,5$ Min.) mit dem von Öholm⁴⁾ angewandten Apparat und Chloroform als Sperrflüssigkeit den Diffusionskoeffizienten bei 17° zu 0,037 ermittelt, woraus sich unter Annahme des Wertes $D\sqrt{M} = 7$ für $20^\circ M = 27000$ ergibt. Die 4 folgenden Untersuchungen sind mit Präparaten von steigendem Reinheitsgrad angestellt worden.

¹⁾ Arrhenius, Festschr., Kopenhagen 1902.

²⁾ Herzog, Zs f. Elektroch. 13, 533; 1907.

³⁾ Euler und Kullberg, H. 73, 335; 1911.

⁴⁾ Öholm, Zs f. physik. Chem. 50, 309; 1904.

If	Präparat von	Schriftstelle	Diff.-Koeffiz. D (20°)	M = 49 : D ²
11; 5—7; 7	E., Hedelius-Svanberg.	H. 110; 1920	0,047	22 000
84.0; 34.2	Euler-Ericson	Koll. 30, 31, 1922	0,0488	20 600
168	Euler-Josephson	H. 130; 1923	0,0476	21 600
198 (220)	Euler-Josephson	H. 130; 1923	0,0500	19 600

Der nunmehr erreichte Wert $M = 20\,000$ dürfte nicht durch hochmolekulare Verunreinigungen bedingt sein, sondern unserer Saccharase (einschliesslich ihrem kolloiden Bestandteil) zukommen.

In diesem Zusammenhang mag auch bemerkt werden, dass auch ein kolloider Ampholyt durch die Ionisierung seine Diffusionsgeschwindigkeit ändern muss. Es wird ja dann für diese Stoffe — zunächst kommen die Eiweisskörper in Betracht — die Nernstsche Theorie der Diffusion von Elektrolyten anwendbar, nach welcher der Diffusionskoeffizient für stark dissoziierte binäre Elektrolyte gegeben ist durch die Formel:

$$D = \frac{u \cdot v}{u + v} \cdot 0,04485 [1 + 0,0034 (t - 18)],$$

wo u und v das molekulare Leitvermögen von Kation und Anion bedeuten.

Der quantitativen Anwendung dieser Gleichung stehen einstweilen noch Hindernisse im Wege, da über die Wertigkeit und den Dissoziationsgrad der hierhergehörenden Stoffe (Eiweissalze u. dgl.) noch wenig bekannt ist. Da bei der Ionisierung der Proteine eine vermehrte Hydratation eintritt, so können wir einstweilen wenigstens sagen, dass der Diffusionskoeffizient dieser Stoffe beim isoelektrischen Punkt ein Maximum haben und mit fortschreitender Ionisierung abnehmen wird, soweit nicht gleichzeitig anwesende Ionen den Partialdruck des Kolloids in ähnlicher Weise beeinflussen, wie dies gegenüber Stoffen wie Rohrzucker u. a. der Fall ist.

Methodisches: Zur Bestimmung von Diffusionskoeffizienten der meisten Stoffe eignet sich sehr gut ein von Öholm¹⁾ eingehend beschriebener Apparat. Für hochmolekulare und kolloide Substanzen sind die nach einem Hittorfschen Prinzip konstruierten Apparate, wie sie v. Wogau²⁾, Öholm³⁾ und Hedelius⁴⁾ benutzt haben, wegen der geringeren Schichthöhe und der dadurch kürzeren Diffusionszeit vorzuziehen. Ein auf dieses Prinzip sich gründender Präzisionsapparat ist 1922 von Cohen beschrieben worden.

Die Beziehung $D \sqrt{M} = \text{konst.}$ ist zunächst eine rein empirische.

Bekanntlich haben sowohl Einstein⁵⁾ als v. Smoluchowsky⁶⁾ auf molekularkinetischer Grundlage die Diffusionskoeffizienten suspendierter Teilchen berechnet. Einstein hat folgende Formel aufgestellt:

$$D = \frac{RT}{N} \cdot \frac{1}{6\pi\eta\varrho} \cdot \dots \dots \dots (21)$$

Darin bedeuten: R die Gaskonstante,

T die absolute Temperatur,

N die wirkliche Anzahl Moleküle in einem g -Molekül,

η die innere Reibung des Dispersionsmittels,

ϱ den Radius der kugelförmig gedachten Teilchen.

¹⁾ Öholm, Zs f. physik. Chem. 50, 309; 1904.

²⁾ v. Wogau, Ann. d. Phys. (4) 23, 345; 1907.

³⁾ Öholm, Medd. Svenska Vet. Akad. Nobel-Inst. 2, Nr. 22; 1912.

⁴⁾ Euler und Hedelius, H. 110, 190; 1920.

⁵⁾ Einstein, Ann. d. Physik (4) 17, 549; (1905) u. 19, 371; 1906.

⁶⁾ v. Smoluchowski, Ann. d. Physik (4) 21, 756; 1906.

Die Einsteinsche Formel (21) ist mehrfach geprüft und angewandt worden, so von Perrin, Svedberg¹⁾, Lorentz u. a.²⁾.

Bei gleichem Dispersionsmittel und gegebener Temperatur, wenn also die Werte von η und T gleich sind, werden dann die Diffusionskoeffizienten umgekehrt proportional den Radien der Teile des suspendierten Stoffes, oder, wenn es sich um molekulardisperse Systeme handelt, auf welche die Formeln ausgedehnt worden sind, umgekehrt proportional den Radien der Moleküle.

Vergleichen wir weiterhin Stoffe mit gleichem spezifischem Volumen, so gilt, falls das spez. Eigenvolumen v der gelösten Moleküle ein bestimmter Bruchteil des Totalvolumens ist

$$\frac{\sqrt[3]{Mv}}{\rho} = \text{konst.}$$

Unter Anwendung der obigen Gleichung (21) würde hieraus folgen:

$$D\sqrt[3]{Mv} = \text{konst.}$$

Wie die in recht weiten Grenzen gültige, empirische Formel $D\sqrt[3]{M}$ theoretisch gedeutet werden kann, ist einstweilen noch nicht recht klar. Vielleicht ist die um die Moleküle gelagerte Wasserschicht die Ursache der Unstimmigkeit zwischen Erfahrung und Theorie, vielleicht auch die Form der Moleküle.

Sutherland³⁾, welcher übrigens 1905 unabhängig von Einstein zur Formel (21) gelangte, nimmt für grosse Molekularvolumina B die Beziehung an:

$$D \cdot B^{1/2} = 21 \cdot 10^{-6}.$$

Sutherland kommt für das Molekulargewicht von Eialbumin zu einem Wert 32814, was mit dem S. 84 erwähnten Ergebnis von Sørensen, 34000, gut übereinstimmen würde.

D. Oberflächenenergie. Capillarerscheinungen.

Wo immer eine Flüssigkeit an den Dampfraum grenzt, bildet sie an der Oberfläche eine Schicht aus, welche andere Eigenschaften besitzt als die im Innern befindliche Flüssigkeit; man bezeichnet sie als Oberflächenschicht. Dieselbe hat das Bestreben, sich zu verkleinern, und verursacht hierdurch die bekannten Capillarerscheinungen; auf das Innere der Flüssigkeit übt sie einen gewissen Druck aus.

Die Dicke dieser Oberflächenschicht, welche sich von der übrigen Flüssigkeit unterscheidet, ist sehr gering.

Auch der Druck, womit die Oberflächenschicht die innere Flüssigkeit zusammenpresst, ist recht klein, wenn nicht das Verhältnis zwischen der Oberfläche eines Stoffes und seinem Volumen, die „spezifische Oberfläche“, sehr

¹⁾ Svedberg, Zs f. physik. Chem. 67, 105; 1909.

²⁾ Herzog, Zs f. Elektroch. 16, 1003; 1910. — Siehe hierzu auch Öholm, Zs f. physik. Chem. 70, 378; 1910.

Bezüglich des Einflusses von η siehe Walden, Zs f. Elektroch. 12, 77; 1906 und Öholm, Medd. Nobel-Inst. 2, 24 u. 26, 1913.

³⁾ Sutherland, Phil. Mag. 9, 781; 1905.

gross, also die Verteilung des Stoffes eine sehr weitgehende ist. Letzteres ist bekanntlich besonders bei emulgierten oder suspendierten Stoffen, überhaupt in fein-dispersen Systemen der Fall.

Wir beginnen mit einem kurzen theoretischen Überblick über die Oberflächenerscheinungen, und folgen einer von Maxwell gegebenen Darstellung.

An dem rechtwinkelig gebogenen Draht ABCD (Fig. 16) sei das Drahtstück EF frei verschiebbar. Innerhalb des Rahmens EBCF befinde sich eine Flüssigkeitslamelle, welche sich infolge der Oberflächenspannung zu verkleinern, also die Seite EF aufwärts zu ziehen, strebt. Das Gewicht sei so gewählt, dass es den Zug der Lamelle auf den Draht gerade kompensiert; eine Vergrösserung der Belastung G würde dann die Lamelle zerreißen, während eine Verkleinerung die Aufwärtsbewegung von EF zur Folge hätte.

Der Zug der Lamelle ist durch ihre Oberflächenspannung veranlasst, und zwar entspricht er, da die beiden Flächen der Lamellen wirksam sind, der doppelten Oberflächenspannung.

Verschiebt man nun mit dem Gewicht G den beweglichen Draht von seiner höchsten Lage an BC bis zur Lage EF, so hat man gegen die Oberflächenspannung eine Arbeit geleistet, welche proportional ist mit G (der Oberflächenspannung gleich gemacht) und mit der Grösse der erzeugten Oberfläche¹⁾. Diese Arbeit stellt offenbar die Oberflächenenergie dar, und es ist:

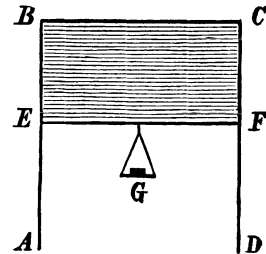


Fig. 16.

$$\text{Oberflächenenergie} = \text{Oberflächenspannung} \times \text{Oberfläche.}$$

Die Oberflächenspannung lässt sich also ausdrücken durch die auf die Flächeneinheit wirkende Energie oder durch die auf die Streckeneinheit wirkende Kraft, und wird gewöhnlich angegeben in $\frac{\text{dyn}}{\text{cm}}$.

Bei dem geringen absoluten Betrag, welchen die bekannten Oberflächenspannungen von Flüssigkeiten und wässrigen Lösungen besitzen — etwa $100 \frac{\text{dyn}}{\text{cm}}$, — erreicht die Oberflächenenergie einer Flüssigkeit erhebliche Werte erst, wenn die Oberfläche gross wird, und kommt also gegenüber den anderen Energieformen eines Stoffes nur dann in Betracht, wenn das Verhältnis von Oberfläche zum Volumen, die „spezifische Oberfläche“ nach W. Ostwald, einen gewissen Betrag, etwa 10000 überschreitet.

Die physiologisch wichtigsten und interessantesten Erscheinungen dieses Gebietes betreffen nicht die reinen Flüssigkeiten, sondern teils Lösungen, teils gröber disperse Gebilde.

¹⁾ Von der Dehnung der Oberfläche ist die Oberflächenspannung von Flüssigkeiten unabhängig.

Lösungen. Allgemein kann gesagt werden, dass die Konzentration an der Oberfläche einer Lösung verschieden ist von derjenigen, welche im Innern der Lösung herrscht. Dies lässt sich experimentell zeigen und ist übrigens eine Forderung der Thermodynamik¹⁾. Die folgende Herleitung schliesst sich der von Millner²⁾ gegebenen an, welche auch H. Freundlich in seiner „Capillarchemie“ anführt³⁾.

In einem gewissen Volum v seien n Moleküle gelöst. Die Konzentration ist dann nicht gleichmässig $\frac{n}{v}$, sondern in der Oberflächenschicht bzw. im Innern grösser oder kleiner. Bezeichnet man den Überschuss pro Flächeneinheit mit σ , so ist in der ganzen Oberfläche ω der Konzentrationsüberschuss $\sigma\omega$, und die Konzentration im Innern ist $c = \frac{n - \sigma\omega}{v}$.

Durch die Betrachtung eines thermodynamischen Kreisprozesses gelangt man zur Differentialgleichung

$$\frac{d\tau}{dv} = -\frac{dp}{d\omega}, \quad \dots \dots \dots \quad (I)$$

wo τ die Oberflächenspannung und p den osmotischen Druck bezeichnet.

Dieselbe drückt aus, dass sich die Oberflächenspannung mit dem Volum, also auch mit der Konzentration ändert, wenn sich der osmotische Druck mit der Grösse der Oberfläche ändert, was nur eintreten kann, wenn die Konzentration in der Lösung von der Grösse der Oberfläche abhängt, also von der Konzentration in der Oberfläche verschieden ist.

Entwickelt man obige Gleichung (I) als Funktion von c , so erhält man:

$$\frac{d\tau}{dv} = \frac{d\tau}{dc} \cdot \frac{dc}{dv} = -\frac{c}{v} \frac{d\tau}{dc} \quad \dots \dots \dots \quad (II)$$

und

$$\frac{dp}{d\omega} = \frac{dp}{dc} \cdot \frac{dc}{d\omega} = -\frac{\sigma}{v} \frac{dp}{dc} \quad \dots \dots \dots \quad (III)$$

Der Konzentrationsüberschuss pro Oberflächeneinheit ist also gegeben durch:

$$\frac{d\tau}{dc} = -\frac{\sigma}{c} \frac{dp}{dc} \quad \dots \dots \dots \quad (IV)$$

Ist die Änderung der Oberflächenspannung mit der Konzentration bekannt, so kann also σ aus (IV) berechnet werden. Gehorcht der osmotische Druck den einfachen Gasgesetzen, so wird $\frac{dp}{dc} = RT$ und somit ist:

$$\frac{d\tau}{dc} = -RT \frac{\sigma}{c} \text{ oder } \sigma = -\frac{c}{RT} \frac{d\tau}{dc} \quad \dots \dots \dots \quad (V)$$

Soweit die Oberflächenspannung anorganischer Lösungen gemessen ist, zeigt sich ein lineares Ansteigen mit der Konzentration, d. h. $\frac{d\tau}{dc}$ ist positiv und konstant, und somit ist σ negativ, und $\frac{\sigma}{c}$ ist konstant. Demnach gelangen wir zum Resultat:

Wenn die Oberflächenspannung einer Lösung mit steigender Konzentration abnimmt, so reichert sich der gelöste Stoff in der Oberfläche an; wenn umgekehrt die Oberflächenspannung einer Lösung mit steigender Konzentration zunimmt, so ist die Konzentration in der Oberfläche geringer als im Innern.

¹⁾ Gibbs, Thermodynamische Studien. Deutsch von Wi. Ostwald. Leipzig 1892.

²⁾ Millner, Phil. Mag. (6) 13, 96; 1907.

³⁾ Freundlich, Capillarchemie, 3. Aufl. Leipzig 1923.

Der Satz ist auch so ausgedrückt worden: Ein gelöster Stoff wird adsorbiert, wenn er die Oberflächenspannung erniedrigt; im entgegengesetzten Fall soll die Adsorption „negativ“ sein. Indessen erscheint es dem Verfasser nicht zweckmässig, die Anreicherung des gelösten Stoffes an der Oberfläche des Lösungsmittels als Adsorption zu bezeichnen.

Betont muss werden, dass zwar tatsächlich im allgemeinen Stoffe, welche die Oberflächenspannung des Wassers stark herabsetzen, auch stark an der Oberfläche angereichert werden, dass aber eine weitgehende quantitative Prüfung des Satzes (V) an der Erfahrung bis jetzt nicht vorliegt.

Zu den Stoffen, welche die Oberflächenspannung des Wassers erniedrigen, gehören die meisten Verbindungen, welche keine starken Elektrolyte sind, also Alkohole, Glycerin, Fettsäuren usw. Ihrem Bestreben, sich an der Oberfläche der wässrigen Lösung anzusammeln, hält bei einer gewissen Oberflächenkonzentration das Gefälle des osmotischen Druckes das Gleichgewicht.

Im Gegensatz zu den genannten Stoffen erhöhen manche Salze die Oberflächenspannung des Wassers gegen Luft und vermutlich auch gegen andere Medien, und eine Anreicherung des gelösten Stoffes an der Grenzschicht von der gleichen Art, wie die oben behandelte, kann dann also nicht eintreten.

Es muss hier noch näher definiert werden, was unter der Oberflächenspannung einer Lösung zu verstehen ist. Da die Oberflächenspannung von der Konzentration abhängt, und da sich in jeder frisch gebildeten Oberfläche im Laufe der Zeit eine Konzentration herstellt, welche von derjenigen im Innern verschieden ist, so hat offenbar eine frisch gebildete Oberfläche, welche mit dem Innern der Lösung noch nicht ins Konzentrationsgleichgewicht gekommen ist, eine andere Oberflächenspannung als eine bereits im stabilen Gleichgewicht befindliche. Man bezeichnet letzteren Wert passend als statische Oberflächenspannung, während ersterer dynamische Oberflächenspannung genannt wird.

Einige Zahlen mögen eine Vorstellung davon geben, in welchem Grade gelöste Krystalloide in 1-norm. Lösung die Oberflächenspannung des Wassers bei 15—20° beeinflussen.

	σ in $\frac{\text{dyn}}{\text{cm}}$
(Wasser)	73
Buttersäure	34
Propylalkohol	44
Natriumchlorid	74,6

In homologen Reihen organischer Substanzen wächst die Erniedrigung der Oberflächenspannung des Wassers (die Capillaraktivität) mit der Länge der Kohlenstoffkette (I. Traube 1891). Wichtige Aufschlüsse über die Orientierung der Moleküle an Oberflächen verdankt man Langmuir¹⁾.

¹⁾ Langmuir, JI Amer. Chem. Soc. 39, 1883; 1917.

Wenden wir uns nun den Kolloiden zu, so treffen wir hier Unterschiede von ganz analoger Art wie hinsichtlich der inneren Reibung.

Wie nämlich zuerst von Linder und Picton¹⁾ und von Zlobicki²⁾ nachgewiesen worden ist, beeinflussen hydrophobe Kolloide die Oberflächenspannung des Wassers nicht.

Hydrophile Kolloide erniedrigen dagegen im allgemeinen die Oberflächenspannung des Wassers mit Beträgen von etwa derselben Größenordnung wie die Krystalloide, und zuweilen mehr. Dies zeigten schon die Zahlen von Quincke (1888), Ramsden u. a.

Schwankende Veränderungen der Oberflächenspannung des Wassers rufen Stärke und manche Gummiarten hervor, vermutlich je nach Anwesenheit von Verunreinigungen. Stark erniedrigen z. B. Proteine, Fette und zahlreiche Ester, Fettsäuren (höhere Homologe der Buttersäure) und Harzsäuren, ferner Tannin und andere Gerbstoffe, sehr stark Seifen und Saponine.

Was besonders Eiweissstoffe betrifft, so liegen Versuche von Zlobicki²⁾, Buglia³⁾ und Iscovesco⁴⁾ vor.

Wird, wie oben, die Oberflächenspannung des Wassers = 75 dynen/cm gesetzt, so ist diejenige einer 10%igen Hämoglobinlösung⁴⁾ = 69,3, einer 2%igen Gelatinelösung²⁾ = 60.

Die Anhäufung von hydrophilen Kolloiden an der Oberfläche der wässrigen Lösungen tritt übrigens zutage, wenn man die Flüssigkeit schüttelt und den Schaum auf seine Zusammensetzung untersucht. Schon die grosse Schaumbeständigkeit vieler Lösungen, z. B. von Albuminen, deutet auf ihre Anreicherung an diesen Stoffen hin.

In diesem Zusammenhang ist die Tatsache bemerkenswert, dass eine Reihe von hydrophilen Kolloiden, besonders Eiweisskörper, Peptone, Saponine usw. die Neigung besitzen, an der Oberfläche der Lösung fast unlösliche Häutchen zu bilden⁵⁾. Nach dem Gibbs-Thomson'schen Satz ist ja eine Konzentration der betr. Stoffe, welche die Oberflächenspannung des Wassers durchweg zu erniedrigen scheinen, an der Oberfläche der Lösung zu erwarten.

Damit steht einerseits wohl das Schimmeln von Eiweisslösungen in Zusammenhang, andererseits die Tatsache, dass Eiweisslösungen durch mechanische Bewegung zum Teil koaguliert werden können⁶⁾. In der Enzymchemie ist seit längerer Zeit eine hierhergehörige Erscheinung unter der Bezeichnung

Schüttel-Inaktivierung

bekannt. Sie wurde zuerst von Abderhalden und Guggenheim⁷⁾ an Tyrosinase beobachtet und bald darauf von Signe und Sigval Schmidt-

¹⁾ Linder und Picton, *Jl Chem. Soc.* 67, 72; 1895.

²⁾ Zlobicki, *Bull. Acad. Cracovie*, Juli 1906, 497.

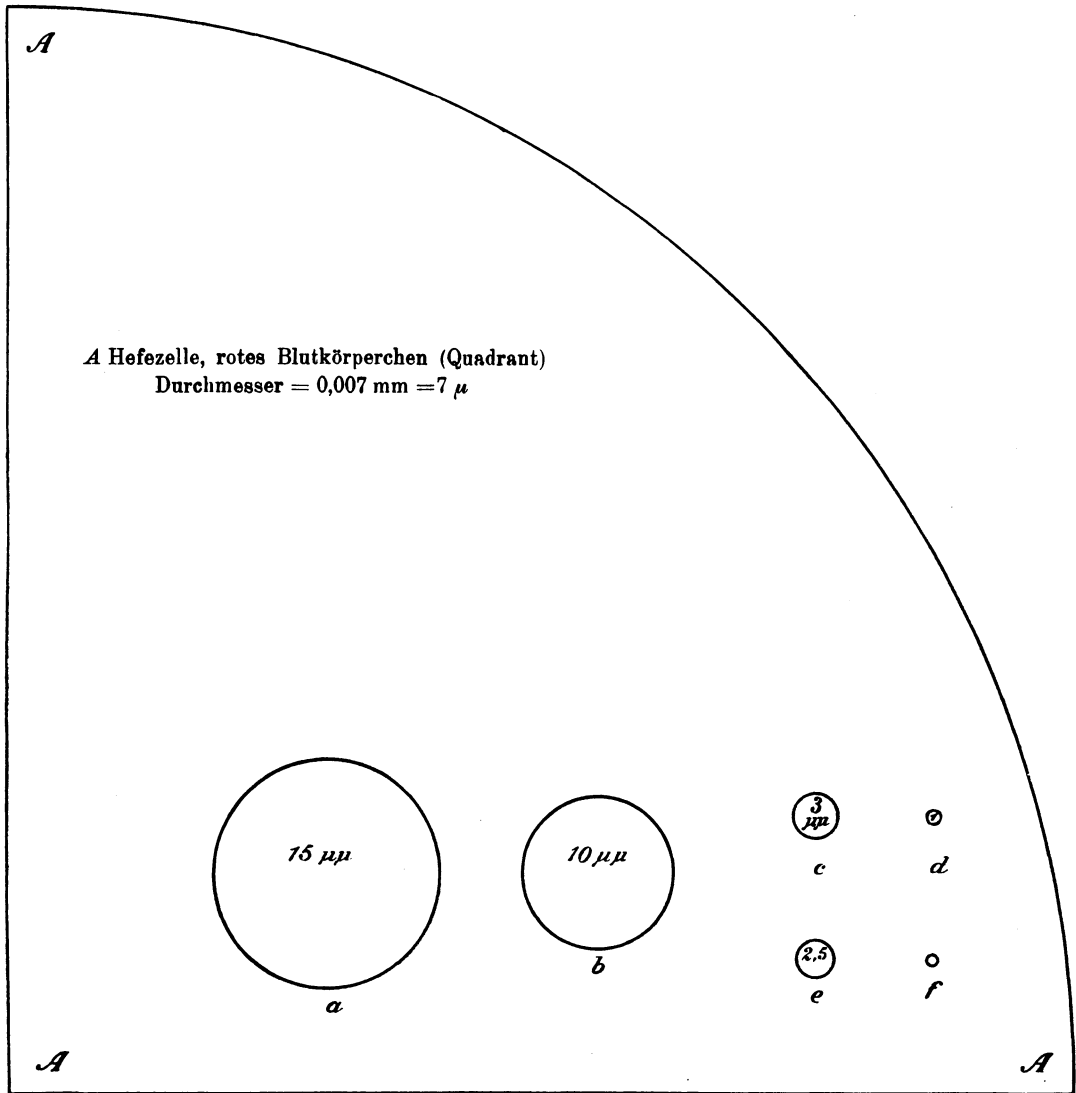
³⁾ Buglia, *Bio. Zs* 11, 311; 1908.

⁴⁾ Iscovesco, *Soc. Biol.* 69, 622; 1910 und 70, 11; 1911.

⁵⁾ Siehe hierzu Metcalf, *Zs f. physik. Chem.* 52, 1; 1905.

⁶⁾ Ramsden, *Zs f. physik. Chem.* 47, 336; 1904.

⁷⁾ Abderhalden und Guggenheim, *H.* 54, 331; 1908.



<i>A</i> Hefezelle	$7,5 \mu$	vergrössert 1 : 40 000
<i>a-d</i> Goldteilchen	$10-1 \mu\mu$	
<i>e</i> Hämoglobinmolekül	$2,5 \mu\mu$	vergrössert 1 : 2 000 000
<i>f</i> Glucosemolekül	$0,9 \mu\mu$	

Nielsen¹⁾ an Lab, Harlow und Stiles²⁾ an Ptyalin, sowie von Shaklee und Meltzer³⁾ an Pepsin eingehend studiert. Sämtliche Forscher stimmen darin überein, dass hier eine Oberflächen- bzw. Grenzflächenwirkung vorliegt. Diese Inaktivierung ist zum Teil reversibel und zum Teil irreversibel, auch geht wohl die erstere Wirkung mit der Zeit in letztere über. Durch Zusätze, welche die Oberflächenspannung bzw. Oberflächenkonzentration der Enzymlösungen vermindern, wird auch die Schüttelinaktivierung beeinflusst; so wird sie z. B. durch Elektrolyte verringert, durch Saponine, welche nach Ramsden die Eiweisskörper von den Oberflächen der Lösungen vertreiben, ganz aufgehoben.

E. Zeitliche Änderung der Oberfläche; „Altern“ hydrophiler Sole.

Wie Haber⁴⁾ in einem zusammenfassenden Vortrag „Über amorphe Niederschläge und kristallisierte Sole“ sagt, entstehen amorphe, feste Massen durch Überschreitungsvorgänge. Bei der Fällung eines Niederschlags aus der wässrigen Lösung wird eine gewisse Art von Molekülen durch einen chemischen Eingriff in einem Betrag hervorgebracht, der die Löslichkeit überschreitet. Haber stellt sich vor, dass zwei Moleküle eines Soles, etwa eines Hydroxyds, sobald sie sich durch die kinetische Energie der Wärme auf einen gewissen Abstand genähert haben, aneinander haften. Durch Annäherung weiterer Moleküle entstehen Molekülhaufen und schliesslich sichtbare und ausfallende Flocken.

„Die massgebliche Häufungsgeschwindigkeit hängt davon ab, in welchem Masse die Dichtigkeit der in Frage kommenden Moleküle die Löslichkeit überschreitet, und wie gross die Beweglichkeit der Moleküle in der Flüssigkeit ist, in der sie zur Ausscheidung kommen.“ Die regellos gehäuften Moleküle ordnen sich sodann allmählich gittermässig mit einer Geschwindigkeit, welche Haber als Ordnungsgeschwindigkeit bezeichnet.

Häufung ist offenbar der primäre Vorgang an den nach Löslichkeitsüberschreitung gebildeten Molekülen. Die Häufung braucht allerdings nicht ausschliesslich durch die Wärmebewegung bewirkt werden, sondern es können Kräfte (z. B. elektrische) sein, welche gleichzeitig richtend wirken.

Bei vielen hydrophilen Solen werden gleichzeitig mit der Ordnung bzw. Orientierung der Moleküle chemische Veränderungen eintreten, welche sich hauptsächlich als Dehydratation äussern.

Massgebend für den Grad und Verlauf der Dehydratation dürfte bei denjenigen hydrophilen Kolloiden, welche Ampholyte sind, und dies dürfte für fast alle hydrophilen Kolloide angenommen werden können,

¹⁾ Signe und Sigval Schmidt-Nielsen, H. 60, 426; 1909 und 63, 317; 1910. — Zur Theorie siehe E. K. Rideal und C. G. L. Wolf, Proc. Roy. Soc. A 106, 97; 1924.

²⁾ Harlow und Stiles, J1 Biol. Chem. 6; 1909.

³⁾ Shaklee und Meltzer, Amer. J1 of Physiol. 25, 81; 1909.

⁴⁾ Haber, Chem. Ber. 55, 1717; 1922.

die Grösse der sauren und basischen Dissoziationskonstanten sein, also der Betrag, mit welchem das Ionenprodukt des Wassers überschritten wird¹⁾. Jedenfalls verdient beim Studium des „Alterns“ der hydrophilen Sole die chemische Seite des Vorgangs in den Vordergrund gestellt zu werden, wie dies auch sowohl von Kohlschütter²⁾ als von Willstätter³⁾ geschehen ist.

Das „Altern“ eines hydrophilen Sols kann an zahlreichen Eigenschaftsänderungen verfolgt werden, welche alle mit zunehmender Häufung, zunehmender Dehydratation und zunehmender Orientierung der Moleküle zusammenhängen dürften. Mit steigendem Alter der Sole nimmt die Grösse der freien Oberfläche ab und damit sowohl die Adsorptionsfähigkeit der Gewichtseinheit Adsorbens als die Reaktionsgeschwindigkeit der Sole gegenüber fremden Agenzien, Säuren und Basen.

Am Aluminiumhydroxyd sind mehrere Alters-Stadien nach verschiedenen Methoden von Kohlschütter, Willstätter und Kraut, H. Fricke⁴⁾, Hedvall, Euler und R. Nilsson studiert worden. Mit A. Westgren hat Verf. versucht, auch röntgen-spektrographische Messungen zur Charakteristik von Sorbentien heranzuziehen. Die aus mässig konzentrierten Lösungen bei Zimmertemperatur gefällten Tonerdehydrat-Sole sind amorph, gehen aber bei Zimmertemperatur im Verlauf von Tagen in eine kristallinische Form über.

Die Abnahme der Löslichkeit organischer hydrophiler Sole mit zunehmendem Alter, welche bei der Bearbeitung und Reinigung der Enzymfällungen in Betracht kommt, ist ebenfalls auf die Aggregation der Moleküle und ihre Entwässerung zurückzuführen.

F. Adsorption (Sorption).

Chemische Gesichtspunkte.

Man hat oft die Adsorption als eine Capillarerscheinung aufzufassen versucht⁵⁾. Indessen hat sich der im vorhergehenden Abschnitt erwähnte Gibbssche Satz vom Zusammenhang zwischen der Änderung der Oberflächenspannung und der Konzentrationsänderung an der Oberfläche von Lösungen für das Studium der in der Enzymchemie vorkommenden Adsorptionserscheinungen

¹⁾ Euler und R. Nilsson, Chem. Ber. 57, 217; 1924.

²⁾ Kohlschütter, Zs anorg. Chem. 105, 1; 1918. — Naturwissenschaften 11, 865; 1923. — Siehe auch die sehr bemerkenswerte Monographie dieses Verfassers: Die Erscheinungsformen der Materie. Berlin 1917.

³⁾ Willstätter und Kraut, Chem. Ber. 57, 58; 1924.

⁴⁾ Fricke, Zs Elektroch. 26, 129; 1920. — Zs anorg. Chem. 134, 344; 1924.

⁵⁾ So sagt Bechhold in seiner Monographie: Die Kolloide in Biologie und Medizin, Leipzig 2. Aufl. 1919, Seite 25: „Die Adsorption ist eine Erscheinung, welche bedingt ist durch die Verminderung der Oberflächenspannung des Lösungsmittels seitens des gelösten Stoffes an der Grenzfläche zwischen Lösungsmittel und Adsorbens.“

als wenig fruchtbar erwiesen¹⁾, und zwar deswegen, weil sich über die nach dem Gibbsschen Prinzip eintretenden Konzentrationsveränderungen andere Effekte superponieren.

Neben den Einflüssen der Capillarität treten bei vielen Adsorptionserscheinungen noch Molekularkräfte, meist chemischer und elektrischer Art, auf, welche erstere in der Regel bedeutend übertreffen.

In der biochemischen Literatur hat L. Michaelis frühzeitig die chemische Seite vieler Adsorptionsvorgänge hervorgehoben.

Nach Ansicht dieses Autors (Oppenheimers Handbuch II, 1, 390; 1910), kommt von allen bekannteren Stoffen mechanische Adsorption nur bei Kohle und bei Cellulose in Betracht. „Fast alle anderen als Adsorbentien bekannten Stoffe wie Kieselsäure, Kieselerde, Kaolin, Arsensulfid, Mastix, Eisenhydroxyd, Tonerde, Zirkonhydroxyd haben überhaupt kein mechanisches Adsorptionsvermögen und adsorbieren elektro-indifferente Stoffe wie Alkohol, Aceton, Zucker überhaupt nicht. Sie adsorbieren nur Stoffe, die in Ionenform oder in Form elektrisch geladener Suspensionen auftreten können, und zwar immer nur gemäss ihrer elektrischen Ladung. So adsorbiert Kieselsäure nur solche Stoffe, die im elektrischen Stromgefälle nach der Kathode wandern, und Eisenhydroxyd nur solche Stoffe, die nach der Anode wandern.“ Es handelt sich also bei diesen Stoffen stets um eine an der Oberfläche des adsorbierenden Stoffes vor sich gehende Neutralisation zwischen einem saurem und einem basischen Stoff. Aber auch Kohle adsorbiert nach Michaelis und Rona nicht in allen Fällen rein „mechanisch“, sondern durch Vermittlung elektrochemischer Kräfte.

Bei der Aufnahme von Basen oder gelösten Körpern durch starre Stoffe machen sich, wie eben erwähnt, verschiedenartige Wirkungen geltend, welche nicht selten gleichzeitig auftreten.

Sofern hierbei nur die äussersten Schichten des starren Körpers beteiligt sind, spricht man gewöhnlich von Adsorption, im Gegensatz zu der Absorption, bei welcher es sich um die Bildung einer Lösung im aufnehmenden Stoffe handelt. Aber auch bei der Adsorption haben wir neben der Verdichtung auf einer starren Oberfläche auch die Aufnahme in dieselbe, so dass es nicht ungeeignet erscheint, für die beiden Erscheinungen der Adsorption und der Absorption nach einem Vorschlag von Mc. Bain²⁾ die zusammenfassende Bezeichnung „Sorption“ einzuführen. Wir werden sie im folgenden neben der älteren üblichen Bezeichnung benützen.

¹⁾ Bei der experimentellen Prüfung musste, von einem speziellen Fall abgesehen, die Voraussetzung gemacht werden, dass die Oberflächenspannungen Lösung-Gasraum mit derjenigen Lösung-Adsorptionsmittel parallel geht; dafür liegt aber kein Anhaltspunkt vor.

²⁾ Mc. Bain, Zs physik. Chem. 68, 471; 1908.

Quantitative Beziehungen bei der Sorption von nicht kolloiden Stoffen an feste Körper.

Wir betrachten zunächst vollständig reversible Sorptionen. Das Sorptionsmittel, welches mit dem sorbierten Stoff beladen ist, muss denselben also bis zur Einstellung eines neuen Gleichgewichtes an das reine Lösungsmittel abgeben. Was den Einfluss der Menge des sorbierenden festen Stoffes betrifft, so ist in erster Linie die Grösse seiner Oberfläche massgebend; für ein und dasselbe Präparat kann man die sorbierende Stoffmenge unter sonst gleichen Umständen der wirksamen Oberfläche proportional setzen.

Was dann die Verteilung des zu sorbierenden Stoffes zwischen fester Oberfläche und umgebendem Medium betrifft, so gilt oft in recht weiten Grenzen sowohl für die Sorption von Gasen als von gelösten Stoffen¹⁾ die bekannte Beziehung:

$$\frac{x}{m} = \alpha c^{\frac{1}{n}} \text{ oder } \log \frac{x}{m} = \log \alpha + \frac{1}{n} \log c, \dots \dots \dots (22)$$

wo

m die Menge des Adsorptionsmittels (Sorbens),

x die von diesem aufgenommene Substanzmenge und

c die Endkonzentration der Lösung bezeichnet.

Der Exponent $1/n$ hängt von der Natur der Komponenten des Systems ab, und pflegt für gelöste Stoffe Werte zwischen 0,1 und 0,5 anzunehmen.

Eine andere empirische Formel für das Adsorptionsgleichgewicht hat Freundlich²⁾ aufgestellt:

$$\frac{v}{m} \ln \frac{a}{a-x} = \lambda = \alpha \left(\frac{a}{v} \right)^{-\frac{1}{n}}$$

Hier bedeutet a die Gesamtmenge des gelösten Stoffes, x die adsorbierte Menge und v das Flüssigkeitsvolumen. Die Grösse λ ist von der Menge der adsorbierenden Substanz unabhängig, dagegen noch eine Funktion von a/v , also von der Anfangskonzentration; α und n sind Grössen, welche nur von der Temperatur und der Art des gelösten Stoffes abhängen.

Bemerkenswert ist das experimentelle Ergebnis einer Arbeit von G. C. Schmidt³⁾, dass die adsorbierte Menge bis zu einem Maximum zunimmt, wie hoch man auch die Konzentration der umgebenden Lösung steigert. Dieses Maximum ist proportional der Menge und Art des Adsorptionsmittels.

Die von G. C. Schmidt aus der oben erwähnten Tatsache abgeleitete Formel⁴⁾ schliesst sich den Beobachtungen nicht immer genügend an.

Arrhenius⁵⁾ hat aus den experimentellen Daten von Schmidt, Miss Francis Homfray und A. Titoff die Formel abgeleitet

¹⁾ Siehe z. B. Gustafson (Gustaver), Zs f. physik. Chem. 91, 397; 1916.

²⁾ Freundlich, Zs physik. Chem. 57, 385; 1907.

³⁾ G. C. Schmidt, Zs physik. Chem. 74, 689; 1910.

⁴⁾ G. C. Schmidt, Zs physik. Chem. 91, 103; 1916.

⁵⁾ Arrhenius, Medd. Nob.-Inst. 2, Nr. 7; 1911.

$$k \frac{dx}{dc} = \frac{s-x}{x}, \dots \dots \dots (23a)$$

woraus sich durch Integration ergibt:

$$\log \frac{s}{s-x} - 0,4343 \frac{x}{s} = \frac{1}{k} c \dots \dots \dots (23b)$$

- x = auf 1 g Adsorptionsmittel (Kohle) verdichtete Menge Substanz,
- s = Maximalwert dieser Menge,
- c = osmotischer Druck dieser Substanz in der umgebenden Lösung (oder Druck des umgebenden Gases, welches adsorbiert wird);
- k = eine Konstante.

Da der Wert von s aus den Beobachtungen direkt bestimmt wird, enthält die Formel nur eine willkürlich zu wählende Konstante, während die Formel von Freundlich deren 2 enthält, nämlich a und n.

Als Beispiel einer reversiblen Adsorption teilen wir einige Zahlen von Rona und Michaelis¹⁾ mit, welche sich auf Traubenzucker, angegeben in Millimolen, und Kohle beziehen.

Volumen v = 100 ccm. Im Mittel 5,0 g Kohle.

Gesamtmenge Zucker, a	Nicht adsorbierter Zucker, a - x	Adsorbierter Zucker, x
2,928	1,422	1,506
11,567	7,139	4,428
43,04	35,75	7,29

Solange die Konzentrationen in der Lösung sehr gering sind, ist die adsorbierte Menge proportional mit der in der Lösung vorhandenen; die Adsorptionskurve steigt also anfangs linear.

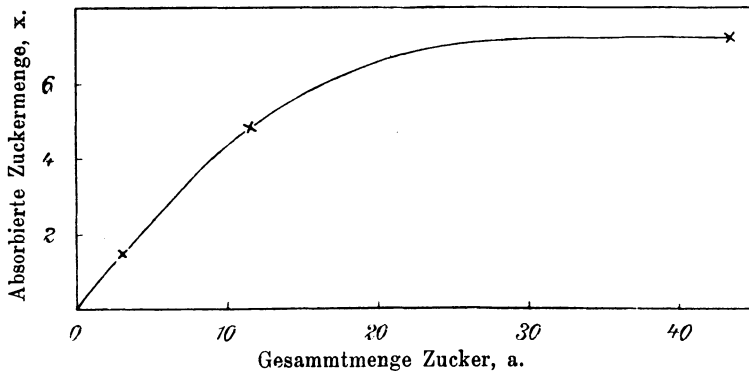


Fig. 17.

Werden aus einer Lösung zwei verschiedene Stoffe von einem Adsorptionsmittel aufgenommen, so können die beiden sich gegenseitig verdrängen, wie etwa gleichzeitig von Rona und Michaelis am Beispiel Essigsäure und

¹⁾ Rona und Michaelis, Biochem. Zs 15, 196; 1909.

Aceton und von Morton Masius¹⁾ unter Freundlich's Leitung gefunden wurde²⁾. Bei der Adsorption eines einzigen Stoffes aus einer Lösung muss sich dieser Effekt ebenfalls bemerkbar machen, da auch Lösungsmittel adsorbiert wird³⁾.

Über Adsorption aus Gemischen von Aminosäuren haben Abderhalden und Fodor⁴⁾ interessante Versuche angestellt. Hierbei wurden eigenartige Beziehungen gefunden, auf die hier nur verwiesen werden kann; ihnen zufolge verdrängen sich Aminosäuren, Traubenzucker, Glycinanhydrid u. a. gegenseitig.

Die erste zusammenfassende Bearbeitung der Adsorptionserscheinungen verdankt man Freundlich, der auch selbst ein sehr grosses Versuchsmaterial beigebracht hat⁵⁾. Seine theoretische Behandlung des Gebiets, wie sie besonders in seinen Adsorptionsforschungen zum Ausdruck kommt, ist in erster Linie formeller Art.

Eine neue Periode in der Lehre von den Oberflächen-Vorgängen ist angebahnt worden durch ein tieferes Eingehen auf die an den adsorbierenden Oberflächen wirksamen Kräfte.

In dieser Hinsicht kann man vielleicht den Stand der Forschung folgendermassen darstellen: Allgemein werden zwischen den Molekülen einer festen oder flüssigen Oberfläche und den Molekülen einer angrenzenden Gas- bzw. Dampf-Phase oder einer Lösung Attraktionskräfte in Wirksamkeit treten, wie sie in der Konstanten a der van der Waalsschen Zustandsgleichung zum Ausdruck kommen. Solche Molekularattraktionskräfte müssen sich z. B. bei der Sorption von inerten Gasen an Kohle bemerkbar machen.

Auch bei anderen Adsorptionserscheinungen, z. B. an Kohlenwasserstoffen, kann neben schwachen Valenzkräften die Molekularattraktion noch hervortreten.

Langmuir⁶⁾ hat in mehreren Arbeiten, welche einen wichtigen Fortschritt auf diesem ganzen Gebiet bedeuten, betont, dass zwischen Sorbens und Adsorbat, z. B. auch bei der Sorption von Dämpfen auf Glimmer, Glas und Platin chemische Nebenvalenzen zur Wirkung kommen, welche zwischen je einer Molekularschicht, also in einer Schichtdicke von der Grössenordnung 10^{-8} cm wirksam sind.

Für die Dicke der Sorptionsschicht von Dämpfen an Kohle hat Gustaver⁷⁾ in exakten Versuchen die Grössenordnung 10^{-8} cm gefunden.

¹⁾ Morton Masius, Über die Adsorption in Gemischen. Dissertation, Leipzig 1908.

²⁾ Ähnliche Ergebnisse erhielten später Rona und v. Tóth am System Kohle, Glucose und Urethan (Biochem. Zs 64, 228; 1914).

³⁾ Siehe hierzu die Versuche von Williams und besonders von Gustaver (Gustafson), Zs physik. Chem. 91, 385; 1916.

⁴⁾ Abderhalden und Fodor, Fermentforschung, 2, 151 u. 211; 1918.

⁵⁾ Hier sei nochmals auf die Monographie Freundlich's: Kapillarchemie (Leipzig, 3. Aufl. 1923) hingewiesen.

⁶⁾ Langmuir, JI Amer. Chem. Soc. 38, 2221; 1916 und 40, 1361; 1918.

⁷⁾ Gustaver, Dissert. Stockholm 1922. Kolloidchem. Beih. 15, Heft 8—12; 1922.

Nicht unerwähnt sollen die Einwände bleiben, welche Eucken¹⁾ gegen die Langmuirsche Theorie erhoben hat. Auch Polany²⁾ nimmt im Gegensatz zu Langmuir an, dass sich die Sorptionskräfte nicht nur über eine Schicht, sondern über einen weiteren Sorptionsraum geltend machen.

In den meisten, und besonders in den biologisch interessanten Fällen dürfte die Adsorption eine rein chemische bzw. elektrochemische Reaktion sein, welche sich von chemischen Vorgängen in homogenen Lösungen durch nichts anderes unterscheidet, als dadurch, dass der Umsatz auf die Oberfläche des freien Sorbens begrenzt ist. Die Sorption ist in solchen Fällen als Salzbildung, doppelter Umsatz usw. zu verstehen, und wird also durch das Massenwirkungsgesetz beherrscht, das in der gleichen Weise, wie überhaupt bei heterogenen Gleichgewichten angewandt werden muss. So führt also z. B. die Sorption einer Säure an Aluminiumhydroxyd zur oberflächlichen Neutralisation einer schwachen Base durch eine Säure und muss als heterogene Hydrolyse behandelt werden³⁾.

Affinität des Adsorbates zum Sorbens einerseits und die Lösungskräfte des Mediums andererseits müssen das Sorptionsgleichgewicht bestimmen. Deswegen wird auch die Sorbierbarkeit eines Stoffes eine Funktion seiner Löslichkeit (bzw. seines Dampfdruckes).

Einen einfachen Fall, an welchem sich ein elektrochemisches Gleichgewicht zwischen Metall und Metallsalz (Silber und Silbernitrat) im Sinne der Nernstschen Theorie einstellt und zu Bildung einer angenähert einmolekularen Schicht führt, haben Rudberg und Euler⁴⁾ studiert.

Andere Anhaltspunkte über die Dicke der Adsorptionsschicht lieferte die Untersuchung von Paneth und Vorwerk⁵⁾.

Nicht selten erscheinen die Vorgänge an Oberflächen dadurch kompliziert, dass die oberste Molekularschicht des festen Sorbens nach eingetretener chemischer Reaktion sich entweder von der Unterlage ablöst oder aber für die Moleküle des Sorbates durchlässig wird, so dass die Reaktion zu tieferen Schichten fortschreitet. Derartige Beispiele findet man in einer Mitteilung von Morávek⁶⁾ beschrieben.

Wichtig für das Studium der Sorptionserscheinungen ist der Umstand, dass die Moleküle an der Oberfläche fester und flüssiger Stoffe in der Regel orientiert sind [Langmuir⁷⁾; Harkins⁸⁾]. Besonders verdienen die verschiedenen

1) Eucken, Zs f. Elektroch. 28, 6; 1922.

2) Polany, Verh. deutsch. physik. Ges. 18, 55; 1916.

3) Vergl. Euler u. E. Erikson, H. 128, 1; 1923. — Euler u. R. Nilsson, H. 131, 107 u. 134, 22; 1924.

4) Rudberg u. Euler, Zs f. Physik 13, 275; 1923. — Euler, Zs f. Elektroch. 28, 446; 1922.

5) Paneth u. Vorwerk, Zs physikal. Chem. 101, 445; 1922. — Siehe auch G. C. Schmidt u. Duran, Zs physik. Chem. 108, 128; 1924.

6) Morávek, Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi 8, Nr. 30; 1923.

7) Langmuir, l. c. und JI Am. Chem. Soc. 39, 1848; 1917.

8) Harkins und Mitarb., JI Am. Chem. Soc. 39, 354 und 541; 1917. — 42, 700; 1920. — 43, 35; 1921.

Orientierungsmöglichkeiten bei festen Stoffen von amphoterem Charakter eingehende Beachtung.

Einen wesentlichen Fortschritt in unserer Kenntnis der Adsorptionserscheinungen haben in neuerer Zeit Michaelis und Rona¹⁾ durch ihre Untersuchung der Adsorption organischer Farbstoffe gebracht, wobei es sich um nicht kolloide Repräsentanten dieser Stoffgruppe handelte. Besonders bemerkenswert ist die rationelle Systematik der hierhergehörenden Erscheinungen von seiten der genannten Autoren.

„Von vornherein sind bei der Adsorption eines Salzes drei Möglichkeiten vorhanden, die auch gleichzeitig nebeneinander bestehen können. Wir wollen sie bezeichnen als:

äquivalente Adsorption,
hydrolytische Adsorption und
Austausch-Adsorption.“

Bei der äquivalenten Adsorption wird Anion und Kation des Salzes in äquivalenter Menge adsorbiert. Hydrolytische Adsorption ist diejenige, bei der die Base des Salzes adsorbiert wird, wobei das Anion in Form freier Säure in Lösung bleibt (bzw. umgekehrt). Bei der Austausch-Adsorption bleibt zwar das Anion (bzw. Kation) auch in der Lösung, aber nicht als freie Säure (bzw. Base), sondern gebunden an ein Kation, welches im Austausch mit der adsorbierten Base aus dem Adsorbens in Lösung geht.

Zu diesen drei Formen der Adsorption der Elektrolyte kommt noch eine vierte, die sich analytisch schwer, oft gar nicht nachweisen lässt, aber doch zur Erklärung der Änderung der elektrischen Ladung angenommen werden muss, nämlich die überschüssige Adsorption eines Anions bzw. Kations. Durch die äquivalente Adsorption kann nämlich niemals eine Änderung der Ladung des Adsorbens zustande kommen, weil ja gleiche Mengen positiver und negativer Elektrizität aufgenommen werden. Diese Ladungsänderungen können nur dadurch zustande kommen, dass von einem der beiden Ionen ein sehr kleiner Überschuss adsorbiert wird. Diese Erscheinung nennen Michaelis und Rona „Aufladungsadsorption“. Dieselbe muss stets dann eintreten, wenn Anion und Kation eines Elektrolyten verschieden adsorbierbar sind, also im allgemeinen bei jeder Adsorption eines Elektrolyten.

An Kohle setzt sich nun nach Michaelis die gesamte Sorption der basischen Farbstoffe folgendermassen zusammen: Die hydrolytische Adsorption ist in allen Fällen = 0; die äquivalente Adsorption schwankt zwischen 70 und 95% der Gesamtadsorption, und die Austauschadsorption schwankt zwischen 30 und 5% der Gesamtadsorption. Die Austauschadsorption kommt aber nicht durch die Kohle selbst zustande, sondern durch die ihr anhaftenden Kalksalze. Demgemäss ist die Adsorption eines basischen

¹⁾ Michaelis und Rona, Biochem. Zs 97, 57; 1919.

Farbstoffes durch Kohle in ihrem ganzen analytisch nachweisbaren Umfange eine äquivalente Adsorption.

Bei unlöslichen, salzartigen Adsorbentien, wie Bariumsulfat, Talkum (Magnesiumsilikat), Kaolin (ein Aluminiumsilikat), Kieselsäure, Eisenhydroxyd gibt es nur eine Form der Adsorption, nämlich die Austauschadsorption.

Von Oxyden saurer oder basischer Natur, welche wirklich wasserunlöslich sind, d. h. dem Wasser weder saure noch basische Reaktion erteilen, werden überhaupt keine Farbstoffe in messbarer Menge adsorbiert. „Die Adsorption verläuft bei ihnen vollständig unter dem Bilde einer chemischen Umsetzung.“ Eine eigentliche Adsorption, wie bei der Kohle, findet bei den Oxyden in sicher nachweisbarer Menge nicht statt.

„Bei elektrolytartigen Adsorbentien ist die Adsorption also identisch mit denjenigen Reaktionen, welche auf Grund der gewöhnlichen chemischen Affinitäten vorhergesagt werden können. Die Annahme besonderer Oberflächenkräfte zur Erklärung der Adsorption ist bei ihnen überflüssig.“

Adsorption von Kolloiden an starren Oberflächen.

Während wir es bei der Adsorption von Stoffen aus sog. „echten“ Lösungen mit reversibeln Gleichgewichten zu tun haben, ist dies, sobald wir zu den kolloiden Lösungen übergehen, nicht mehr der Fall. Allerdings stellt sich vermutlich zunächst ein umkehrbares Adsorptionsgleichgewicht ein, aber in kürzerer oder längerer Zeit findet dann an der adsorbierten Substanz eine Denaturation und eine Abnahme der Löslichkeit statt, ein Umstand, welcher dieses ganze Erscheinungsgebiet erheblich kompliziert.

Besonderes Interesse bietet hier das Verhalten der kolloiden Farbstoffe und der Proteine.

Abgesehen davon, dass die Adsorptionen dieser Stoffe nicht mehr rein reversibel sind, haben wir hier noch einen Umstand besonders zu betonen:

Bei der Adsorption der Farbstoffe wie der Eiweisskörper — übrigens auch der meisten anderen kolloidal gelösten Stoffe — an viele Sorbentien, wie Metallhydroxyde, Kaolin, Kieselsäure treten elektrische bzw. elektrochemische Kräfte in den Vordergrund¹⁾. (Eine Unterscheidung in mechanische und elektrische Adsorption ist wohl bei der Adsorption der Kolloide nicht mehr zweckmässig, wenn wir die „mechanische Adsorption“ als das Ergebnis der Molekular-Attraktion deuten. Jedenfalls können wir sagen, dass der elektrochemische Charakter der Adsorbentien bzw. die elektrische Ladung, welche auf dieselben übergeht, auch hier, wie bei den nicht-kolloiden Stoffen einen starken Einfluss auf den Grad der Adsorption ausübt; oft ist die Ladung von Adsorbens und adsorbiertem Stoff allein massgebend für den Endzustand.

¹⁾ Vgl. hierzu Michaelis und Ehrenreich, *Biochem. Zs* 10, 283; 1908. Michaelis und Rona, *Biochem. Zs* 15, 196; 1909.

Es wird dies dann der Fall sein, „wenn das Adsorbens gegen die Flüssigkeit eine hohe elektrische Potentialdifferenz zeigt und durch die Adsorption des gelösten Stoffes eine Verminderung derselben erreicht werden kann“. Unter den Adsorbentien werden diejenigen eindeutige Resultate ergeben, welche, möglichst unter allen Bedingungen, entschiedene und einsinnige Ladungen tragen¹⁾. Hier kommen besonders in Betracht einerseits die Hydroxyde des dreiwertigen Eisens, des Aluminiums und Magnesiums und andererseits sog. kolloide Metalle. Versuche mit den ausgesprochen basischen Farbstoffen Fuchsin, Methylviolett und Methylenblau, sowie den sauren Farbstoffen Pikrinsäure und Eosin hatten zunächst an Kaolin, Tonerde und Eisenhydroxyd folgendes Resultat ergeben²⁾:

Kaolin adsorbiert in neutraler, alkalischer und saurer Lösung immer nur basische Farbstoffe, dagegen nicht einmal spurenweise saure Farbstoffe. Tonerde (und Eisenhydroxyd) adsorbiert bei allen Reaktionen nur saure Farbstoffe.

Michaelis hat daraus den Schluss gezogen, dass alle Substanzen, die durch Kaolin adsorbiert werden können, Basen sein müssen, alle Substanzen, die durch Tonerde adsorbiert werden, hingegen Säuren. Für reine, verdünnte Lösungen solcher Stoffe trifft dies wohl auch in der Regel zu.

Adsorption der Enzyme.

Die Fähigkeit der Enzyme, von elektropositiven oder elektronegativen Adsorptionsmitteln wie Eisen- oder Aluminiumhydroxyd einerseits und Kaolin andererseits adsorbiert zu werden hat für viele präparative Reinigungsarbeiten an Enzymen eine besonders grosse Bedeutung erhalten. In der Tat haben sich die Adsorptionsmethoden als sehr erfolgreiche Enzymreinigungsmethoden erwiesen.

Von den früheren Untersuchungen über Adsorbierbarkeit der Enzyme sind die von Brücke³⁾ über die Adsorbierbarkeit des Pepsins an Calciumphosphat, Schwefel oder Cholesterin, ferner diejenigen von Hammarsten bereits S. 12 erwähnt worden. Bezüglich anderer älterer Versuche wird auf

¹⁾ Es würde zu weit führen, hier auf die Ursache der Ladungen fester Stoffe näher einzugehen, zumal es sich auch hier um verschiedenartige Erscheinungen handelt. Zunächst sei daran erinnert, dass die Ladung fein verteilter fester Stoffe bei der Überführung durch den elektrischen Strom, der sog. Kataphorese, der Umkehrung der Elektroendosmose, zum Ausdruck kommt (vgl. hierzu Kap. 2). Stets müssen elektrolytische Ionenladungen an der Oberfläche der Adsorbentien die Ladungen an ihren Grenzflächen bedingen. Diese Ionenladungen können nun vom reinen Adsorbens selbst herrühren und sind dann Diffusionspotentiale im Sinne der Nernstschen Theorie vom Lösungsdruck (Nernst, Zs physik. Chem. 9, 137, 1892. — Michaelis, Zs f. Elektroch. 14, 353; 1908. — Haber, Ann. d. Physik (4) 26, 927; 1908. — Haber und Klemensiewicz, Zs physik. Chem. 67, 385; 1909). Nicht selten sind die Potentiale auch hervorgerufen bzw. stark beeinflusst durch adsorbierte Elektrolyte (Freundlich und Mäkel, Zs f. Elektroch. 15, 161; 1909).

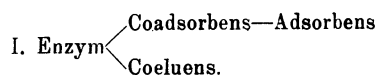
²⁾ Michaelis und Ehrenreich, Biochem. Zs 10, 283; 1908.

³⁾ Brücke, Sitzungsber. math.-naturw. Klasse d. K. Akad. d. Wiss. Wien, 43, 601; 1861.

die zusammenfassende Darstellung von Willstätter¹⁾ verwiesen. Auch der ersten anregenden Arbeiten von Michaelis²⁾ ist bereits gedacht worden.

Nachdem schon beim Arbeiten über die Peroxydase³⁾ die Adsorptionsmethoden mit gutem Erfolg geprüft waren, wurde durch die grundlegenden Untersuchungen von Willstätter und Racke⁴⁾ deutlich gemacht, dass die Adsorbierbarkeit der Saccharase vom Reinheitsgrad des Enzyms in hohem Grade abhängig ist. Ungereinigte Saccharase (mit welcher Michaelis gearbeitet hatte) wurde nicht oder nur unbedeutend von Kaolin adsorbiert, während das Enzym, wenn es schon eine erste Reinigung durch Tonerdeadsorption durchgemacht hatte, sich auch von Kaolin gut adsorbieren liess. In unreinem Zustande des Enzyms machen sich also die verunreinigenden Begleitstoffe bezüglich der Adsorptionsverhältnisse des Enzyms stark geltend. Hierdurch erklären sich auch die verschiedenen Adsorptionsverhältnisse des unreinen Enzyms in Lösungen verschiedenen Ursprungs und Alters. Die Adsorbierbarkeit der Saccharase im Hefeautolysat ist somit vom Grad der Proteolyse abhängig⁵⁾. Auch auf die Freimachung des Enzyms aus dem Adsorbat (Elution) wirken die Begleitstoffe ein.

Zur Deutung der gefundenen Verschiedenheiten unreiner Adsorbate hat Willstätter angenommen, dass das Adsorbendum an das Adsorbens sowohl unmittelbar gebunden, wie auch durch Vermittlung eines besonderen Coadsorbens gebunden, auftritt; die von Willstätter näher betrachteten Fälle von verschiedenartigen Adsorbaten werden durch folgende Formeln zum Ausdruck gebracht.



II. Enzym—Coadsorbens—Adsorbens. III. Enzym—Adsorbens.

Nur in den Fällen I und III soll das Enzym aus dem Adsorbat durch Ammoniak eluierbar sein.

Was die Adsorbierbarkeit der Saccharase auf Kaolin betrifft, haben Willstätter und Wassermann⁶⁾ gefunden, dass die Saccharase auch in unreinem Zustand adsorbiert werden kann, wenn die Adsorption unter solchen Bedingungen ausgeführt wird, dass das Enzym in grosser Verdünnung vorliegt und die Acidität geeignet ist (0,04 n Essigsäure). Nach Willstätter und Schneider⁷⁾ lässt sich die Saccharase auch in unreinem Zustande und sogar auch bei grösseren Konzentrationen glatt auf Kaolin adsorbieren, wenn für eine genügend starke Acidität gesorgt wird. Ein Zusatz von Essigsäure bis zu einer Konzentration von 10⁰/₀ sollte nach diesen Autoren zum

¹⁾ Willstätter, Chem. Ber. 55, 3601 u. zwar 3611; 1922.

²⁾ Michaelis, Biochem. Zs 7, 488; 1907/08. 12, 26; 1908, — Michaelis und Ehrenreich, Biochem. Zs 10, 283; 1908.

³⁾ Willstätter, Lieb. Ann. 422, 47; 1921.

⁴⁾ Willstätter und Racke, Lieb. Ann. 425, I; 1921. 427, 111; 1922.

⁵⁾ Willstätter, Graser und Kuhn, H. 123. 1; 1922.

⁶⁾ Willstätter und Wassermann, H. 123, 181; 1923.

⁷⁾ Willstätter und Schneider, H. 133, 193; 1924.

erwünschten Ziel führen. Bei so starkem Ansäuern ist aber die Operationsdauer sehr abzukürzen, um die durch hohe Aciditäten bewirkte Inaktivierung der Saccharase auszuschalten. Gerade bei diesen hohen Aciditäten lässt sich die Saccharase durch Kaolinadsorption in einfachster Weise von Verunreinigungen weitgehend befreien.

Nach diesem Versuchsergebnisse aus Willstätters Laboratorium ist Michaelis' Annahme über die elektrochemischen Eigenschaften der Saccharase nicht mehr haltbar.

Über die Einzelheiten bei der Anwendung der Adsorptionsmethoden zur Reinigung der Saccharase muss auf den speziellen Teil dieses Werkes sowie auf die Originalarbeiten von Willstätter und Mitarbeiter¹⁾ und Euler und Josephson²⁾ verwiesen werden.

Wegen der grossen Bedeutung der Adsorption der Enzyme mögen hier die Eigenschaften und das Verhalten der sorbierten Saccharase als Beispiel etwas näher gesprochen werden.

Die Fähigkeit eines Sorptionsmittels, die Saccharase zu adsorbieren kann definiert werden durch die Angabe eines „Adsorptionswertes“, welcher die pro Gewichtseinheit Adsorptionsmittel absorbierte Anzahl Aktivitätseinheiten ausdrücken soll. Die von Willstätter und Racke zuerst gegebene Definition ihrer Adsorptionswerte wurde von Willstätter und Wassermann in gewisser Hinsicht modifiziert. Nach ihnen ist der Adsorptionswert eines Tonerdehydrates gegeben durch die Zahl der auf 1 g des Präparates [berechnet als Al_2O_3 ; nicht wie früher $\text{Al}(\text{OH})_3$] adsorbierten Saccharase-Einheiten (bestimmt durch die Nulldrehungszahl bei der Inversion von 4 g Rohrzucker unter den Bedingungen der Zeitwertbestimmung). Es muss dabei bemerkt werden, dass die Adsorbierbarkeit des Enzyms von der Konzentration desselben in der Lösung abhängig ist. In erster Linie hängt aber der Adsorptionswert vom Reinheitsgrad der Enzymlösung (auch vom Gehalt an inaktivem Enzym) und von der Beschaffenheit des Sorptionsmittels ab.

Über den Einfluss der Acidität auf die Adsorption der Saccharase durch Tonerdehydrat haben Euler und Myrbäck³⁾ einige Versuche mitgeteilt. Sie fanden das pH -Optimum der Adsorption, wenn als Puffer Essigsäure und Ammoniak verwendet wurde, bei $\text{pH} = 6$ (Fig. 17 b). Über eine eventuelle Beziehung zwischen dem pH -Optimum der Adsorption und den amphoterer Eigenschaften der Saccharase haben Euler und Josephson⁴⁾ hingewiesen.

¹⁾ Willstätter und Racke, Lieb. Ann. 425, 1; 1921. 427, 111; 1922. — Willstätter, Graser und Kuhn, H. 123, 1; 1922. — Willstätter und Wassermann, H. 123, 181; 1923. — Willstätter und Schneider, H. 133, 193; 1924.

²⁾ Josephson, Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi, 8, Nr. 26; 1922/23. — Euler und Josephson, Chem. Ber. 56, 446, 453, 1097; 1923. 57, 299, 859; 1924.

³⁾ Euler und Myrbäck, H. 127, 115; 1923.

⁴⁾ Euler und Josephson, H. 133, 279; 1924.

Bei Trypsin, dessen Reinigung viel weniger weit fortgeschritten ist als diejenige der Saccharase, fand Northrop¹⁾ ein breites, von der Acidität innerhalb der pH -Grenzen 3—9 unabhängiges Maximum der Adsorption an Kohle.

Um zu prüfen, ob die Adsorption der Saccharase durch Tonerdehydrat nach stöchiometrischem Verhältnis und in Beziehung zu den nach verschiedenen Methoden berechneten „Äquivalentwerten“ der Saccharase²⁾ sich berechnen lässt, wären Versuche über die zur Adsorption einer bestimmten Menge eines möglichst reinen Enzympräparates ausreichende Menge des Adsorptionsmittels wertvoll. Die in dieser Hinsicht als orientierend zu betrachtenden Versuche von Euler und Nilsson³⁾ waren nicht mit genügend reinen Saccharase-

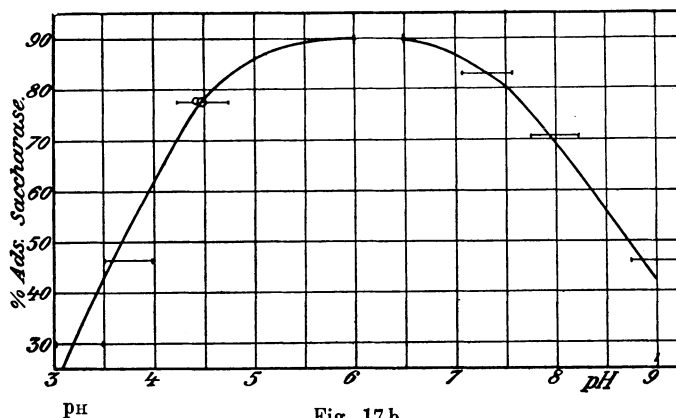


Fig. 17 b.

lösungen ausgeführt, um auch nur eine annähernde Berechnung einer solchen maximalen Adsorptionsfähigkeit zu erlauben.

Die Aktivität der adsorbierten Saccharase ist dieselbe wie im freien unadsorbierten Zustande. Diese Tatsache, welche zuerst von Michaelis⁴⁾ und dann von Meyerhof⁵⁾ konstatiert wurde, gilt auch für andere Enzyme, wie Peroxydase und Katalase.

Überhaupt scheinen Substrate eluierend auf die entsprechenden Enzyme zu wirken. Die ersten derartigen Fälle sind wohl von Hedin in den Systemen Kohle-Trypsin⁶⁾ und Kohle-Lab⁷⁾ beobachtet worden.

Aus dem Adsorbat lässt sich die Saccharase durch verschiedene Mittel ablösen. Die eluierende Wirkung des Rohrzuckers auf Saccharase, welche auf Eisenhydroxyd adsorbiert war, wurde von Meyerhof festgestellt. Eine

¹⁾ Northrop, *Jl Gen. Physiol.* 5, 571; 1923.

²⁾ Euler und Josephson, *Chem. Ber.* 56, 453; 1923.

³⁾ Euler und Nilsson, *H.* 134, 22; 1924.

⁴⁾ Michaelis, *Biochem. Zs* 7, 488; 1907/08.

⁵⁾ Meyerhof, *Pflügers Arch.* 157, 251; 1914. — Siehe auch J. M. Nelson und Hitchcock, *Jl Am. Chem. Soc.* 43, 1956; 1921.

⁶⁾ Hedin, *Biochem. Jl* 2, 81; 1907. — *H.* 50, 497; 1907.

⁷⁾ Hedin, *H.* 60, 364; 1909. — 63, 143; 1909.

tiefer eingehende Untersuchung über die Eluierbarkeit der an Tonerde adsorbierten Saccharase verdankt man Willstätter und Kuhn¹⁾. Sie fanden, dass Rohrzucker allein nur langsam und unvollständig eluiert, während Rohrzucker + prim. Natriumphosphat in kurzer Zeit die Saccharase vollständig in Lösung bringt. Zu präparativen Zwecken eignen sich sekundäre Alkaliphosphate oder -arsenate gut. Auch mit Ammoniak lässt sich die Saccharase aus dem Tonerdeadsorbat oft eluieren. Das Verhalten der Adsorbate verschiedenen Elutionsmitteln gegenüber scheint auch in hohem Grade vom Reinheitsgrad (Coadsorbens und Coeluens) abhängig zu sein.

Im Tonerdeadsorbat ist die Saccharase, wenn sie in unreinerem Zustande adsorbiert worden ist, längere Zeit beständig. Bei reineren Präparaten macht sich aber die Aktivitätszerstörung stärker geltend. Vielleicht wird diese leicht eintretende Vernichtung der Aktivität der Saccharase Hindernisse für die weitere Steigerung des Reinheitsgrades bieten. Im Kaolinadsorbat ist die Saccharase auch im reinerem Zustande weniger haltbar.

Auch die Beschaffenheit (verschiedene Vorbehandlung mit Salzsäure) des Kaolins macht sich geltend. Nach Willstätter und Schneider sollen die grossen Aktivitätsverluste schon bei der Adsorption eintreten, während im Adsorbat die Vernichtung der enzymatischen Wirkung nur langsam fortschreitet.

Eingehende Angaben über das Verhalten anderer Enzyme zu Sorptionsmitteln verdankt man in erster Linie Willstätter und seinen Mitarbeitern.

Unter Hinweis auf den speziellen Teil dieses Buches seien hier nur diejenigen Enzyme erwähnt, für welche bereits eingehende Untersuchungen und Angaben vorliegen:

Tierische Lipasen und Ricinus-Lipase.
 Amylase, Maltase und β -Glucosidase. — Oxynitrilase²⁾.
 Trypsin³⁾, Pepsin⁴⁾, Papain⁵⁾.
 Peroxydase und Katalase⁶⁾.

Im Anschluss an diese sei auch die Co-Zymase und die Entero-Kinase erwähnt.

Die Pankreasamylase hat keine sauren Eigenschaften. In reinerem Zustand wird sie nämlich von Aluminiumhydroxyd nicht adsorbiert. Auch die basischen Eigenschaften scheinen zu fehlen. Deshalb war die Trennung

¹⁾ Willstätter und Kuhn, H. 116, 53; 1921.

²⁾ Nach Versuchen von Nordefeldt wird die Oxynitrilase des Emulsins sowohl aus saurer wie aus alkalischer Lösung von Aluminiumhydroxyd adsorbiert. Das Adsorbat ist aktiv. Durch Kaolin lässt sich die Oxynitrilase dagegen nicht adsorbieren, auch nicht, wenn die Lösungen vorher in anderer Weise gereinigt sind.

³⁾ Willstätter und Mitarb. — Northrop, JI Gen. Physiol. 5, 751; 1923.

⁴⁾ Ege, Biochem. Zs 145, 66; 1924.

⁵⁾ Willstätter und Grassmann, H. 138, 184; 1924.

⁶⁾ Madinaveitia (Dissert. Zürich 1912) hat in Willstätters Laboratorium Fettsäuren als Sorptionsmittel verwendet. Nach Hennichs (Biochem. Zs 145, 286; 1924) ist die Reinigung mit Aluminiumhydroxyd erfolgreich.

der Amylase vom pankreatischen Trypsin möglich. Trypsin wurde nämlich von Kaolin gut adsorbiert. Die Amylase konnte (allerdings unter Verlust) deshalb durch wiederholte Behandlung mit diesem Adsorptionsmittel vom Trypsin befreit werden. Bei den pankreatischen Enzymen spielen die früher erwähnten Stoffe, welche Willstätter als „Coadsorbentien“ bezeichnet, eine grosse Rolle.

Bei Anwendung der Adsorptionsmethoden an Peroxydase (das erste Enzym, an welchem die Willstätterschen Adsorptionsmethoden geprüft wurden) haben Willstätter und Pollinger¹⁾ sehr aktive Präparate erhalten.

Bei der Untersuchung der Pankreas-Enzyme ergab sich die Aufgabe, dieselben voneinander zu trennen. Nach Willstätter und Waldschmidt-Leitz²⁾ konnte die Trennung der Lipase von den beiden Begleitenzymen, Amylase und Trypsin, einfach durch die Adsorption mit Tonerde bewirkt werden. Die Lipase besitzt nämlich nach den genannten Autoren viel stärker saure Eigenschaften als Pankreasamylase und Trypsin. Besonders das verschiedenartige Verhalten dieser Enzyme bei der Elution war für die Trennung günstig. Die quantitative Abtrennung der Lipase gelang daher schon durch zweimalige Adsorption mit Aluminiumhydroxyd aus saurer Lösung und Elution mit ammoniakalischem Phosphat.

Eine interessante Trennung von 3 in der Milz wirksamen Proteasen, welche teils in saurer, teils in alkalischer Lösung wirksam sind, also eine Mischung von Peptasen und Tryptasen ausmachen, ist Hedin³⁾ durch fraktionierte Adsorption gelungen. Die Tryptasen wurden nämlich durch Kieselgur adsorbiert, während das in saurer Lösung wirksame Enzym (Peptase) in Lösung blieb.

Von Kohle wird Trypsin bei jeder Reaktion adsorbiert. Überhaupt liegen bei Kohle die Verhältnisse am kompliziertesten und auch hier zeigt es sich, dass sich die Scheidung in mechanische Adsorption und elektrische Adsorption nicht auf genügend scharfe Merkmale stützt. In diesem Zusammenhang sind weitere ausführliche Versuche über die Adsorption von Trypsin durch Kohle von Hedin zu erwähnen⁴⁾. Bei Anwendung von genügenden Mengen Tierkohle ist die Sorption vollständig. Sie ist zunächst reversibel. Dann aber tritt der schon erwähnte Prozess ein, welcher an adsorbierten, organischen Substanzen nicht ungewöhnlich ist, die Fixierung. Die Fixierung ist ein relativ langsam verlaufender Vorgang; die fixierte Menge Trypsin ist um so grösser, je grösser die Menge Tierkohle und je höher die Temperatur ist. Indessen gibt Kohle, welche bei 37° Enzym adsorbiert hat, an Wasser

1) Willstätter und Pollinger, Lieb. Ann. 430, 269; 1923.

2) Willstätter und Waldschmidt-Leitz, H. 125, 132; 1923. — Über Adsorption der Pankreaslipase siehe auch Willstätter und Memmen, H. 138, 216, und zwar 235; 1924.

3) Hedin, H. 50, 497; 1907.

4) Hedin, Biochem. JI 1, 484; 1906 und 2, 81; 1907.

von 0° nichts davon ab. Während also durch Wasser die fixierte Trypsinmenge der Tierkohle nicht mehr entzogen werden kann, ist Casein imstande, der Kohle Trypsin zu entreissen, und zwar um so mehr, je höher die Temperatur ist.

Nach demselben Verf. werden ferner die in der Rindermilz vorkommenden Enzyme, α - und β -Protease, von Tierkohle aufgenommen, und zwar in gleichen Verhältnissen.

Erwähnt sei hier noch die von Hedin gefundene Tatsache, dass man die Adsorption von Trypsin an Kohle grösser findet, wenn zuerst die Kohle einige Zeit auf das Enzym gewirkt hat und dann die Menge wirksamen Enzyms durch Zusatz von Casein als Substrat bestimmt wird, als wenn das Substrat von vornherein zugegen war (Reihenfolgephänomen). Es liegt dies daran, dass mit der Zeit mehr und mehr Trypsin an der Kohle verfestigt wird.

Die Enzymhemmungen, welche durch Kohle eintreten, sind nach Hedin analog mit den Hemmungen durch verschiedene organische, meist kolloide Substanzen, wie z. B. der Labhemmung durch Serum¹⁾. Wir kommen auf diese Beziehungen im Kap. 5 noch zurück.

Ganz ähnlich wie zum Trypsin verhält sich sowohl Kohle als Talkum dem Lab gegenüber [Hedin²⁾]; auch dieses Enzym kann der Kohle durch das Substrat entzogen werden, also durch Stoffe wie Serum, Eierklar usw., so dass die Hemmung der Labwirkung durch Kohle bei Zusatz dieser Stoffe aufgehoben wird. Diese Erscheinung ist möglicherweise von derselben Art wie die S. 101 erwähnte Verdrängung von Stoffen bei reversibler Adsorption; so verringert Traubenzucker, welcher von Kohle adsorbiert wird, auch die Aufnahmefähigkeit der Kohle für Lab.

Eriksson³⁾ schliesst aus seinen Versuchen, dass Saccharase, die an Kohle adsorbiert ist, durch Rohrzucker zum Teil wieder freigemacht wird, und auch hier soll die Reihenfolge des Mischens von grosser Bedeutung sein.

Von J. M. Nelson und Griffin wird aber diese Angabe bestritten (Jl Am. Chem. Soc. 38; 1916).

Allgemeine Gesichtspunkte. Die Möglichkeit der Anwendung der Adsorptionsverfahren zur Reinigung von Enzymen ist gegeben durch die Selektivität oder die auswählende Adsorptionswirkung der Adsorbentien. Die Enzyme scheinen in vielen Fällen in besonders hohem Grade von den besprochenen Adsorptionsmitteln auswählend adsorbiert zu werden. Man darf annehmen, dass dies mit der Verschiedenheit ihrer sauren und basischen Eigenschaften (Dissoziations-Konstanten) und ferner mit der verschiedenen Löslichkeit der Adsorptionsprodukte zusammenhängt. In ähnlicher Weise wird eine feste Base [etwa $\text{Al}(\text{OH})_3$] aus Wasser zwei gelöste Säuren auswählend

¹⁾ Vgl. hierzu Hedin, Erg. d. Physiol. 9, 433; 1910 und Grundzüge d. physikalischen Chemie in ihrer Beziehung zur Biologie. Wiesbaden 1915.

²⁾ Hedin, H. 60, 364 und 63, 143; 1909.

³⁾ Anselm Eriksson, H. 72, 313; 1911.

adsorbieren, und zwar je nach ihrem Dissoziationsgrad und je nach der Löslichkeit der entstehenden Aluminiumsalze.

Dagegen ist es schwer einzusehen, wie die ganz spezifischen Affinitäten, welche die Enzyme gegen ihre Substrate zeigen, einen besonderen Einfluss auf die Adsorbierbarkeit durch solche Stoffe wie Aluminiumhydroxyd und Kaolin ausüben könnten, wie es Kraut und Wenzel¹⁾ ausgesprochen haben: Die Enzyme sind „dadurch ausgezeichnet, dass sie schon in ganz geringen Mengen grosse Wirkungen ausüben, also eine grosse Anlagerungsfähigkeit für ihre Substrate besitzen, und wir dürfen daher annehmen, dass sie auch als Adsorbenda sich durch grosse Adsorbierbarkeit bei kleiner Konzentration in Lösung... auszeichnen.“ Anhaltspunkte für diese Auffassung kann Verf. nicht finden.

Eine gewisse Spezifität der verschiedenen Adsorptionsmittel verschiedenen Enzymen gegenüber besteht darin, dass das Verhalten verschiedener Sorten Aluminiumhydroxyd gegen verschiedene Enzyme ungleich ist. So zeigt nach Willstätter und Kraut²⁾ das Tonerdepräparat, welches gegen Saccharase das grösste Adsorptionsvermögen besitzt, nicht die grösste Adsorbierbarkeit gegen Lipase. Die genannten Autoren haben eine Reihe verschiedener Präparate ungleicher Herstellungsweise in ihren Verhältnissen gegen verschiedene Enzyme untersucht. Durch solche Versuche lassen sich die Adsorptionsaffinitäten der Enzyme studieren. Einige Versuche zur Aufklärung der Natur solcher Adsorptionsaffinitäten haben Euler und B. af Ugglas³⁾, Euler und E. Erikson⁴⁾, sowie Euler und Nilsson⁵⁾ mitgeteilt.

Viele ältere Angaben über die Adsorbierbarkeit müssen wohl, wie es ja für die Saccharase erforderlich war, durch neuere Untersuchungen an reinerem Enzymmaterial richtiggestellt werden. Einige solche ältere Angaben über Adsorption werden im folgenden zusammengestellt.

Speichelamylase soll nach Michaelis und Rona bei jeder Acidität von Kaolin und von Tonerde (auch von Kohle) adsorbiert werden. Neben den elektrischen machen sich hier vielleicht noch andere Einflüsse geltend.

Malzamylyase wird weder aus neutraler noch aus alkalischer Lösung dagegen aus saurer Lösung von Kaolin adsorbiert. Malzamylyase ist vielleicht ein Ampholyt, und zwar mit stärker sauren als basischen Eigenschaften; dementsprechend wird dieses Enzym von Tonerde bei neutraler und alkalischer Reaktion sehr vollkommen, bei saurer Reaktion unvollkommen adsorbiert.

Pepsin soll von Tonerde, nicht aber (oder nur wenig) von Kaolin adsorbiert werden; das Verhalten bei basischer Reaktion liess sich wegen der grossen Unbeständigkeit dieses Enzyms in alkalischer Lösung nicht feststellen.

Mastix adsorbiert Lab und zwar irreversibel; auch Trypsin wird adsorbiert; durch Behandeln der Mastix-Trypsin-Fällung mit Chloroform-Alkohol erhält man das Trypsin in ziemlich wirksamem Zustand zurück⁶⁾.

¹⁾ Kraut und Wenzel, H. 133, 1; 1924.

²⁾ Willstätter und Kraut, Chem Ber. 56, 149 und 1117; 1923.

³⁾ Euler und af Ugglas, Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi 3, Nr. 34; 1910.

⁴⁾ Euler und E. Erikson, H. 128, 1 u. 9; 1923.

⁵⁾ Euler und Nilsson, H. 131, 107; 1923 und 134, 22; 1924.

⁶⁾ Michaelis und Rona, Biochem. Zeitschr. 4, 11; 1907.

Nach E. Buchner und F. Klätte¹⁾ wird Trypsin durch Seide, Wolle und Baumwollfäden, durch Leinwand- und Papierstreifen, Agar-Agarstränge, Asbest- und Glaswolle aus verdünnter Lösung adsorbiert.

An sonstigen Angaben über Enzymadsorption können erwähnt werden:

Pepsin, Lab und β -Glucosidasen aus Emulsin werden adsorbiert: von Quarz, Marmor, Talk, Glaspulver, Kieselgur, Cholesterin und Lecithin nach Dauwe²⁾.

Pepsin nach Hammarsten³⁾ von Fettsäuren und $MgCO_3$, nach Brücke⁴⁾ von Cholesterin und frisch gefälltem Bariumsulfat und Kalziumphosphat. Niederschläge von Blei und Kupferverbindungen fallen nach A. Mayer⁵⁾.

Schliesslich sind hier noch die Bedingungen zu erwähnen, welche zwischen Enzymen und Eiweisspartikeln, Casein-Flocken, Suspensionen, ferner Gallerten usw. eintreten. Fibrinflocken haben sich zur Adsorption mancher Enzyme wie Lab resp. Pepsin⁶⁾ und Trypsin¹⁾ wirksam erwiesen. Auch zahlreiche andere koagulierte Eiweisskörper zeigen starke Adsorptionskraft⁷⁾.

Sind diese Eiweissstoffe in feinerer Verteilung bzw. kolloider Lösung im Dispersionmittel anwesend, so werden die Vorgänge meist nicht als Adsorptionen bezeichnet⁸⁾, sondern fallen in das Erscheinungsgebiet der gegenseitigen Kolloid-Fällung und sollen in diesem Zusammenhang behandelt werden.

Adsorption von Enzymen an und in Filtersubstanzen.

An die Daten über die Adsorptionserscheinungen an Pulvern bzw. suspendierten Partikeln reihen wir die Angaben über die Adsorption an festen Wänden oder Schichten. Die Adsorption an solchen, oft als Filtermaterial dienenden Wänden, z. B. von Cellulose, Pergament, Kollodium, Ton beeinflusst die Durchlässigkeit und überhaupt die Anwendbarkeit dieser Substanzen in höchstem Grad. Manchmal wirken die genannten Filter allerdings in erster Linie als Siebe, wie z. B. das Bechholdsche Ultrafilter, auf das wir gleich zurückkommen. In Rücksicht auf die praktische Verwendbarkeit bei Enzymen erwähnen wir folgende Resultate, müssen aber hinzufügen, dass dieselben zunächst nur für die von den betreffenden Autoren verwendeten Präparate gelten, und durch die zufälligen Verunreinigungen stark beeinflusst sind, wie z. B. aus Versuchen von Myrbäck (siehe II. Teil, 2. Aufl., Seite 179) hervorgeht.

Chamberlandfilter.

Aufgehalten werden:

Lipasen nach Fermi und Pernossi, Ann. Inst. Pasteur 3, 531; 1889;

Zymase nach Buchner, Zymasegärung, München 1903;

Pepsin und Trypsin.

¹⁾ Buchner und Klätte, Biochem. Zeitschr. 9, 436; 1908.

²⁾ Dauwe, Hofm. 6, 426; 1905. — Siehe auch Reiss, Berl. klin. Wochenschr. 1904, Nr. 45.

³⁾ Hammarsten, Malys Jahresb. 2, 118; 1872.

⁴⁾ Brücke, Wien. Sitz.-Ber. 43, 601; 1862.

⁵⁾ A. Mayer, Landw. Versuchsst. 27, 247. — Vergl. auch die Wirkung von Uranyl-fällungen nach Jacoby, H. 30, 135; 1900.

⁶⁾ Jacoby, Biochem. Zeitschr. 4, 21; 1907.

⁷⁾ Weitere experimentelle Ergebnisse findet man auch bei Bayliss, Adsorption in ihrer Beziehung zur Enzymwirkung, Kolloid. Zeitschr. 1908.

⁸⁾ Willstätter nimmt eine Adsorptionsverbindung des Hämoglobins an (Lieb. Ann. 416, 21; 1918.

Durchgelassen werden:

Maltase nach Hill, J. Chem. Soc. 73, 636; 1898;
 Magenlipase nach Volhard, Z. klin. Med. 42, 414; 1901;
 Leberaldehydasen nach Jacoby, H. 20, 135; 1900;
 Proteinasen des Malzsaftes nach Fernbach und Hubert, C. r. 130 u. 131; 1900.

Nach Holderer soll die Durchlässigkeit der Chamberlandfilter für Enzyme von der Konzentration der Wasserstoffionen in der Lösung abhängen. Ist die Lösung gegen Phenolphthalein neutral (also nach Sörensens Bezeichnung $\text{pH} = 6 - 7$), so erfolgt keine Adsorption, das Filter ist durchlässig; ist die Lösung neutral gegen Methylorange ($\text{pH} = 3 - 4$), so ist die Filterkerze undurchlässig; dies soll für Saccharase, Katalase, Pepsin und Emulsin gelten, also für Stoffe mit recht verschiedenem Aciditätsoptimum. Diese Befunde hängen in erster Linie mit den von Michaelis gefundenen Tatsachen über die Abhängigkeit der Adsorption von der Acidität der Lösung zusammen, sind aber auch durch anwesende Verunreinigungen stark beeinflusst, ein Resultat, zu dem Svanberg¹⁾ auf Grund eigener Versuche gelangt ist.

Pergament.

Aufgehalten werden:

Pepsin nach Hammarsten, Malys Jahresb. 3, 160;
 Peroxydase nach Euler und Bolin, H. 61, 82; 1909.

Durchgelassen werden:

Saccharase, Amylase } nach Chodschajew, Arch. de physiol.
 (langsam) Emulsin, Trypsin, Pepsin } 30, 241; 1898; ferner Herzfeld u. a.
 Labferment und Pepsin gehen durch ungespannte Amnionmembran. Jacoby, Biochem. Zs 1, 53; 1906;
 Labferment, Saccharase und Katalase gehen durch Darmmembran. Vandeveld, Biochem. Zs 1, 408; 1906;
 Labferment, Saccharase und Katalase gehen nicht durch Cellulosewandungen (Hülsen von Leune-Paris. Vandeveld, l. c.).

Kolloidmembranen.

Aufgehalten werden:

Pepsin nach Strada, Ann. Inst. Pasteur 22, 982; 1908;
 Saccharase je nach Reinheit, siehe Myrbäck, II. Tl. S. 179.

Durchgelassen werden:

Emulsin und Lactase nach Bierry und Schaeffer, Soc. Biol. 62, 723; 1907.
 Trypsin teilweise

„ nach Aktivierung mit Kinase vollständig (?) } Strada, l. c.

Da Kolloidsole durch tierische Membranen und Kolloidhäute im allgemeinen nicht diffundieren, so lassen sich als Kolloidfilter sehr verschiedene Membranen verwenden.

Ultrafiltration.

Durch Abstufung des Kolloidgehaltes einer Unterlage aus Cellulose oder dgl. kann man die Durchlässigkeit von Filtern nach Bedürfnis variieren und kann dadurch fraktioniert filtrieren. Nach diesem Prinzip hat Bechhold²⁾ seine Ultrafilter hergestellt, bei welchen als Kolloide besonders Eisessigkolloidium und Gelatine zur Anwendung kommen. Durch Eintauchen in Wasser härtet man die Kolloidiumfilter, durch Behandeln mit Formaldehydlösungen die Gelatinefilter. Die Filtration geschieht in der Regel unter Druck in Apparaten

¹⁾ Svanberg, H. 109, 65; 1920. — Holderer, C. r. 149, 1153 u. 150, 230, 285 u. 790; 1910.

²⁾ Bechhold, Zs physik. Chem. 60, 257; 1907 und 64, 328; 1908. — Eine andere apparative Anordnung ist von Wegelin angegeben worden (Koll. Zs 18, 225; 1916).

besonderer Konstruktion. Besonders bei Suspensionskolloiden, kolloiden Metallen und Sulfiden, aber auch bei einzelnen Gruppen von Eiweissstoffen, wie Albumosen, Albumin u. a. hat Bechhold schöne Resultate erzielt¹⁾ Gerade bei Enzymen, manchen Toxinen usw., versagt indessen diese Methodik zur Trennung, weil sich hier die Adsorption am Filtriermaterial stark geltend macht.

Die fraktionierte Ultrafiltration ist also, wie theoretisch begründet werden kann, nur bei gewissen Mischungen anwendbar und darf zu Schlüssen über Teilchengrösse nur mit grosser Vorsicht verwendet werden, um so mehr, als Kolloide ihre Filtrationsfähigkeit gegenseitig beeinflussen können. Teils macht sich nämlich die S. 101 erwähnte gegenseitige Verdrängung zweier Substanzen durch ein Adsorptionsmittel geltend, teils auch eine Wirkung, welche manche Stoffe befähigt, als „Schutzkolloide“ aufzutreten. (Vgl. S. 125.)

Immerhin haben Abderhalden und Fodor²⁾ die Ultrafiltrationsmethode zu Enzymstudien zu verwenden versucht.

Die „Niederdruckultrafiltration“ (Dialyse) ist bereits S. 14 erwähnt worden (Anordnungen von Zsigmondy, Wo. Ostwald, Malfitano).

G. Ionengleichgewichte an Membranen (Donnan-Effekt).

Viele hydrophile Kolloide sind — wie bereits betont wurde — Ampholyte und bilden also mit starken Säuren und Basen normale Salze. Betrachten wir z. B. das Mono-Natriumsalz eines Albumins. Der Leitfähigkeit nach verhält es sich wie ein Ammoniumsalz, was auf einen entsprechend grossen Dissoziationsgrad (fast vollständige Dissoziation in verdünnter Lösung) schliessen lässt.

Eine Besonderheit besteht in der grossen Verschiedenheit der Molekularvolumina seiner beiden Ionen; dem kleinen Volumen des Na-Ions steht das sehr grosse Volumen des Albumin-Ions — eines typischen Kolloid-Ions — gegenüber.

Die Verschiedenheit dieser beiden Ionen gibt sich u. a. darin kund, dass Membrane verschiedener Art, welche Na⁺ unbehindert passieren lassen, den Kolloid-Ionen gegenüber undurchlässig sind.

Wir wollen nun durch eine solche Membran die Lösung dieses Na-Albuminates vom gleichen Volumen der Lösung des entsprechenden Kalium-Albuminates trennen; dann ist folgendes zu beachten: Da die Membran sich gegen Ka⁺ so durchlässig verhält wie gegen Na⁺, so können die beiden Metallionen durch Diffusion ihre Plätze tauschen, aber nur in äquimolekularen Mengen. Ein Konzentrationsausgleich des K⁺ und Na⁺ durch die Membran hindurch wird verhindert durch die Undurchlässigkeit der Membran gegen-

¹⁾ Andere Anwendung siehe in Bechhold, Die Kolloide in Biologie und Medizin, 2. Aufl. 1919, S. 191.

²⁾ Abderhalden und Fodor, Fermentforsch. 2, 225; 1918.

über dem Albumin-Ion; zur Wahrung der elektrischen Neutralität werden die Kationen zurückgehalten, und wir finden eine Erscheinung, welche in gewissem Sinne derjenigen analog ist, die bei der freien Diffusion von Elektrolyten (Nernst) auftritt.

Wie an der freien Grenzfläche von beispielsweise NaCl und HCl die von Nernst berechneten Potentialdifferenzen durch die verschiedenen Wanderungsgeschwindigkeiten der Ionen entstehen, so treten auch in unserem Beispiel



Potentialdifferenzen auf. Die Kenntnis der Gleichgewichte, welche sich in Systemen, wie den oben genannten, zu beiden Seiten der Membran einstellen, verdankt man Donnan¹⁾, welcher dieses für das Verständnis der intracellulären Vorgänge sehr interessante und für das Studium in vitro der Kolloid-Ionen sehr wichtige Gebiet experimentell und theoretisch eingehend behandelt hat.

Wir folgen einer in jüngster Zeit²⁾ erschienenen Darstellung dieses Forschers.

Bezeichnen wir

das Kolloid-Ion mit A^- ,

die Anfangs-Konzentration des Natriumsalzes (auf der einen Seite der Membran) mit c_1 ,

die Anfangs-Konzentration des Kaliumsalzes (auf der anderen Seite der Membran) mit c_2 ,

so können — unter Voraussetzung vollständiger Ionisation — Anfangs- und Endzustand folgendermassen dargestellt werden:



Wenn F die freie Energie des Systems bedeutet, dann ist der Gleichgewichtszustand charakterisiert durch die Bedingung $(\delta F)_{p, t} = 0$.

Es gehen über

$$\delta n \text{ Mole } \text{Na}^+ \text{ von (1) } \rightarrow \text{(2)}$$

$$\delta n \text{ Mole } \text{K}^+ \text{ von (2) } \rightarrow \text{(1)}.$$

Da elektrische Arbeit nicht in Betracht kommt, erhalten wir einfach:

$$\delta F = RT \left\{ \delta n \log \frac{[\text{Na}^+]_1}{[\text{Na}]_2} + \delta n \log \frac{[\text{K}^+]_2}{[\text{K}^+]_1} \right\} = 0,$$

so dass

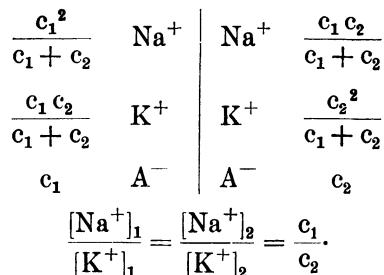
$$\frac{[\text{Na}^+]_1}{[\text{K}^+]_1} = \frac{[\text{Na}^+]_2}{[\text{K}^+]_2}$$

¹⁾ Siehe hierzu Donnan u. Harris, JI Chem. Soc. 99, 1554; 1911. — Donnan, Zs f. Elektroch. 17, 572; 1911.

²⁾ Donnan, Chemical Reviews, 1, 73; 1924.

somit
$$\frac{c_1 - x}{x} = \frac{x}{c_2 - x}, \quad x = \frac{c_1 c_2}{c_1 + c_2}.$$

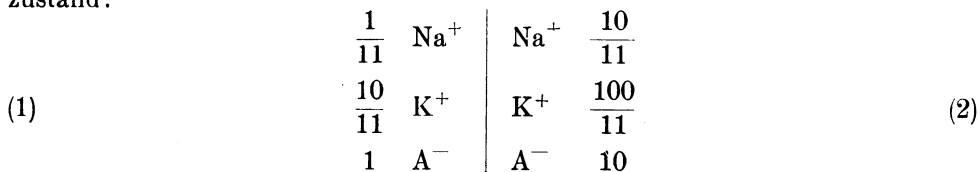
Der Gleichgewichtszustand des Systems ist deswegen:



Nur unter der Bedingung $c_1 = c_2$ gilt für das Gleichgewicht

$$[\text{Na}^+]_1 = [\text{K}^+]_1 \quad \text{und} \quad [\text{Na}^+]_2 = [\text{K}^+]_2.$$

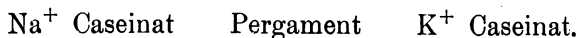
Nehmen wir dagegen $c_1 = 1$ und $c_2 = 10$, dann wird der Gleichgewichtszustand:



Mit anderen Worten: 9,1% des ursprünglich in (2) anwesenden K^+ diffundieren nach (1), während 90,9% des ursprünglich in (1) anwesenden Na^+ nach (2) diffundieren. Eine prozentisch relativ geringe Konzentrationsabnahme des Kalium-Ions reicht also in diesem Fall hin, um eine prozentisch grosse Konzentrationssteigerung des Natrium-Ions zu bewirken.

Diese durch Ionen-Austausch erreichten Gleichgewichte sind experimentell untersucht worden an Ferrocyaniden von Na^+ und K^+ , getrennt durch eine in Pergamentpapier eingelagerte Membran von Ferrocyan Kupfer¹⁾.

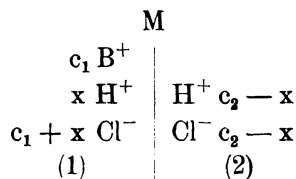
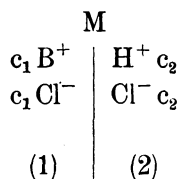
Die beim Gleichgewicht eingetretenen Konzentrationen wurden mit oben angegebener Theorie in guter Übereinstimmung gefunden. Das gleiche Ergebnis erhielt Donnan in noch unveröffentlichten Versuchen im System



Ein anderer interessanter Fall von Ionengleichgewicht an einer semipermeablen Membran tritt auf, wenn das System zwei Elektrolyte mit einem gemeinsamen Ion enthält, wobei aber das nicht-dissoziierende (Kolloid-) Ion eines der anderen Ionen (und zwar Anion oder Kation) ist. Angenommen, wir haben z. B. die Chloride BCl und HCl zu beiden Seiten einer Membran, welche für H^+ und Cl^- vollkommen durchlässig ist, nicht aber für B^+ .

Gleiche Volumina und vollständige Dissoziation vorausgesetzt, lassen sich Anfangs- und Gleichgewichtszustand folgendermassen darstellen:

¹⁾ Donnan u. Garner, Jl Chem. Soc. 115, 1313; 1919.



Der Austausch: δn Mole H^+ (2) \rightarrow (1)
 δn Mole Cl^- (2) \rightarrow (1)

liefert für das Gleichgewicht die Bedingung $[H^+]_1 \cdot [Cl^-]_1 = [H^+]_2 \cdot [Cl^-]_2$

so dass $x(c_1 + x) = (c_2 - x)^2$, woraus $x = \frac{c_2^2}{c_1 + 2c_2}$.

Für den Gleichgewichtszustand gilt, wie sich leicht zeigen lässt,

$$\frac{[H^+]_2}{[H^+]_1} = \frac{[H^+ Cl^-]_2}{[H^+ Cl^-]_1} = 1 + \frac{c_1}{c_2}$$

Wenn c_1 gross ist im Vergleich zu c_2 , so übersteigt der Ausdruck $1 + \frac{c_1}{c_2}$ den Wert 1 sehr erheblich. Die Eigentümlichkeit dieses Gleichgewichts liegt deshalb darin, dass die Gegenwart des ionisierten Salzes BCl mit dem nicht diffusibeln Kation B^+ hemmend wirkt auf die Diffusion der HCl zu derjenigen Seite, wo sich BCl befindet bzw. es treibt die HCl auf die andere Seite.

Diese ungleiche Verteilung wurde untersucht im Falle Kongorot und $NaCl$ (Donnan und Harris l. c.), ferner im Fall KCl und $K_4 Fe Cy_6$ sowie Natrium-Caseinat und $NaCl$ (noch unveröffentlicht).

Interessante Anwendungen der Donnanschen Theorie haben Procter¹⁾ und seine Mitarbeiter gemacht; besonders sei auf die Arbeit von Procter und J. A. Wilson über die Schwellungsvorgänge in sauren Gelatinelösungen aufmerksam gemacht.

Gegen J. Loeb's²⁾ zahlreiche Anwendungen der Membran-Potentiale lassen sich manche Einwendungen³⁾ erheben.

Neuerdings hat E. Hammarsten⁴⁾ in einer bemerkenswerten Untersuchung einen starken Donnan-Effekt beim Natriumsalz der Thymonukleinsäure gefunden.

Northrop⁵⁾ hat den Versuch gemacht, durch den Donnan-Effekt die basische Dissoziation des Trypsins zu messen, und kam zum Resultat, dass dieses Enzym eine starke einsäurige Base sein muss. Auch wenn gerade bei den proteolytischen Enzymen solche Messungen wegen der noch

¹⁾ Procter, JI Chem. Soc. 105, 313; 1914. — Procter u. J. A. Wilson, JI Chem. Soc. 109, 307; 1916.

²⁾ J. Loeb, Proteins and the theory of colloidal behavior. New-York, London 1922.

³⁾ Siehe A. V. Hill, Proc. Roy. Soc. London, A, 102, 705; 1923. Hitchcock, JI Gen. Physiol. 5, 661; 1923.

⁴⁾ Einar Hammarsten, Biochem. Zs 144, 333; 1924.

⁵⁾ Northrop, JI Gen. Physiol. 6, 337; 1924.

reichlichen Beimengungen zunächst bloss einen orientierenden Charakter haben können, so werden vielleicht ähnliche Versuche an hochmolekularen Enzymen manches Interessante ergeben.

H. Ausfällung von Kolloiden.

In der Einleitung zu diesem Kapitel ist der Unterschied betont worden, welcher hinsichtlich der Fällung der Kolloide durch Salze deutlich hervortritt: Während Suspensionen und hydrophole Sole durch kleine und manchmal sehr kleine Mengen von Elektrolyten ausgefällt werden, tritt die Ausfällung bzw. Ausflockung der hydrophilen Kolloide erst in erheblich grösseren Salzkonzentrationen ein.

1. Ausfällung von Nicht-Elektrolyten und hydrophilen Kolloiden durch Salze.

Wir können und müssen uns auch hier wieder darauf beschränken, die mit den Enzymen verwandten hydrophilen Sole näher zu betrachten.

Dieselben reihen sich, was die Ausfällung betrifft, an die nicht-kolloiden Stoffe an.

Hinsichtlich ihrer Fähigkeit, Nichtelektrolyte auszufällen, lassen sich die Salze in eine Serie ordnen, welche von der chemischen Natur der Nichtelektrolyte unabhängig ist, worauf der Verf.¹⁾ zuerst aufmerksam gemacht hat.

Bezeichnet man mit l_w bzw. l_s die Löslichkeit eines Nichtelektrolyten in Wasser bzw. in Salzlösung von der Konzentration n , so gilt für die äquivalente Löslichkeitsänderung AS der Ausdruck

$$-AS = \frac{1}{n} \frac{l_w - l_s}{l_w} \cdot 100.$$

Dieser Effekt setzt sich additiv aus der Wirkung der beiden Ionen des Elektrolyten zusammen, und wir können für die einzelnen Ionen folgende Werte AS berechnen²⁾:

(SCN).	(+ 4,0)	NH ₂	+ 2,5
J	+ 4,0	Li	- 8
Br	- 3	K	- 13,3
NO ₂	- 4,5	Na	- 17,3
Cl	- 17,3		
OH	- 23		
Ac	- 35		

An die Anionen der Essigsäure schliessen sich die Anionen der Weinsäure und Citronensäure an. Hingegen zeigen aromatische Ionen, und zwar sowohl Anionen²⁾ als Kationen (Thorin) den auffallenden Effekt der Löslichkeitserhöhung.

¹⁾ Euler, Zs physik. Chem. 31, 360; 1899.

²⁾ Euler und Svanberg, Svenska Vet. Akad. Arkiv f. Kemi 6, Nr. 14; 1917 und Euler, Zs f. Elektrochem. 23, 192; 1917. Ferner Euler und K. Budberg, H. 139; 1924.

Berechnet man aus diesen Moduln unter Berücksichtigung der Dissoziationsgrade die Werte für AS, so ergibt sich folgende Übereinstimmung mit den gefundenen Werten, wobei alle mit 2 oder mehr Nichtelektrolyten untersuchten Salze aufgenommen sind.

Salz	AS		Salz	AS	
	gef.	ber.		gef.	ber.
NH ₄ Br	0	— 0,4	NaNO ₃	— 14,5	— 14,5
NH ₄ NO ₃	0	— 1,3	NaBr	— 16	— 16
KJ	— 10	— 7	LiCl	— 17	— 15
NH ₄ Cl	— 7,5	— 11	KCl	— 23	— 23
KNO ₃	— 11,5	— 12	NaCl	— 26	— 26
KBr	— 13	— 13	NaOH	— 30	— 30

Die Wertigkeit des Ions, welche bei der Sedimentierung der hydrophoben Kolloide und Suspensionen in erster Linie in Betracht kommt, spielt bei der Fällung der hydrophilen Sole keine so grosse Rolle, so dass z. B. Mg Cl₂ nicht viel stärker aussalzt als Na Cl. Diese Aussalzung hängt sehr nahe mit einer Reihe anderer Neutralsalzwirkungen zusammen, was schon daraus hervorgeht, dass die in obiger Tabelle angegebene Reihenfolge der Salze bei zahlreichen anderen physiologischen und physikalischen Vorgängen wiedergefunden wird (Höber). Die Beziehung zwischen Oberflächenspannung und Löslichkeit wird seit langer Zeit von I. Traube¹⁾ in zahlreichen Arbeiten eifrig hervorgehoben. Tatsächlich zeigt sich auch zwischen der aussalzenden Wirkung von Elektrolyten und der Veränderung der Oberflächenspannung ein unverkennbarer Zusammenhang (Euler und Svanberg l. c.).

Offenbar liegt allen diesen Ionenwirkungen eine gemeinsame Ursache zugrunde, und man wird dieselbe in der besonderen Beziehung der Ionen zum Wasser suchen, welche sowohl in der Änderung der Oberflächenspannung wie des inneren Druckes, der Kompressibilität usw., mehr oder weniger beeinflusst durch andere Faktoren, zum Ausdruck kommt. Wir verweisen auf das Seite 43 Gesagte und machen hier zunächst aufmerksam, dass die obige Reihenfolge mit derjenigen übereinstimmt, welche schon Hofmeister²⁾ für die Fällung der Eiweisskörper gefunden hat, und welche nach Höber³⁾ u. a. auch für Lezithin gilt.

Bezüglich der Eiweissstoffe und anderer Ampholyte ist allerdings hervorzuheben, dass die genannte Reihenfolge nur für die isoelektrischen Punkte Gültigkeit haben kann. Bei anderen H⁻ und HO[']-Konzentrationen macht

¹⁾ I. Traube, Journ. Phys. Chim. 14, 452; 1910. — Kolloidchem. Beih. 3, 237; 1912.

²⁾ Hofmeister, Arch. exp. Path. und Pharmak. 28, 210; 1891. — Siehe auch Pauli. Hofm. Beitr. 3, 225; 1902 und 5, 27; 1903.

³⁾ Höber, Hofm. Beitr. 11, 15; 1907.

sich in erster Linie die Salzbildung mit den entsprechenden Anionen bzw. Kationen geltend¹⁾.

Über die „Aussalzung“ superponiert sich bei Ampholyten die Löslichkeits-erhöhung durch Neutralsalze (vgl. S. 76).

Besonders zu erwähnen ist, dass die Erdalkalisalze mit Eiweisskörpern im Gegensatz zu den Alkalisalzen irreversible Fällungen erzeugen sollen.

Über die Abscheidung des Eialbumins in Krystallform haben Sörensen und M. Höyrup²⁾ eingehende Versuche angestellt; sie stellen die Eiweisskonzentration fest, welche mit Ammoniumsulfatlösungen im Gleichgewicht sind. Die Einstellung dieses Gleichgewichts erfordert mehrere Tage und die Geschwindigkeit, mit welcher das Eialbumin ausfällt, ist stark von der Acidität der Lösung abhängig.

Bei Lecithin tritt, wie bei hydrophilen Kolloiden das Phänomen der sog. „unregelmässigen Reihen“ ein, d. h. die Erscheinung, dass die Fällbarkeit innerhalb eines gewissen Konzentrationsgebietes des Elektrolyten aufhört³⁾.

Die oben erwähnte Anionenreihe zeigt sich auch beim Einfluss der Alkalisalze auf Gallerten, welche in der Erstarrung gehemmt bzw. gefördert werden⁴⁾.

Im Kapitel 2 haben wir Michaelis' Definition des isoelektrischen Punktes besprochen und die Beziehungen zwischen isoelektrischem Punkt und Löslichkeitsminimum der krystalloiden Ampholyte. Diese Beziehung gilt, wie nicht übersehen werden darf, und wie Michaelis selbst erkannt hat⁵⁾, streng nur in salzfreier Lösung.

Bei den Proteinen besteht vermutlich eine analoge Beziehung; darüber dürften sich aber bei allen kolloiden Ampholyten Ausflockungswirkungen superponieren, welche mit Änderungen des Wassergehalts der hydrophilen Sole in Zusammenhang stehen. Auch dieser Wassergehalt ist von der Acidität und vom Salzgehalt der Lösung abhängig, die quantitativen Beziehungen sind aber noch unbekannt.

Immerhin scheinen die Proteinsole ihr Stabilitätsminimum in der Nähe des isoelektrischen Punktes zu besitzen. Beim isoelektrischen Punkt erreicht demgemäss auch die Fällbarkeit des Proteins durch Alkohol ihr Maximum (m. a. W. Proteinsalze sind in wässrigem Alkohol löslicher als freies Protein). Dies geht z. B. aus folgenden Versuchen von Pauli hervor:

¹⁾ Siehe hierzu Jaques Loeb, *Jl gen. Physiol.* 1, 363 und 483; 1919.

²⁾ Sörensen und M. Höyrup, *H.* 103, 211; 1918.

³⁾ Porges und Neubauer, *Biochem. Zs* 7, 2152; 1908.

⁴⁾ Pauli und Rona, *Hofm. Beitr.* 2, 1; 1902. — Freundlich und Seal, *Koll. Zs* 11, 257; 1912.

⁵⁾ Michaelis, *Biochem. Zs* 24, 79; 1910.

$h \times 10^5$	Grad der Fällung durch Alkohol
0,6	+
0,9	+ +
1,8	+ + +
3,6	+ +
5,4	+
7,2	--

Ähnliche Erfahrungen macht man häufig bei der Reinigung von Enzymlösungen, welche nicht selten durch eine Alkoholfällung eingeleitet wird. Bei der Ausarbeitung von Reinigungsmethoden ist es deswegen wichtig, den Säuregrad der optimalen Fällung, bzw. den erforderlichen Zusatz von Säure oder Base (Essigsäure oder Ammoniak) genau festzustellen.

Auch die Abscheidung des kristallisierten Eieralbumins durch Ammoniumsulfat erfordert einen gewissen Säuregrad, dessen Optimum Sørensen und Höyrup¹⁾ bei $\text{pH} = 4,58$ fanden.

In höheren Konzentrationen wirken auch Nichtelektrolyte auf die Löslichkeit anderer Nichtelektrolyte bzw. Kolloide ein; es handelt sich dann in der Regel schon um eine Veränderung des Lösungsmittels, z. B. bei Zusätzen von 20% und mehr Alkohol, Glycerin usw.

Die hier bis jetzt besprochenen Ausfällungen sind zunächst alle reversibel. Mit der Zeit geht indessen bei vielen Proteinfällungen die Löslichkeit mehr und mehr verloren, die Proteine erfahren eine Veränderung²⁾. Dieselbe gibt sich oft zunächst dadurch zu erkennen, dass die Fällungen ihren gallertartigen, kolloiden Zustand verlieren und mehr und mehr den Charakter von Suspensionen annehmen. Der Vorgang besteht vermutlich zunächst darin, dass die kolloiden Fällungen mit der Zeit immer mehr Wasser verlieren, sie „altern“ (vgl. S. 97).

Solche, nach der reversiblen Bildung eines Niederschlags sekundär eintretenden physikalischen und chemischen Veränderungen machen sich auch geltend, wenn die Niederschläge durch chemische Reaktionen zwischen Kolloiden nach dem Massenwirkungsgesetz entstanden sind. Es treten dann irreversible „Verfestigungen“ ein, die besonders bei den Immunkörpern die theoretische Behandlung der Vorgänge wesentlich erschwert haben.

2. Gegenseitige Fällung von Kolloiden.

Linder und Picton hatten schon 1897 gefunden, dass Kolloide sich gegenseitig ausfällen können, und einige Jahre später brach sich durch die Arbeiten von W. Biltz³⁾ u. a. die Erkenntnis Bahn, dass eine solche Ausflockung eintritt, wenn beide Kolloide entgegengesetzte Ladung tragen.

¹⁾ Sørensen und Höyrup, H. 103, 211 u. zw. 256; 1918.

²⁾ Siehe z. B. Spiro, Hofm. Beitr. 4, 300; 1903.

³⁾ W. Biltz, Chem. Ber. 37, 1905; 1904.

Diese Ergebnisse bezogen sich hauptsächlich auf Mischungen von zwei hydrophoben Solen.

Über die gegenseitigen Fällungen von 2 hydrophilen Kolloiden liegt verhältnismässig wenig Zahlenmaterial vor. Eiweissfällungen durch anorganische, entgegengesetzt geladene Kolloide behandelten z. B. Brossa und Freundlich¹⁾; auch fast alle anderen Angaben beziehen sich auf Eiweisskörper.

Schon O. Hammarsten²⁾ hatte gefunden, dass sich Fibrinogen mit den Eiweissstoffen des Blutserums verbindet. Kossel³⁾ machte die Beobachtung, dass Protamine mit anderen Eiweisskörpern Fällungen erzeugen; die so entstehenden Verbindungen wurden von Hunter⁴⁾ näher studiert, dem man eine eingehende Untersuchung über die Fällungen der Protamine mit verschiedenen Eiweissstoffen verdankt. Es handelt sich hier wahrscheinlich um chemische Verbindungen. Ferner werden die von Hardy⁵⁾ studierten Globulinverbindungen von diesem Forscher als die Produkte chemischer Reaktionen zwischen Proteinen angesehen. Auch bei den Fällungen, welche Nucleinsäuren mit anderen Proteinen geben [Friedemann und Friedenthal⁶⁾] handelt es sich wohl um Absättigung zwischen einem sauren und einem basischen Eiweiss. Eine Globin-Casein-Fällung wurde 1913 von Robertson⁷⁾ untersucht; sie enthielt 2 Teile Globin auf Teil Casein.

Schliesslich ist eine systematische Untersuchung von B. v. Euler-af Ugglas⁸⁾ zu erwähnen, welche sich mit der Frage beschäftigt, ob bei Eiweissfällungen durch Eiweiss chemische Verbindungen oder Adsorptionsvorgänge zugrunde liegen, oder um die Frage präziser zu fassen, ob Oberflächenenergie oder chemische Energie zur Wirkung kommt. Bei der Untersuchung der Paare:

Protamin-Hämoglobin	Histon-Hämoglobin
Protamin-Casein	Casein-Hämoglobin
Histon-Casein	

ergab sich, dass die Fällungen von Casein mit basischem Eiweiss unabhängig von der Konzentration der Komponenten konstante Zusammensetzung besitzen, was darauf hindeutet, dass die Fällung durch eine nach stöchiometrischen Gesetzen verlaufenden Reaktion entsteht. Bei Hämoglobinfällungen konnten die quantitativen Analysen hingegen keine bestimmte Antwort auf die Frage liefern, ob der Vorgang auf Oberflächen beschränkt ist.

Soviel man bis jetzt aus dem vorliegenden Material entnehmen kann, treten Eiweissfällungen durch Eiweiss bei elektrochemischem Gegensatz der

¹⁾ Brossa und Freundlich, Zs f. physik. Chem. 89, 306; 1915.

²⁾ Hammarsten, H. 22, 333; 1896.

³⁾ Kossel, Deutsche med. Wochenschr. 20, 147; 1894.

⁴⁾ Hunter, H. 53, 526; 1907.

⁵⁾ W. B. Hardy, JI of Physiol. 33, 251; 1905.

⁶⁾ Friedemann und Friedenthal, Zs f. exp. Path. 3, 73; 1906.

⁷⁾ Robertson, Biol. Chem. 13, 499; 1913.

⁸⁾ B. v. Euler-af Ugglas, Biochem. Zs 61, 469; 1914.

Komponenten am häufigsten ein. Das Maximum der Fällung wird von der Acidität der Mischung abhängen, worüber meines Wissens systematische Untersuchungen noch nicht gemacht worden sind.

Die Verbindungen zwischen hydrophilen Kolloiden, welche in Wasser löslich sind — hierher gehören ausser Enzymmischungen viele Verbindungen zwischen Immunkörpern — können wir in diesem Zusammenhang mangels geeigneten Zahlenmaterials noch nicht behandeln.

Auf Vorgänge, welche durchaus in homogenem bzw. mikroheterogenem System verlaufen, werden wir bis auf weiteres die Lösungsgesetze anwenden, bis sich triftige Gründe vorbringen lassen, dass dies nicht angängig oder zweckmässig ist. „Auch hier wäre eine Unterscheidung zwischen dem Verhalten von Krystalloiden, welche homogene, und den Kolloiden, welche heterogene Lösungen bilden, gänzlich erkünstelt und würde nicht den Tatsachen entsprechen“¹⁾.

Biologisch wichtig sind die Verbindungen zwischen hydrophilen und hydrophoben Kolloiden. Durch die Untersuchungen von Landsteiner und Jagič²⁾, Friedemann³⁾, Pauli und Flecker⁴⁾ u. a. sind zahlreiche Fälle bekannt, in welchen Eiweisskörper durch hydrophobe Sole ausgeflockt werden. Bemerkenswert ist hierbei, dass die Flockung wieder verschwindet, wenn das Eiweiss im Überschuss zugesetzt wird.

Schutz-Kolloide.

Diese letztgenannte Wirkung geht noch weiter, indem der Zusatz des hydrophilen Kolloids das Ausfällen des hydrophoben Kolloids durch andere, sonst immer wirksame Fällungsreagenzien hindert, also das hydrophobe Kolloid in Lösung hält⁵⁾. Diese „Schutzwirkung“ hydrophiler Kolloide macht sich bei zahlreichen physiologischen Erscheinungen geltend und erbiertet ein erhebliches Interesse.

Ein relatives Mass für die Schutzwirkungen der einzelnen Emulsoide hat man in der „Goldzahl“⁶⁾; eine Theorie dieser Erscheinungen ist aber noch nicht ausgearbeitet, wahrscheinlich werden unter der Bezeichnung Schutzwirkung sehr verschiedenartige Vorgänge zusammengefasst⁷⁾. Bechhold (l. c.)

¹⁾ Robertson, *Physikalische Chemie der Proteine*, Deutsch v. Wyncken, Dresden 1912. S. 138.

²⁾ Landsteiner und Jagič, *Münch. med. Wochenschr.* 1904, Nr. 27.

³⁾ Friedemann, *Arch. f. Hygiene* 55, 361; 1906.

⁴⁾ Pauli und Flecker, *Biochem. Zs* 41, 461; 1912.

⁵⁾ Bechhold, *Zs physik. Chem.* 48, 385; 1904.

⁶⁾ Unter Goldzahl versteht man die Anzahl Milligramm Schutzkolloid, welche eben nicht mehr ausreicht, den Farbenumschlag von 10 ccm hochroter Goldlösung Au_F gegen Violett zu verhindern, welcher ohne Kolloidzusatz durch 1 ccm 10%iger Kochsalzlösung hervorgerufen wird. Zsigmondy, *Zs analyt. Chem.* 40, 697; 1901. Willstätter, Graser und Kuhn (H. 123) haben an einigen Schutzkolloiden der Saccharase die Goldzahl gemessen (vgl. 6. Kap. 4).

⁷⁾ Die „Schutzwirkung“ der hydrophilen Kolloide bei der Darstellung kolloider Metallösungen kommt für unsere Aufgaben nicht in Betracht.

sowie Neisser und U. Friedemann¹⁾ nehmen an, dass die Schutzwirkung gegen das Ausfällen von Bakterien und Suspensionen dadurch zustande kommt, dass das Schutzkolloid eine homogene Umhüllung um das suspendierte Teilchen bildet, so dass der ganze Komplex die Eigenschaften des Schutzkolloids annimmt²⁾. So verlieren die so umhüllten Teilchen einerseits die Fähigkeit zu koagulieren, andererseits ändert sich ihr Durchdringungsvermögen gegenüber Ton und ähnlichem Filtermaterial.

Eine vorzüglich schützende Wirkung übt die Gelatine aus. Euglobuline zeigen allgemein die höchste Schutzwirkung, Paraglobuline eine geringere und Albumine die kleinste.

Einige Goldzahlen seien im folgenden angegeben:

Gelatine	0,005—0,01
Casein	0,01
Hämoglobin	0,03—0,07
Gummi arabicum	0,15—0,25
Dextrin	6—20

Pauli und Samec³⁾ haben die interessante Tatsache gefunden, dass die Löslichkeit schwer löslicher Kalksalze, wie Calciumphosphat und Calciumcarbonat durch Gelatine, und noch weit mehr durch Serum, gesteigert wird.

Das Verhalten der Enzyme wird vielfach durch „Schutzkolloide“ beeinflusst. Dies zeigt sich z. B. bei der Diffusion durch Membranen, ferner bei Versuchen, Enzyme in Lösung zu bringen bei Aktivierungen und Inaktivierungen.

Mit den erwähnten Reaktionen werden oft auch die Niederschlagsbildungen in Zusammenhang gesetzt, welche zwischen Antigenen und ihren spezifischen Antikörpern entstehen. Als Präzipitinreaktionen werden aus dem äusserlichen Grund, dass bei der Reaktion zwischen der präzipitablen Substanz und dem Antikörper ein Niederschlag entsteht, eine Reihe von Vorgängen zusammengefasst, welche vom chemischen Standpunkt aus vielleicht wenig miteinander zu tun haben. Einstweilen kann man sie den gegenseitigen Fällungen zweier hydrophiler Sole anreihen, bis man über die chemischen Vorgänge, welche diesen Fällungen vorausgehen, besser unterrichtet ist.

¹⁾ Neisser und Friedemann, Münch. med. Wochenschr. 1904, Nr. 11 und 19.

²⁾ Bei solchen geschützten Ultramikronen, deren Dimensionen den molekularen nahe stehen, hält Zsigmondy diese Erklärung nicht für stichhaltig, sondern nimmt eine Vereinigung zwischen den Teilen des Schutzkolloids und des kolloiden Metalls an, in erster Linie wegen der enormen Wirkung minimaler Mengen von Schutzkolloid.

³⁾ Pauli und Samec, Biochem. Zs 17, 235; 1909.

Bekanntlich war es vor nicht langer Zeit eine der am heftigsten diskutierten Fragen der Immunitätslehre, ob die Bindung von Toxin und Antitoxin als chemische Reaktion oder als Adsorptionsvorgang aufzufassen ist. Diese Streitfrage verliert immer mehr an Inhalt, je klarer es durch ein eingehenderes experimentelles Studium wird, dass die Adsorptionserscheinungen der Hauptsache nach durch chemische Reaktionen an der festen Oberfläche bedingt sind, und dass also wesentliche Gegensätze nicht bestehen (vgl. S. 98 u. ff.).

Dass es sich in der überwiegenden Mehrzahl der Präzipitinreaktionen um chemische Vorgänge (etwa vom Typus der Salzbildung oder einer Schiffchen Reaktion) handelt, dürfte nach der langen, übrigens an Unklarheiten reichen Diskussion nicht mehr bestritten werden können.

4. Kapitel.

Allgemeine chemische Kinetik der Enzymreaktionen.

Die Beziehungen, welche die chemische Dynamik für die einfachsten katalytischen Reaktionen fordert, findet man bei enzymatischen Vorgängen in sehr ungleichem Grade erfüllt. In einigen Fällen gilt das Zeitgesetz für monomolekulare Reaktionen und die Proportionalität zwischen Reaktionsgeschwindigkeit und Katalysator mit grosser Schärfe; in der Mehrzahl der Fälle aber stimmen die experimentellen Befunde nur in einem beschränkten Konzentrationsbereich mit den Schulfällen der Reaktionslehre überein, und wir werden zahlreiche Reaktionen kennen lernen, deren Verlauf sich noch nicht durch eine einfache, theoretisch begründete Formel hat darstellen lassen.

Es soll nicht versäumt werden, schon hier zu betonen, wie notwendig bei der Verwertung der im Band II mitzuteilenden quantitativen Ergebnisse eine kritische Prüfung der betreffenden Zahlen ist. Man hat es selbst in den günstigen Fällen, wo ein chemisch einheitliches Substrat zur Verwendung kommt, mit Lösungen zu tun, welche einerseits einen chemisch unbekanntem Katalysator in unbekannter Konzentration enthalten, andererseits durchweg durch die fremden Bestandteile des Enzympräparates verunreinigt sind, und zwar mit Stoffen, welche unter Umständen in minimalen Mengen einen entscheidenden Einfluss auf den Gang der zu beobachtenden Reaktion ausüben können; kurz, man ist in der misslichen Lage, quantitative Beobachtungen an einem qualitativ ungenügend erforschten System anzustellen.

Man kann fragen, welchen Wert die an Enzymlösungen gewonnenen quantitativ-dynamischen Messungen überhaupt besitzen, und ob eine eingehendere Diskussion derselben angezeigt ist.

Die Fragestellung, welche man in der Enzymliteratur der letzten 20 Jahre vielfach antrifft, „ob die studierte enzymatische Reaktion monomolekular bzw. bimolekular oder nach einer anderen der zahlreichen, aus verschiedenen Voraussetzungen entwickelten Formeln verläuft“, hat allerdings selten zu wirklich verwertbaren Ergebnissen geführt, besonders wenn die an einem Präparat gemachten Beobachtungen nur wenig umfassend waren, und die Versuchsbedingungen nur unerheblich variiert worden sind. Die Unfruchtbarkeit dieser zahlreichen Arbeiten ist, wie schon im Vorwort betont wurde, in

der Vernachlässigung der chemischen Seite des Problems zu suchen. Wie die weitere Entwicklung der Enzymologie gezeigt hat, wird der Verlauf vieler Enzymreaktionen sowohl durch die Wasserstoff- und Hydroxylionen als durch spezielle Aktivatoren wesentlich beeinflusst; da diese Wirkungen ursprünglich vernachlässigt wurden, ist der grosse Aufwand an mathematischer Arbeit oft nutzlos geblieben.

Dass aber durch kritische reaktionskinetische Untersuchungen wesentliche Erweiterungen unserer Kenntnisse gewonnen werden, dafür brauchen nur die Arbeiten von Sørensen, von Michaelis und besonders von Willstätter als Beispiele angeführt zu werden.

Ferner geben chemisch-dynamische Messungen die einzige Möglichkeit, die Wirkung eines Enzympräparates oder Saftes exakt zahlenmässig festzustellen, und schon dadurch sind solche Messungen der Reaktionsgeschwindigkeiten bzw. Feststellungen von Reaktionskoeffizienten von grösster praktischer Bedeutung.

Da der zeitliche Verlauf der einzelnen Enzymreaktionen mit den speziellen chemischen Vorgängen bei denselben eng zusammenhängt, wollen wir die charakteristischen reaktionskinetischen Ergebnisse im II. Band bei jedem Enzym gesondert anführen.

Bevor wir die experimentellen Resultate im einzelnen betrachten, wird es zweckmässig sein, uns zu vergegenwärtigen, nach welchen theoretischen Grundsätzen wir dieselben beurteilen können.

A. Die theoretischen Grundlagen der enzymatischen Dynamik.

Der Inhalt des Massenwirkungsgesetzes darf hier wohl als bekannt vorausgesetzt werden. Dasselbe besagt, dass die aktive Masse eines Stoffes seinem osmotischen Druck und damit (innerhalb etwas engerer Grenzen) seiner Konzentration proportional ist. Verwandelt sich durch eine chemische Reaktion eine einzige Molekülart A von der Konzentration C_A in neue Stoffe, ohne dass dabei die Konzentration irgend einer anderen, gleichzeitig anwesenden Molekülart wesentlich verändert wird, so ist — bei gegebenen äusseren Umständen der Temperatur, des Druckes und des Mediums — die in jedem Zeitteil dt pro Volumeinheit umgewandelte Substanzmenge, dC_A , gegeben durch die Gleichung

$$v = \frac{dC_A}{dt} = k^1 C_A,$$

wo k^1 einen Koeffizienten bedeutet, welcher Geschwindigkeitskoeffizient (oder auch Reaktionskonstante) des Vorgangs genannt wird.

Dieser Koeffizient k^1 behält also, wie betont werden soll, seinen Wert unvermindert bei, wie weit auch die Reaktion fortgeschritten sei, und welche Anfangskonzentrationen man gewählt habe.

Die Reaktionsgeschwindigkeit v dagegen, d. h. die in der Volumeneinheit pro Zeiteinheit umgewandelte Substanzmenge, ist von der Konzentration C_A abhängig (damit proportional). Sie nimmt denselben Zahlenwert wie k' an, wenn $C_A = 1$ ist, d. h. wenn die sich umwandelnde Stoffmenge ein g-Molekül pro Liter beträgt und in irgend einer Weise auf dieser Konzentration erhalten wird.

Durch diese einfachste Gleichung lässt sich also ein chemischer Vorgang darstellen, welcher in einer Richtung (praktisch) vollständig verläuft.

Man bezeichnet in der physikalisch-chemischen Literatur die Konzentration, welche ein reagierender Stoff A beim Beginn der Reaktion besitzt, also wenn $t = 0$ ist, mit a . Wir bezeichnen ferner mit x die Konzentration der zur Zeit t bereits umgesetzten Moleküle A; dann wird obige Gleichung:

$$v = \frac{dx}{dt} = k'(a - x), \quad \dots \dots \dots (24a)$$

denn zur Zeit t ist $a - x$ die Konzentration der noch vorhandenen Moleküle A.

Durch Integration erhalten wir:

$$-\ln(a - x) = k't + \text{konst.}$$

und, da für $t = 0$ auch $x = 0$, so ergibt sich die Anfangsbedingung

$$-\ln a = \text{konst.}$$

und hieraus

$$k' = \frac{1}{t} \ln \frac{a}{a - x} \dots \dots \dots (24b)$$

Gewöhnlich rechnet man mit dekadischen Logarithmen (\log).

Aus

$$\log(a - x) = \log a - 0,4343 k't$$

erhält man

$$0,4343 k' = \frac{1}{t} \log \frac{a}{a - x} = k, \quad \dots \dots \dots (24c)$$

indem man

$$k = 0,4343 k' \text{ setzt.}$$

Anstatt stets mit dem Ausgangspunkt a für $t = 0$ zu rechnen, kann man die Konstante k zwischen je zwei beliebigen Zeiten t_1 und t_2 ermitteln. Man benutzt dann die aus (24a) leicht ableitbare Gleichung

$$k = \frac{1}{t_2 - t_1} \log \frac{a - x_1}{a - x_2},$$

wo die Werte x_1 und x_2 den Zeiten t_1 und t_2 entsprechen.

Ist die halbe Substanzmenge a umgesetzt, also $x = a/2$, so wird

$$k = \frac{1}{t} \log 2 \text{ oder } t = \frac{\log 2}{k};$$

aus der Reaktionskonstanten ergibt sich also direkt die Zeit t , welche zum halben Umsatz der Anfangsmenge erforderlich ist.

Wir haben hier das denkbar einfachste Beispiel gewählt, dass eine einzige¹⁾ Molekülart sich vollständig, ohne Rest, in eine andere verwandelt, wie dies bei idealen, nicht umkehrbaren Reaktionen der Fall ist.

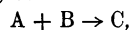
Auf umkehrbare Reaktionen werden wir im Kapitel 7 zurückkommen.

Die genannte Gleichung findet man ausserdem in sehr zahlreichen Fällen bestätigt, in welchen ausser einem gelösten Substrat auch noch das Wasser an der Reaktion beteiligt ist. Da dies im Vergleich zur gelösten Substanz in grossem Überschuss vorhanden zu sein pflegt, so kann man seine Konzentration als konstant ansehen; es ändert sich auch in diesen Fällen praktisch nur die Konzentration einer einzigen Molekülart. So war das erste Beispiel für die Gültigkeit des monomolekularen Reaktionsgesetzes die Inversion des Rohrzuckers durch Säuren (Wilhelmy 1850).

1. Katalyse durch Säuren und Basen.

Die Spaltung des Rohrzuckers erfolgt bekanntlich in reinem Wasser ganz ausserordentlich langsam; einigermaßen erheblich wird die Geschwindigkeit erst dann, wenn ausser dem Zucker noch eine Säure (oder ein Enzym die Saccharase) in der Lösung enthalten ist. Durch den Verlauf der Hydrolyse verändert sich die Konzentration der zugesetzten Säure, soweit wir bis jetzt feststellen können, nicht. Auch gilt das Gesetz für monomolekulare Reaktionen anscheinend unverändert, ob die Lösung als Katalysator 0,001 oder 0,1 g-Molekül Säure pro Liter enthält; es ändert sich (solange wir im Gebiet wässrig verdünnter Lösungen bleiben) ausschliesslich der numerische Wert der Reaktionskonstanten k . Ein Katalysator ist deswegen, wie schon eingangs erwähnt, zu definieren als ein Stoff, welcher, ohne selbst durch die Reaktion verbraucht zu werden, die Geschwindigkeit

¹⁾ Verläuft eine Reaktion so, dass äquimolekulare Mengen zweier Stoffe zur Bildung des Reaktionsproduktes zusammentreten, also nach dem Schema



so ist, wenn wir von den Konzentrationen a und b ausgehen, und mit x die zur Zeit t umgewandelte Menge dieser beiden Stoffe (also die gebildete Konzentration von C) bezeichnen, die Geschwindigkeit in jedem Augenblick proportional mit den Konzentrationen der beiden miteinander reagierenden Stoffe, also:

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

oder, wenn die beiden Stoffe von vornherein die gleiche Konzentration a haben,

$$\frac{dx}{dt} = k (a - x)^2.$$

Für letzteren, einfachsten Fall einer sog. bimolekularen Reaktion lautet das Integral:

$$k = \frac{1}{at} \frac{x}{a - x}$$

Enzymatische Vorgänge, welche nach der Gleichung für bimolekulare Reaktionen verlaufen, sind bisher nicht bekannt geworden. Man könnte einen bimolekularen Verlauf z. B. bei den enzymatischen Synthesen von Monoestern aus Alkohol und Säure und von Glucosiden erwarten.

ändert, mit welcher eine Reaktion ihre Gleichgewichtslage erreicht¹⁾.

Arrhenius hat 1884 die wichtige Entdeckung gemacht, dass die katalytische Wirkung verschiedener Säuren mit ihrer Leitfähigkeit (angenähert) parallel geht. Berechnet man mit Arrhenius den Dissoziationsgrad einer Säure aus dem Leitvermögen nach Formel 1b (S. 19), so ergibt sich bei hoher Verdünnung der Säure mit grosser Annäherung Proportionalität zwischen der Konzentration des dissoziierten Anteiles der Säure und der Reaktionsgeschwindigkeit.

Dieser Satz, welcher in der Entwicklung der Reaktionslehre eine wesentliche Rolle gespielt hat, lässt sich auch so ausdrücken, dass verschiedene Säuren hydrolytische Reaktionen proportional mit der Konzentration der Wasserstoffionen ihrer Lösungen katalysieren. Man findet diese Beziehung nicht selten in der Literatur so dargestellt, als ob die Wasserstoffionen allein das katalysierende Agens wären und als eine Art Kontaksubstanz fungierten. Eine solche Vorstellung entspricht aber den chemischen Tatsachen keineswegs.

Es gelten für die Inversion des Rohrzuckers — um diesen klassischen Fall der chemischen Dynamik weiter zu kennzeichnen — die folgenden Beziehungen:

1. Der zeitliche Verlauf der Reaktion wird durch die oben erwähnte Integralformel (24 c) dargestellt:

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

2. Von der Anfangskonzentration a ist die Konstante k unabhängig, es wird also, welches auch die Anfangskonzentration des Rohrzuckers (innerhalb gewisser Verdünnungsgrenzen) ist, bei gegebenen übrigen Bedingungen (Temperatur und Konzentration der Säure) in der Zeiteinheit stets der gleiche prozentische Anteil des Rohrzuckers umgesetzt. Wir werden später sehen, dass enzymatische Katalysen oft von dieser für den einfachsten Fall geltenden theoretischen Forderung abweichen.

3. Die Reaktionsgeschwindigkeit, ausgedrückt durch die Reaktionskonstante k , ist (bei gegebener Temperatur) proportional der Konzentration des dissoziierten Anteiles der katalysierenden Säure, also proportional der Konzentration der Wasserstoffionen²⁾. So wurden beispielsweise für die Inversion von 10%iger Rohrzuckerlösung folgende Zahlen gefunden:

Konz. HCl	Konz. d. H ⁺ -Ionen	Reaktionskonst. k	k : Konz. H ⁺ .
0,00995	0,00984	0,001833	0,1863
0,00500	0,00498	0,000925	0,1857
0,002057	0,002057	0,0003793	0,1844

¹⁾ Dies gilt für alle diejenigen Fälle, in welchen nicht ein Stoff seine eigene Umwandlung katalysiert, wie dies z. B. bei der Lactonbildung aus γ - und δ -Oxysäuren der Fall ist, wo die Oxysäuren proportional mit ihrem dissoziierten Anteil die Lactonbildung beschleunigen (Autokatalyse).

²⁾ Diese Proportionalität zeigt sich bei starken Säuren allerdings nur in grosser Verdünnung (etwa ab 0,01 norm.) der katalysierenden Säure, wo die sog. Salzwirkung der Ionen sich nicht mehr geltend macht.

In analoger Weise wie die Säuren katalysieren in zahlreichen Reaktionen, (Isomerisierungen, Esterspaltungen usw.) die Basen proportional mit ihrem dissoziierten Anteil, also mit der Konzentration der HO-Ionen.

Eine abschliessende theoretische Behandlung der Katalyse liegt noch nicht vor. Die grosse und verhältnismässig übersichtliche Gruppe der katalytischen Hydrolysen durch Säuren und Basen lässt sich, wie der Verf. zu zeigen versucht hat¹⁾, unter der Annahme beschreiben, dass die katalysierende Säure bzw. Base mit dem Substrat zu einer salzartigen Verbindung zusammentritt, welche die „reaktionsvermittelnden Moleküle I. Ordnung“ bildet. Die Konzentration der reaktionsvermittelnden Moleküle I. Ordnung lässt sich nach dem Massenwirkungsgesetz angenähert berechnen, da die Molekülart, welche den Zerfall erleidet (reaktionsvermittelnde Moleküle II. Ordnung) nur einen kleinen Bruchteil der ersten ausmachen.

Behandeln wir demgemäss z. B. Rohrzucker als eine sehr schwache Base (die Dissoziationskonstante K lässt sich zu rund 10^{-19} schätzen), so lässt sich der Grad der Salzbildung mit HCl nach den für hydrolytische Gleichgewichte geltenden Gesetzen berechnen, und man findet eine diesbezügliche Tabelle

im 2. Kapitel Seite 54. Aus der gemachten Annahme ergibt sich also zunächst als direkte Folgerung eine der Grundtatsachen der katalytischen Hydrolysen, nämlich die schon oben erwähnte Proportionalität zwischen katalysierender Säure und Reaktionsgeschwindigkeit. Der Katalysator vermehrt also die Konzentration der reaktionsvermittelnden Ionen.

Es hat sich weiter ergeben, dass Ester den Charakter von Ampholyten besitzen, und zwar wurde — unter der vorläufigen Annahme, dass die durch Salzbildung entstehenden reaktionsvermittelnden Ionen 1. Ordnung gleich schnell reagieren — der isoelektrische Punkt des Äthylacetats aus dem Maximum der Stabilität dieses Esters bei $\text{pH} = 5$ gefunden²⁾. Im Anschluss

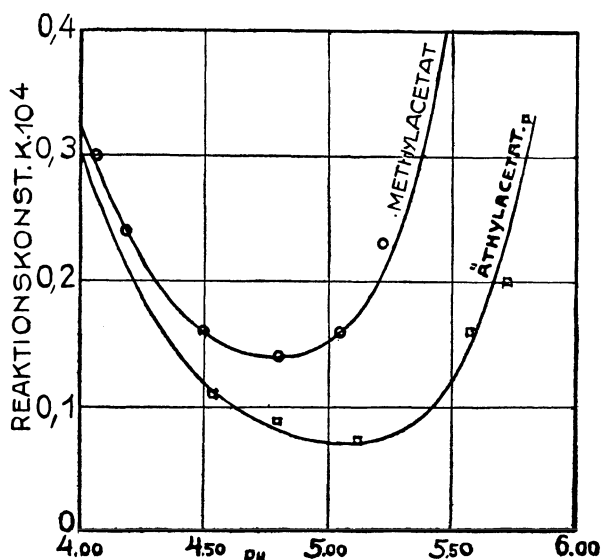


Fig. 18.

¹⁾ Euler, Zs physik. Chem. 36, 681; 1901. — Euler u. Rudberg, Zs anorg. Chemie 127, 244; 1923. — Euler u. Rudberg, Zs. für Physik, 16, 54; 1923.

²⁾ Euler und Laurin, Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi 7, Nr. 30; 1920. — Euler u. Svanberg, H. 115, 139; 1921.

hieran sind zum erstenmal die Kurven für die Hydrolyse von Estern¹⁾, Säureamiden u. a. in der Nähe der Stabilitätsmaxima ermittelt worden (Fig. 18).

Das Maximum der Stabilität zeigte sich stärker ausgeprägt (weniger flach) als für Ampholyte von so kleinem Produkt $K_a \cdot K_b$ zu erwarten ist. Man darf daraus vielleicht schliessen, dass die Zwitterionen Bjerrums (oder die ungeladenen Moleküle) im Stabilitätsmaximum zum Vorschein kommen.

Über die absoluten Konzentrationen der reaktionsvermittelnden Ionen, r_i , und ihre Reaktionsgeschwindigkeit, $k:r_i = r_q$, sind die Messungen noch nicht abgeschlossen und die Berechnungsweisen noch nicht geklärt.

2. Katalysen durch Enzyme.

Beispiel: Inversion des Rohrzuckers durch Saccharase.

Der zeitliche Verlauf der katalytischen Spaltungen durch Enzyme lässt sich mit den Forderungen der chemischen Kinetik im allgemeinen nicht so einfach in Einklang bringen wie die Katalysen durch verdünnte Mineralsäuren.

Um zunächst eine Vorstellung davon zu geben, in welchem Grade und in welcher Weise die Enzymreaktionen von den nicht enzymatischen Katalysen abweichen, wollen wir bei der Rohrzuckerspaltung bleiben; die Inversion dieses Zuckers durch Saccharase (Invertin) ist nämlich einer der best studierten enzymatischen Vorgänge.

Was zunächst die Form des zeitlichen Verlaufes betrifft, so führen wir aus einer sehr zuverlässigen Arbeit von C. S. Hudson²⁾ die folgende Versuchsreihe an, welche sich offenbar durch die Formel (24c) gut darstellen lässt.

Minuten	Drehung	$10^4 k = \frac{10^4}{t} \log \frac{a}{a-x}$
0	24,50°	—
30	14,27	55,8
60	7,90	53,0
90	3,00	53,9
110	+ 0,80	53,4
130	— 1,49	55,9
150	— 2,40	53,3
∞	— 7,47	—

Ein solcher Anschluss an das Gesetz für monomolekulare Reaktionen ist indessen auch bezüglich der Saccharasewirkung nicht die Regel, sondern eher als ein Spezialfall zu betrachten.

Bei obigem Versuche macht sich schon eine geringe Enzymzerstörung geltend; wird diese durch geeignete Wahl der Versuchsbedingungen vermieden,

¹⁾ K. G. Karlsson, Zs. anorg. Chem. 119, 68; 1921.

²⁾ C. S. Hudson, Amer. Chem. Soc. 30, 1160; 1908.

so steigen die Werte des Reaktionskoeffizienten k mit der Zeit leicht an. Michaelis und Davidsohn sehen folgenden Reaktionsverlauf als normal an¹⁾:

Acetatgemisch als Puffer. — Acetatgehalt = $n/50$.

H^+ -Konzentration = $0,20 \cdot 10^{-4}$; $p_H = 4,70$.

Wasserbad = $22,3^0 \pm 0,05$.

Minuten	a	x	$k = \frac{1}{t} \log \frac{A}{A-x}$
0	(+ 4,334)	—	—
0,5	4,324	0,010	—
21,0	3,945	0,389	0,00145
60,0	3,260	1,074	0,00151
130,0	2,129	2,205	0,00164
190,2	1,330	3,004	0,00171
246,0	0,744	3,590	0,00176

Dass für die enzymatische Inversionsgeschwindigkeit und den Inversionsverlauf die Acidität der Lösung eine wesentliche Rolle spielt, ist schon von O'Sullivan und Tompson²⁾ in ihrer nunmehr 35 Jahre alten, ausgezeichneten Untersuchung bemerkt worden.

Wir haben schon S. 65 die von Michaelis und Davidsohn gegebene Kurve mitgeteilt, welche die relative Umsatzgeschwindigkeit (also die relative Aktivität in ihrer Abhängigkeit vom Logarithmus der H^+ -Konzentration) darstellt.

Wir bemerken ein ziemlich flaches Optimum der Saccharasewirkung innerhalb der Aciditätsgrenzen 5 bis 3,5 und zu beiden Seiten des Optimums einen starken Abfall, welchen wir bereits früher besprochen haben.

2. Einfluss der Rohrzuckerkonzentration. Hier liegen die Verhältnisse weniger einfach als bei der nicht enzymatischen Inversion. Es kommt nämlich hier die relative Menge von Enzym und Substrat (Rohrzucker) in Betracht. Im allgemeinen nimmt bei gegebener Enzymmenge der relative Umsatz mit steigender Zuckermenge ab.

In gewissen ziemlich engen Konzentrationsgrenzen des Rohrzuckers ist der Reaktionskoeffizient k umgekehrt proportional der Rohrzuckerkonzentration, so dass man annehmen kann³⁾:

$$k \times \text{Rohrzucker-Konzentration} = \text{konstant};$$

¹⁾ Michaelis und Davidsohn, Biochem. Zs 35, 401; 1911.

²⁾ O'Sullivan und Tompson, Jl Chem. Soc. 57, 834; 1890.

³⁾ In sehr verdünnten Zuckerlösungen, wenn die Lösungen relativ viel Enzym enthielten, soll nach Brown (siehe S. 136) die Wirkung einer gegebenen Enzymquantität der Zuckerkonzentration proportional sein (l. c. S. 387).

g Rohrzucker in 100 ccm	g Rohrzucker invertiert in 60 Min.	$10^5 k = \frac{10^5}{t} \log \frac{a}{a-x}$
(2,0)	(0,308)	(132)
1,0	0,249	219
0,5	0,129	239
0,25	0,060	228

in diesem Gebiet werden also, unabhängig von der Anfangskonzentration, von einer gegebenen Enzymmenge in gleichen Zeiten die gleichen absoluten Zuckermengen invertiert¹⁾. Zu diesem Ergebnis kommt auch Brown²⁾, aus dessen Zahlen Verf. die Werte k und $k \times g$ Rohrzucker berechnet hat.

g Rohrzucker in 100 ccm	g Rohrzucker invertiert in 60 Min.	% Rohrzucker invertiert in 60 Min.	$k \cdot 10^5$	$k \cdot 10^5 \times g$ Rohrz
4,89	1,230	25,2	210	1027
9,85	1,355	13,8	106	1044
19,91	1,355	6,8	51	1016
29,96	1,235	4,1	37,8	1153
40,02	1,076	(2,7)	20	

Bei anderen Versuchen mit grösserer Enzymkonzentration nimmt das Produkt $k \times g$ Zucker mit steigender Zuckerkonzentration ab. So berechnet Verf. z. B. nach Hudson:

g Zucker in 100 ccm	$k \cdot 10^4$	$k \cdot 10^4 \times g$ Zucker
8	10,5	84
16	4	64

Weitere Belege finden wir in folgender Tabelle von Hudson, welche Messungen an drei verschiedenen Rohrzuckerkonzentrationen enthält.

Inversion bei 30°.

Konzentration der Saccharase E	Minuten t	Produkt E · t	Invertierter Zucker in % bei verschied. Rohrzuckermengen pro Liter		
			45,5 $\frac{g}{\text{Liter}}$	90,9 $\frac{g}{\text{Liter}}$	273 $\frac{g}{\text{Liter}}$
			2,00	15	30
2,00	30	60	93,0	74,2	22,0
1,50	20	30	73,2	44,8	11,2
1,50	40	60	92,8	74,5	22,7
1,00	30	30	72,9	45,3	11,5
1,00	60	60	93,0	74,7	22,3
0,50	60	30	72,9	45,2	11,4
0,50	120	60	92,7	74,5	22,6
0,25	120	30	73,1	45,2	10,9
0,25	240	60	92,7	74,7	21,9

Neuerdings sind Euler und Myrbäck³⁾ zu sehr hohen Zuckerkonzentrationen gegangen, und zwar in Versuchsreihen mit sehr verschiedenem Enzymgehalt.

¹⁾ Vorgänge dieser Art hat man gelegentlich als „Reaktionen nullter Ordnung“ bezeichnet. Man findet diese Unabhängigkeit des Umsatzes von der Substratkonzentration bei vielen photochemischen Vorgängen. Der Unterschied zwischen enzymatischen und nicht enzymatischen Katalysen, etwa zwischen der Rohrzuckerinversion durch Saccharase und durch Salzsäure liegt darin, dass die Affinität der Saccharase zum Rohrzucker ($K_M = 50$) sehr viel grösser ist, als die Affinität der Salzsäure zum Rohrzucker (vgl. Euler, Chem. Ber. 55, und zwar 3589; 1922).

²⁾ Brown, Jl. Chem. Soc. 81, 373; 1902.

³⁾ Euler u. Myrbäck, H. 124, 159; 1923.

Versuchsreihe mit hohem Enzymgehalt. pH = 4,45.

g Zucker in 100 ccm Lösung	$k \cdot 10^4$	$k \cdot 10^4$ g Zucker	g Zucker in 100 ccm Lösung	$k \cdot 10^4$	$k \cdot 10^4$ g Zucker
0,5	2352	1176	10,0	472	4720
1,0	2407	2407	20,0	226	4520
1,5	2063	3094	30	112	3360
2,0	1850	3700	40	73,3	2932
3,0	1370	4110	50	42	2100
4,0	1170	4680	62,0	19,5	1210
5,0	973	4685	70,0	16	1120

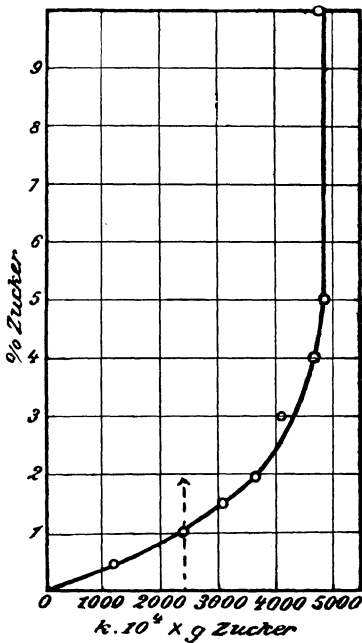


Fig. 19a.

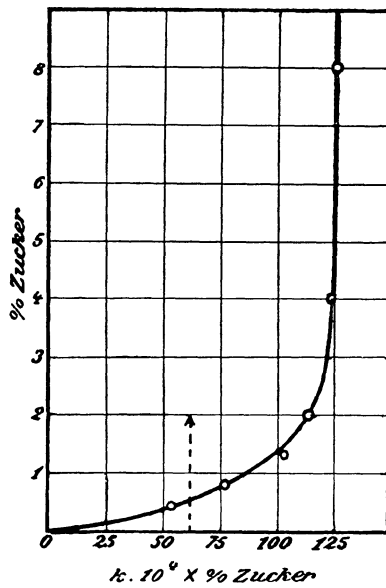


Fig. 19b.

Wie ersichtlich, erreicht der Wert $k \times \text{g Zucker}$ in etwa 10%iger Zuckerlösung ein Maximum. Aber auch in 70%iger Lösung ist die Reaktionsgeschwindigkeit noch ziemlich gross. Dieser Versuch ist graphisch in Fig. 19a dargestellt. Aus der Fig. 19b wird deutlich, dass sich die Wirksamkeit der verdünnten Saccharaselösung in ähnlicher Weise ändert wie die der konzentrierteren.

Einfluss der Enzymkonzentration.

Auch hier können wir zunächst auf die Arbeit von O'Sullivan und Tompson zurückgreifen, welcher wir folgende Tabelle entnehmen (l. c. S. 848).

Temp.	Saccharase- Präparat g	$\frac{1}{2}$ H ₂ SO ₄ normal	Reaktionszeiten Minuten	Ablesung im 2 dm-Rohr	Minuten bis zur Drehung 0°	
					A gef.	B ber.
15,5	0,15	0,00187	301	— 2,0	283,0	291,5
15,5	0,45	0,0031	100	— 1,8	94,8	96,3
15,5	1,50	0,0050	30	+ 1,0	30,7	29,1
56,5	0,0345	0,00025	103	+16,5	157,6	157,1
56,5	0,0722	0,000375	53	+13,5	74,8	75,1

In der dritten Spalte ist die Acidität der Lösung, dem damaligen Stand der Kenntnisse entsprechend, noch durch die Gesamtnormalität angegeben; durch Vorversuche waren die betr. Säure-Konzentrationen als die für die Reaktionsgeschwindigkeit günstigsten ermittelt worden. In der vorletzten mit A bezeichneten Spalte sind die Zeiten angegeben, welche bis zum Eintritt der Drehung 0° verfließen sind, und in der Spalte B_{ber.} die Zeit, welche sich unter der Annahme der Proportionalität zwischen Enzymkonzentration und Reaktionsgeschwindigkeit ergeben. Man bemerkt die gute Übereinstimmung zwischen den gefundenen und berechneten Werten, welche also anzeigt, dass tatsächlich in weiten Grenzen die Reaktionsgeschwindigkeit der Enzymkonzentration proportional ist. Diese Proportionalität ergibt sich auch sehr deutlich aus der oben tabellierten Versuchsreihe von Hudson, in welcher die Enzymkonzentration von 2—0,25 variiert wurde. Berechnen wir beispielsweise für die Zuckerkonzentration 90,9 g/Liter die Reaktionskoeffizienten, so erhalten wir:

Reakt.-Koeff. $k \cdot 10^4$	1,85	1,39	0,934	0,465	0,232
Saccharase-Konz. E	2	1,5	1	0,5	0,25
$k \cdot 10^4 : E$	0,92	0,92	0,93	0,93	0,93

Vergleicht man die eben angegebenen Beziehungen mit denjenigen, welche wir S. 132 kennen gelernt haben, so erkennen wir, dass den enzymatischen und den nicht enzymatischen Reaktionen die gleichen Gesetze zugrunde liegen, dass sich aber doch erhebliche Verschiedenheiten bemerkbar machen.

In diesem Zusammenhang muss noch betont werden, dass das Gesetz der Massenwirkung, auf welchem die ganze chemische Kinetik ruht, sich aus den beiden Hauptsätzen der Thermodynamik herleiten lässt; es ist also unabhängig von unseren gegenwärtigen molekularkinetischen Vorstellungen. Dass das Massenwirkungsgesetz allen chemischen Vorgängen zugrunde liegt, kann also nicht bezweifelt werden; die Frage ist nur, wann und inwieweit die Voraussetzungen zutreffen, unter welchen wir es in der obigen einfachen Form anwenden. Finden wir Abweichungen von den einfachen Formeln, zu welchen uns das Massenwirkungsgesetz führt, so haben wir zu fragen, welche Voraussetzungen unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht erfüllt gewesen sind.

Das eben erwähnte Beispiel kann natürlich nur eine Vorstellung von den Reaktionsverhältnissen bei den Saccharase-Wirkungen geben. Bei anderen Enzymen treten starke Besonderheiten auf, besonders macht sich der Einfluss der relativen Menge von Enzym und Substrat oft mehr geltend als bei der Saccharase, wo die Beziehungen auch noch dadurch verhältnismässig einfach liegen, dass — soviel bekannt ist — keine spezifischen Aktivatoren mitwirken.

B. Verbindung des Enzyms mit Substrat und Reaktionsprodukten. Theoretische Folgerungen aus diesen Annahmen.

1. Ältere Arbeiten.

Von grossem Einfluss auf den Verlauf enzymatischer Reaktionen schien bereits nach älteren Messungen die Bindung einerseits zwischen Enzym und Substrat, andererseits zwischen Enzym und Reaktionsprodukten zu sein.

Die Annahme, dass die Verbindung des Katalysators mit dem Substrat die reaktionsvermittelnden Moleküle liefert, ist in der Enzymologie bereits zur allgemeinen Annahme gelangt; von den Autoren, welche sich auf Grund eigener Untersuchungen in diesem Sinne geäussert haben, seien nur genannt: Kastle und Loevenhart, Bach, Hanriot, A. Brown, H. Brown und Glendinning, Bodenstein, Henri, Hedin, Armstrong, Bayliss, Northrop, Abderhalden und Fodor, Colin und Chaudun und besonders Michaelis.

Die Verbindungen zwischen Enzym und Substrat dürften bei vielen enzymatischen Reaktionen in viel höherem Grade auftreten, als dies bei der katalytischen, nicht enzymatischen Hydrolyse durch Säuren der Fall ist. Über die sich während der Reaktion bindenden Enzym- und Substratmengen hat Michaelis Berechnungen angestellt, auf welche wir bald zurückkommen.

Es würde zu weit führen, hier alle Erwägungen wiederzugeben, welche die verschiedenen Forscher veranlasst haben, eine Vereinigung zwischen Enzym und Substrat anzunehmen. Wir wollen nur in Kürze einige der mathematischen Formulierungen erwähnen, welche die in Rede stehende Hypothese gefunden hat.

Henri fand bei seinen Versuchen über die Inversion des Rohrzuckers¹⁾, dass die Reaktionskonstanten 1. Ordnung stark anstiegen. Um sein Beobachtungsmaterial einem mathematischen Ausdruck anzuschliessen, hat Henri eine von Wi. Ostwald gegebene Herleitung (Lehrbuch d. allgem. Chem. 2, 2; 265) benützt.

Wird eine Reaktion durch einen Stoff von der Konzentration p beschleunigt, so ist der obige Ausdruck $k(a-x)$ noch zu multiplizieren mit $(1 + \varepsilon p)$, wo ε eine Konstante bedeutet. Für den Fall, dass das Reaktionsprodukt der beschleunigende Stoff ist, erhöht sich also die Geschwindigkeit im Verhältnis $1 : \left(1 + \varepsilon \frac{x}{a}\right)$, d. h. proportional mit dem umgesetzten Anteil $\frac{x}{a}$ des Substrates, und wir erhalten:

¹⁾ Henri, Zs f. physik. Chem. 39, 194; 1902.

$$\frac{dx}{dt} = k_H \left(1 + \varepsilon \frac{x}{a} \right) (a - x) \dots \dots \dots (a)$$

Die Integration ergibt:

$$k_H (1 + \varepsilon) = \frac{1}{t} \left[\log \frac{a}{a-x} + \log \left(1 + \varepsilon \frac{x}{a} \right) \right] \dots \dots \dots (b)$$

oder

$$k_H (1 + \varepsilon) = \frac{1}{t} \log \frac{a + \varepsilon x}{a - x} \dots \dots \dots (c)$$

Bei einer Berechnung mehrerer Versuchsreihen der Saccharasewirkung ergaben sich für die neue Konstante ε Werte, welche nahe 1 lagen, und es wurde daher $\varepsilon = 1$ gesetzt.

Die Gleichung geht dann über in

$$2k_H = \frac{1}{t} \left[\log \frac{a}{a-x} + \log \left(1 + \frac{x}{a} \right) \right],$$

oder

$$2k_H = \frac{1}{t} \log \frac{a+x}{a-x} \dots \dots \dots (d)$$

Bald darauf hat Bodenstein die Henrischen Zahlen einer Bearbeitung unterworfen und machte die Annahme, dass sowohl der Rohrzucker a als dessen Spaltprodukte die Saccharase schwächen, und zwar der Rohrzucker stärker als der Invertzucker. Er leitete hieraus die Formel¹⁾ ab:

$$k_B E = \frac{a+i}{t} \left[(m-n) \frac{x}{a+i} + n \log \frac{a}{a-x} \right] \dots \dots \dots (e)$$

Hier bedeutet i die Menge des von vornherein zugesetzten Invertzuckers. E bedeutet die Enzymmenge; m und n sind Konstanten, welche die spezifische Schwächung der Saccharase durch Rohrzucker bzw. Invertzucker zum Ausdruck bringen. Bodenstein wählte für diese Konstanten die Werte $m = 2$ und $n = 1$, wodurch die stärkere Wirkung des Rohrzuckers zum Ausdruck kommt. Enthält die Lösung von vornherein kein Reaktionsprodukt ($i = 0$), so vereinfacht sich seine Formel auf folgende Gleichung:

$$k_B E = \frac{a}{t} \left[\frac{x}{a} + \log \frac{a}{a-x} \right] \dots \dots \dots (f)$$

Während diese Formel die von Henri an mässig verdünnten Lösungen angestellten Beobachtungen ziemlich gut wiedergab, stimmten die von ihm an verdünnten Lösungen gewonnenen Zahlen nicht mit derselben überein.

Henri hat deshalb einen anderen Ausdruck unter der Annahme, dass sowohl der Rohrzucker als der Invertzucker (besonders die Fructose) sich mit dem Enzym verbinden²⁾, abgeleitet.

Von der ursprünglichen Substanzmenge a seien x Moleküle gespalten, so dass $a - x$ Moleküle übrig sind. Die Enzymmenge sei E ; ferner sei X die Quantität des Enzyms, welche frei ist, Z die Menge, welche zur Zeit t am Rohrzucker haftet und Y diejenige Menge, welche mit dem Invertzucker verbunden ist.

Zwischen Enzym und Substrat einerseits, Enzym und Reaktionsprodukt andererseits sollen Gleichgewichte bestehen, welche durch das Massenwirkungsgesetz geregelt werden. Demnach gelten für diese beiden Gleichgewichte die Beziehungen (falls 1 Molekül Enzym mit 1 Molekül Substrat zusammentritt):

$$X(a-x) = \frac{1}{m} Z \quad \text{und} \quad X \cdot x = \frac{1}{n} Y, \dots \dots \dots (g) (h)$$

wo m und n Gleichgewichtskonstanten sind.

Für die gesamte Enzymmenge E gilt ferner:

$$E = X + Y + Z \dots \dots \dots (i)$$

Hieraus berechnet Henri die Menge X des freien Enzyms und Z der Verbindung Zucker-Enzym:

$$X = \frac{E}{1 + m(a-x) + nx} \quad \text{und} \quad Z = \frac{mE(a-x)}{1 + m(a-x) + nx} \dots \dots \dots (k) (l)$$

¹⁾ Henri, Lois générales de l'action des diastases. Thèse Paris 1903, S. 77 u. ff.

²⁾ Henri, Lois générales, S. 85 u. ff. und C. r. 135, 916; 1902.

Nun kann man zweierlei Annahmen machen:

1. Es wirke der freie Anteil des Enzyms auf den Zucker; in diesem Falle ist die Geschwindigkeit proportional der Menge des freien Enzyms und der Menge Rohrzucker, also proportional mit X und mit $a - x$. Somit wird

$$\frac{dx}{dt} = \text{konst. } X (a - x). \quad \dots \quad (m)$$

Ersetzt man hierin X nach Gleichung (k), so erhält man:

$$\frac{dx}{dt} = \frac{\text{konst. } E (a - x)}{1 + m (a - x) + nx}. \quad \dots \quad (n)$$

2. Würde die Reaktion im Gegenteil durch den Komplex Enzym-Zucker vermittelt, so wäre die Geschwindigkeit der Konzentration dieser Molekülart, also Z , proportional. Aus

$$\frac{dx}{dt} = \text{konst. } Z \text{ erhält man nach (l):}$$

$$\frac{dx}{dt} = \frac{\text{konst. } m \cdot E (a - x)}{1 + m (a - x) + nx}. \quad \dots \quad (o)$$

Beide Annahmen führen also zu einem identischen Ausdruck für die Reaktionsgeschwindigkeit.

Arrhenius gibt unter der Annahme, dass sich Komplexe bilden, welche aus 1 Molekül Enzym, p Molekülen Substrat und q Molekülen der verschiedenen Reaktionsprodukte bestehen, obigem Ausdruck eine noch allgemeinere Form (Immunochemie, S. 40).

Man erhält nämlich für jede einzelne solche Molekülart eine Formel von folgender Art:

$$Z = \kappa^1 X (a - x - \sum p Z)^p (x - \sum q Z)^q, \text{ wo } E = X + \sum Z. \quad \dots \quad (p)$$

Wenn wir annehmen, dass $\sum Z$ klein gegen a und x ist, so erhalten wir

$$Z = \kappa^1 X (a - x)^p x^q,$$

und es wird

$$\frac{dx}{dt} = \kappa^1 X (a - x - \sum p Z)^p = \frac{\kappa^1 E (a - x)^p}{1 + \sum \kappa^1 (a - x)^p x^q}. \quad \dots \quad (p)$$

Ist das erste Glied im Nenner, 1, klein gegen die Glieder unter dem Summationszeichen, so erhalten wir die Formel von Bodenstein, wenn wir $a = 1$ setzen und annehmen, dass unter \sum zwei Glieder stehen, eines, in welchem $p = 1$ und $q = 0$ ist und ein zweites, in welchem $p = 0$ und $q = 1$ ist.

In einer zwei Jahre später erschienenen vorläufigen Mitteilung verspricht Henri (Zs physik. Chem. 51, 19; 1905) eine neue Theorie der Enzymwirkung, welche den kolloiden Zustand der Enzyme berücksichtigt. Der gelöste Körper, etwa Zucker, soll sich nach dem Verteilungssatz zwischen der wässrigen Lösung und dem Kolloid verteilen, und für die Reaktionsgeschwindigkeit soll in erster Linie die Konzentration des Zuckers im Kolloid in Betracht kommen.

Einwandfreie Bestätigungen hat keine dieser Formeln und Theorien erfahren, und sie haben gegenwärtig hauptsächlich historisches Interesse.

2. Berechnungen von L. Michaelis.

1913 haben L. Michaelis und Miss Menten¹⁾ neue Versuche zur Kinetik der Saccharasewirkung veröffentlicht. In Rücksicht auf ihre speziellen Ziele haben sie ihre Versuche so angestellt, dass der hemmende Einfluss der Spaltprodukte der Inversion experimentell ausgeschaltet wurde. Es war hierzu nur erforderlich, bei wechselnder Anfangskonzentration des Rohrzuckers die Inversion so weit zu verfolgen, als sich der Einfluss der gebildeten

¹⁾ Michaelis und Menten, Biochem. Zs 49, 333; 1913.

Spaltprodukte noch nicht bemerkbar macht; es wurden also nur die Anfangsgeschwindigkeiten gemessen.

Aus den experimentell bestimmten Anfangsgeschwindigkeiten wurden graphisch die S. 143 wiedergegebenen Kurven erhalten.

Wir geben hier einen Auszug aus der Tab. I der zitierten Arbeit und die dieser Tabelle entsprechende Figur 20 a (S. 143) wieder.

Zeit t in Minuten	Korrigierte Drehung	Drehungs- änderung x	Anfangs- konzentration des Rohr- zuckers	Zeit t in Minuten	Korrigierte Drehung	Drehungs- änderung x	Anfangs- konzentration des Rohr- zuckers
1. 0	[14,124]	0	0,333 n	2. 0	[7,123]	0	0,167 n
1	14,081	0,043		1	7,076	0,047	
7	13,819	0,305		8	6,749	0,374	
14	13,537	0,587		16	6,528	0,595	
26	13,144	0,980		28	6,109	1,014	
49	12,411	1,713		52	5,272	1,851	
75	11,502	2,602		82	4,316	2,807	
117	10,156	3,968		103	3,592	3,531	
1052	— 4,129	18,253		24 Std.	— 2,219	9,342	
Theoretischer Endwert		18,57		Theoretischer Endwert		9,35	
3 a. 0	[3,485]	0	0,0833 n	4. 0	[1,745]	0	0,0416 n
2,5	3,440	0,045		2,25	1,684	0,061	
12,5	3,262	0,223		10,25	1,487	0,258	
49,5	1,880	1,605		30,75	0,929	0,816	
90,0	0,865	2,620		61,75	0,359	1,386	
125,0	0,340	3,145		90,75	0,061	1,684	
151,0	0,010	3,496		112,75	— 0,169	1,914	
208,0	— 0,617	4,102		132,75	— 0,339	2,084	
267,0	— 0,815	4,300		154,75	— 0,374	2,119	
24 Std.	— 0,998	4,433		1497,00	— 0,444	2,189	
Theoretischer Endwert		4,560		Theoretischer Endwert		2,247	

An diese Versuche hat Michaelis bemerkenswerte Berechnungen geknüpft, über welche hier ausführlich berichtet werden muss.

a) Verbindung Rohrzucker-Saccharase.

Michaelis macht die Annahme, dass die Saccharase mit dem Rohrzucker eine Verbindung eingehe, die sehr labil ist, und in freies Enzym, Glucose und Fructose zerfällt. Er nimmt ferner an, dass die Geschwindigkeit der Inversion proportional der jeweiligen Konzentration der Rohrzucker-Enzym-Verbindung ist.

Wir folgen nun der Darlegung von Michaelis.

„Wenn 1 Mol. Enzym mit 1 Mol. Rohrzucker eine Verbindung von 1 Mol. Zucker-Enzym-Verbindung eingeht, so lehrt das Massenwirkungsgesetz, dass stets

$$[R] \cdot [\Phi - \varphi] = K_m \varphi \quad \dots \dots \dots (1 M)$$

Hier ist:

[R] die Konzentration des freien Rohrzuckers, oder, da ja vom Rohrzucker immer nur ein verschwindend kleiner Teil durch das Enzym mit Beschlag belegt ist, auch die Gesamtkonzentration des Rohrzuckers,

Φ die gesamte molare Enzymkonzentration,

φ die Konzentration des gebundenen Enzyms oder der Enzym-Zucker-Verbindung, also

[$\Phi - \varphi$] die Konzentration des freien Enzyms,

K_m die Dissoziationskonstante der Michaelisschen Gleichung (1M).

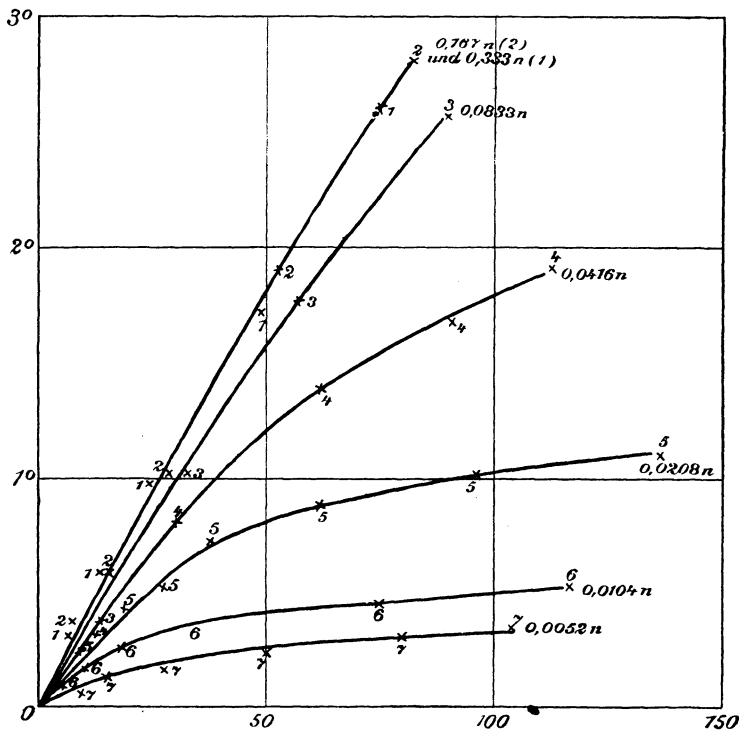


Fig. 20 a.

Hieraus folgt, dass

$$\varphi = \Phi \cdot \frac{[R]}{[R] + K_m} \quad \dots \dots \dots (2 M)$$

Dieser Menge muss also die Anfangsgeschwindigkeit v der Inversion immer proportional sein, oder

$$v = C \cdot \Phi \cdot \frac{[R]}{[R] + K_m}, \quad \dots \dots \dots (3 M)$$

wo C den Proportionalitätsfaktor bedeutet. Da wir experimentell in einem willkürlichen Masssystem messen, und da Φ in einer Versuchsserie konstant gehalten wird, so können wir

$$\frac{v}{C\Phi} \text{ einfach als } V$$

bezeichnen. V ist somit irgend eine Funktion, die aber der wahren Anfangsgeschwindigkeit proportional ist. So ist

$$V = \frac{[R]}{[R] + K_m} \dots \dots \dots (4 M)$$

Diese Funktion ist formal dieselbe wie die Dissoziationsrestkurve einer Säure (siehe S. 29 Formel (5))

$$e = \frac{[H^+]}{[H^+] + K}$$

Stellt man demgemäss V als eine Funktion von $\log [R]$ dar, so muss man die S. 30 besprochene Dissoziationsrestkurve erhalten.“

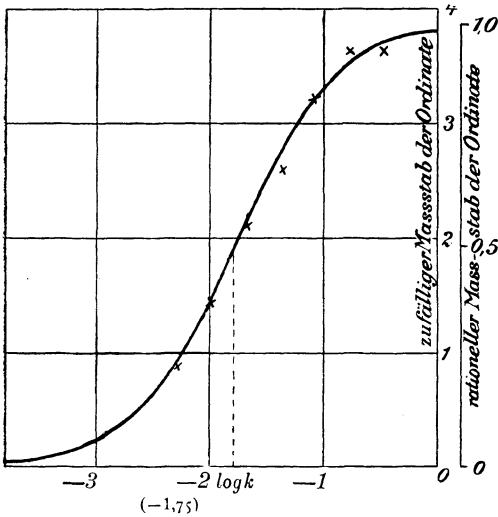


Fig. 20 b.

Wie früher wird in der nebenstehenden Fig. 20 b der Logarithmus der unabhängigen Variablen, also der Logarithmus der Anfangskonzentration des Rohrzuckers, auf die Abszisse aufgetragen. Unbestimmt bleibt hier noch, welche Strecke als Einheit der Ordinate zu wählen ist. Man weiss zunächst nur, dass der grösste Wert, welchen V (asymptotisch) erreicht, = 1 sein muss, und dass der Fusspunkt derjenigen Ordinate, welche den Wert $1/2$ besitzt, den Logarithmus von K_m anzeigen muss. Um diesen Massstab zu finden, wendet Michaelis folgendes graphische Verfahren an:

„Angenommen, wir hätten durch den Versuch eine Anzahl Punkte bestimmt, von denen wir vermuten, dass sie eine Dissoziationsrestkurve bilden. Da wir die Ordinaten dieser Punkte in einem willkürlichen Massstabe gemessen haben, so ist anzunehmen, dass dieser Massstab ein anderer sein wird, als derjenige der Abszisse. Die Funktion, die wir graphisch darstellen, ist wenn $r = \log [R]$ ist,

$$V = \frac{10^r}{10^r + K_m} \dots \dots \dots (5 M)$$

oder, wenn wir $10 = e^p$ setzen, wo p der Modul des dekadischen Logarithmen-systems = 2,303 ist,

$$V = \frac{e^{pr}}{e^{pr} + K_m} \dots \dots \dots (6 M)$$

Durch Differenzieren erhalten wir

$$\frac{dV}{dr} = \frac{p \cdot K_m \cdot e^{pr}}{(e^{pr} + K_m)^2} \cdot \dots \cdot \dots \cdot \dots \quad (7 M)$$

Dieser Differentialquotient stellt die Tangente des Neigungswinkels für das betreffende Stückchen der Kurve dar. Nun hat die Dissoziationsrestkurve ein Stück, dessen Neigungswinkel sich besonders leicht erkennen lässt, weil dieses Stück auf eine lange Strecke fast genau eine gerade Linie darstellt. Dieses ist das mittlere Stück der Kurve, im besonderen derjenige Punkt der Kurve, dessen Ordinate = $1/2$ ist. Wir wissen (vgl. S. 63 und Biochem Zs 33, 182), dass dieser Ordinate der Punkt $\log K_m$ auf der Abszisse entspricht. Setzen wir nun für V den Wert $1/2$ und für r den Wert $\log K_m$, bzw. für e^{pr} den Wert K_m , in unseren Differentialquotienten ein, so ist für $V = 1/2$

$$\frac{dV}{dr} = \frac{4}{p} = \frac{2,3026}{4} = 0,576.$$

Das bedeutet also: der mittlere, fast geradlinige Teil der Kurve hat einen Neigungswinkel gegen die Abszisse, dessen Tangente = 0,576 ist (d. h. einen Neigungswinkel von ziemlich genau 30°). Das gilt natürlich unter der Voraussetzung, dass Ordinate und Abszisse in gleichem Masse gemessen werden¹⁾. Wir verbinden nunmehr die experimentell bestimmten Punkte des mittleren Teiles unserer Kurve durch eine gerade Linie und finden etwa, dass die Tangente ihres Neigungswinkels = ν ist. Daraus können wir schliessen, dass die Einheit der Ordinate zur Einheit der Abszisse sich wie 0,576 : ν verhalten muss, d. h. die Einheit der Ordinate ist das $\frac{\nu}{0,576}$ fache der Einheit der Abszisse. Nunmehr können wir an der Ordinate den richtigen Massstab abtragen.“ (Vgl. Fig. 20 b: „rationeller Massstab“.)

„Wir bestimmen zunächst die Lage des Punktes 0,5 nach diesem neuen Massstabe. Diejenige Ordinate der Kurve, die diesem Punkt entspricht, zeigt in ihrem Fusspunkt auf der Abszisse den Wert von $\log K_m$ an. Nunmehr kennen wir K_m und können graphisch die ganze Dissoziationsrestkurve Punkt für Punkt konstruieren. Wir werden dies tun und nun nachsehen, ob alle beobachteten Werte sich dieser Kurve gut einfügen, vor allem also, ob der Wert 1 auch wirklich nicht überschritten wird. Wenn wir dieses Verfahren für unsere Versuche anwenden, so finden wir für jede Kurve einen bestimmten Wert für ν ; wir konstruieren die Kurven danach und finden bis auf eine gleich zu erwähnende Unstimmigkeit eine recht gute Übereinstimmung der beobachteten Punkte mit den berechneten.“

„Eine zweite Methode der graphischen Bestimmung des Massstabes der Ordinate ist folgende. Sind am rechten Ende der Kurve mehrere Punkte

Anm. des Verf.: Wie S. 30 erwähnt, ist dies in den Figuren 3 und 4 nicht der Fall, vielmehr sind dort die Ordinate 5- bzw. 10mal vergrössert, weshalb die Neigungswinkel entsprechend grösser sind als 30° .

gut bestimmt, von denen man sagen kann, dass sie den maximalen Wert der Ordinate praktisch erreichen, so kann man die denselben zugehörige Ordinate einfach = 1 setzen. Man konstruiert jetzt wieder den schrägen, mittleren Teil der Kurve durch geradlinige Verbindung der in diesem Abschnitt beobachteten Punkte und misst aus, welchem dieser Punkte die Ordinate 0,5 in dem neuen Massstab zukommt. Somit haben wir wieder alle Daten zur Konstruktion der Kurve.“

Die erste Methode wird man wählen, wenn die mittleren Punkte der Kurve besser experimentell festgelegt sind, die zweite, wenn die mehr am rechten Ende gelegenen Punkte der Kurve experimentell besser belegt sind. Wo es möglich ist, verwendet man beide Methoden und überzeugt sich von der Gleichheit des Resultats oder wählt, bei einer kleinen Differenz der ermittelten Dissoziationskonstante, das Mittel aus den beiden graphischen Bestimmungen als wahrscheinlichsten Wert. Durch Kombination dieser beiden Methoden hat Michaelis alle in der zitierten Arbeit gezeichneten Kurven gewonnen. In dieser Weise wurde in jedem der 4 Fälle (Kurve 1 a, 2 a, 3 a, 4 a) eine Schar von Dissoziationskurven konstruiert, und zwar für alle möglichen, auf Grund der graphischen Bestimmungen nach den beschriebenen zwei Methoden noch ins Bereich der Wahrscheinlichkeit fallenden Grössen für die Masseinheit der Ordinate; die dem Verlauf nach bestpassende wurde ausgesucht und so weit nach rechts oder links auf und abgeschoben, bis alle Beobachtungspunkte möglichst gut zu ihr stimmten. Es ist nun in der Tat möglich, in jedem der 4 Fälle eine Kurve zu finden, derart, dass die beobachteten Punkte innerhalb der erlaubten Fehlergrenzen mit ihr zusammenfallen, trotzdem die 4 Versuchsserien mit ganz verschiedenen Enzymmengen angestellt wurden.

Die Dissoziationskonstante der Saccharase-Rohrzucker-Verbindung fand Michaelis nach diesem graphischen Verfahren in den einzelnen Versuchen:

	1	2	3	4
$\log K_m =$	— 1,78	— 1,78	— 1,80	— 1,78
$K_m =$	0,0167	0,0167	0,0160	0,0167

Die Übereinstimmung ist gut, obwohl die einzelnen Versuchsserien mit verschiedenen Enzymmengen angestellt sind¹⁾. Dieses Ergebnis liefert zum erstenmal ein Bild von der Grösse der Affinität eines Enzyms zu seinem Substrat.

Der Sinn dieser Affinitätskonstante ist folgender: „Wenn wir die Enzym-Rohrzucker-Verbindung rein darstellen könnten und sie in solcher Konzentration im Wasser lösten, dass der undissoziierte Anteil derselben die Konzentration von einfach molar im Liter hätte, so wäre daneben noch in Lösung $\sqrt{0,0167}$ oder 0,133 Mol. freies Enzym und ebensoviel freier Rohrzucker.“

¹⁾ Bezüglich des Zahlenwertes siehe S. 150 u. ff.

Die Übereinstimmung der theoretischen Kurve mit den beobachteten Punkten ist von den niedersten, der Beobachtung zugänglichen Konzentrationen an Rohrzucker bis herauf zu etwa 0,4 n (entsprechend dem Logarithmus — 0,4) befriedigend. Bei noch höherer Konzentration tritt allerdings eine Abweichung ein, indem die Geschwindigkeiten wieder kleiner werden, statt konstant zu bleiben. Da aber hier schon ein Einfluss vorliegt, welcher als „Veränderung der Natur des Lösungsmittels“ zusammengefasst werden kann, so darf man wohl von den Abweichungen, welche sich bei den ca. 25%igen Rohrzuckerlösungen zeigen, absehen.

b) Einfluss der Spaltprodukte.

Im Anschluss an obige Messungen hat Michaelis auch den Einfluss der Spaltprodukte des Rohrzuckers zahlenmässig bestimmt. Er verfuhr dazu folgendermassen:

In einer Rohrzuckerlösung wird, wie vorher, die von einer bestimmten Enzymmenge hervorgerufene Anfangsgeschwindigkeit der Hydrolyse bestimmt. Nunmehr wird in einem zweiten Versuch ausserdem noch eine bestimmte Menge Fructose (bzw. Glucose) hinzugefügt und die Anfangsgeschwindigkeit der Rohrzuckerspaltung verglichen. Wir führen eine der von Michaelis und Menten (l. c. 351) gegebenen Versuchsreihen an.

Tab. 5 M.

Zeit in Minuten	Drehung	Drehungsänderung	Konzentration
<i>I</i> 0,0	[3,905]	0,000	Rohrzucker 0,1 n
0,5	3,896	0,009	
15,0	3,640	0,365	
30,0	3,183	0,722	
<i>I</i> 0,0	[3,926]	0,000	Rohrzucker 0,1 n
(wiederholt) 0,5	3,915	0,011	
30,0	3,223	0,703	
46,0	2,971	0,935	
<i>II</i> 0,0	[5,643]	0,000	Rohrzucker 0,1 n
0,5	5,633	0,010	Glucose 0,1 n
30,0	5,033	0,610	
46,0	4,788	0,855	
<i>III</i> 0,0	[1,322]	0,000	Rohrzucker 0,1 n
0,5	1,013	0,009	Fructose 0,1 n
30,0	0,463	0,554	
46,0	0,237	0,785	

Durch Vergleich der ohne Fructose und bei Gegenwart derselben gemessenen Anfangsgeschwindigkeit wurde nun gefunden, dass dieselbe im

zweiten Fall verringert ist.“ Wir können daraus schliessen, dass die Konzentration der Rohrzucker-Enzym-Verbindung im zweiten Falle kleiner ist als im ersten, immer vorausgesetzt, dass die Anfangsgeschwindigkeit uns stets ein genaues Mass für die Konzentration der Rohrzucker-Enzym-Verbindung abgibt. Sind also v_0 und v die beiden Anfangsgeschwindigkeiten, φ_0 und φ die entsprechenden Konzentrationen der Rohrzucker-Enzym-Verbindung, so ist

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

Wenn sich nun die Enzymmenge Φ zwischen der Rohrzuckermenge R und der Fructosemenge F verteilt, und wenn φ die Konzentration der Rohr-

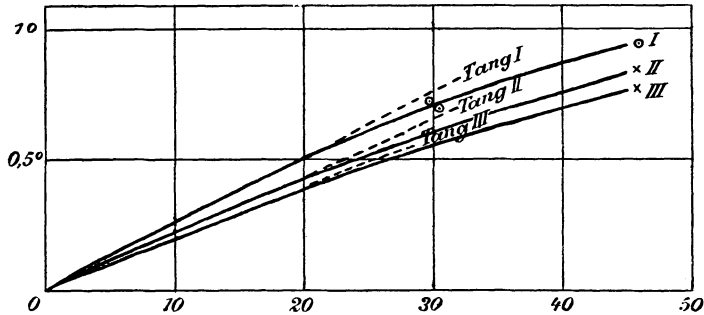


Fig. 21.
Graphische Darstellung der Zahlen der Tabelle 5 M.
Einfluss von Glucose und Fructose.

zucker-Enzym-Verbindung und ψ die der Fructose-Enzym-Verbindung ist, so ist nach dem Massenwirkungsgesetz

$$R(\Phi - \varphi - \psi) = K_m \cdot \varphi,$$

$$F(\Phi - \varphi - \psi) = K_{m1} \psi,$$

wo K_m und K_{m1} die beiden Affinitätskonstanten sind.

Aus diesen beiden Gleichungen folgt durch Elimination von ψ

$$K_{m1} = \frac{F \cdot K_m}{R \left(\frac{\Phi}{\varphi} - 1 \right) - K_m} \dots \dots \dots (8M)$$

$\frac{\Phi}{\varphi}$ erfährt man auf folgende Weise: Macht man einen Parallelversuch ohne Fructose, so habe dieser die Anfangsgeschwindigkeit v_0 und die Konzentration der Rohrzucker-Enzym-Verbindung sei φ_0 ; im eigentlichen Hauptversuch mit Fructose seien diese beiden Grössen gleich v bzw. φ , so ist

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

und $\varphi = \frac{v}{v_0} \cdot \varphi_0.$

In dem fructosefreien Kontrollversuch ist nun nach Seite 143, Gleichung (2M)

$$\varphi_0 = \Phi \cdot \frac{R}{R + K_m},$$

und so wird

$$\varphi = \frac{v}{v_0} \cdot \Phi \cdot \frac{R}{R + K_m}, \quad \dots \dots \dots (9M)$$

oder

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

und schliesslich durch Einsetzen dieses Wertes in (8M)

$$K_{m1} = \frac{F \cdot K_m}{(R + K_m) \left(\frac{v_0}{v} - 1 \right)}. \quad \dots \dots \dots (10M)$$

Bei der Anlage solcher Versuche muss man vermeiden, dass die Gesamtkonzentration an Kohlehydraten zu hoch wird — man wird über 0,3-Normalität nicht hinausgehen — um die Natur des Lösungsmittels nicht zu verändern. Hierdurch ist die Notwendigkeit gegeben, mit verhältnismässig niederen Konzentrationen von Rohrzucker zu arbeiten. Damit entsteht aber gleichzeitig die Unbequemlichkeit, dass die Geschwindigkeit des Umsatzes nicht lange gleichförmig bleibt, sondern schon nach ziemlich kleinen Umsätzen die Kurve von der Geraden abzuweichen beginnt, so dass die Anfangsgeschwindigkeit nur aus kleinen Drehungsänderungen oder durch eine graphische Extrapolation ermittelt werden kann, bei der eine gewisse Willkürlichkeit nicht zu vermeiden ist.

Wie Michaelis selbst hervorhebt, können die Resultate bezüglich der Affinität der Spaltprodukte bei der Art des zur Verfügung stehenden Ermittlungsverfahrens auf grosse Genauigkeit bisher keinen Anspruch machen; immerhin wird uns die Berechnung eine richtige Vorstellung von der Grössenordnung der uns interessierenden Zahlen geben.

Aus seinen Versuchen hat Michaelis folgende Mittelwerte erhalten:

$\frac{K_{\text{Rohrzucker}}}{K_{\text{Glucose}}} =$	4,7	4,6	5,3	6,7	Mittel
$\frac{K_{\text{Rohrzucker}}}{K_{\text{Fructose}}} =$	3,0	3,2	3,3	4,3	3,45

Auf dieselbe Weise wurde der hemmende Einfluss einiger anderer Substanzen gemessen.

Wir geben nun folgende von Michaelis nach (3 M bzw. 10 M) S. 143 und 149 ermittelten Werte an.

Zuckerart	K_M Affin.-Konst.
Rohrzucker	60
Fructose	17
Glucose	11
Mannose	12

3. Neue Versuche über die Affinität zwischen Enzym und Substrat.

Bei einer Prüfung der Michaelis'schen Theorie im Falle der Saccharase konnten Euler und Laurin¹⁾ die Ergebnisse von Michaelis und Menten insofern bestätigen, als in der von den genannten Autoren angegebenen Weise konstante Zahlen der Affinitätskonstante (oder deren reziproken Wert, der Dissoziationskonstante) der Enzym-Rohrzucker-Verbindung berechnet werden konnten.

Aber dieser Zahlenwert der Konstanten K_M wurde von Euler und Laurin etwas abweichend vom Michaelis'schen Wert gefunden. Als Mittel aus den Messungen Laurins berechnet sich nämlich $K_M = 38$ ($K_m = 1/K_M = 0,026$), während das Michaelis'sche Resultat $K_M = 60$ ($K_m = 0,016$) war. Diese Abweichungen der Zahlenwerte sprechen für die Existenz verschiedener Saccharasen mit verschiedenen Affinitäten zum Substrat.

Die variierende Grösse der Konstanten K_M wurde später von Kuhn²⁾ bei der Untersuchung einer Reihe Saccharasen aus verschiedenen Hefen bestätigt. Er fand Werte von K_M zwischen 25 und 62. Auch die mit denselben Enzympräparaten ausgeführten Bestimmungen der Affinitätskonstanten der Enzym-Raffinoseverbindungen wiesen ähnliche Schwankungen auf, wenn die Enzympräparate aus verschiedenem Hefematerial hergestellt waren. Dagegen zeigten Präparate verschiedener Reinheitsgrade denselben Wert von K_M , wenn sie aus derselben Hefe stammten. Das Verhältnis

$$\frac{\text{Affinität zu Rohrzucker}}{\text{Affinität zu Raffinose}}$$

erwies sich bei den verschiedenen Präparaten innerhalb der Versuchsfehler auch dann als konstant, wenn die absoluten Werte der zwei Affinitätskonstanten für die verschiedenen Präparate wechselten.

Die Ursache dieser Variation ist zu suchen entweder in einer Verschiedenheit der Enzymmoleküle selbst oder darin, dass die aus verschiedenen Hefen stammenden Präparate verschiedene, die Affinität beeinflussende, dem Enzym vielleicht nahestehende Körper enthalten. Aus seinen Versuchen schliesst Kuhn, dass die letztere Annahme sich am besten mit den Versuchsergebnissen in Einklang bringen lässt. Die Tatsache, dass Präparate aus demselben Ausgangsmaterial, aber von verschiedenen Reinheitsgraden dieselbe Affinität zum Substrat haben, zeigt aber, dass die Eigenschaften der von Kuhn angenommenen Begleitstoffe mit denen des Enzyms so weitgehend übereinstimmen müssen, dass es fraglich bleibt, ob man nicht diese „Begleitstoffe“ mit gleich grossem Recht als einen Bestandteil des Enzymkomplexes ansehen kann. Die von Kuhn gemachte Annahme der konstanten und charakteristischen Affinität des Enzyms unabhängig vom Ursprung bedarf somit einer

¹⁾ Euler und Laurin, H. 110, 55; 1920.

²⁾ Kuhn, H. 125, 28; 1923.

stärkeren Begründung. (Über Schwankungen in den Affinitätsverhältnissen der Saccharase siehe auch den folgenden Abschnitt 4.)

Einfluss der Acidität auf die Affinität. Sowohl Euler und Laurin wie Kuhn haben festgestellt, dass die Affinität zwischen Saccharase und Rohrzucker auf dem alkalischen Zweig der Aciditätskurve unabhängig von der Acidität und gleich der Affinität beim p_H -Optimum ist. Es ist dabei anzunehmen, dass die Affinität des Rohrzuckers zu der undissoziierten Saccharase und zu ihren Anionen wenigstens sehr nahe gleich ist¹⁾.

Andersartig als im alkalischen Gebiet von Optimum liegen die Verhältnisse im sauren Gebiet. Josephson²⁾ konnte nämlich zeigen, dass bei höherer Acidität die Affinität der untersuchten Saccharase zu Rohrzucker deutlich vermindert ist. Es wurden für die folgenden Aciditäten die darunterstehenden Affinitätskonstanten K_M der Saccharase-Rohrzucker-Verbindungen berechnet:

p_H	4,5	2,77	2,63
K_M	54	35	22

Wegen dieser Verminderung der Affinität im sauren Gebiet muss der Verlauf der Aciditätskurve der Saccharase auf der sauren Seite anders gedeutet werden als der Verlauf auf der alkalischen Seite dieser Kurve; ich erinnere hierzu an die Erörterungen Seite 67 u. ff.

4. Die bisher gemessenen Werte von K_M .

Auch in anderen Fällen konnte die Affinität zwischen Enzym und Substrat berechnet und zahlenmässig durch die Angabe einer Affinitätskonstante der Enzym-Substrat-Verbindung charakterisiert werden. Es folgt hier eine Zusammenstellung einiger solcher Affinitätskonstanten:

Enzym	Substrat	K_M	Autoren	Literatur
Saccharase	Rohrzucker	25—65	Michaelis u. Menten Kuhn Euler u. Laurin Josephson	Biochem. Zs 49, 333; 1913. H. 125, 28; 1923. H. 110, 55; 1920. H. 134, 50; 1924.
Raffinase (Saccharase)	Raffinose	1,3—4,2	Kuhn	H. 125, 28; 1923.
Maltase	Maltose	3,3—8,3	Willstätter, Kuhn u. Sobotka	H. 134, 224; 1924.
Maltase	α -Methylglucosid	13—26	Willstätter, Kuhn u. Sobotka	H. 134, 224; 1924.
Maltase	α -Phenylglucosid	20—48	Willstätter, Kuhn u. Sobotka	H. 134, 224; 1924.

¹⁾ Euler, Josephson und Myrbäck, H. 134, 39; 1924.

²⁾ Josephson, H. 134, 50; 1924.

Enzym	Substrat	K _M	Autoren	Literatur
Emulsin	β-Methylglucosid	0,9—2,5	Willstätter, Kuhn u. Sobotka	H. 129, 33; 1923.
Emulsin	β-Phenylglucosid	15—25	Willstätter, Kuhn u. Sobotka	H. 129, 33; 1923.
Emulsin	Salicin	24—59	Willstätter, Kuhn u. Sobotka	H. 129, 33; 1923.
Katalase	Wasserstoffperoxyd	22	Hennichs	Biochem.Zs 145, 286; 1923.
Urease	Harnstoff	etwa 90	Euler u. Josephson nach Vers. von van Slyke u. Lövgren	Ber. 56, 1749; 1923.

5. Affinität zwischen Enzym und Reaktionsprodukten bzw. zwischen Enzym und anderen Substanzen.

Wie Henri, Barendrecht, E. F. Armstrong gezeigt haben, wird die Spaltung des Rohrzuckers durch Zusatz verschiedener Stoffe und spez. Zuckerarten gehemmt. Wie schon im zweiten Abschnitt erwähnt wurde, haben Michaelis und Menten diese Hemmung zahlenmässig durch Angaben von Affinitätskonstanten, wie

$$\frac{[\text{Enzym-Glucose}]}{[\text{Enzym}] \cdot [\text{Glucose}]} = K$$

in einigen Fällen berechnen können.

Diese älteren Untersuchungen haben aber keine Rücksicht auf die Mutarotationsisomerie der Zuckerarten genommen. Neuere Untersuchungen haben aber gezeigt, dass im allgemeinen die Affinität der Saccharase zu den verschiedenen Mutameren eines Zuckers nicht gleich gross ist. So fand Kuhn¹⁾, dass die Affinität der von ihm untersuchten Saccharase zur α-Form der Glucose unmessbar klein war im Verhältnis zu der Affinität zur β-Form dieses Zuckers. Euler und Josephson²⁾ fanden bei der Untersuchung einer anderen Saccharase (aus Unterhefe H) die Affinität zu α-Glucose zwar kleiner als die Affinität zu β-Glucose, aber die Differenz war nur unbedeutend. Gerade wie die Affinität zu den Substraten können die Affinitäten zu anderen Zuckerarten für verschiedene Saccharasen verschiedenartig sein. Diese Tatsache spricht für die Existenz verschiedener Saccharasen.

Von erheblichem Interesse ist der Befund Kuhn's³⁾, dass das rohrzucker-spaltende Enzym in *Aspergillus oryzae* (Taka-Saccharase) ganz andere Affinitätsverhältnisse zeigt als die von Kuhn untersuchte Kulturhefe-Saccharase. Die folgende Tabelle betrifft die Hemmung der durch diese zwei Saccharasen

¹⁾ Kuhn, H. 127, 234; 1923.

²⁾ Euler und Josephson, H. 132, 301; 1924. — Josephson, H. 134, 50; 1924. 136, 62; 1924.

³⁾ Kuhn, H. 129, 57; 1923.

bewirkten Rohrzuckerspaltung bei Zusatz der Spaltprodukte der Hydrolyse; die Verschiedenheiten treten deutlich hervor:

	Hefe-Saccharase	Taka-Saccharase
α -Glucose	hemmt nicht	hemmt stark,
β -Glucose	hemmt	hemmt nicht,
Fructose	hemmt	hemmt nicht.

Dieselben Unterschiede bezüglich der reaktionshemmenden Eigenschaften der Glucose und Fructose wie bei *Aspergillus oryzae* scheinen auch bei *Penicillium glaucum* vorzuliegen¹⁾.

Auch andere Zuckerarten hemmen die Rohrzuckerspaltung. Die folgende Tabelle zeigt die Ergebnisse von Euler und Josephson bei ihrer Untersuchung einer Saccharase (aus Unterhefe H):

Zucker	Hemmung durch	
	α -Form	β -Form
Glucose	hemmt	hemmt
Fructose	Gleichgewichts-Fructose hemmt	"
Mannose	Gleichgewichts-Mannose hemmt	"
Galaktose	hemmt nicht oder schwach	"
Arabinose	hemmt nicht oder schwach	"
Xylose	hemmt	"
Rhamnose	hemmt nicht oder schwach	"

Zu dieser Tabelle sind noch folgende Beziehungen besonders hervorzuheben: Glucose und Xylose, welche ja bezüglich Konfiguration übereinstimmen, zeigen Ähnlichkeit auch in der Hinsicht, dass von diesen Zuckern sowohl α - wie β -Formen die Inversion hemmen. Galaktose und Arabinose zeigen auch Ähnlichkeiten bezüglich sowohl Konfiguration wie Affinität zu Saccharase. Hemmungsversuche mit je zwei Zuckern fehlen noch.

Eine Hemmung durch Disaccharide (Biosen), welche hydrolysierbar sind, aber nicht das Substrat bilden, ist nicht nachgewiesen.

Versuche über Hemmung durch Glucoside verdankt man Michaelis und Pechstein²⁾, sowie Kuhn³⁾. Bei den Glucosiden trifft man die Tatsache, dass die Hemmung durch Zusatz einer bestimmten Menge Glucosid prozentisch immer gleich gross ist, wie auch die Rohrzuckerkonzentration variiert wird. Diese Hemmung ist somit andersartig als z. B. die durch Fructose bedingte. Ähnliche Verhältnisse treten bei Maltase nach Michaelis und Rona⁴⁾ auf.

Was andere Enzyme betrifft, so ist noch zu erwähnen, dass die schon

¹⁾ Euler, Josephson und Söderling, H. 139, 1; 1924.

²⁾ Michaelis und Pechstein, Biochem. Zs 60, 79; 1914.

³⁾ Kuhn, H. 135, 1; 1924.

⁴⁾ Michaelis und Rona, Biochem. Zs 60, 62; 1914.

von Armstrong¹⁾, sowie von Herzog und Kasarnowski²⁾ beobachtete Hemmung der Maltase durch Glucose nach Kuhn³⁾ bei den beiden Formen der Glucose nahezu gleich gross ist.

Über Emulsin (β -Glucosidase) liegen Angaben von Armstrong, Henri und Kuhn vor. Nach letzterem Autor ist es nur die β -Form der Glucose, welche die Spaltung des Salicins und Helicins hemmt. Die β -Glucosidase des Emulsins sollte somit nur zu derjenigen Form der Glucose eine messbare Affinität besitzen, auf deren Derivate sich die hydrolytische Wirksamkeit beschränkt.

Im Zusammenhang zwischen der Konfiguration verschiedener Stoffe und ihrer Affinität zu Enzymen lassen sich bereits gewisse Regelmässigkeiten und Gesetzmässigkeiten aufspüren. Die Erforschung solcher Beziehungen ist für die Enzymchemie zweifellos von wesentlicher Bedeutung, da gerade die Affinitätsverhältnisse besonders geeignet sind, Klarheit über die wichtige Frage zu bringen, wie und an welcher Gruppe die Bindung zwischen Enzym und Substrat zustande kommt.

Die Bindung zwischen Enzym und Substrat als Sorptionserscheinung.

Von verschiedenen Forschern ist wiederholt energisch die Auffassung vertreten worden, dass die Verbindungen zwischen Enzymen und ihren Substraten, welche als Zwischenprodukte die Enzymreaktionen vermitteln, Adsorptionsverbindungen sind, bzw. durch Adsorptionsprozesse zustande kommen.

Bei der Diskussion mancher von Kolloid-Chemikern gegebenen Darstellungen⁴⁾ wäre zunächst zu fragen, worin die genannten Forscher den Unterschied zwischen Adsorptionsverbindungen und chemischen Verbindungen erblicken und wie sie die Besonderheit der Adsorptionsverbindungen präzisieren.

Fasst man unter der Bezeichnung Adsorption, dem gegenwärtigen Stand der Forschung gemäss, solche Vorgänge zusammen, welche auf chemischen Austausch- und Bindungsreaktionen an Phasengrenzflächen beruhen oder welche durch elektrochemische Kräfte veranlasst werden, gibt man also zu, dass die Sorptionen — von der Verdichtung von Gasen und Dämpfen an festen Körpern abgesehen, — chemische, auf die oberste Molekülschicht des

¹⁾ Armstrong, Proc. Roy. Soc. London, 73, 516, und zwar 520; 1904.

²⁾ Herzog und Kasarnowski in C. Oppenheimer, Die Fermente, 4. Aufl., Bd. II, S. 988; 1913.

³⁾ Kuhn, H. 127, 234; 1923.

⁴⁾ Bayliss, Proc. Roy. Soc. 84, 81; 1911. — Fodor, Fermentproblem, Leipzig 1920. — Siehe auch Mlle. Philoche, JI de Chim. Phys. 6, 212; 1908. — Vgl. auch die gegen Bayliss' Darstellung gemachten Einwände von Brailsford Robertson, JI Biol. Chem. 4, 35; 1908.

Sorbens beschränkte Reaktionen sind, so wird eine prinzipielle Gegenüberstellung von Adsorptionsvorgängen und chemischen Vorgängen gegenstandslos.

Von vornherein darf vielleicht betont werden, dass Adsorption ja überhaupt nur in Frage kommen kann, wenn es sich um heterogene Systeme handelt, also um Flüssigkeiten, in welchen die Partikeln wenigstens ultramikroskopisch sichtbar sind; dies ist keineswegs immer der Fall; in hochgereinigten Saccharaselösungen z. B. ist sogar der Tyndall-Effekt kaum wahrnehmbar.

Wenn ein Kolloid mit einem anderen oder mit einem Krystalloid, etwa einem einfachen binären Elektrolyten, reagiert, so kommt es vor, dass die zuerst und mit grosser Geschwindigkeit eintretende Bindung nicht die stabilste ist, sondern mit geringerer Geschwindigkeit in eine beständigere übergeht. Ein solcher Fall liegt z. B. vor bei der Einwirkung von verdünnten Säuren auf gewisse kolloide Metallhydroxyde, wie $\text{Al}(\text{OH})_3$. Die zuerst entstehende Verbindung ist ihrer chemischen Natur nach noch nicht näher bekannt, es mag für dieselbe also das Wort Adsorptionsverbindung angewandt werden, wenn man sich nur bewusst ist, dass damit über die betreffende Verbindung nichts ausgesagt wird.

Ob man Enzymlösungen als homogene oder als heterogene Systeme behandeln soll, lässt sich, da ja der Dispersitätsgrad stark wechselt, und bei Enzymen auch verhältnismässig kleine Molekulargewichte vorzukommen scheinen (Willstätters Peroxydase), nicht allgemein entscheiden.

Bei denjenigen Enzymen, deren Dispersitätsgrad wirklich oder scheinbar (infolge von Verunreinigungen) klein ist, wo sich also die enzymhaltige Flüssigkeit einer Suspension nähert, wird die enzymatische Wirksamkeit nicht proportional der Masse, sondern proportional der Oberfläche sein, und das Verhältnis Masse : Oberfläche kann zeitlichen Veränderungen unterliegen.

Unter diesen Umständen ist also nur die oberste Molekülschicht der Enzymteilchen wirksam und wir können dann folgende Fälle unterscheiden:

Entweder ist die Affinität des Substrates zum Enzym genügend gross und die Konzentration des Substrates in der Lösung genügend hoch, dass eine Sättigung der Oberfläche der Enzympartikel erreicht ist. Solange dies zutrifft, wird die Molekulart Enzym-Substrat proportional mit der Menge Enzym wachsen und proportional mit ersterer die Reaktionsgeschwindigkeit.

Oder aber die Sättigung des Enzyms mit dem Substrat wird nicht erreicht, sondern die Verbindung befindet sich im Dissoziationsgebiet, dann gelten die Beziehungen, wie für heterogene Hydrolysen oder für Dissoziationen im heterogenen System; Enzymkonzentration und Reaktionsgeschwindigkeit sind dann nicht mehr proportional.

Zu den Schwierigkeiten, welche die theoretische Behandlung solcher Fälle bietet, kommt dann noch der Umstand, dass sich in kolloidhaltigen

Enzymlösungen Alterserscheinungen und zeitlich variierende „Verfestigungen“ von Bindungen geltend machen. Deswegen werden die hochgereinigten Enzymlösungen in der Regel günstigere und einfachere Fälle zum Studium der Enzymkinetik darbieten, als die Lösungen solcher Enzyme, bei welchen die Reinigungsarbeit noch nicht so weit fortgeschritten ist. Immerhin ist es in der oben angedeuteten Weise vielleicht möglich, auch solche Beziehungen, wie sie Hedin¹⁾ am Trypsin gefunden hat, mit dem Massenwirkungsgesetz in Übereinstimmung zu bringen.

Abschliessend mag noch hervorgehoben werden, dass es besonders schwer sein würde, den hohen Grad der Spezifität der Bindungen zwischen Enzym und Substrat in anderer Weise zu erklären, als durch die grossen Verschiedenheiten der vom chemischen Bau der beteiligten Moleküle abhängigen chemischen Affinität zwischen denselben.

C. Die Reaktionsgleichung der enzymatischen Rohrzuckerspaltung nach Michaelis.

Michaelis war durch die von ihm gewonnenen Daten imstande, die Reaktionsgleichung der Inversion durch Saccharase auf rationelle Weise und ohne Zuhilfenahme von mehr als einer willkürlichen Konstanten zu lösen.

Die Grundannahme dieser Ableitung ist die, dass die Zerfallsgeschwindigkeit in jedem Augenblicke der Konzentration der Rohrzucker-Saccharase-Verbindung proportional ist, und dass die Konzentration dieser Verbindung in jedem Augenblicke bestimmt wird durch die Konzentration des Enzyms, des Rohrzuckers und der ebenfalls an das Enzym bindungsfähigen Spaltprodukte. Dabei werden einzeln eingeführt die Dissoziationskonstante der Rohrzucker-Enzym-Verbindung, $K_m = 1/60$, diejenige der Fructose-Enzym-Verbindung, $K_{m_1} = 1/17$, und diejenige der Glucose-Enzym-Verbindung, $K_{m_2} = 1/11$.

Wir wenden ausserdem folgende Bezeichnungen an:

ϕ	=	die gesamte Enzymkonzentration,	
φ	=	die Konzentration der Rohrzucker-Enzym-Verbindung,	
ψ_1	=	„ „ „ Fructose-Enzym-Verbindung,	
ψ_2	=	„ „ „ Glucose-Enzym-Verbindung,	
R	=	„ „ des Rohrzuckers	} d. h. die Konzentration des betr., in freiem Zustande vorhandenen Zuckers, was aber praktisch gleich der des gesamten betr. Zuckers ist.
F	=	„ „ der Fructose	
G	=	„ „ „ Glucose	

Da bei der Spaltung stets gleichviel Fructose und Glucose entsteht, ist G stets gleich F.

¹⁾ Hedin, H. 57, 468; 1908.

Nun ist in jedem Augenblick nach dem Massenwirkungsgesetz

$$R(\Phi - \varphi - \psi_1 - \psi_2) = K_m \varphi \quad \dots \dots \dots (11 M)$$

$$F(\Phi - \varphi - \psi_1 - \psi_2) = K_{m1} \psi_1 \quad \dots \dots \dots (12 M)$$

$$G(\Phi - \varphi - \psi_1 - \psi_2) = K_{m2} \psi_2 \quad \dots \dots \dots (13 M)$$

Aus (11 M) folgt

$$\varphi = \frac{R(\Phi - \psi_1 - \psi_2)}{R + K_m} \quad \dots \dots \dots (14 M)$$

Wir können ψ_1 und ψ_2 eliminieren, indem wir zunächst durch Division von (12 M) und (13 M) finden:

$$\psi_2 = \frac{K_{m1}}{K_{m2}} \cdot \psi_1,$$

und weiter durch Division von (11 M) und (12 M):

$$\psi_1 = \frac{K_m}{K_{m1}} \cdot \varphi \cdot \frac{F}{R},$$

so dass

$$\psi_1 + \psi_2 = K_m \cdot \varphi \cdot \frac{F}{R} \left(\frac{1}{K_{m1}} + \frac{1}{K_{m2}} \right).$$

Bezeichnen wir zunächst zur Abkürzung

$$\frac{1}{K_{m1}} + \frac{1}{K_{m2}} = q,$$

so ist

$$\psi_1 + \psi_2 = K_m \cdot q \cdot \varphi \cdot \frac{F}{R}.$$

Dieses ergibt, in (14 M) eingesetzt und nach φ aufgelöst,

$$\varphi = \Phi \cdot \frac{R}{R + K_m(1 + qF)} \quad \dots \dots \dots (15 M)$$

Nunmehr können wir zur Differentialgleichung gelangen. Ist

a die Anfangsmenge des Rohrzuckers,

t die Zeit,

x die zur Zeit t vorhandene Menge Fructose oder Glucose, also

a-x die zur Zeit t noch vorhandene Menge Rohrzucker,

so ist die Zerfallsgeschwindigkeit zur Zeit t definiert durch

$$v_t = \frac{dx}{dt}$$

Nach der Grundannahme ist diese proportional φ , so dass die Differentialgleichung mit Benutzung der Gleichung (15 M) lautet:

$$\frac{dx}{dt} = C \cdot \frac{a - x}{a + K_m - x(1 - K_m q)}, \quad \dots \dots \dots (16 M)$$

wo C die einzige willkürliche Konstante darstellt; und zwar ist diese der Enzymmenge proportional.

Das allgemeine Integral der Gleichung ergibt sich ohne rechnerische Schwierigkeit:

$$C \cdot t = (1 - K_m q) x - K_m(1 + aq) \ln(a - x) + \text{konst.}$$

Zur Eliminierung der Integrationskonstanten subtrahieren wir in obiger Gleichung die für den Anfangszustand des Prozesses, also für $x = 0$ und $t = 0$, geltende Gleichung

$$0 = K_m(1 + aq) \ln a + \text{konst.},$$

woraus sich das bestimmte Integral ergibt:

$$C \cdot t = K_m(1 + aq) \cdot \ln \frac{a}{a-x} + (1 - K_m q) x, \quad \dots \quad (17 M)$$

oder nach Einsetzung des Wertes für q

$$\frac{K_m}{t} \left(\frac{1}{a} + \frac{1}{K_{m_1}} + \frac{1}{K_{m_2}} \right) \cdot a \ln \frac{a}{a-x} + \frac{K_m}{t} \left(\frac{1}{K_m} - \frac{1}{K_{m_1}} - \frac{1}{K_{m_2}} \right) x = C.$$

Bezieht man nun noch K_m auf die rechte Seite in die Konstante ein, so erhält man:

$$\frac{1}{t} \left(\frac{1}{a} + \frac{1}{K_{m_1}} + \frac{1}{K_{m_2}} \right) \cdot a \cdot \ln \frac{a}{a-x} + \frac{1}{t} \left(\frac{1}{K_m} - \frac{1}{K_{m_1}} - \frac{1}{K_{m_2}} \right) x = \text{konst.} \quad (18 M)$$

Für diese Funktion ist, wie für die Henri'sche (S. 140), charakteristisch, dass sie sich durch Superposition einer geradlinigen und einer logarithmischen Funktion ergibt, von dem Typus

$$m \cdot \ln \frac{a}{a-x} + n \cdot x = t \cdot \text{konst.},$$

wo m und n die aus der vorigen Gleichung ersichtliche Bedeutung haben: es sind Faktoren, deren Grössen von den einzelnen Dissoziationskonstanten und der Anfangsmenge des Zuckers bestimmt werden.

Setzen wir die für die Versuchstemperatur von 25° von Michaelis ermittelten Werte von K_m , K_{m_1} und K_{m_2} ein, so wird

$$\frac{1}{t} (1 + 28a) \cdot 2,303 \log \frac{a}{a-x} + \frac{1}{t} \cdot 32 \cdot x = \text{konst.} \quad \dots \quad (19 M)$$

Statt $\log \frac{a}{a-x}$ schreiben wir für die Rechnung einfacher $-\log \left(1 - \frac{x}{a} \right)$.

Diese Konstante muss der Enzymkonzentration proportional sein. Dass dies der Fall ist, geht aus der S. 137—138 zitierten Untersuchung hervor; besonders wurde von L. Michaelis und H. Davidsohn (l. c. S. 398—400) gezeigt, dass eine Gleichung der Form zutrifft

$$\text{Enzymmenge} \times \text{Zeit} = f(a, x).$$

Es bleibt also nur noch zu prüfen, ob diese Konstante bei gleicher Enzymmenge, aber wechselnder Zuckermenge die gleiche bleibt, und ob sie überhaupt innerhalb eines einzelnen Versuchs unabhängig von der Zeit ist. Michaelis verwendet dazu die oben, S. 142 wiedergegebene Versuchsserie.

Die in dieser Tabelle in willkürlichen polarimetrischen Masseinheiten dargestellten Ergebnisse werden nun in Mole umgerechnet.

Nach der früher angegebenen Beziehung $L^0 = R^0 (0,440 - 0,005 \theta)$ ergibt sich die Enddrehung $L^0 = -R^0 \cdot 0,313$.

[Hudson gibt an: $L^0 = R^0 (0,417 - 0,005 \theta)$].

Wir führen hier das Ergebnis für 2 Rohrzuckerkonzentrationen an.

Zeit (t)	$\frac{x}{a}$	k	Mittel	Zeit (t)	$\frac{x}{a}$	k	Mittel
I. Rohrzucker 0,333 n.				II. (IV.) Rohrzucker 0,0416 n.			
7	0,0164	0,0496		10,25	0,1147	0,0406	
14	0,0316	0,0479		30,75	0,3722	0,0489	
26	0,0528	0,0432		61,75	0,615	0,0467	
49	0,0923	0,0412		90,75	0,747	0,0438	
75	0,1404	0,0408		112,70	0,850	0,0465	
117	0,2137	0,0407		132,70	0,925	0,0443	
1052	0,9834	[0,0498]	0,0439	154,70	0,940	0,0405	
				1497,00	0,972	[0,0514]	0,0445

Michaelis hat auch in drei anderen Fällen die Konstanten berechnet. Sämtliche stimmen gut überein und zeigen weder einen „Gang“ mit der Zeit noch mit der Zuckerkonzentration.

Willstätter, Graser und Kuhn¹⁾ fanden bei drei Präparaten die nach der Michaelis'schen Berechnungsweise ermittelten Konstanten in Übereinstimmung mit der Theorie, in einem anderen Falle dagegen die nach der gewöhnlichen monomolekularen Reaktionsformel ermittelten Koeffizienten konstant. Euler und Myrbäck²⁾ fanden bei ihren Präparaten die Michaelis'sche Berechnungsweise bestätigt.

Allerdings steht es fest, dass verschiedene Saccharasepräparate sehr verschiedenartige Kinetik zeigen. Die Annahmen von Michaelis mussten in einiger Hinsicht ergänzt werden.

Einfluss der Mutarotationsisomerie der Spaltprodukte auf die Kinetik.

Die Grundlage der Theorie von Michaelis ist ja der Einfluss der Reaktionsprodukte auf die Wirksamkeit des Enzyms. Nun steht es fest, dass die Mutarotationsisomerie der bei der Spaltung des Rohrzuckers auftretenden Glucose in einigen Fällen eine grosse Rolle für die Affinität des Enzyms spielt (Kuhn), in anderen Fällen dagegen von weniger Bedeutung ist (Euler und Josephson). Die verschiedene Kinetik verschiedener Präparate wäre somit in diesen Verschiedenheiten der Präparate zu suchen³⁾.

Bestimmend für die Kinetik ist offenbar das Verhältnis der Affinitäten zum Substrat und zu den verschiedenen Reaktionsprodukten. In denjenigen Fällen, in welchen die Affinität zu den beiden Formen der Glucose (eventuell auch zu den verschiedenen Formen der Fructose) ungleich ist, muss die Geschwindigkeit der Mutarotation auch für die

¹⁾ Willstätter, Graser und Kuhn, H. 123, 1 und zwar 63 ff.; 1923.

²⁾ Euler und Myrbäck, H. 129, 100; 1923.

³⁾ Euler und Josephson, H. 132, 301 und zwar 324; 1924. — Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi, Bd. 9 Nr. 4; 1924. — Josephson, H. 134, 50 und zwar 64; 1924.

Kinetik der Rohrzuckerspaltung massgebend sein. In den Fällen (wie bei der von Euler und Josephson studierten Saccharase), wo die Mutarotationsisomerie von unwesentlicher Bedeutung für die Affinität ist, macht sich dagegen die Mutarotation nicht geltend. Es muss somit für verschiedene Saccharasen eine verschiedene Kinetik der Rohrzuckerspaltung gelten. Auch der ungleiche Einfluss der Acidität auf die Kinetik ist in derselben Weise zu erklären. In einigen Fällen ändert sich die Kinetik stark mit der Acidität (Einfluss der Mutarotation), in anderen nicht (kein Einfluss der Mutarotation).

Die bisher sich scheinbar widersprechenden Angaben der Literatur über die Kinetik der Rohrzuckerspaltung durch Saccharase lassen sich somit von diesem Standpunkt aus in einfacher Weise erklären.

Zeitlicher Verlauf der Bindung zwischen Enzym und Substrat.

Michaelis hatte bei den oben erwähnten, zunächst für die enzymatische Rohrzuckerinversion geltenden Ableitungen stillschweigend vorausgesetzt, dass die Bindung des Enzyms an das Substrat, welche die enzymatische Spaltung jedes Substratmoleküls einleitet, im Verhältnis zur Spaltung sehr schnell erfolgt, so dass die zur Bindung des Enzyms erforderliche Zeit gegenüber der Spaltungsgeschwindigkeit nicht in Betracht kommt.

Eine andere Auffassung hatte früher Adrian Brown¹⁾ in seiner bemerkenswerten Untersuchung „Enzyme Action“ vertreten. Er nahm an (a. a. O. S. 385), dass das Molekül Enzym-Rohrzucker eine gewisse endliche Zeit existenzfähig ist, und dass diese Lebensdauer der Moleküle Enzym-Substrat die gesamte Reaktionsgeschwindigkeit mitbestimmt.

D. D. van Slyke und Cullen²⁾, welche ebenfalls eine primäre Bindung des Enzyms an das Substrat annehmen, finden im Fall Urease-Harnstoff den Verlauf dieser primären Bindung zeitlich bestimmbar.

Sie stellen den Gesamtvorgang der Harnstoffspaltung durch folgende Gleichung dar:

$$t = \frac{1}{E} \left(\frac{1}{c} \log \frac{a}{a-x} + \frac{x}{d} \right) \cdot \cdot \cdot \cdot \cdot \quad (24)$$

E = Enzymkonzentration, c = Geschwindigkeit der Enzymbindung,
a = Substratkonz. am Anfang, d = Geschwindigkeit der Substratzersetzung.
a-x = Substratkonz. zur Zeit t,

Vgl. hierzu auch Formel (18 M) S. 158.

Die Formel ist nur in einem beschränkten Gültigkeitsgebiet geprüft³⁾.

Was die Grundfrage betrifft, wie sich die Geschwindigkeit der Bildung der Moleküle Enzym-Substrat zur Gesamtgeschwindigkeit der Enzymreaktion

¹⁾ Adrian Brown, J1 Chem. Soc. 81, 373; 1902.

²⁾ D. D. van Slyke und Cullen, J1 Biol. Chem. 19, 141; 1914.

³⁾ Gegen S. Lövgrens Kritik dieser Formel (Biochem. Zs 137, 206; 1923) können sachliche und formelle Bedenken erhoben werden.

verhält, so muss unterschieden werden zwischen den Molekülen, welche primär aus beiden Komponenten durch Zusammenstoß entstehen [reaktionsvermittelnde Moleküle I. Ordnung¹⁾], und derjenigen Molekülart, aus welcher direkt die Spaltprodukte des Substrates (die Reaktionsprodukte) hervorgehen (reaktionsvermittelnde Moleküle II. Ordnung).

Augenblicklich verläuft auch die Bindung des Rohrzuckers an das Enzym vermutlich nicht. Unter den gewöhnlichen Versuchsbedingungen und Konzentrationsverhältnissen lässt sich aber die Bildungsgeschwindigkeit der reaktionsvermittelnden Moleküle I. Ordnung (R. v. M. I) im Sinne von D. D. van Slyke schwer messen.

Die Schütz'sche Regel.

Die Proportionalität zwischen Enzymkonzentration und Reaktionsgeschwindigkeit, welche wir eben beim beststudierten Enzym, der Saccharase, bestätigt gefunden haben, ist auch bei einer Reihe anderer Enzyme, z. B. Esterasen, Katalasen, Erepsin gefunden worden.

Indessen ist eine Ausnahme von dieser einfachsten Beziehung seit langer Zeit bekannt. Die durch Pepsin in bestimmten Zeiten verdauten Eiweissmengen sind nicht den Pepsinmengen direkt, sondern den Quadratwurzeln denselben proportional, bzw. die durch eine gegebene Pepsinmenge verdauten Eiweissmengen sind den Quadratwurzeln aus den Verdauungszeiten proportional.

Es ist dies der Inhalt der 1885 von Emil Schütz aufgestellten Regel²⁾.

Die Gültigkeit dieser Regel ist zwar manchmal bestritten worden; indessen kann die Zuverlässigkeit der zahlreichen mit verschiedenen Methoden angestellten Versuche, welche die Schütz'schen Zahlen — wir sprechen hier zunächst besonders von der Pepsinwirkung — bestätigt haben, nicht in Zweifel gezogen werden. Für die peptische Verdauung gilt also wenigstens im ersten Drittel der Reaktion oft die Schütz'sche Regel.

Es muss nun gleich eingangs betont werden, dass die peptische Spaltung von Eiweiss ihrem Chemismus nach noch sehr ungenügend bekannt ist, und dass sie keinesfalls ein reiner, einheitlicher Vorgang ist, etwa wie die Spaltung einer Biose; vielmehr beschleunigt das Pepsin — wie übrigens auch das Trypsin — einen Reaktionskomplex, vermutlich Folgereaktionen bzw. gekoppelte Reaktionen (vgl. S. 167). Schon aus diesem Grund darf ein der Schütz'schen Regel entsprechender Reaktionsverlauf nicht den für einfache monomolekulare Vorgänge gültig befundenen Vorgängen an die Seite gestellt werden³⁾.

¹⁾ Vgl. hierzu die zusammenfassende Besprechung am Schluss dieses Kapitels (Abschn. E) sowie Euler und Josephson, H. 133, 279, und zwar 296; 1924.

²⁾ E. Schütz, H. 9, 577; 1885.

³⁾ Allerdings gilt nach Abderhalden und Fodor (Fermentforsch. 2, 248; 1918) auch bei der Spaltung von Dipeptiden durch Erepsin des Hefenmazerationssaftes „unter bestimmten Bedingungen, und zwar vor allem dann, wenn die Spaltprodukte eine Hemmungswirkung

Was dann besonders das Pepsin betrifft, so ist in keiner der älteren Messungen die Acidität während der Reaktion konstant gehalten worden¹⁾; p_H variiert aber hier während der Reaktion besonders stark, da die starke Salzsäure (etwa $p_H = 2$) zum grossen Teil durch die Reaktionsprodukte gebunden und in diesem Fall dem Enzym und dem Substrat in einem Verhältnis, das wir nicht genau kennen, entzogen wird. Von Interesse wäre es jedenfalls, diejenigen Salzsäurekonzentrationen bzw. H^+ -Konzentrationen aufzusuchen, welche gewählt werden müssen, damit die Geschwindigkeit der Pepsinverdauung der Enzymkonzentration direkt proportional wird²⁾.

Auch in anderen Fällen, welche sich durch eine der Formel (25) entsprechenden Gleichung haben darstellen lassen, wie z. B. die Spaltung von Mono- und Tributyrin³⁾, wäre es interessant zu untersuchen, unter welchen Bedingungen der Acidität und besonders der Aktivatorkonzentration der monomolekulare Reaktionsverlauf — bei Vermeidung von Enzymzerstörung — hervortritt.

Arrhenius hat die Schützsche Regel durch Behandlung eines chemisch einfacheren Falles dem Verständnis näher zu bringen gesucht.

Da die Kenntnis der Wirkungsweise des Pepsins auch in praktisch medizinischer Hinsicht wichtig ist und auch für andere Enzyme ähnliche Beziehungen zwischen Enzymmenge und Reaktionsgeschwindigkeit angegeben werden, so rechtfertigt sich die Wiedergabe der theoretischen Herleitung, welche Arrhenius⁴⁾ für die Schützsche Regel gegeben hat.

Um eine Vorstellung zu erhalten, welche Umstände die Schützsche Regel bedingen, kann man folgende Überlegungen machen. Wenn die um-

auszuüben vermögen“, nahezu die Gleichung $x = k \sqrt{t}$, also mit anderen Worten die Schützsche Regel.

Im allgemeinen soll „die durch Hefenmazerationssaft bewirkte Spaltung der Polypeptide von der sog. Adsorptionsisotherme beherrscht werden“ und die Reaktionsgeschwindigkeit soll der Gleichung folgen:

$$dx/dt = k(a - x)^{\frac{1}{n}}$$

Es würde zu weit führen, hier diesen Befund eingehender zu diskutieren, so dass ein Hinweis auf die genannten Arbeiten und auf das im Kap. 3, Seite 98 u. ff. Gesagte genügen muss. — Siehe hierzu auch Eichwald und Fodor, Physik.-chem. Grundlagen der Biologie. Berlin 1919. — Ferner Fodor, Fermentforsch. 3, 193; 1920.

¹⁾ Vgl. hierzu Jastrowitz, Biochem. Zs 2, 157; 1907 und Michaelis u. Mendelsohn, Biochem. Zs 65, 1; 1914. — Auf die eingehenderen neueren Messungen und Berechnungen von Northrop (siehe z. B. JI Gen. Physiol. 2, 113; 1919 und 2, 471; 1920) kommen wir im 2. Teil bei der Besprechung des Pepsins und Trypsins zurück.

²⁾ Entsprechende Messungen an Trypsin unter gleichzeitiger Feststellung der HO^+ -Konzentration haben T. B. Robertson und C. L. A. Schmidt ausgeführt (Jl Biol. Chem. 5, 31; 1908).

³⁾ Siehe Pighini, Biochem. Zs 33, 190; 1911. — Rona und Ebsen, Biochem. Zs 39, 21; 1912. — Knaffl-Lenz, Arch. f. exp. Pathol. 97, 242; 1923. — Willstätter und Memmen, H. 133, 229; 1924.

⁴⁾ Arrhenius, Medd. Nobel-Inst. 1, Nr. 9; 1908.

gesetzte Menge mit x und die Zeit mit t bezeichnet wird, so verlangt diese Regel, dass:

$$x = \kappa_1 \sqrt{t} \text{ oder } x^2 = \kappa_1^2 t. \quad (25)$$

Durch Differentiation erhalten wir:

$$2 x dx = \kappa_1^2 dt,$$

oder

$$\frac{dx}{dt} = \frac{\kappa_1^2}{2} \cdot \frac{1}{x}. \quad (26)$$

Damit also die Schützsche Regel gilt, ist es eine nötige und, wie leicht zu sehen, genügende Bedingung, dass die Reaktionsgeschwindigkeit der umgesetzten Menge (x) umgekehrt proportional ist. Da die Schützsche Regel nur am Anfang der Reaktion zutrifft, so soll auch diese Proportionalität nur für die erste Zeit der Reaktion vorausgesetzt werden.

Eine solche Proportionalität kann folgendermassen zustande kommen: Die Reaktionsgeschwindigkeit ist — falls von jedem der reagierenden Körper nur eine Molekel in das Reaktionsprodukt eingeht — dem Produkt der Konzentrationen der reagierenden Substanzen proportional. — Im Anfang der Reaktion sind so geringe Mengen der reagierenden Körper umgesetzt, dass ihre Totalmengen im allgemeinen mit genügender Annäherung als konstant angesehen werden können. Hier haben wir also den Grund für die Begrenzung der Gültigkeit der Schützschen Regel am Anfang der Reaktion. Nun soll die wirksame Menge (M) eines der reagierenden Körper der umgesetzten Menge, oder mit anderen Worten der Menge von neugebildetem Produkt (x) umgekehrt proportional sein, also muss gelten:

$$M = \frac{\text{konst.}}{x} \quad \text{oder} \quad Mx = \text{konst.}$$

„Dies tritt offenbar ein, wenn ein chemisches Gleichgewicht zwischen dem neugebildeten Produkt und einem der reagierenden Körper auf der einen Seite und einer Verbindung von ihnen, deren Menge nahezu konstant bleibt, auf der anderen Seite besteht. Einen solchen Fall kennen wir schon von den wohlbekanntem Verseifungen, nämlich wenn Ammoniak auf einen Ester, z. B. Äthylacetat, einwirkt. Der eine reagierende Körper ist nämlich dann das Ion HO, und die Menge (M_{HO}) dieses Ions wird durch die bei der Reaktion entstehenden NH_4 -Ionen des Ammoniumacetats (Menge x_{NH_4}) vermindert nach der Gleichung:

$$M_{HO} \cdot x_{NH_4} = K_1 (N_{NH_4OH} + N_{NH_3}),$$

wo N_{NH_4OH} und N_{NH_3} die Mengen der NH_4OH - und NH_3 -Molekeln bedeuten. Das Volumen bleibt nämlich während der Reaktion konstant. Die letztere Menge kann als konstant angesehen werden, solange wir nur den Anfang der Reaktion betrachten.“

Dieser Fall ist näher untersucht und die Analogie mit dem Verlauf der peptischen Verdauung hervorgehoben worden.

Wir betrachten also mit Arrhenius ein System, in welchem Ammoniak von der anfänglichen Menge a auf Äthylacetat einwirkt, und zwar nehmen wir der Einfachheit halber an, dass die Menge des Äthylacetats so gross sei, dass sie nicht merklich durch die Reaktion verändert wird, sondern während der Reaktion als konstant (P) betrachtet werden kann; d. h. das Äthylacetat möge in grossem Überschuss anwesend sein. Wenn nun x Molekeln Ammoniumacetat, das bei grossen Verdünnungen, die wir hier voraussetzen wollen, als vollkommen in NH_4^- und CH_3CO_2^- -Ionen gespalten angesehen werden kann, zur Zeit t gebildet sind, so sind $(a - x)$ Molekeln Ammoniak zur selben Zeit vorhanden. Wegen des geringen Dissoziationsgrades des Ammoniaks ist nur ein sehr geringer Bruchteil davon in NH_4^- und HO^- -Ionen umgewandelt, so dass wir mit genügender Annäherung die nicht dissoziierte Ammoniakmenge ebenfalls mit $a - x$ bezeichnen können. Schon bei Anwesenheit einer sehr geringen Menge Ammoniumsalz können wir die aus dem Ammoniak herrührenden NH_4^- -Ionen im Vergleich mit den von dem Salz abgespaltenen vernachlässigen, so dass wir die Menge der NH_4^- -Ionen mit x bezeichnen können. Nach dieser Voraussetzung muss von den allerersten Momenten der Reaktion abgesehen werden, in welchen noch kein oder nur sehr wenig Ammoniumsalz vorhanden ist. Die Konzentration der Hydroxyionen, q , ist demnach durch folgende Gleichung bestimmt:

$$q \cdot x = K_2[a - x],$$

wo K_2 die Dissoziationskonstante des Ammoniaks bedeutet.

Die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Verseifung ist nun proportional der Menge der Hydroxyionen (q) und der Menge des Äthylacetats (P), folglich gilt:

$$\frac{dx}{dt} = \kappa_2 K_2 \frac{a - x}{x} \cdot P = \kappa P \frac{a - x}{x}, \quad \dots \dots \dots (27)$$

wo κ_2 und κ Konstanten sind, und $\kappa \cdot P$ als eine neue Konstante betrachtet werden kann, da P sich bei einem Einzelversuch nicht verändert.

Die letzte Gleichung gibt nach Integration:

$$F(x) = a \ln \frac{a}{a - x} - x = \kappa P t. \quad \dots \dots \dots (28)$$

Die folgende Tabelle, ein Auszug aus der von Arrhenius mitgeteilten, gibt einen Doppelversuch wieder, bei welchem eine gegebene Ammoniakmenge auf 0,66 normales Äthylacetat bei 14,8° einwirkte.

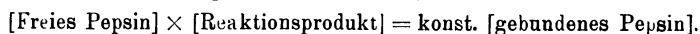
Mittel von $\kappa P = 21$.

t	Umgesetztes Ammoniak in %		κP
	beobachtet ¹⁾	berechnet	
1	17,5	19,4	17,4
2	25,5	25,2	22,0
3	30,7	30,6	21,2
5	38,5	38,5	20,9
10	51,2	51,3	20,9
15	59,6	59,7	20,9
22	67,5	68,0	20,6
30	74,5	74,7	21,2
50	84,8	85,0	20,8
70	91,1	90,7	21,6
100	95,3	95,3	21,1

Wie man sieht, stimmt die Formel (28) ausgezeichnet.

Die Analogie der Esterverseifung durch Ammoniak und der Eiweissverdauung durch Pepsin ist nun nach Arrhenius folgende:

Bei der Eiweisspaltung werden Albumosen und Peptone gebildet. Das Pepsin wird zum grössten Teil von den Reaktionsprodukten gebunden, und es herrscht das Gleichgewicht:



¹⁾ Mittel aus 2 Versuchen.

Die freie Pepsinmenge ist der Menge der gebildeten Reaktionsprodukte, d. h. x , nahezu umgekehrt proportional. Dies gilt, sobald so viel Reaktionsprodukte gebildet sind, dass ihr Hauptteil nicht vom Pepsin gebunden ist, während umgekehrt der Hauptteil des Pepsins gebunden ist.

Die freie Pepsinmenge ist ferner der angewandten Pepsinmenge proportional. Wir erhalten also hier, wenn wir mit P die Konzentration des Enzyms (Pepsins) bezeichnen, mit $a - x$ das unveränderte Eiweiss und mit x die Verdauungsprodukte nach (27):

$$\frac{dx}{dt} = \kappa P \frac{a - x}{x}$$

und demgemäss, wenn wir die Menge der Spaltprodukte auf Bruchteile von 1000 beziehen:

$$1000 (\ln 1000 - \ln \text{unverändertes Eiweiss}) - \text{verdautes Eiweiss} = \kappa Pt.$$

Wirklich schliesst sich die peptische Verdauung auffallend gut der Formel (27) an, und da sie innerhalb weiterer Grenzen der Enzymkonzentration und der Substratkonzentration zu gelten scheint, als andere bisher für die Pepsinverdauung aufgestellte Formeln, so ist die Arrheniussche Darstellung der Schützchen Regel hier ausführlich referiert worden. Allerdings lässt sich noch nicht sagen, ob die hier hervortretende Analogie in wesentlicher Übereinstimmung ihren Grund hat oder überwiegend formeller Art ist.

Dass auch bei der Verdauung von Proteinen und ihren Spaltprodukten die sterische Konfiguration der beteiligten Stoffe eine sehr wesentliche Rolle spielt, geht aus dem Einfluss hervor, welchen Zusätze optisch aktiver Körper auf die Verdauungsvorgänge *in vitro* ausüben.

Im II. Teil werden wir auf die einschlägigen Spezialuntersuchungen ausführlicher zurückkommen.

Anhang: Empirische Formeln der enzymatischen Hydrolyse.

J. M. Nelson hat mit einer Reihe von Mitarbeitern¹⁾ mehrere eingehende Untersuchungen über die Kinetik der Rohrzuckerinversion ausgeführt und hat diese Präzisionsmessungen zur Aufstellung empirischer Interpolationsformeln verwendet, welche das Zahlenmaterial sehr genau wiedergeben.

Die aufgestellte Formel

$$t = 135,2 \log \frac{100}{100 - p} + 0,9724 p$$

(wo t die zum Umsatz von p % des Zuckers erforderliche Zeit bedeutet)

hat spezielles Interesse für die Kinetik der Saccharase und wird deshalb im speziellen Teil dieses Buches näher besprochen.

D. Gegenseitige Beeinflussung mehrerer Reaktionen. (Reaktionen mit Folgewirkungen.)

Es ist bereits im vorhergehenden Abschnitt darauf aufmerksam gemacht worden, dass der chemische Umsatz bei zahlreichen enzymatischen Reaktionen

¹⁾ Nelson und Vosburgh, Am. Chem. Soc. 39, 790; 1917. — Nelson und Hitchcock, Am. Chem. Soc. 43, 2632; 1921. — Nelson und Hollander, Biol. Chem. 58, 291; 1924. — Nelson und Kerr, Biol. Chem. 59, 495; 1924.

sich aus mehreren Teilvorgängen zusammensetzt, über deren Geschwindigkeit wir im einzelnen nichts wissen. Dies ist z. B. der Fall bei der alkoholischen Gärung der Zucker, bei der Spaltung von Eiweisskörpern in Aminosäuren und der Stärke in Glucose.

Es kann also keineswegs erwartet werden, dass in solchen Fällen die Gesetze der chemischen Dynamik in ihrer einfachsten Form zutage treten¹⁾; und wenn es sich zeigt, dass z. B. die Spaltung der Albumine in Aminosäuren sich innerhalb gewisser Grenzen durch die Gleichung $k = 1/t \cdot \log a/(a-x)$, unter anderen Umständen durch die Gleichung $x = k\sqrt{t}$ darstellen lässt, so kann es sich hier um nichts anderes handeln, als um Interpolationsformeln, welche, bis das Gebiet genauer durchforscht ist, praktisch oft gute Dienste leisten können, und für die auch wohl eine Herleitung angegeben werden kann.

Gemeinsam für alle hierhergehörenden „Reaktionen mit Folgewirkungen“ ist der Umstand, dass bei keinem dieser Vorgänge die Geschwindigkeit sich durch eine einzige Konstante ausdrücken lässt, sondern dass dazu mindestens zwei Reaktionskoeffizienten (der beiden Teilreaktionen) erforderlich sind.

Einleitend können wir für die folgenden Erwägungen den (gelegentlich als Prinzip der Koexistenz bezeichneten) Satz voranstellen, dass die nebeneinander verlaufenden Teilvorgänge keine anderen Einflüsse aufeinander ausüben als diejenigen, welche durch das Gesetz der Massenwirkung und der Elektroneutralität hervorgerufen werden.

Die Zahl der verschiedenen theoretisch möglichen Fälle, in welchen zwei oder mehrere Reaktionen voneinander abhängen, ist ausserordentlich gross, und es würde viel zu weit führen, alle diese Fälle hier eingehender zu besprechen. Nur die wichtigsten können erwähnt werden.

1. Parallelreaktionen.

Als Parallelreaktionen wollen wir solche bezeichnen, welche, von einem gemeinsamen Substrat ausgehend, dasselbe in ungleicher Weise verändern, ohne dass sich die Reaktionsprodukte gegenseitig beeinflussen. Ein einfaches Beispiel wäre die Hydrolyse der Raffinose (Fructose-Glucose-Galaktose), welche einerseits in Fructose und Melibiose (Glucose Galaktose), andererseits in Galaktose und Rohrzucker gespalten wird. Zur enzymatischen Spaltung sind zwei verschiedene Enzyme erforderlich, nämlich zu ersterer Saccharase (Willstätter und Kuhn), zur zweiten nach Neuberg²⁾ Emulsin.

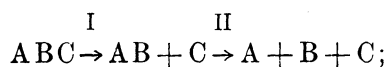
In welcher Richtung der Umsatz des Substrates (der Raffinose) bei gleichzeitiger Gegenwart von Saccharase und Emulsin vorzugsweise geht, hängt von den Geschwindigkeitskonstanten der beiden Reaktionen und vom Konzentrationsverhältnis der beiden spezifischen Katalysatoren ab.

¹⁾ Siehe eine lehrreiche Arbeit von Burian, H. 43, 497; 1905.

²⁾ Neuberg, Biochem. Zs 3, 519 u. 535; 1907.

2. Stufenweise Reaktionen.

Ein zweiter, übrigens vom vorhergehenden nicht prinzipiell verschiedener Fall von Reaktionsbeeinflussung liegt vor, wenn das Produkt einer Reaktion I das Substrat einer Reaktion II bildet. Das allgemeinste Schema eines solchen Prozesses ist



demnach entstehen durch die Reaktion I aus dem Körper ABC die Produkte $\text{AB} + \text{C}$, von welchen AB seinerseits durch die Reaktion II in die Produkte $\text{A} + \text{B}$ weiterverwandelt wird. In dem Gesamtvorgang $\text{ABC} \rightarrow \text{A} + \text{B} + \text{C}$ kann AB als Zwischenprodukt angesehen werden.

Solche Vorgänge sind auch in der Biochemie sehr zahlreich. Die Gesetze ihres zeitlichen Verlaufs sind bereits theoretisch und an mehreren Beispielen experimentell studiert worden. Die erste Untersuchung über Verseifung von Estern mehrbasischer Säuren rührt von Esson¹⁾ her, spätere von Reicher²⁾, Hjelt³⁾ und von Knoblauch⁴⁾, ferner über die Verseifung von Estern mehrwertiger Alkohole von Geitel⁵⁾, und etwa gleichzeitig hat Walker⁶⁾ einen rechnerischen Beitrag zum vorliegenden Problem geliefert.

Die Verseifung der Ester zweibasischer Säuren, die sich durch keine einfache Reaktionsgleichung darstellen lässt (Reicher, Hjelt), verläuft in zwei Stufen: Die erste besteht in der Verseifung des neutralen Esters in den sauren Ester; sie erfolgt mit verhältnismässig grosser Geschwindigkeit; die zweite besteht in der Verseifung zu Alkohol und Säure und verläuft bedeutend langsamer.

Knoblauch hat mit Diäthylbernsteinsäure die Geschwindigkeit der ersten Reaktionsstufe beim Beginn der Gesamtreaktion bestimmt und die Konstante zu $k_1 = 14$ gefunden. Für die zweite Reaktionsstufe, welche am Schluss der gesamten Verseifung gemessen wird, ergab sich die Konstante $k_2 = 1,5$. Während des mittleren Teiles der Verseifung schreiten beide Teilreaktionen gleichzeitig fort und beeinflussen sich gegenseitig in berechenbarer Weise.

Walker hat einen ähnlichen Fall für zwei monomolekulare Reaktionen unter der Annahme berechnet, dass die erste etwa 200 mal so schnell verläuft als die zweite; er fand, dass man dann die schnellere Reaktion vernachlässigen

¹⁾ Esson, Phil. Trans. 156, 216; 1866.

²⁾ Reicher, Rec. Trav. Chim. Pays-Bas, 4, 350; 1885. — Siehe hierzu Wi. Ostwald, Allg. Chem. 2, 2, 278; 1896—1902.

³⁾ Hjelt, Chem. Ber. 29, 1864; 1896.

⁴⁾ Knoblauch, Zs f. physik. Chem. 26, 96; 1898.

⁵⁾ Geitel, JI f. prakt. Chem. (2) 55, 429; 1897.

⁶⁾ Walker, Proc. Roy. Soc. Edinburgh, 1897/98, 22. — Neue Beiträge verdankt man A. Skrabal, Monatsh. f. Chem. 37, 137; 1916 und 38, 29; 1917. — Zur Theorie: Rakowski, Zs f. physik. Chem. 57, 321; 1906.

und die Gesamtreaktion als monomolekular betrachten kann¹⁾. Sind in analoger Weise eine monomolekulare und eine bimolekulare Reaktion verknüpft, so werden die Verhältnisse komplizierter, wie in der Originalarbeit Walkers einzusehen ist.

Auch die stufenweise Hydrolyse des Triacetins ist mehrfach untersucht worden, u. a. von Yamasaki²⁾ und von K. G. Karlsson.

Gerade der Spezialfall der Esterverseifung findet in der Enzymchemie Anwendung, da auch durch Lipasen die neutralen Ester zweibasischer Säuren und die Ester mehrwertiger Alkohole stufenweise gespalten werden³⁾. Eine eingehendere Feststellung dieser Reaktionsstufen wäre übrigens von Interesse.

Stufenweise verlaufen übrigens vermutlich die allermeisten organischen, katalytischen Reaktionen insofern, als das primäre Produkt aus Substrat und Katalysator (die reaktionsvermittelnden Moleküle I. Ordnung) häufig sich in eine andere Molekülart (reaktionsvermittelnde Moleküle II. Ordnung) umwandelt, aus welcher die Reaktionsprodukte direkt entstehen (vgl. S. 173).

Was die Bildungs- und Zerfallsgeschwindigkeit der reaktionsvermittelnden Moleküle bzw. der reaktionsvermittelnden Ionen I. Ordnung (R. v. M. I) betrifft, so muss hier betont werden, dass die Konzentration dieser Molekülart resp. Ionenart, r_i , sich im Sinne von Euler und Rudberg⁴⁾ nach den Gleichgewichtsgesetzen nur dann berechnen lässt, wenn die Umwandlung in R. v. M. II die Lage des Gleichgewichts nicht wesentlich ändert.

3. Reaktionen, welche durch einen Zwischenkörper, bzw. durch einen Katalysator verknüpft werden können.

Wenn zwei verschiedene Stoffe durch einen Katalysator gleichzeitig umgesetzt werden, z. B. Äthylacetat und Pepton durch Salzsäure, so kann durch die Produkte der einen Reaktion (etwa durch die Aminosäuren) der Katalysator gebunden werden, wodurch der anderen Reaktion der Katalysator entzogen wird.

Die Geschwindigkeitsänderungen, welche die erste Reaktion durch die Verminderung der Katalysator-Konzentration erleidet, lässt sich — wenigstens in einfacheren, in vitro verlaufenden Fällen — leicht berechnen. Durch Zusatz eines Überschusses von Katalysator kann übrigens diese Abhängigkeit vermindert oder aufgehoben werden.

¹⁾ Ein Beispiel hierfür liefert die vom Verf. (Öfvers. Sv. Vet. Akad. Förh. 1902, Nr. 4) untersuchte Reaktion zwischen aromatischen Aminen und salpetriger Säure zu Phenolen und Stickstoff. Die intermediäre Bildung von Diazoniumsalz geht so schnell vor sich, dass sich der Gesamtvorgang als eine Reaktion erster Ordnung darstellt.

²⁾ E. Yamasaki, JI Am. Chem. Soc. 42, 1455; 1920.

³⁾ Auch die enzymatische Synthese von Neutralestern des Glycerins verläuft offenbar stufenweise. Siehe Pottevin, Bull. Soc. Chim. (3) 35, 693; 1906.

⁴⁾ Euler und Rudberg, Zs f. Physik 16, 54; 1923.

Da Enzyme durch ihre Substrate und, wie in Kap. 2 und 5 gezeigt ist, auch durch andere Stoffe gebunden werden, so dürften derartige Fälle in Zellen sowie in tierischen und pflanzlichen Sekreten häufig vorkommen.

Gekoppelte Reaktionen.

Als gekoppelte Reaktionen wollen wir solche miteinander verknüpfte Reaktionen bezeichnen, in welchen der beeinflusste Vorgang entgegen der Affinität auf Kosten eines beeinflussenden, freiwillig verlaufenden Vorganges erfolgt¹⁾

Es handelt sich also hier zunächst um einen durch eine untrennbare stöchiometrische Gleichung verknüpften Gesamtvorgang, bei welchem der Energiefall eines Teilsystems den Energiehub eines anderen bedingen kann.

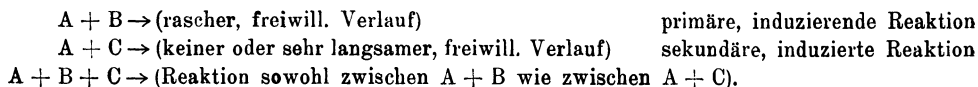
Für die speziellen Fälle von sich gegenseitig beeinflussenden Oxydations- und Reduktionsvorgängen haben Luther und Schilow²⁾ eine Systematik versucht.

Dieselbe soll nur für die Gesamtzahl von drei Ausgangsstoffen und die Gesamtzahl von zwei Bruttoreaktionen gelten. Einer der Ausgangsstoffe soll sich somit an beiden Reaktionen beteiligen.

Ferner wird die vereinfachende Annahme gemacht, dass der eine Vorgang relativ langsam und nicht freiwillig, der andere relativ rasch freiwillig verläuft.

Es werden dann die Reaktionsbeeinflussungen untersucht, wo die relativ langsame Reaktion durch die relativ rasche beschleunigt wird.

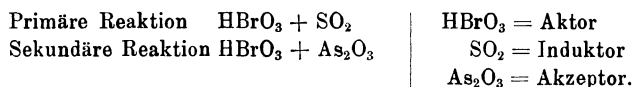
Schema und Nomenklatur werden folgendermassen angegeben:



Derjenige Stoff, welcher an beiden Reaktionen teilnimmt (A), wird **Aktor** genannt; der Stoff, welcher nur in der primären Reaktion auftritt (B), **Induktor**, und schliesslich der Stoff, welcher nur in dem sekundären Vorgang reagiert (C), nach Englers Vorschlag **Akzeptor**.

Beispiel:

Die unmessbar langsam verlaufende Oxydation von arseniger Säure durch Bromsäure wird beschleunigt, wenn man gleichzeitig die Bromsäure durch schweflige Säure reduziert.



Das Verhältnis, in welchem sich der reagierende Aktor zwischen Induktor und Akzeptor verteilt, also das Verhältnis der in Reaktion getretenen Mengen des Akzeptors und Induktors nennt man **Induktionsfaktor**.

Da im Sinne der elektrochemischen Theorie der Oxydations-Reduktionsvorgänge einem Oxydationsäquivalent ($\frac{1}{2} O$) die Menge von 96 540 Coulombs positiver Elektrizität (+ F) entspricht, so kann man das obige Verhältnis folgendermassen darstellen:

¹⁾ Wi. Ostwald, Zs physik. Chem. 34, 248; 1900.

²⁾ Luther und Schilow, Zs physik. Chem. 46, 777; 1903. — Luther fasst übrigens den Ausdruck Reaktionskoppelung in weiterem Sinne, indem er damit überhaupt jede Reaktionsbeeinflussung zweier in demselben Medium stattfindender Reaktionen bezeichnet wobei er hervorhebt, dass häufig die Grenze zwischen solchen Fällen, wo die beeinflusste Reaktion im Sinne der vorhandenen Affinitäten oder entgegen diesen stattfindet, keine scharfe ist.

$$\frac{nF_{\text{Akzeptor}}}{mF_{\text{Induktor}}} = \text{Induktionsfaktor.}$$

Für die Induktion im obigen Sinne sind nun zwei Erklärungen möglich.

1. Der Induktor katalysiert die äusserst langsam verlaufende Reaktion zwischen Akzeptor und Aktor; gleichzeitig wird der Induktor in einer unabhängigen Reaktion von dem Aktor in einem katalytisch unwirksamen (bzw. unwirksameren) Stoff übergeführt. (Katalyse unter Verbrauch des Katalysators.)

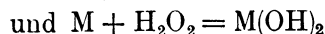
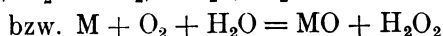
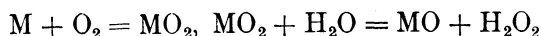
2. Der Induktor bildet mit dem Aktor oder Akzeptor oder mit beiden irgend einen intermediären Stoff, der mit den vorhandenen Stoffen derart reagiert, dass schliesslich alle drei ursprünglichen Stoffe verändert werden. (Induktion durch einen Zwischenstoff.)

Welche der beiden möglichen Wirkungsweisen in einem bestimmten Fall zutrifft, lässt sich nach Luther und Schilow durch systematische Konzentrationsvariationen der drei Bestandteile bestimmen.

Auf die hier skizzierte Systematik werden wir im zweiten Band dieses Buches bei der Behandlung der Oxydationsenzyme zurückkommen.

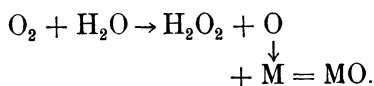
Habers Schema.

In einer Reihe sehr interessanter Arbeiten hat Haber¹⁾ die Autooxydationen als „gekoppelte Reaktionen“ eingehend behandelt. Haber präzisiert seine Auffassung, indem er die Gleichungen



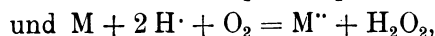
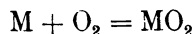
(M = zweiwertiger, oxydabler Körper)

in folgendes Schema umformt:



Hier ist „der Energiehub, welchen die Wasserstoffsuperoxydbildung darstellt, untrennbar an den Energiefall geknüpft, welchen der Übergang von MO_2 in MO verwirklicht“.

Strukturchemisch gibt Haber in Übereinstimmung mit Engler und Wild²⁾, ausgehend von den beiden Gleichungen



folgende Darstellung:

„Die Bindung $O = O$ spaltet sich auf, und die Gruppe $-O-O-$ lagert sich an, einmal an M , das andere Mal an zwei Wasserstoffionen, die naturgemäss dabei ihre Ladung abgeben, so dass zur Erhaltung des elektrisch neutralen Zustandes gleichzeitig M eine entsprechende Menge positiver Ladungen aufnehmen muss.“ Der Sauerstoff lagert sich stets als Molekül $-O-O-$ an, und zwar bei den nassen Autooxydationsprozessen an zwei Ionen.

Auf die spezielleren Vorstellungen über den Mechanismus der Oxydationen

¹⁾ Haber, Zs physik. Chem. 34, 513; 1900. 35, 81; 1900. Zs f. Elektrochem. 7, 441; 1901.

²⁾ Engler und Wild, Chem. Ber. 30, 1669; 1897.

kann hier nicht näher eingegangen werden, weshalb auch bezüglich der bemerkenswerten Arbeiten von Wieland¹⁾ auf die Einleitung zum Abschnitt „Oxydationsenzyme“ im zweiten Band dieses Buches verwiesen werden muss.

Hier soll nur noch erwähnt werden, dass die Habersche Darstellung des Verlaufes der Autooxydation in einem galvanischen Element den Einfluss deutlich hervortreten lässt, welchen die freien Elektrizitätsmengen nach dem Satz von der Elektroneutralität auf die Reaktionskoppelung ausüben.

Auf die Energie-Übertragungen bei gekoppelten Reaktionen kommen wir am Schluss des Kapitels 8 zurück.

Gleichzeitige Wirkung mehrerer Katalysatoren.

Die gleichzeitige Wirkung mehrerer Katalysatoren auf ein Substrat ist durch einige von Price²⁾ und Brode³⁾ studierten Beispiele bekannt, ferner gehören hierher alle die Fälle, in welchen positive Katalysatoren — nach einem kurzen, aber nicht ganz glücklichen Ausdruck — „vergiftet“ werden.

In der Enzymchemie sind Vorgänge, in welchen zwei Katalysatoren zusammenwirken, recht häufig. Hier sind die zahllosen Erscheinungen, bei welchen eine Enzymreaktion durch einen Aktivator oder Paralytiker beschleunigt oder verzögert wird zu erwähnen. Dieses letztere Tatsachengebiet ist so umfassend, dass ihm der grösste Teil des folgenden Kapitels gewidmet werden muss.

Gleichzeitige Wirkung zweier Enzyme auf ein Substrat liegt vielleicht bei der alkoholischen Gärung vor.

E. Beziehungen zwischen enzymatischen und nicht-enzymatischen Hydrolysen.

Die Mehrzahl der hydrolytischen Spaltungen, für welche spezifische Enzyme in der Natur gefunden worden sind, lassen sich auch durch nicht-enzymatische Katalysatoren beschleunigen. Die Frage, in welcher Beziehung diese beiden Gruppen von Vorgängen zueinander stehen⁴⁾, ist für die tiefere Einsicht in die Kinetik der Enzymreaktionen nicht ohne Bedeutung.

Das wichtigste Prinzip bezüglich der Wirkungsweise der Enzyme ist

¹⁾ Wieland, Chem. Ber. 45, 484; 1912 und 46, 3327; 1913.

²⁾ Price, Zs physik. Chem. 27, 474; 1898.

³⁾ Brode, Zs physik. Chem. 37, 257; 1901.

⁴⁾ Für einige spezielle enzymatische (nicht hydrolytische) Vorgänge, nämlich für die Spaltung des Wasserstoffsperoxyds in Wasser und Sauerstoff und für die Oxydation von Cystin hat man bemerkenswerte Analogien zu entsprechenden nicht-enzymatischen Katalysen gefunden, und zwar sind die Katalysatoren in ersterem Falle kolloide Platinmetalle, (dieselben haben den wenig glücklichen Namen „anorganische Fermente“ erhalten; Bredig und Mitarb.), im zweiten Falle bewirkt Kohle die Katalyse, deren Eisengehalt von Otto Warburg als das wirksame Agens erkannt worden ist. Wir werden im speziellen Teil dieses Buches auf die Wirkung dieser Stoffe wie auch der Oxyhämoglobine (Willstätter und Pollinger, H. 130, 281; 1923) zurückkommen.

wohl der nunmehr allgemein angenommene Satz, dass die enzymatischen Reaktionen durch eine Molekülart vermittelt werden, welche die Verbindung des Substrates mit dem Enzym ausmacht. Die Fortschritte der Enzym-Kinetik beruhen im wesentlichen auf der Möglichkeit, wenigstens die relativen Konzentrationen dieser Molekülart bei Variation der Lösungskomponenten zu berechnen. Die Grundlagen für diese Berechnung verdankt man Michaelis, welcher zum erstenmal die Affinität zwischen einem Enzym und dem zugehörigen Substrat festgestellt hat.

Es ist hier nicht der Ort, die Gründe zu erörtern, weshalb die frühzeitig geläufige Auffassung, dass auch bei den nicht-enzymatischen Katalysen der Katalysator mit dem Substrat ein Zwischenprodukt bildet¹⁾, ein halbes Jahrhundert lang, und auch in Perioden, in welchen das Katalyse-Problem eifrig bearbeitet wurde, nicht fruchtbar geworden ist²⁾.

Schon vor längerer Zeit hat Verf.³⁾ betont, dass auch hier die Konzentration der reaktionsvermittelnden Moleküle in den Vordergrund der Betrachtung gestellt werden muss, und ist davon ausgegangen, dass da, wo man sich über die Natur der reaktionsvermittelnden Moleküle eine Vorstellung machen kann, dieselben den Charakter eines Salzes zwischen der katalysierenden Säure (oder Base) und dem Substrat tragen. Der in dieser Weise ionisierte Teil des Substrates ist durchgehends sehr viel reaktionsfähiger als das undissoziierte Substrat. Da die Salzbildung proportional der Konzentration des Katalysators sein muss, so folgt die für solche Katalysen wichtigste empirische Beziehung, die Proportionalität der Reaktionskonstanten mit der Konzentration des (dissoziierten Anteiles des) Katalysators.

In Lösungen solcher Stoffe, welche durch Säuren katalysiert werden, behandeln wir also das Substrat als Base; bei rein basischen Katalysen fassen wir das Substrat als Säure auf, und für Stoffe, welche — wie etwa Ester — sowohl durch Säuren als durch Basen gespalten werden, nehmen wir amphoteren Charakter an.

Betrachten wir, um die Idee zu fixieren, speziell die Inversion des Rohrzuckers durch Salzsäure, und setzen für die Dissoziationskonstante des Zuckers den der Grössenordnung nach annähernd zutreffenden Wert 10^{-20} ein, so ergeben sich daraus die S. 54 berechneten Konzentrationen der reaktionsvermittelnden Verbindung Rohrzucker-Salzsäure.

Wir können, ausgehend vom Wert $k = 10^{-20}$ ferner die Hydrolysenkonstante der Verbindung Rohrzucker-Salzsäure (bzw. Rohrzuckerchlorid) berechnen. Ihr reziproker Wert ist offenbar die Affinitätskonstante der Verbindung Rohrzucker-Salzsäure.

¹⁾ Siehe z. B. Kekulé, Ann. d. Chem. 106, 140; 1858.

²⁾ Es sei auf einen zusammenfassenden Vortrag von W. Ostwald (Hamburg 1901) verwiesen.

³⁾ Euler, Zs f. physik. Chem. 36, 641; 1901.

Der Zahlenwert dieser Konstante ist 10^{-6} .

Es ist nun nicht uninteressant, diesen Zahlenwert mit demjenigen zu vergleichen, welcher sich für die Verbindung Rohrzucker-Saccharase ergeben hat. Wir haben ihn S. 151 zu rund 50 festgestellt.

Wir wählen nun als Beispiel eine spezielle Konzentration des Rohrzuckers, etwa 0,1 Normalität, und wählen solche Mengen einerseits des Enzyms und andererseits der katalysierenden Salzsäure, dass (bei gleicher Temperatur 20°) die gleiche Geschwindigkeit etwa $k = 1,5 \cdot 10^{-4}$ erreicht wird.

Für die nicht-enzymatische Katalyse können wir dann unter Benützung der angegebenen Zahlen die Konzentration der reaktionsvermittelnden Rohrzuckerionen zu 10^{-8} berechnen.

Machen wir nun die Annahme, dass der gleichen Anzahl Moleküle Substrat-Katalysator die gleiche Reaktionskonstante entspricht, sowohl wenn der Katalysator Saccharase, als wenn er Salzsäure ist, so würde sich als Saccharase-Konzentration der Wert 10^{-8} bis 10^{-9} g-Äquivalente ergeben. Die exakte Prüfung dieses Wertes ist im gegenwärtigen Stand der Enzymforschung noch nicht möglich; immerhin ist es bemerkenswert, dass die Anhaltspunkte, welche man gegenwärtig über die molekulare Konzentration der Saccharase besitzt, mit dem in obiger Weise gefundenen Wert gut vereinbaren lassen.

Wie schon bei der ersten Mitteilung einer solchen Überschlagsrechnung¹⁾ betont wurde, handelt es sich hier um Größenordnungen. Das Resultat, dem aber eine gewisse Bedeutung zugeschrieben werden darf, ist folgendes:

Unter der Voraussetzung, dass einer gleichen Zahl reaktionsvermittelnder Moleküle eine angenähert gleiche Reaktionskonstante entspricht, kann der Unterschied zwischen der Salzsäure und der Saccharase-Katalyse des Rohrzuckers so dargestellt werden:

Bei der enzymatischen Reaktion wird die erforderliche Zahl der reaktionsvermittelnden Moleküle durch eine kleine Katalysator-Konzentration und grosse Affinitätskonstante erreicht, bei der Salzsäurekatalyse wird der in relativ grosser Konzentration anwesende Katalysator mit einer viel kleineren Affinitätskonstante an das Substrat gebunden.

Gewiss ist dieses Resultat nur ein Ausgangspunkt für ein tieferes Eindringen in die Enzymkinetik; besonders ergibt sich sofort die neue Frage: Welcher Art und von welcher chemischen Struktur müssen die Stoffe sein, welche mit einer so grossen Affinität an Substrate wie Rohrzucker gebunden werden?

Besonders soll hier noch darauf hingewiesen werden, dass die Verbindung Rohrzucker-Salzsäure, bzw. Rohrzuckerion als reaktionsvermittelnde Molekülart I. Ordnung berechnet wurde; damit sollte betont werden, dass die Reaktion der Konzentration dieser Molekülart bzw. Ionenart proportional ist,

¹⁾ Euler, Chem. Ber. 55, 3583; 1922.

dass aber diese Moleküle nicht selbst dem Zerfall unterliegen, sondern ein kleiner, konstanter Bruchteil derselben in die reaktionsvermittelnden Moleküle II. Ordnung übergeht¹⁾, welche ihrerseits eine sehr viel geringere Lebensdauer besitzen, d. h. fast momentan zerfallen.

Bezüglich der Umwandlung der reaktionsvermittelnden Moleküle I. Ordnung (R. v. M. I) in die selbst zerfallenden reaktionsvermittelnden Moleküle II. Ordnung (R. v. M. II) haben Euler und Josephson²⁾ als vorläufige Arbeitshypothese folgende spezielle kinetische Vorstellung eingeführt, besonders um darüber Rechenschaft zu geben, wieso bei der nichtenzymatischen Katalyse die starke Säure eine ähnliche Wirkung ausübt wie das als Säure jedenfalls schwache Enzym.

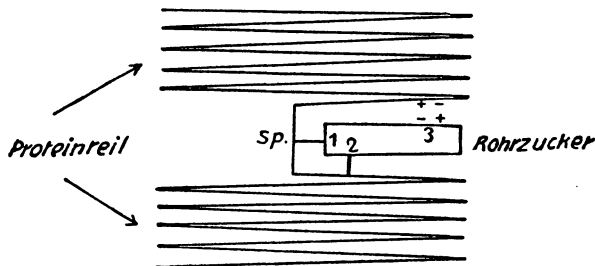
Die Konzentration eines in reversiblen Gleichgewicht befindlichen Stoffes ist das Ergebnis einerseits der pro Zeiteinheit stattfindenden „erfolgreichen Zusammenstösse“ und andererseits derjenigen Atombewegungen, welche zum Zerfall führen (Gegenreaktion). Die Zahl der „erfolgreichen Zusammenstösse“ ist in unserem Fall gegeben

1. durch die Zahl der überhaupt erfolgenden Zusammenstösse, proportional mit der Konzentration der Komponenten Rohrzucker-Salzsäure bzw. Rohrzucker, H⁺- und Cl⁻-Ionen,
2. durch die Gesamtheit derjenigen Eigenschaften der Komponenten, welche die Affinität — in unserem Fall gemessen durch die inverse Hydrolysekonstante des Salzes Rohrzucker-HCl — bestimmen.

Es wird angenommen, dass die Bindung des Enzyms an den Rohrzucker nicht an der gleichen Stelle erfolgt, an welcher die Spaltung bzw. die vorhergehende amphotere Aufladung geschieht. Ferner ist die Vorstellung über die Affinität zwischen Enzym und (hydrolyisierbarem) Substrat dahin zu erweitern und zu präzisieren, dass hier zwei Bindungen und demgemäss zwei Affinitätskonstanten in Betracht kommen.

Die reaktionsvermittelnden Moleküle II. Ordnung entstehen nach neuerer Annahme unter amphoterer Aufladung durch Aufnahme der Ionen H⁺ und HO⁻ des Wassers.

Wir können etwa annehmen — es ist dies aber kein integrierender Bestandteil unserer Vorstellung —, dass sich die rohrzuckerbindenden Gruppen irgendwo innerhalb der Proteinkomponente der Saccharase befindet. Schematisch lässt sich diese Annahme etwa folgendermassen ausdrücken:



Obwohl die sauren Gruppen des Proteins im Vergleich zur Salzsäure nur wenig dissoziiert sind, wird die Anzahl der Zusammenstösse, welche erfolgreich sind und also zur Salzbildung führen, deswegen verhältnismässig gross sein können, weil sich sämtliche Gruppen von vornherein und ständig im Molekülverband befinden.

Die oft hohen Werte der Affinitätskonstanten K_M (vgl. S. 151) mögen durch das Zusammenwirken zweier Affinitäten bedingt sein.

Einstweilen ist man zur Fixierung der Ideen jetzt noch auf die Mitteilung solcher Schemen beschränkt, da die präparative Chemie noch so wenig Fälle geliefert hat, aus welchen entnommen werden könnte, wie sich die Eigenschaften einer im freien Zustand bekannten Gruppe durch die Anlagerung an ein Proteinmolekül ändern.

¹⁾ Sonst wäre es nicht möglich, die Konzentration dieser Molekülarart in der angegebenen Weise nach dem Massenwirkungsgesetz zu berechnen.

²⁾ Euler und Josephson, H. 133, 279; 1924.

Interessante Vergleiche der Reihenfolge bzw. der relativen Reaktionsgeschwindigkeit eines Enzyms und verschiedener Substrate unter Berücksichtigung der wechselnden Affinitäten haben neuerdings Kuhn und Sobotka¹⁾ angestellt und damit frühere diesbezügliche Versuche von Armstrong²⁾ wesentlich erweitert.

Kuhn und Sobotka fanden, dass das Verhältnis der Hydrolysegeschwindigkeiten k von Maltose, α -Methyl- und α -Phenyl-Glucosid annähernd unabhängig ist von der Natur des angewandten Katalysators. Ihrer Arbeit ist folgende Tabelle entnommen:

Substrate	Rel. Reaktionsgeschwindigkeit k	
	Säure	Enzym
α -Phenylglucosid: α -Methylglucosid	25	28
α -Phenylglucosid: Maltose	0,14	0,20
Helicin: Salicin	1,1	5 ± 2
Helicin: β -Phenylglucosid	0,46	$8,3 \pm 0,5$
Helicin: β -Methylglucosid	4,7	$1,0 \pm 0,2$

Abschliessend mag nochmals hervorgehoben werden, dass die für Saccharase angestellten Rechnungen und Erwägungen zwar wohl ein in mancher Hinsicht typisches Beispiel für Enzymreaktionen überhaupt betreffen, dass aber bei anderen Enzymen doch auch wesentlich andere Verhältnisse auftreten können. Ganz besonders können durch die Salzbildung am Substrat³⁾ Modifikationen der im vorstehenden gegebenen kinetischen Formeln notwendig werden.

¹⁾ Kuhn und Sobotka, Zs physik. Chem. 109, 65; 1924. Siehe auch Kuhn, Naturw. 12; 1924.

²⁾ E. F. Armstrong, Proc. Roy. Soc. 74, 188; 1904. — E. F. Armstrong und Caldwell, Proc. Roy. Soc. 73, 526; 1904 und 74, 195; 1905.

³⁾ Durch Salzbildung am Substrat dürfte sich auch dessen Affinität zum Enzym wesentlich ändern, wodurch ein starker Einfluss der Acidität auf die Reaktionsgeschwindigkeit bedingt wird.

Ein interessantes Modell für den Einfluss der Acidität auf die Kinetik gewisser Enzymreaktionen hat E. Widmark gefunden und eingehend untersucht (Acta med. Scand. 53, 393; 1920).

5. Kapitel.

Aktivatoren und Paralysatoren (Gifte). Co-Enzyme. Enzym-Destruktoren.

A. Systematik.

Im Kapitel 2 ist der wesentliche Einfluss besprochen worden, welchen Säuren und Basen bzw. H- und HO-Ionen auf die Enzymwirkungen ausüben, und es ist im Anschluss an die experimentellen Daten über die optimale H-Konzentration die Auffassung ausführlich besprochen worden, nach welcher Enzyme als Elektrolyte mit Basen bzw. Säuren Salze bilden.

Säuren und Basen können, wie gezeigt wurde, je nach ihrer Konzentration eine Enzymreaktion beschleunigen oder verzögern, sie wirken also sowohl als positive wie als negative Katalysatoren, und zwar — zum grossen Teil wenigstens — dadurch, dass sie das primär katalysierende Enzym beeinflussen. Man kann deswegen die Säuren und Basen und eine grosse Anzahl ähnlich wirkender Stoffe als sekundäre Katalysatoren der Enzymwirkungen bezeichnen. Damit soll aber, wie ausdrücklich betont sei, nicht gesagt werden, dass diese Stoffe die Wirksamkeit der Enzyme katalytisch beeinflussen. Vielmehr wirken wohl die meisten hierher gehörenden Stoffe stöchiometrisch, also pro Molekül oder Äquivalent Säure, Metall usw. auf je ein Molekül oder Äquivalent Enzym.

Nachdem die Wirkung der häufigsten und wichtigsten Hilfsstoffe enzymatischer Vorgänge, nämlich der dissoziierten Anteile von Säuren und Basen, zum grossen Teil aufgeklärt ist, bleiben für dieses Kapitel die anderen hierher gehörenden Stoffe übrig, für deren Wirkung bis jetzt noch keine allgemeinen theoretischen Gesichtspunkte und keine empirischen Regeln gefunden worden sind.

Ein prinzipieller Grund, die Aktivierung und Hemmung durch Säuren und Basen getrennt von derjenigen der übrigen Stoffe zu behandeln, liegt nicht vor, denn auch von den Salzen muss man annehmen, dass sie mit den Enzymen Verbindungen, und zwar meist reversible, eingehen. Diese Verbindungen können enzymatisch mehr oder weniger aktiv sein als die freien Enzyme und die betreffenden Komponenten fungieren demgemäss entweder als Aktivatoren oder Hemmungskörper. Das gleiche gilt von organischen Stoffen, bei welchen allerdings auch die Löslichkeitsbeeinflussung und die Änderung der Oberflächenspannung eine gewisse Rolle spielt. Bei anderen

organischen Stoffen ist die Umkehrbarkeit der Verbindung mit dem Enzym unvollständig, und die Wirkung als Paralysatoren geht in diejenige von „Destruktoren“ über.

Es sollen in diesem Kapitel nicht alle Einzelbeobachtungen über Aktivierungen und „Giftwirkungen“ bei Enzymen gesammelt werden — Angaben von rein speziellem Interesse finden ihren Platz im II. Teil des Buches —, sondern es soll hier eine Übersicht über die einschlägigen Erscheinungen geliefert werden, teils zum unmittelbaren Gebrauch bei enzymologischen Studien, teils als Vorarbeit zu einer künftigen theoretischen Behandlung dieses Gebietes.

Noch immer ist, trotz zahlreicher Einzelbeobachtungen, die Gesamtheit dieser Erscheinungen so wenig aufgeklärt, dass sogar für eine Systematik recht unzureichende Anhaltspunkte vorliegen.

Zunächst müssen wir die in der Literatur dieses Gebietes sehr häufigen Ausdrücke Gift und Giftwirkung erläutern.

Wir bezeichnen als Giftwirkungen Hemmungen enzymatischer Reaktionen durch solche Substanzen bzw. Substanzkonzentrationen, welche in den lebenden Zellen bzw. in natürlichen Säften und Geweben nicht zusammen mit dem betr. Enzym vorkommen.

Damit ist zunächst hervorgehoben, dass wir Hemmungen durch die Reaktionsprodukte der enzymatischen Reaktionen als ein besonderes Erscheinungsgebiet betrachten.

Zunächst lassen sich die hierher gehörenden Vorgänge in zwei Gruppen teilen:

1. Die Wirkungen an isolierten Enzymen *in vitro*,
2. Die Wirkungen auf Enzymreaktionen in Zellen, Säften und Geweben.

Innerhalb der 1. Gruppe müssen wir wieder unterscheiden zwischen

- a) reversiblen Beeinflussungen der Wirksamkeit von Enzymen, durch chemisch bekannte und unbekannte Stoffe (Co-Enzyme),
- b) Zerstörungen oder irreversiblen Veränderungen der Enzymsubstanz bis zur Aufhebung der typischen katalytischen Wirksamkeit.

B. Hemmungen und Aktivierungen an isolierten, gelösten Enzymen.

1. Reversible Beeinflussungen der Enzymwirkungen.

a) Schwermetallsalze.

Unter den älteren Angaben über die Vergiftung durch Schwermetallsalze sind verhältnismässig wenige genügend vollständig und wirklich brauchbar; deswegen sind besonders die älteren Daten stark gesichtet worden, aber auch im folgenden zitierte Arbeiten tragen durchaus nicht alle den Stempel

der Gründlichkeit und Zuverlässigkeit. Viele der zahlenmässigen Angaben über die zu Vergiftungen erforderlichen Salzmengen sind dadurch illusorisch, dass die Hauptmengen der Metallsalze vermutlich an Verunreinigungen der Enzympräparate gebunden worden sind. Deswegen ist bei den Untersuchungen aus dem Laboratorium des Verf. besonderer Wert darauf gelegt worden, die Einwirkung der Gifte an möglichst hochgereinigtem Enzymmaterial zu studieren¹⁾.

Die ersten derartigen systematischen Untersuchungen über die Kinetik der Enzym-Inaktivierung durch Schwermetallsalze betrafen die Saccharase, und für dieses Enzym sind nunmehr auch die Bedingungen der Inaktivierung am besten bekannt. Wir führen daher die hierher gehörenden Arbeiten ausführlicher an.

1. Systematische Versuche über Hg- und Ag-Vergiftung der Saccharase.

In den ersten Versuchen von Euler und Svanberg²⁾ wurde zunächst festgestellt, dass die Inaktivierung der Saccharase vollständig reversibel verläuft; wenn also das inaktivierende Metall durch H_2S entfernt wurde, zeigte die Enzymlösung die ursprüngliche Aktivität.

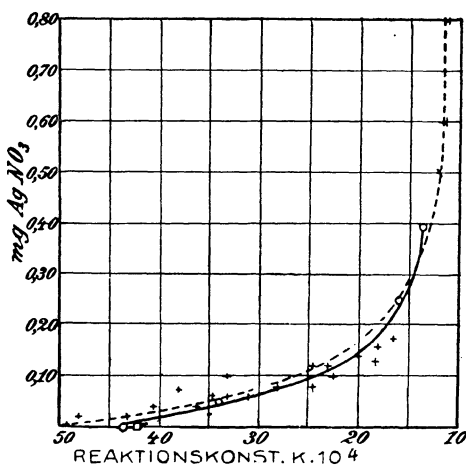


Fig. 22.

Ferner war zum erstenmal der Nachweis erbracht worden, dass bei der Vergiftung durch Schwermetallsalze tatsächlich das Metallion zum grössten Teil vom Enzym gebunden wird und also als freies Ion aus der Lösung verschwindet.

Um eine quantitative Vorstellung von der Bindung der vergiftenden Metallionen an die Bestandteile einer relativ reinen Enzymlösung zu geben, sei z. B. erwähnt, dass nach elektrometrischen Messungen von Svanberg

in einer für Saccharase stark giftigen Silbernitratlösung, welche 0,056 mg Ag in 18 ccm enthält, durch Zusatz von 1 ccm Enzymlösung 98% der gesamten Ag Menge komplex gebunden werden.

Die Versuche von Euler und Svanberg sind später von Myrbäck an erheblich reinerem Enzymmaterial wiederholt und über ein grösseres

¹⁾ Wenn mehrfach hervorgehoben worden ist (vgl. Euler u. Myrbäck, H. 125, 298; 1923), dass sich die Giftempfindlichkeit der Saccharase wenig mit dem Reinheitsgrad des Enzympräparates ändert, so ist damit natürlich der experimentelle Befund gemeint, dass in Lösung (oder im Präparat) gleichzeitig anwesende freie Verunreinigungen den Vergiftungsgrad der Saccharase wenig beeinflussen. Wie die an das Enzymmolekül festgebundenen, an sich nicht aktiven Gruppen die Vergiftungsfähigkeit beeinflussen, ist unbekannt.

²⁾ Euler u. Svanberg, H. 107, 269 u. zw. 302; 1919. — Fermentf. 3, 330; 1920.

Aciditätsgebiet wesentlich erweitert worden; diese Versuche sind deshalb der folgenden Darstellung zugrunde gelegt.

Silbernitrat. Zunächst wurde bei optimaler Acidität, $p_H = 4,5$, die Abhängigkeit der Inaktivierung von der Konzentration des Silbersalzes festgestellt¹⁾. Es zeigte sich, dass die anfängliche Proportionalität bei grösseren Ag-Zusätzen aufhört und der Inaktivierungsgrad konstant wird (Fig. 22).

Die prozentische Vergiftung nahm (bei Verwendung eines Saccharase-Präparates von $I_f = 84$) mit steigender Enzymkonzentration stark zu, wie die folgenden Zahlen zeigen:

Enzymkonzentration $k \cdot 10^4$	Inaktivierte Saccharase % des gesamten Enzyms
650	89,5
300	88
150	80
100	73,3
42,5	58
27,5	43

Die Substratkonzentration wurde ohne Einfluss auf den Inaktivierungsgrad gefunden.

Besonders stark ist die Ag-Inaktivierung von der Acidität der Lösung abhängig, und zwar verlaufen die Kurven prozentischer Inaktivierungen bei

wechselnder Acidität genau parallel mit dem absteigenden Ast der p_H -Aktivitätskurve der Saccharase selbst (Fig. 23).

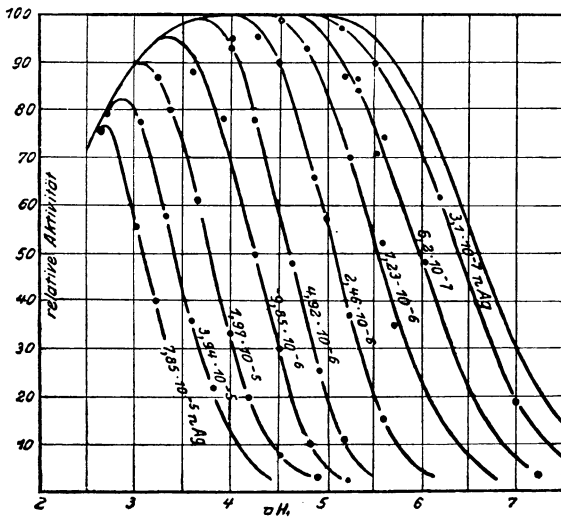


Fig. 23.

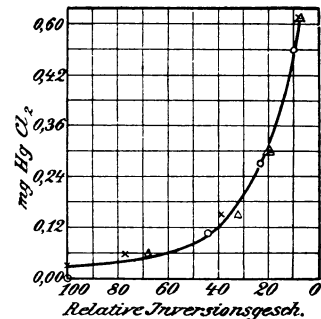


Fig. 24.

Quecksilberchlorid. Wesentlich andere Verhältnisse wurden bei der Inaktivierung durch $HgCl_2$ gefunden.

Hier hat die Kurve, welche Giftmenge und relative Aktivität verbindet,

¹⁾ Euler u. Myrbäck, H. 121, 177; 1922. — Sv. Kem. Tidskr. 34, 221; 1922. Myrbäck, Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi, 8, Nr. 29; 1923.

die Form einer Dissoziationskurve, wie schon die Versuche von Svanberg gezeigt hatten (Fig. 24).

Die Acidität hat in der optimalen Zone keinen Einfluss, dagegen fällt hier die prozentische Inaktivierung mit steigendem Rohrzuckergehalt, wofür folgende kleine Tabelle nach Myrbäck einen Beleg liefert:

Rohrzuckerkonz.	Proz. Inaktivierung
2 %	49,4
4 %	45
8 %	40
16 %	25,6

Durch diese Schutzwirkung des Rohrzuckers gegen die Sublimat-Vergiftung wird die Berechnung der Gleichgewichtskonstanten Sublimat-Saccharase erschwert.

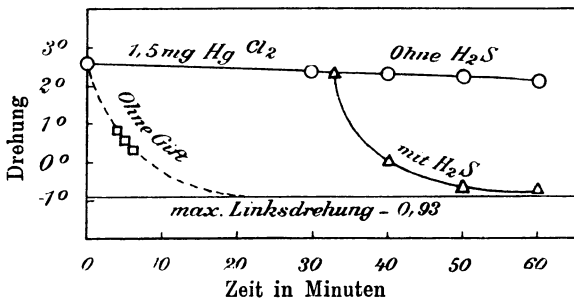


Fig. 25.

Die Aktivität des Enzyms wird beim Einleiten von H_2S fast augenblicklich und bis auf 96–98 % des ursprünglichen Wertes regeneriert; dies zeigen die in Fig. 25 wiedergegebenen Messungen.

Myrbäck hat solche elektrometrischen Messungen mit einigen Präparaten von

verschiedenem Reinheitsgrad ausgeführt, um zu erfahren, inwieweit die Silberentionisierung durch Verunreinigungen verursacht ist; er fand, dass die Fähigkeit, Silber zu binden mit zunehmendem Reinheitsgrad stark abnahm. Es sind noch weitere Messungen mit hoch gereinigten Saccharase-Präparaten erforderlich.

Da die Silbervergiftung in hohem Grad von der Acidität abhängig ist, muss bei der reinen Saccharase die Entionisierung in neutraler Lösung ($p_H = 7$) viel stärker sein als bei etwa $p_H = 2,5$.

Was die theoretische Auswertung der Vergiftungsmessungen betrifft, so gehen wir, wie schon eingangs erwähnt, davon aus, dass zwischen dem aufgenommenen Metall und der inaktivierten Saccharase eine direkte stöchiometrische Beziehung besteht. Dadurch werden die erwähnten Messungen für das chemische Studium der Enzyme wertvoll.

Mit Sublimat dürfte die Saccharase eine dissoziierende Verbindung eingehen. Aus dem oberen Grenzwert der Saccharase-Vergiftung können wir ein Hg-Äquivalent der Saccharase berechnen, das sich unter vorläufiger Einführung unseres gegenwärtigen I_f -Wertes 250 zu rund 4000 ergibt. Wir benützen ferner, wie Myrbäck, den für die Inaktivierung der zuckerfreien Saccharaselösung ($I_f = 230$; $k \cdot 10^4 = 125$) durch 0,02 mg Hg gefundenen

Wert, 54% (vgl. Arkiv 29, S. 14). Die gebundene Hg-Menge ergibt sich dann zu 0,0075 mg HgCl_2 , die freie somit zu 0,0125 mg HgCl_2 .

Da das Volumen 60 ccm beträgt, berechnet sich die Normalität des freien Hg-Salzes zu $7,7 \cdot 10^{-7}$. Nach dem Massenwirkungsgesetz ergibt sich

$$\frac{[\text{freie Saccharase}] \cdot [\text{freies Hg}]}{[\text{Hg-Saccharase}]} = K = 6,6 \cdot 10^{-7}$$

Bei Silber liegen die Verhältnisse anders. Da die Substratkonzentration keinen Einfluss hat, kann sich die Saccharase nicht zwischen Zucker und Silber verteilen. Myrbäck hat die Annahme eingeführt, dass die Verbindung Rohrzucker Saccharase mit Ag ein sehr wenig dissoziiertes Salz bildet, welches die Fähigkeit zum spontanen Zerfall eingebüsst hat. Wir wollen die Zahlenrechnung hier nicht durchführen, da auch hier neue Messungen an unseren reinsten Enzympräparaten wünschenswert sind.

Selbst-Regeneration der bei Gegenwart anderer Stoffe vergifteten Saccharase.

Bei den ersten Inaktivierungsversuchen von Euler und Svanberg war stets die Enzymlösung zu der Mischung von Substrat, Schwermetallsalz und Puffer, also zu der Mischung von Rohrzucker, Silbernitrat oder Quecksilberchlorid und Acetat oder Phosphat zuletzt zugesetzt worden. Das Enzym war also bei diesen Versuchen gleichzeitig mit dem Zucker und dem vergiftenden Metallsalz in Berührung gekommen.

Als bei den daran anschließenden Versuchen, welche mit Saccharase von Reinheitsgrad $I_f = 4 - 10$ angestellt waren, die Einwirkung des Giftes (Schwermetallsalzes) auf das Enzym in zuckerfreier Lösung studiert worden war, hatte sich das be-

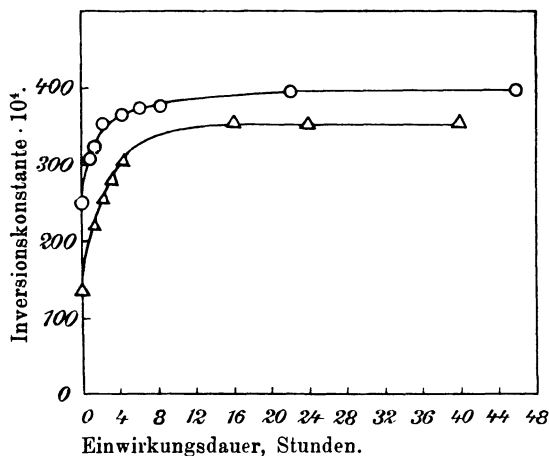


Fig. 26.

Zeiteffekt bei 1 ccm 3 F 5

0,16 mg HgCl_2 bzw. 0,276 mg HgCl_2 .

merkenswerte Resultat ergeben, das die Inaktivierung des Enzyms mit der Zeit freiwillig zurückgeht, und zwar in genau reproduzierbarer Weise, bis zu einem gewissen, von der zugesetzten Giftmenge weitgehend unabhängigen Endwert¹⁾.

Der normale Verlauf einer solchen Regeneration geht aus der Fig. 26 hervor. Die untere Kurve bezieht sich auf einen Versuch, bei welchem die

¹⁾ Siehe hierzu Euler und Svanberg, Sv. Vet. Akad. Arkiv. f. Kemi 7, Nr. 27; 1920.

Aktivität der unvergifteten Lösung durch die Konstante $k \cdot 10^4 = 750$ gekennzeichnet ist. Nach dem Giftzusatz ging die Aktivität auf den Wert 134 herunter und stieg dann durch den in Rede stehenden Effekt auf den Wert 355.

Der Endwert dieser Selbstregeneration ist von der Temperatur nicht oder nur sehr wenig abhängig. Dagegen steigt die Geschwindigkeit, mit welcher der Endwert der Selbstregeneration erreicht wird, stark mit der Temperatur. Die Selbstregeneration ist nicht auf die Quecksilbervergiftung beschränkt, sondern wurde auch bei der Vergiftung der Saccharase mit Silbernitrat festgestellt und studiert.

Der Effekt wächst mit steigendem Überschuss an vergiftendem Metallsalz.

Eine Fortsetzung dieser Versuche¹⁾ hat neuerdings ergeben, dass die bei weniger aktiven, bzw. weniger reinen Enzymlösungen beobachtete Selbstregeneration bei höher gereinigten Saccharaselösungen ($If > 50$) nicht mehr eintritt.

Die erwähnte Erscheinung der Selbstregeneration eines Enzyms ist in vieler Hinsicht analog mit dem in der Immunochemie viel besprochenen Danysz-Effekt²⁾.

Danysz hat 1902 den Befund mitgeteilt, dass die Giftigkeit einer Mischung von Ricin und Antiricin von der Herstellungsart abhängt. Wesentlich für das Eintreten des Danysz-Effektes sind offenbar folgende Faktoren:

1. Die relativen Mengen Toxin und Antitoxin, insofern als der Danysz-Effekt nur dann eintritt, wenn die Menge Antitoxin, welche zum ersten Teil des Toxins zugesetzt wird, einen Überschuss über das Toxin ausmacht.

2. Die Zeit, welche bei bzw. nach dem Mischen von Toxin und Antitoxin verfließt.

Was die Messung des Danysz-Effektes betrifft, so stellt man die Aktivitätszahl fest, welche sich ergibt, wenn man zur Mischung von einem Teil Toxin und einem Überschuss von Antitoxin unmittelbar den Rest des Toxins hinzufügt. Die Aktivität bezeichnet man mit 1.

Wartet man mit dem Zusatz des Toxinrestes einige Zeit, so findet man eine grössere Giftigkeit; wartet man genügend lange Zeit, so erreicht man einen — unter den gewählten Versuchsbedingungen konstanten — Grenzwert der Aktivität. Derselbe betrage auf die obige Einheit bezogen, beispielsweise 1,6. Die Differenz $1,6 - 1 = 0,6$ gibt dann die Grösse des schliesslichen Danysz-Effektes an.

Zwischen der Regeneration der Saccharase nach der Metallvergiftung und dem Danysz-Effekt kann folgende Parallele aufgestellt werden:

Substrat	Wirksamer Stoff	Hemmender Stoff
Erythrocyten	Toxin	Antitoxin
Rohrzucker	Saccharase	HgCl ₂ bzw. AgNO ₃ .

Aus dem Umstand, dass die „Selbstregeneration“, die in ungereinigten Lösungen der Saccharase eintritt, aber in solchen von $If > 50$ ausbleibt, kann der Schluss gezogen werden, dass der Vorgang durch die Anwesenheit von enzymatisch unwirksamen Beimengungen der Saccharase bedingt wird. Die nächstliegende chemische Deutung ist die, dass das Metallion von der Saccharase

¹⁾ Euler und Myrbäck, Zs f. d. ges. exp. Med. 33, 483; 1923.

²⁾ Danysz, Ann. Inst. Pasteur 16, 331; 1902. — Siehe hierzu Madsen und Arrhenius, Medd. Vet. Akad. Nobel-Inst. 1, Nr. 3; 1906. — Arrhenius, JI of Hyg. 8, 1; 1908.

mit verhältnismässig sehr grosser Geschwindigkeit gebunden wird, dass aber dann sofort eine mit geringerer Geschwindigkeit verlaufende Reaktion einsetzt, durch welche die Verunreinigungen mit den vergiftenden Metallionen reagieren und diese dadurch der Saccharase entziehen.

Auch innerhalb der lebenden Zelle kann die Saccharase durch Schwermetalle vergiftet werden. Dazu ist natürlich ein erheblicher Überschuss von Metallsalz, z. B. Silbernitrat erforderlich. Auffallend ist, dass auch dann, wenn die Hefe mehr als 4% ihres Gewichtes an Silber aufgenommen hat, die Regeneration der Saccharase mit Schwefelwasserstoff schnell und vollständig verläuft. Wie zu erwarten, tritt bei den Ag-Vergiftungen in Hefezellen die oben beschriebene Selbstregeneration der Saccharase auf und stellt, unter gewissen Bedingungen, etwa 100% des inaktivierten Enzyms wieder her¹⁾.

Andere Schwermetallsalze, diejenigen von Cu und Pb, verhalten sich insofern den Silbersalzen analog, als die Aktivitäts- p_H -Kurve einen ähnlichen Verlauf zeigt (Myrbäck, l. c. S. 22 u. 23). Indessen ist die Wirksamkeit des Cu und besonders des Pb per Milligramm sehr viel geringer als die des Ag.

Goldchlorid zeigte (bei $p_H = 4,5$) eine Giftwirkung von der gleichen Grössenordnung wie Sublimat.

Von älteren Versuchen über Vergiftung der Saccharase durch anorganische Salze seien als die ersten diejenigen von Duclaux²⁾ angeführt. Die von ihm beobachteten Vergiftungsgrade waren klein, teils wegen der Unreinheit seiner Enzymlösungen, teils — worauf Rona aufmerksam gemacht hat — wegen ungünstiger, nicht konstant gehaltener Aciditätsbedingungen. Einige weitere Angaben machten Bau³⁾ und Bokorny⁴⁾.

2. Schwermetallsalz-Vergiftung der Amylasen.

Unter den älteren systematischen Versuchen sind diejenigen von Mc Guigan⁵⁾ (Ag, Au, Hg, Cu, Pb, Ni, Co, Fe) zu erwähnen; im Anschluss an Mathews⁶⁾ betont Mc Guigan die Parallelität zwischen der Lösungstension der vergiftenden Metalle und ihrer Vergiftungsfähigkeit, erwähnt aber als offenbare Ausnahmen Pb und Co. Hata⁷⁾ hat die zur vollständigen Vergiftung der Speichelamylase erforderlichen Sublimatmengen angegeben. Eine Berechnung seiner Zahlen findet man in einer Untersuchung von Euler und Svanberg⁸⁾. Hier sei noch erwähnt, dass Hata die Umkehrbarkeit der Quecksilbervergiftung bei diesem und einigen anderen Enzymen nachweisen konnte, indem er die ursprüngliche Aktivität mittels KHS wieder herstellte.

¹⁾ Euler und Walles, H. 132, 167; 1924.

²⁾ Duclaux, *Traité de Microbiologie* 2, 379; 1898.

³⁾ Bau, *Wochenschr. f. Brauerei* 20, 562; 1903.

⁴⁾ Bokorny, *Biochem. Zs* 75, 375; 1916.

⁵⁾ Mc Guigan, *Amer. Jl Physiol.* 10, 444; 1904.

⁶⁾ Mathews, *Amer. Jl Physiol.* 10, 290; 1904.

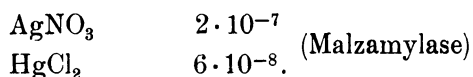
⁷⁾ Hata, *Biochem. Zs* 17, 156; 1909. — Siehe bzgl. Takadiastase auch Jacoby, *Biochem. Zs* 128, 95; 1922.

⁸⁾ Euler und Svanberg, *Fermentforschung* 3, 330; 1920. — Siehe daselbst auch den Hinweis auf ältere Arbeiten von Kjeldahl.

Mangansulfat soll nach Gigon und Rosenberg¹⁾ sogar in der Verdünnung $1/1000$ ‰ noch energisch aktivieren.

Weitere Angaben: E. Funk (Biochem. Zs 128), Kobaltammoniake.

Eine eingehende Untersuchung über Vergiftungserscheinungen an Amylasen und zwar sowohl Speichel- als Malz-Amylasen hat Urban Olsson²⁾ angestellt. Die Metallsalz-Konzentrationen, welche Inaktivierung auf die Hälfte der Wirksamkeit (Verzuckerung) hervorrufen, sind nach diesem Autor:



Was die Beziehung zwischen AgNO_3 -Konzentration und Inaktivierung betrifft, so ist anfangs die Vergiftung der angewandten Silbernitratmenge

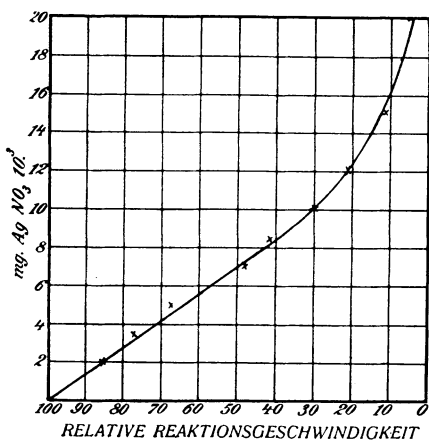


Fig. 27.

proportional, und scheint dann, wie bei der Saccharase, einem Grenzwert zuzustreben (Fig. 27). Vermutlich ist auch hier, wie bei anderen Enzymreaktionen, die Vergiftung der vom Enzym aufgenommenen Ag-Menge proportional.

Die Versuche Olssons, welche den Einfluss der Acidität auf die Vergiftung betreffen, sind noch nicht veröffentlicht.

Die Verhältnisse sind hier insofern komplizierter als diejenigen bei der Saccharase, als bei manchen Metallsalzen und gewissen Aciditäten auch die Inkubationszeit eine Rolle spielt,

also die Zeit, unter welcher das Enzym mit dem vergiftenden Metallsalz in Berührung ist. Der Einfluss der Acidität betrifft also auch die Inkubationszeit.

Wo eine Inkubationszeit in Betracht kommt, wird man in erster Linie zeitlich fortschreitende, irreversible Zerstörung des Enzyms vermuten, etwa durch Oxydation, die durch das Schwermetallsalz katalysiert wird.

Aus der (noch nicht veröffentlichten) Untersuchung U. Olssons sei folgender Versuch über den Einfluss der Acidität auf die Inkubationszeit angeführt:

Inkubationslösung: 19 ccm Acetatpuffer (var. pH) + 1 ccm
+ 1 ccm AgNO_3 -Lösung $6 \cdot 10^{-5}$ norm.
+ 5 ccm Malz-Amylase-Lösung $k = 0,024$. — Sf = 11,7.

Davon 10 ccm + 50 ccm 2%iger Stärkelösung + 20 ccm Acetatlösung (pH optimal)

Inkubationszeit 30 Minuten bei 37°.

pH im Inkubationskolben:	3,15	3,7	5,2	5,5–5,6	5,1
Rel. Reakt.-Geschw. k:	0,34	30	58	61	ohne Gift 100

¹⁾ Gigon und Rosenberg, Skand. Arch. Physiol. 20, 423; 1908.

²⁾ Urban Olsson, H. 114, 51; 1921; 117, 91; 1921; 119, 1; 1922; 126, 29; 1923.

Über den Einfluss von Metallgiften (CuSO_4) auf die Verflüssigung der Stärke durch Malz Amylase liegt bisher nur ein Versuch von U. Olsson (H. 119) vor.

Weitere Untersuchungen über die Vergiftung von Amylasen:

Speichel-Amylase: Kehoe (II Lab. Clin. Med. 7, 736; 1922). Das durch Hg oder Ag-Salze inaktivierte Enzym wird durch Alkalisalze teilweise reaktiviert.

Malz-Amylase: Gensichi Moci (II of Biochem. 2, 47; 1922).

3a. Tierische Lipasen (Butyrasen). Silbernitrat ist nach Kastle¹⁾ auffallenderweise ungiftig gegen Leberbutyrasen; HgCl_2 und CuSO_4 nach dem gleichen Autor mässig giftig (vielleicht waren die Lösungen zu sauer).

3b. Phytolipasen. Die von Hoyer²⁾ dann auch von Y. Tanaka³⁾ und Falk beschriebenen Aktivierungen durch Mangansalze konnten von Willstätter und Waldschmidt-Leitz⁴⁾ unter optimalen Wirkungsbedingungen nicht gefunden werden.

4. Emulsin. Nach Hébert⁵⁾ üben die Salze einiger seltener Erden, nämlich die des Thoriums und Zirkoniums schon in 0,005 %iger Lösung eine beträchtlich hemmende Wirkung auf Emulsin aus, während die Salze von Cerium und Lanthan unwirksam sind. Es bleibt zu untersuchen, ob es sich um spezifische Wirkungen oder um Aciditätsbeeinflussungen handelt.

5. Urease ist nach Duclaux (Traité, Bd. 2, S. 551) äusserst empfindlich gegen Cu- und Hg-Salze, wie die Zahlenangaben zeigen. Dies wird durch eine Untersuchung von Jacoby⁶⁾ bestätigt, welche auch die Reversibilität der Quecksilbervergiftung feststellte. Auch Ni, Co und Zn werden als Paralysatoren angegeben (Jacoby und Shimizu), Fe aber als unwirksam.

6. Trypsin. Ältere Angaben von Chittenden und Cummins. Hata (l. c.) hat die Quecksilberhemmung der Caseinverdauung durch Trypsin untersucht. Nach seinen Angaben würde 0,001 g Grüblers Trypsin durch etwa 0,01 g Sublimat deutlich gehemmt, 0,0002 g Grüblers Trypsin durch etwa 0,005 g Sublimat deutlich gehemmt.

Vollständige Hemmung erst bei grösseren Sublimatmengen. Die Zahlen sind durch die inaktiven Verunreinigungen natürlich in höchstem Grade beeinflusst. Durch KCN Reaktivierung.

7. Pepsin. Sublimat hemmt die Pepsinwirkung auf Ricin verhältnismässig wenig (Hata, l. c.). Über die Einwirkung der Metallpulver von Fe, Co, Ni, Cu, Zn teilt Tschuchihashi⁷⁾ einige Beobachtungen mit.

8. Proteasen der Autolyse werden nach Truffi⁸⁾ durch Hg-Salze in geringer Konzentration aktiviert und erst bei grösserer Konzentration gehemmt. Dagegen fand Hata am gelatinolytischen Enzym der Pferdeleber keine Aktivierung.

Wie Quecksilbersalze verhalten sich nach Preti⁹⁾ $\text{Pb}(\text{Ac})_2$, und nach Izar¹⁰⁾ Ag-Salze; Kupfersalze hemmen in mittleren Konzentrationen¹¹⁾.

¹⁾ Kastle, Chem. Zentralbl. 77, 1555; 1906.

²⁾ Hoyer, H. 50, 414 und zwar 433; 1907. — Siehe aber auch Connstein, Hoyer und Wartenberg, Chem. Ber. 35, 3988; 1902.

³⁾ Y. Tanaka, JI Coll. Engin. Tokyo 5, 142; 1912. — Chem. Zentralbl. 1913, I 667. — Siehe hierzu K. G. Falk und Hamlin, Am. Chem. Soc. 35, 210; 1912.

⁴⁾ Willstätter und Waldschmidt-Leitz, H. 134, 161 und zwar 171; 1924.

⁵⁾ Hébert, Bull. Soc. Chim. (5) 35, 1299; 1906.

⁶⁾ Jacoby, Biochem. Zs 76, 275; 1916. — Jacoby und Shimizu, Biochem. Zs 128, 89; 1922.

⁷⁾ Tschuchihashi, Biochem. Zs 140, 149; 1923.

⁸⁾ Truffi, Biochem. Zs 23, 270; 1909.

⁹⁾ Preti, H. 58, 539; 1909.

¹⁰⁾ Izar, Biochem. Zs 20, 249; 1909.

¹¹⁾ Preti, H. 60, 317; 1909.

9. Chymosin. Sublimatvergiftung lässt sich nach Hata durch KCN aufheben. Quantitative Angaben über Hemmung von Pflanzenlab macht Gerber¹⁾ bezüglich Salzen von Hg, Ag, Cu, Zn, Cd, Mn, Co, Ni, Fe.

10. Katalasen. Die ersten genaueren Angaben verdankt man Senter²⁾. HgCl₂ vermindert die Wirkung der Blutkatalase in der Konzentration $\frac{1}{2000000}$ auf die Hälfte des ursprünglichen Wertes. — Santesson³⁾ fand starke Vergiftung der Muskelkatalase durch HgCl₂ und AgNO₃.

Bei einem Versuch von Hata (l. c.) waren zur Vergiftung auf die halbe Wirksamkeit 0,005 mg Sublimat per Liter erforderlich.

Starke Giftwirkungen übt auch CuSO₄ auf Blutkatalase aus. Dieselbe wird ferner durch metallisches Cu geschädigt [Händel und Segall⁴⁾].

Weitere Angaben: E. Funk (Biochem. Zs 128), Kobaltammoniake.

11. Gärungsenzyme. Hier werden Eisen- und Mangan-Salze oft als kräftige sekundäre Aktivatoren angegeben. Vielleicht rührt diese Wirkung aber nicht von einer Veränderung oder Komplexbildung am Enzym her, vielmehr kann die Beschleunigung mit derjenigen in Zusammenhang stehen, welche durch diese Metallionen bei nicht enzymatischen Katalysen hervorgerufen werden. — Auf die von Kostytschew⁵⁾ gefundenen interessanten Wirkungen von Zn- und Cd-Salzen kann hier nur verwiesen werden.

12. Oxydations-Reduktions-Enzyme: An der Wirkung vieler der hierher gehörenden Enzyme sind Fe und Mn vermutlich beteiligt. Im speziellen Teil (II, 3) wird besonders die Rolle des Eisens und Mangans bei biochemischen Oxydationen in vitro (Teilnahme an der Oxydation der Phenole) sowie vor allem in Zellen und Geweben [im Anschluss an die bemerkenswerten Versuche von O. Warburg⁶⁾] zu besprechen sein.

Oligodynamische Wirkungen von Metallen.

Besonders in der Pflanzenphysiologie und Bakteriologie ist die tödliche Wirkung, welche die Metalle selbst auf lebende Zellen ausüben, ohne dass sich mit den gewöhnlichen Reagenzien die entsprechenden Metallionen in Lösung nachweisen liessen, seit Naegeli unter der Bezeichnung oligodynamische Wirkung bekannt.

In neuerer Zeit hat sich P. Saxl⁷⁾ wieder mit diesen Erscheinungen beschäftigt. Er nimmt an, dass die Metalle eine eigenartige Form der keimtötenden Kraft besitzen, welche nicht mit der Löslichkeit der Metalle zusammenhängen soll. Saxl nimmt eine „physikalische Energie“ an, „die sich zunächst auf der Oberfläche der Metalle abspielt, jedoch auch in andere Medien übergehen kann“.

Demgegenüber kamen zunächst Pfeiffer und Kadletz⁸⁾, sowie Baumgarten und Luger⁹⁾ zur Einsicht, dass die oligodynamischen Wirkungen auf sehr kleine Konzentrationen der betreffenden Metallionen zurückzuführen sind. Silber und Quecksilber sind z. B. in Konzentrationen wirksam, welche weit unter der Löslichkeitsgrenze fast sämtlicher Verbindungen dieser Metalle liegen; abgesehen davon werden diese Metallionen durch diejenigen Stoffe, welche inaktiviert, bezw. vergiftet werden, komplex gebunden, so dass diese Stoffe die Lösung des Metalls und die Bildung neuer Ionen befördern.

¹⁾ Gerber, Soc. Biol. 68, 384; 631; 634; 636; 935; und 69, 102, 211; 1910.

²⁾ Senter, Zs f. physik. Chem. 51, 673; 1905.

³⁾ Santesson, Skand. Arch. f. Physiol. 33, 105 und 108; 1915.

⁴⁾ Händel und Segall, Zs f. Hyg. und Infekt. 97, 1; 1922.

⁵⁾ Kostytschew, H. 79, 130 und 358; 1912; 89, 367; 1914. — Kostytschew und Subkowa, 111, 132; 1920. — Siehe auch May, Biochem. Zs 141, 450; 1923.

⁶⁾ O. Warburg, Biochem. Zs 119, 134; 1921. — O. Warburg und Brefeld, Biochem. Zs 145, 461; 1924.

⁷⁾ P. Saxl, Wien. klin. Wochenschr. 30, 714; 1917. — Siehe auch ebenda, S. 1426; 1917. — Wien. klin. Wochenschr. 36, 551; 1923.

⁸⁾ Pfeiffer und Kadletz, Wien. klin. Wochenschr. 30, 997 und 1221; 1917.

⁹⁾ Baumgarten und Luger, Wien. klin. Wochenschr 30, 1222; 1917.

Ferner zeigte Doerr¹⁾ durch eine Reihe von Untersuchungen, dass der Träger der oligodynamischen Silberwirkung dialysabel ist, dass Silber durch Glühen, Kochen, durch Behandlung mit KCN usw. seine Wirksamkeit verliert und dass die bactericide Wirkung den Ag-Ionen zukommt, die sich in oligodynamisch wirksamem Wasser nach Hönigschmidt und Birkenbach nephelometrisch nachweisen lassen. Damit ist Saxls oben erwähnter Standpunkt widerlegt.

Übrigens dürfte die relative Wirksamkeit verschiedener Metalle in hohem Grad von den nicht enzymatischen Bestandteilen der Lösungen abhängen, welche die Metallionen komplex binden²⁾.

Bereits 1912 haben Euler und Kullberg Gelegenheit gehabt, auf die inaktivierende Einwirkung des metallischen Quecksilbers auf Saccharaselösungen aufmerksam zu machen.

Bei neueren Versuchen von Svanberg befanden sich 20 ccm einer Saccharaselösung von der Aktivität $(18,5^{\circ}) \cdot 10^4 = 470$ 7 Tage in Berührung mit 5 ccm reinsten metallischen Quecksilbers (Oberfläche etwa 10 cm²). In dieser Zeit nahm die Aktivität der Saccharase um rund 50% ab, was einer Giftwirkung von 0,05 mg Hg per Kubikzentimeter Enzymlösung entsprechen würde.

Im übrigen sei auf die Arbeit von Euler und Svanberg (Fermentf.) verwiesen.

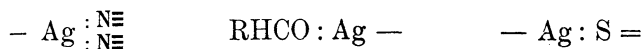
Fassen wir die im vorstehenden angegebenen Daten über Vergiftung durch Schwermetallsalze zusammen, so ergibt sich etwa folgendes:

Die Hemmungen, soweit sie reversibel sind, werden dadurch hervorgerufen, dass die betreffenden Metallionen mit den Enzymen nach stöchiometrischen Verhältnissen zu Verbindungen zusammentreten. Die Sonderstellung, welche die eigentlichen Schwermetalle, vor allem Ag und Hg in dieser Hinsicht einnehmen, dürfte mit ihrer Eigenschaft zusammenhängen durch gewisse organische Gruppen entionisiert zu werden, wodurch eine feste Bindung des Silbers eintritt.

Man kann demgemäss, wie dies früher schon Loew, Mathews, Mc Guigan u. a. getan haben, die Bildung von Komplexen annehmen. Dafür spricht in erster Linie die Reihenfolge der Vergiftungsfähigkeit der verschiedenen Metallionen.

Mathews hebt, wie S. 183 erwähnt, die Parallelität zwischen Vergiftungsfähigkeit und Lösungstension der Schwermetalle hervor. Dies ist insofern zutreffend, als die Fähigkeit zur Komplexbildung im Allgemeinen bei den Metallen mit kleiner Lösungstension am meisten ausgeprägt ist. Eine Parallelität zwischen den beiden letztgenannten Grössen besteht indessen, wie Verfasser³⁾ vor längerer Zeit nachgewiesen hat, keineswegs.

Als Komplexe, die hier in Frage kommen können, wird man, um die Ideen zu fixieren, u. a. folgende Typen annehmen können (wo Hauptvalenzen durch —, Nebenvalenzen durch : angedeutet sind):



¹⁾ Doerr, Biochem. Zs 106, 110 und 107, 207; 1920. — R. Doerr und W. Berger, 131, 351; 1922.

²⁾ Hinsichtlich enzymatischer Reaktionen liegen hierüber noch keine Untersuchungen vor. Was die oligodynamische Metallwirkung auf Organismen betrifft, so kann auf Mitteilungen von Spiro verwiesen werden (Münch. med. Wochenschr. 1905, 1601. — Biochem. Zs 74, 265; 1916).

³⁾ Euler, Chem. Ber. 36, 3400; 1903.

Ferner kann man aber an eigentliche Salze der Enzyme denken, bei welchen das Silber bezw. Quecksilber an Stickstoff oder Schwefel gebunden ist; bei solchen Salzen ist die Dissoziation oft sehr gering.

Leider sind die rein chemischen Untersuchungen, die über Metallkomplexe vorliegen, noch so wenig fortgeschritten, dass für keine der in Betracht kommenden Typen die Komplexbildungskonstanten, also die Affinitäten der Metallionen zu den betreffenden organischen Stoffen in genügender Anzahl bekannt sind. Man würde sonst aus der Reihenfolge der Vergiftungsfähigkeiten der verschiedenen Metalle und aus der Grösse der Wirkung Schlüsse auf die Art der chemischen Gruppen ziehen können, welche bei jedem Enzym die betreffenden Metalle binden. Auch die nunmehr in einzelnen Fällen gut bekannte Beziehung zwischen Vergiftungsgrad und Aktivität der Lösung wäre geeignet, Analogien zwischen dem vergifteten Enzym und Stoffen bekannter Konstitution finden zu helfen.

Welche Vorstellung man sich aber, als Arbeitshypothese, über den chemischen Charakter der Schwermetallverbindungen der Enzyme macht, daran kann man — besonders auf Grund der elektrometrischen Messungen — festhalten, dass die Schwermetallsalze in dem Grade inaktivieren, in welchem die Metalle vom Enzym gebunden werden.

b) Salze der Alkalien, alkalischen Erden und Leichtmetalle. Wirkungen anorganischer Anionen.

Alkali- und Erdalkalisalze aktivieren oder hemmen Enzymwirkungen in der Regel erst in grösseren Konzentrationen als Schwermetallsalze.

Viele der beobachteten positiven und negativen Salzwirkungen lassen sich ohne weiteres als Aciditätsänderungen deuten. Immerhin bleiben nach Ausscheidung solcher Fälle andere Angaben bestehen, deren chemische Aufklärung von bedeutendem Interesse wäre.

Alkalisalze. In erster Linie ist hier die offenbar wesentliche Rolle der Alkalisalze bei der Stärkespaltung durch tierische Amylasen zu erwähnen. Diese Wirkung ist schon lange bekannt und oft in einzelnen Versuchen bestätigt worden.

Schon Nasse ¹⁾ und Effront ²⁾ geben an, dass Amylase durch kleine Mengen vieler Alkalisalze in hohem Grade begünstigt wird.

Natriumchlorid befördert die Amylase-Wirkung nach Osborne, Bierry und Schäffer ³⁾, Cole ⁴⁾ und Wohlgemuth ⁵⁾.

¹⁾ Nasse, Pflüg. Arch. 9, 138; 1875.

²⁾ Effront, C. r. 115, 1324; 1892.

³⁾ Osborne, Bierry und Schäffer, Soc. Biol. 62, 723; 1907.

⁴⁾ Cole, Jl of Physiol. 30, 202, 281 (Saccharase); 1903.

⁵⁾ Wohlgemuth, Biochem. Zs 9, 10; 1908.

Man verdankt Bierry zwei wesentliche Feststellungen: Bierry und Giaja¹⁾ fanden, dass Pankreassaft und Pankreasextrakte durch Dialyse diastatisch unwirksam werden, aber durch Salzzusätze wieder aktiviert werden.

Ferner findet man bei Bierry²⁾ zum erstenmal ausdrücklich den Unterschied erwähnt, dass tierische Amylasen nur in Gegenwart von Salzen wirken, während Malzamyrase keinen Salzzusatz benötigt³⁾. Es bleibt noch zu entscheiden, ob auch andere pflanzliche Amylasen von Salzgegenwart unabhängig sind⁴⁾. Nach H. Haehn und Schweigart (Biochem. Zs 143, 516) träfe dies nicht zu. (Methodik nach Wohlgemuth.)

Cole⁵⁾ war zum Resultat gekommen, dass Anionen die Amylase begünstigen, Kationen schwächen, und zwar soll der Effekt um so grösser sein, je grösser die Elektroaffinität (diese Grösse meint Cole offenbar mit dem etwas unbestimmten Ausdruck: actinising power) der Ionen ist. Jedenfalls sind, wie auch Wohlgemuth⁶⁾, sowie Neilson und Terry⁶⁾ hervorhoben, Anionen wirksame Aktivatoren.

Einen wesentlichen Fortschritt hinsichtlich der Neutralsalzwirkung auf tierische Amylasen brachte die Untersuchung von Michaelis und Pechstein⁷⁾. Diese Forscher gehen davon aus, dass reine Speichel-Amylase die Stärke überhaupt nicht spaltet und erst durch die Mitwirkung von Neutralsalzen, deren Anionen sich mit der Amylase zu „Komplexen“ verbinden, aktiviert wird.

Michaelis und Pechstein fanden, dass die relative enzymatische Wirksamkeit der verschiedenen Anionen auf Stärke sehr verschieden ist, und nehmen daher ungleiche Aktivität der verschiedenen „Komplexe“ an. Am stärksten wirken Cl⁻-Verbindungen, schwächer NO₃⁻-Verbindungen, noch sehr viel schwächer die Sulfat-, Acetat- und Phosphat-Verbindungen. (Die verschiedenen Aciditäts-Optima dieser Verbindungen sind bereits S. 70 erwähnt worden.)

Ähnlich ist der Befund von Willstätter, Waldschmidt-Leitz und Hesse⁸⁾ an Pankreas-Amylase; bei optimaler Acidität (p_H = 6,8) wird dieselbe am bedeutendsten durch Chloride aktiviert. Durch Gegenwart von Alkalichloriden kommen Höchstwerte zustande, die sich durch gleichzeitige Anwesenheit anderer Anionen, z. B. Acetationen nicht mehr steigern lassen. Willstätters Ergebnisse (siehe folgende Tabelle) gelten allerdings für gleichzeitige Anwesenheit von Phosphatpuffer.

¹⁾ Bierry und Giaja, C. r. 143, 300; 1906. — Siehe ferner Preti, Biochem. Zs 4, 1; 1907. — Slosse und Limbosch, Arch. int. Physiol. 6, 365; 1908. — E. C. Kendall und Sherman, Am. Chem. Soc. 32, 1087; 1910.

²⁾ Bierry, Biochem Zs 40, 357; 1912.

³⁾ Siehe auch Euler und Svanberg, H. 112, 193; 1920, sowie A. Hahn und Harpuder, Zs Biol. 71, 302; 1920. — Aber W. S. Iljin, Biochem. Zs 132, 511; 1922.

⁴⁾ Siehe z. B. Sjöberg, Biochem. Zs 133, 218; 1922. — Fermentf. 4, 97; 1920.

⁵⁾ Cole, JI of Physiol. 30, 202, 281 (Saccharase); 1903.

⁶⁾ Neilson und Terry, Am. JI Physiol. 22, 43; 1908.

⁷⁾ Michaelis und Pechstein, Biochem. Zs 59, 77; 1914.

⁸⁾ Willstätter, Waldschmidt-Leitz und A. R. F. Hesse, H. 126, 143; 1923.

0,0032 ccm Glycerinauszug, 25 ccm 1%ige Stärke, 10 ccm 0,2 n Phosphatpuffer.
Temp. 37°. Die Zahlen bedeuten mg Maltose in 10 Minuten.

Zusatz von je 1 ccm	p _H = 5,4	p _H = 6,0	p _H = 6,8	p _H = 7,5	p _H = 8,0
Wasser	4,5	12,35	18,0	10,0	3,7
n/20 NaCl	5,66	16,0	33,6	19,7	12,9
n/10 NaCl	8,06	17,1	39,2	25,2	18,5
n/5 NaCl	9,43	24,1	39,05	32,15	26,75
n NaCl	9,09	18,0	40,2	31,4	29,7
2n NaCl	8,06	18,2	34,4	32,1	31,35

„Nach den in der Tabelle zusammengestellten Versuchen ist für die Aktivierung (der Pankreas-Amylase) durch Chlorion ein Konzentrationsbereich von 0,003—0,03 Normalität optimal.“ Demgemäss ist 0,03% NaCl-Konzentration ausreichend zur Aktivierung. Ein ähnliches Optimalgebiet der NaCl-Konzentration (0,008—0,5 n) fand O. Holmbergh¹⁾ für Leberamylase.

Für Speichelamylase²⁾ fand Bang (Biochem. Zs 32) die Grenzen 0,05% bis 0,2%, „so dass der Speichel ungefähr den NaCl-Gehalt besitzt, der dem Optimum der Aktivierung entspricht“.

Die Beobachtung von Falk und Winslow³⁾, dass KBr in Konzentrationen 1:100000 die Caseinverdauung durch Trypsin stark aktiviert, verdient weitere Prüfung und Beachtung.

Alkalijodide hemmen die Verzuckerung der Malz-Amylase⁴⁾; sie befördern, wie die Chloride, die Stärke-Verzuckerung durch Speichel- und Pankreas-Amylase; die Verzuckerung durch Leberamylase wird dagegen verzögert⁵⁾. Bemerkenswert ist ferner, dass der Abbau der Stärke zu Dextrinen durch Leber-Enzym von Jodiden beschleunigt wird. Es scheint also, dass sich Teil-Enzyme der „Amylase“ (oder die Substrate derselben) gegen Jodide ungleich verhalten.

Saccharase der Hefen wird von Neutralsalzen wenig beeinflusst, erst bei hohen Konzentrationen tritt Hemmung auf⁶⁾. — Darmsaccharase verliert nach

¹⁾ Holmbergh, H. 134, 68; 1924.

²⁾ Mit der Chlorid-Aktivierung hängt vielleicht folgende Beobachtung Rogers zusammen: Menschlicher Speichel wird durch 10—15 Minuten langes Erhitzen auf 85—100° inaktiviert. Setzt man zu der erhitzten Lösung eine kleine Menge frischen Speichels, so verzuckert dieselbe viel stärker als die zugesetzte Speichelmenge allein. Diese Beobachtung ist später von Starkenstein und von Bang (Biochem. Zs 32, 417) bestätigt und ergänzt worden.

Biedermanns auffallende Angaben (Fermentforsch. 1, 385; 1916) haben von anderer Seite keine einwandfreie Bestätigung erfahren. Siehe auch 6. Kapitel.

³⁾ Falk und Winslow, Biol. Chem. 33, 453; 1917.

⁴⁾ O. Holmbergh, Biochem. Zs 145, 244; 1924.

⁵⁾ In welchem Grade diese Inaktivierung reversibel ist und ob die Bildung von Hypojodit dabei eine Rolle spielt, bleibt noch zu untersuchen.

⁶⁾ Neuschlosz, Pflüg. Arch. 181, 45; 1919.

Bierry¹⁾ durch Dialyse ihre Wirksamkeit und gewinnt sie durch NaCl-Zusatz wieder.

Andere Enzymreaktionen sind, soweit bekannt, nicht im gleichen Grad von der Gegenwart von Alkalihalogeniden abhängig wie die tierischen Amylasen, insofern als schon geringe Mengen stark aktivieren und unentbehrlich sind. NaCl, das nach Tanaka die Ricinus-Lipase aktivieren soll, fanden Willstätter und Waldschmidt-Leitz (H. 134) stark hemmend.

In grösseren Konzentrationen — von etwa 2 bis 5% an — hemmen die Alkalisalze der starken Mineralsäuren viele Enzymwirkungen mehr oder weniger vollständig.

Einen wesentlichen Einfluss der Alkalijodide auf die Abspaltung der Phosphorsäure aus Lactacidogen fand Embden mit seinen Mitarbeitern²⁾.

Die Zymophosphat-Synthese (Glucose) durch Trockenhefe konnte durch Jodide nicht aktiviert, sondern nur gehemmt werden³⁾.

Die Wirkung der Phosphate auf Amylasen ist eine zweifache: Einerseits wirken diese Salze wie in anderen Enzymlösungen als „Puffer“ (vgl. S. 49); diese Wirkung dürfte in erster Linie bei den älteren Versuchen von Effront in Betracht kommen. Andererseits wird bei tierischen Amylasen von mehreren Forschern eine eigentliche Aktivierung durch die Phosphationen angenommen⁴⁾ [Kendall und Sherman (l. c.), Michaelis und Pechstein (l. c.), Böhne⁵⁾]. Dagegen finden Willstätter, Waldschmidt-Leitz und Hesse bei Pankreas-Amylase und Holmbergh bei Leber-Amylase keine ausgeprägte Phosphat-Aktivierung.

Die spezifische Wirkung der Gärungsenzyme durch Phosphate und Arseniate sind im II. Teil des Buches behandelt.

Acetat-Ionen scheinen wenig wirksam zu sein.

Nach F. Krüger (1902) verzögern NaCl, KCl, NH₄Cl, CaCl₂, MgCl₂ in äquivalenten Mengen in gleicher Weise. Man kann daraus den Schluss ziehen, dass der hemmende Einfluss des Anions der überwiegende ist. Dies erinnert an die übereinstimmenden Resultate von J. Schütz⁶⁾ und Levites⁷⁾⁸⁾, dass die peptische Verdauung hauptsächlich durch Anionen geschwächt wird.

Katalasen sind gegen Alkalichloride verhältnismässig empfindlich⁹⁾; Nitrate und Chlorate sind für Katalase direkte Gifte.

Nach Kudo wird die verdauende Wirkung des Pankreatins durch

¹⁾ Bierry, Biochem. Zs 40, 357 und 44, 415; 1912.

²⁾ Siehe z. B. Embden und Lehnartz, H. 134, 243; 1924.

³⁾ Euler und Westling, H. 140, 164; 1924.

⁴⁾ Nach Roger sollen Phosphate für die Wirksamkeit der Speichelamylase unbedingt nötig sein (Soc. Biol. 65, 375; 1908; 62, 833, 1020, 1070; 1907).

⁵⁾ Böhne, Fermentf. 6, 200; 1922.

⁶⁾ J. Schütz, Hofm. Beitr. 5, 406; 1904. — ⁷⁾ Levites, H. 48, 187; 1906.

⁸⁾ Neue Messungen verdankt man Rona und Kleinmann, Biochem. Zs 150, 444; 1924.

⁹⁾ Lockemann, Thies und Wichern, H. 58, 390; 1909.

Alkalisalze im allgemeinen verzögert; durch NaCl etwas mehr als durch NaNO_3 ; Kaliumsalze hemmen nach diesem Autor weniger als Natriumsalze.

Natriumfluorid. Dieses Salz nimmt unter den Alkalihalogeniden eine biologische Sonderstellung ein, die mit seinen chemischen Besonderheiten, insbesondere den Löslichkeitsverhältnissen der Fluoride in Zusammenhang stehen.

Natriumfluorid ist für eine Anzahl von Enzymen ein starker Paralytiker.

Lipase wird durch dieses Salz mehr als von irgend einem anderen Antiseptikum geschädigt [Loevenhart¹⁾]; Davidsohn¹⁾ bestätigt diese Angabe. Die Ursache ist vermutlich die, dass das NaF den Aktivator Ca ausfällt. Bemerkenswert ist der Befund von Rona²⁾³⁾ und Pavlovič²⁾, dass NaF die Leber-Lipase und Serum-Lipase stark hemmen, die Pankreas-Lipase nur wenig; es wäre immerhin möglich, dass hier die Begleitstoffe dieser Enzyme eine ausschlaggebende Rolle spielen, sei es direkt, oder aber durch Beeinflussung des Ca-Gleichgewichtes.

Chymosin wird geschädigt (vielleicht ebenfalls durch Ca-Fällung), nicht dagegen stärkere Trypsinlösungen [Kaufmann⁴⁾]. Den Einfluss der Fluoride auf Thrombin haben Bordet und Gengou⁵⁾ eingehend studiert. Die Wirkung des Erepsins auf Dipeptide wird durch NaF teils gehemmt, teils gefördert [Abderhalden, Caemmerer und Pinkussohn⁶⁾]. Auf Pepsin und Trypsin hat NaF nach Vandavelde keinen Einfluss. NH_4F hebt nach Buchner die Wirkung der Zymase auf⁷⁾. Über den Einfluss auf Diastasen haben Effront und Rockwood Versuche angestellt. U. Olsson (H. 117) fand keine Hemmung der Malzamyase.

Sehr bemerkenswert sind die von Embden⁸⁾ und seinen Mitarbeitern festgestellten Einflüsse des Natriumfluorides auf den Kohlehydrat-Phosphat-Stoffwechsel im Muskel, wobei NaF nach Embden den Aufbau von Lactacidogen kräftig fördert. Ob hier eine eigentliche Aktivierung vorliegt, ist wohl noch nicht entschieden; Verf. möchte die Vermutung äussern, dass das Fluorid durch Hemmung einer Gegenreaktion des Lactacidogenaufbaues zur Wirkung kommt; ebenso in der Hefe (Euler und Myrbäck).

Sulfate. Natrium- und Kalium-Sulfat hemmen die Labwirkung des tierischen Chymosins proportional ihrer Menge (wenn die labende Kraft durch die Koagulierung roher Milch gemessen wird), während pflanzliches Lab in seiner

¹⁾ Loevenhart und Pierce, *Jl Biol. Chem.* 2, 391; 1907. — Siehe auch Kastle und Loevenhart, *Amer. Chem. Jl* 24, 491; 1900. — Davidsohn, *Biochem. Zs* 49, 249; 1913.

²⁾ Rona und Pavlovič, *Biochem. Zs* 130, 225; 1922.

³⁾ Rona und Takata, *Biochem. Zs* 134, 108; 1922.

⁴⁾ Kaufmann, *H.* 39, 434; 1903. — Dagegen findet Treyer Hemmung von Trypsin (l. c.).

⁵⁾ Bordet und Gengou, *Ann. Inst. Pasteur*, 18, 98; 1904.

⁶⁾ Abderhalden, Caemmerer und Pinkussohn, *H.* 59, 293; 1909.

⁷⁾ Siehe hierzu auch Euler und Westling, *H.* 140, 164; 1924.

⁸⁾ Embden und Lange, *H.* 130, 350; 1923. — Embden und Lehnartz, *H.* 134, 273; 1924. — Embden und Haymann, *H.* 137, 154; 1924.

koagulierenden Wirkung durch kleine Dosen unterstützt, durch grössere gehemmt wird. Dieses verschiedene Verhalten des pflanzlichen und des tierischen Labs gegenüber neutralen Sulfaten erklärt Gerber wie dasjenige der Sulfate durch die von diesen Salzen verursachte Fällung von Kalk, der bei der pflanzlichen Labgerinnung weniger nötig sein soll als bei der tierischen.

Die Pepsinverdauung wird nach Grützner verzögert [Pfleiderer¹⁾].

Was andere anorganische Anionen betrifft, so wären hier diejenigen der Borsäure zu erwähnen, welche nach Duclaux Chymosin hemmen, nach Agulhon²⁾ aktivieren. Vermutlich liegt hier aber keine spezifische Wirkung des Borsäure-Anions vor, sondern eine Aciditätsbeeinflussung. Nach dem gleichen Autor sollen übrigens hydrolysierende Enzyme in kalt gesättigter Borsäurelösung ungeschwächt wirksam sein.

Arseniat beschleunigt die Gärung, aktiviert Phosphatase (Harden und Young; Euler und Myrbäck, H. 136, 127).

Einfluss auf Pepsin gering (Smorodinzew und Mitarbeiter).

Arsenite und Nitrite vergiften irreversibel (siehe S. 216); ebenso vermutlich Na-Wolframat und NH_4 -Molybdät, bei welchen U. Olsson³⁾ eine erhebliche Inaktivierung der Malzamyase beobachtet hat.

Alkalische Erden.

Eine ausgeprägte Aktivierung ruft CaCl_2 bei Lipasen hervor, wie bezüglich der Pankreas-Lipase aus den älteren Arbeiten von Pottevin⁴⁾, Kanitz⁵⁾, Pekelharing⁶⁾ und Falk⁷⁾ hervorgeht. Sie tritt auch bei der Spaltung von Estern ein, und zwar sowohl von Methylbutyrat als von Tributyrin. Die Tabelle S. 194 ist der eingehenden Untersuchung von Willstätter und Memmen⁸⁾ entnommen, welche an Pankreas-Enzym angestellt ist.

Aus der Tabelle geht auch der interessante Befund hervor, dass CaCl_2 mit Seife eine potenzierte Kombinationswirkung ergibt (Nr. 14), viel günstiger als mit Glykocholat. Die bedeutendste Aktivierung ist mit Albumin + Natriumoleat + CaCl_2 erzielt worden (Nr. 15, 16 und 17).

Bei der Ester-Spaltung scheint das Calcium die Rolle eines wesentlichen Aktivators zu spielen. Jedenfalls ist Ca hier nicht durch Alkali ersetzbar.

Über den Einfluss von Kationen auf die enzymatische Stärke- oder Glykogen-Spaltung war bis jetzt nichts Sicheres bekannt. Kürzlich hat nun H. Lange⁹⁾ in Embdens Laboratorium einige interessante Versuche über den enzymatischen Glykogenabbau im lebensfrischen Muskelbrei mitgeteilt. Dieser Abbau „zeigt wie bekannt mit zunehmender H-Konzentration eine

¹⁾ Pfleiderer, Pflüg. Arch. 66, 605; 1897. — Siehe dagegen Ascher, Boas Arch. 14, 629; 1908.

²⁾ Agulhon, C. r. 148, 1340; 1909.

³⁾ Urban Olsson, H. 117, 91 und zwar 101; 1922.

⁴⁾ Pottevin, C. r. 136, 767; 1903.

⁵⁾ Kanitz H. 46, 482; 1905.

⁶⁾ Pekelharing, H. 81, 355; 1912.

⁷⁾ Falk, Biol. Chem. 36, 229; 1918.

⁸⁾ Willstätter und Memmen, H. 133, 229 und zwar 235; 1924.

⁹⁾ H. Lange, H. 137, 105; 1924.

Hydrolyse von Methylbutyrat unter Aktivierung.

Vol. 20 ccm, davon 5 ccm 2,5/n-Puffer von $\text{NH}_3 + \text{NH}_4\text{Cl}$ (1 : 2, $\text{pH} = 8,9$);
0,2 g Ester; 0,8 ccm Glyc.-Lsg. d. Pankreasprobe Nr. III; Zeit 60'; 30°.

Nr.	Na-Oleat mg	CaCl ₂ mg	Na- glykocholat mg	Albumin mg	n/5 KOH ccm	Spaltung %	Aktivierungs- Effekt etwa %
1	—	—	—	—	0,40	4,6	—
2	1,25	—	—	—	0,74	8,5	80
3	5,0	—	—	—	0,67	7,7	70
4	—	—	1,25	—	0,66	7,5	60
5	—	—	2,5	—	0,60	6,9	50
6	—	—	5,0	—	0,60	6,9	50
7	—	—	20,0	—	0,60	6,9	50
8	—	1,25	—	—	0,66	7,5	60
9	—	10,0	—	—	0,53	6,1	30
10	5,0	—	5,0	—	1,58	18,1	290
11	—	—	10,0	15,0	0,84	9,6	110
12	—	10,0	10,0	—	0,80	9,1	100
13	10,0	—	—	15,0	1,90	21,7	370
14	10,0	10,0	—	—	2,30	26,3	470
15	10,0	10,0	—	7,5	2,50	28,6	510
16	10,0	10,0	—	15,0	3,30	37,8	700
17	10,0	10,0	—	30,0	3,54	40,5	780

steigende Hemmung. Durch Zusatz von verschiedenen Kationen wird diese Hemmung verringert, oder es tritt sogar eine Beschleunigung ein. Einwertige Kationen sind schwächer wirksam als zweiwertige, die Reihenfolge ist Na, K, NH_4 bzw. Mg, Ba, Ca. Diese Kationenwirkung tritt um so deutlicher in Erscheinung, je mehr man die pH nach der sauren Seite verschiebt“.

Ferner sei auf die früheren Erfahrungen aus dem Embdenschens Laboratorium über die Einwirkung der Calcium-Ionen auf die enzymatische Lactacidogen-Synthese hingewiesen.

α -Prothrombase wird durch Ca-Salze in Thrombase verwandelt [Morawitz¹⁾]. Auch die Pektase, das pflanzliche koagulierende Enzym, welches Pektin in Pektinsäure überführt, soll erst in Gegenwart von Ca, welches hier durch Sr und Ba ersetzt werden kann, seine Wirkung entfalten²⁾.

Einen kräftig aktivierenden Einfluss üben Ca- und Mg-Salze nach Delezenne und nach E. Zuntz³⁾ auf die Trypsinverdauung⁴⁾ aus.

Auch Ereptase wird nach Abderhalden, Caemmerer und Pinkusohn (l. c.) durch Ca-Salze aktiviert (vgl. Willstätters Befund an Trypsin).

¹⁾ Morawitz, Hofm. Beitr. 4, 381; 1903; 5, 133; 1904.

²⁾ Bertrand und Mallèvre, C. r. 119—121; 1894—95.

³⁾ E. Zuntz, Soc. Biol. 59, 477 und 60, 1070; 1906.

⁴⁾ Der schädigende Einfluss von CaCl_2 , welchen Malfitano bei Milzbrandprotease gefunden hat, beruht vielleicht darauf, dass das Optimum der Ca-Konzentration weit überschritten war.

Urease wird nach Hosokawa und nach Kochmann (Biochem. Zs 149 und 151) durch Ca und Sr aktiviert und geschützt.

Antagonistische Wirkungen der alkalischen Erden gegen Schwermetallsalze, wie sie J. Loeb¹⁾, Hawkins²⁾, Spiro³⁾, Osterhout⁴⁾ u. a. bei Organismen beobachtet haben, sind bei Enzymvergiftungen noch nicht beschrieben.

Andererseits kennen wir auch rein chemische Reaktionen, in welchen Ca als spezifischer Katalysator wirkt. So hat O. Loew⁵⁾ gefunden, dass Kalk ein besonders geeignetes Mittel ist, um Formaldehyd zu Zucker zu kondensieren. Das gleiche hat Verf.⁶⁾ für die Formiatbildung festgestellt.

Magnesium, das ja als Bestandteil des Chlorophylls (Willstätter 1906) eine ausserordentlich wichtige Rolle im Pflanzenleben spielt, ist als spezifischer enzymatischer Hilfsstoff noch nicht nachgewiesen worden.

Aluminiumsalze (schwächer auch Ca- und Mg-Salze) sollen nach Bach⁷⁾ die Wirkung der Tyrosinase verstärken.

Zusammenfassend lässt sich über die Wirkung der Anionen, sowie der Alkali-, Erdalkali-, Mg- und Al-Ionen folgendes sagen:

Während wir mit guten Gründen annehmen können, dass die Kationen der Schwermetallsalze mit Enzymen komplexe Verbindungen oder wenig dissoziierte Salze bilden (Metall an N oder S gebunden), haben wir hinsichtlich der Wirkung der in diesem Abschnitt behandelten Salze so gut wie keine Anhaltspunkte.

Auf Aciditätsänderungen ist schon eingangs hingewiesen worden.

In manchen Fällen mögen durch die zugesetzten Elektrolyte unlösliche Salze gebildet und dadurch notwendige Aktivatoren oder anwesende Paralysatoren entfernt worden sein. Die gegenseitige Löslichkeitsbeeinflussung mehrerer zusammenwirkender Hilfsstoffe und Gifte dürfte oft die wesentlichste Rolle spielen.

Auch der Lösungszustand des Enzymes selbst kann schon durch verhältnismässig geringe Salzkonzentrationen wesentliche Veränderungen erfahren. Bei der Beurteilung des Einflusses von NaCl und anderen Neutralsalzen auf tierische Amylasen liegt es nahe, an die Löslichkeitserhöhungen der Globuline durch diese Salze zu denken und überhaupt an die Verbindungen, welche zwischen Ampholyten und Neutralsalzen entstehen (vgl. S. 76 u. 120).

Wie schon in der 1. Auflage dieses Buches betont wurde, würden die Wirkungen vieler Salze klarer zutage treten, wenn die Salzzusätze zu von vorn herein elektrolytfreien Enzymlösungen erfolgten. Wenigstens

1) J. Loeb, Am. JI Physiol. 7, 327; 1900.

2) Hawkins, Physiol. Researches 1, 57; 1903.

3) Spiro, l. c.

4) Osterhout, Biol. Chem. 34, 363; 1918.

5) Loew, Chem. Ber. 24, 270; 1888.

6) Euler, Chem. Ber. 38, 2551; 1905.

7) Bach, Chem. Ber. 43, 166; 1910.

deuten viele Versuche darauf hin, dass gerade die kleinen Salzmengen, welche die Enzyme in den Organen begleiten, wichtig für deren Tätigkeit sind.

Sehr grosse Salzzusätze wirken koagulierend und fällen aus den meistens kolloide Stoffe enthaltenden Enzymlösungen mehr oder weniger direkt das Enzym aus. Manchmal bleiben jedoch selbst hohe Salzkonzentrationen ohne schädigende Wirkung, wie z. B. Ptyalinlösungen auch durch viel $MgSO_4$ und $(NH_4)_2 SO_4$ nicht geschwächt werden sollen [Patten und Stiles¹⁾].

Bereits bei der Besprechung der Pepsinwirkung auf Seite 162 ist darauf hingewiesen worden, dass die Salzsäure nicht nur auf das Enzym einwirkt, sondern auch durch die Salzbildung mit den Eiweisskörpern die Verdauung beschleunigt. Analog sind es wohl die Alkalisalze der Peptone und Peptide, welche die aktiven Substrat-Moleküle der tryptischen Verdauung ausmachen. So wird man bei Versuchen, das vorliegende experimentelle Material zu deuten, die Wechselwirkungen zwischen Neutralsalzen und den Substraten (und den anwesenden Hilfsstoffen) nicht übersehen dürfen. Ferner wird man sich erinnern, dass auch bei nicht enzymatischen Katalysen erhebliche Neutralsalzwirkungen vorkommen.

c) Organische Stoffe bekannter Zusammensetzung als Paralytoren und Aktivatoren.

Auch viele organische Substanzen scheinen an Enzyme nach stöchiometrischen Verhältnissen reversibel gebunden zu werden; entfernt man diese „Gifte“ oder Hilfsstoffe, so bleibt also das Enzym im Ausgangszustand zurück.

Die Entfernung der organischen Gifte oder die Entbindung des Enzyms von denselben ist indessen in der Regel viel weniger leicht und vollständig durchführbar als die Ausfällung der Schwermetalle. Ferner muss gleich hier betont werden, dass sich ein zeitlicher Verlauf, eine Inkubationszeit, hier oft geltend macht, welche auf den Eintritt organischer Reaktionen schliessen lässt; demgemäss wird auch nicht selten die Umkehrbarkeit der Inaktivierung mit der Zeit weniger vollständig, und wir treffen alle Übergangstadien von reversibeln Inaktivierungen zu irreversibeln Zerstörungen (Destruktionen) der Enzyme.

Um das Aufsuchen der hier behandelten Stoffe zu erleichtern teilen wir die organischen Paralytoren und Aktivatoren ein in stickstofffreie und stickstoffhaltige.

Stickstofffreie Paralytoren und Aktivatoren.

Kohlenwasserstoffe.

Das von E. Fischer²⁾ für Arbeiten mit Enzymen empfohlene Toluol ist nach allen zuverlässigen Angaben für Enzyme unschädlich. Es hat

¹⁾ Patten und Stiles, Amer. JI Physiol. 17, 26; 1906.

²⁾ E. Fischer, Chem. Ber. 27, 2985; 1894 und 28, 1436; 1895.

andererseits die Nachteile, dass es kein stark wirksames Bakteriengift ist und ferner, dass es sich wegen seiner Unlöslichkeit im Wasser nicht scharf dosieren lässt.

Von den aliphatischen Kohlenwasserstoffen spielen nur die Trihalogen-derivate des Methans, Chloroform, Bromoform und Jodoform, eine bedeutendere Rolle; ihre Brauchbarkeit wird öfters durch ihre sehr geringe Löslichkeit eingeschränkt.

Chloroform. Die ursprüngliche Angabe von Müntz, dass Chloroform nur die Mikroorganismen, nicht aber die Enzyme schädigt bzw. hemmt, ist später modifiziert worden ¹⁾).

Chloroform hemmt: Speichel-Amylase (Pugliese), Maltase innerhalb der Hefe [Lintner und Kröber²⁾], Pepsin, Lab (Freudenreich), Emulsin (Tammann), Trypsin [Kaufmann³⁾], Urease.

Es hemmt wenig oder nicht: Trypsin, Erepsin, Saccharase und freie Maltase [E. Fischer⁴⁾], Aspergillus-Maltase (Hérissey), Zymase.

Jodoform ist auf proteolytische Enzyme ohne Effekt⁵⁾. Es ist bei einer bemerkenswerten Untersuchung von H. Pringsheim⁶⁾ mit Erfolg verwendet worden. Durch welche chemische Reaktion die Chloroform- und Jodoform-Vergiftung der Enzyme zustande kommt, bleibt noch aufzuklären. Möglicherweise spielt hier die Aufnahme dieser Stoffe in die kolloiden Teile des Enzyms eine Rolle.

Siehe ferner die Einwirkung der Kohlenwasserstoffe auf Enzymreaktionen in Zellen S. 228.

Alkohole.

Über die Einwirkung der niedrigeren aliphatischen Alkohole, besonders des Äthylalkohols als Lösungsmittel oder überhaupt in hohen Konzentrationen siehe S. 235 u. ff.

Höhere aliphatische Alkohole sind durch ihre Fähigkeit, die Oberflächenspannung wässriger Lösungen stark zu erniedrigen, ausgezeichnet; sie sind — was nach Traube damit in Zusammenhang steht — Narkotica.

Glykol steht in seinem Einfluss auf Enzyme im allgemeinen dem Äthylalkohol näher als dem Glycerin. Siehe S. 241.

Glycerin erfüllt als Lösungs- und Extraktionsmittel für Enzyme eine wichtige Aufgabe. Besonders mag hier seine Rolle als Aktivator bei der Fettspaltung durch Pankreaslipase erwähnt werden (Willstätter, Waldschmidt-Leitz und Memmen), welche allerdings auch erst in hoher Konzentration hervortritt⁷⁾.

Speziellere Alkoholwirkungen sind pharmakologisch von Macht⁸⁾ an

¹⁾ Kaufmann, H. 39, 434; 1903.

²⁾ Treyer, Arch. de Physiol. 672; 1898.

³⁾ Lintner und Kröber, Chem. Ber. 28, 1050; 1895.

⁴⁾ E. Fischer, H. 26, 75; 1898.

⁵⁾ Vandevelde, Biochem. Zs 3, 315; 1907.

⁶⁾ Pringsheim, H. 73, 266 und zwar 278; 1912.

⁷⁾ Willstätter, Waldschmidt-Leitz und Memmen, H. 125, 93 und zwar 107; 1923.

⁸⁾ Macht, JI of Pharm. 11, 263; 1918. — Siehe auch J. Jacobsen, Soc. Biol. 83, 255; 1920.

Benzylalkohol entdeckt worden. Eine Prüfung im Laboratorium des Verfassers an Saccharase hat keine Inaktivierung ergeben.

Aldehyde.

Formaldehyd ist oft untersucht worden, zuerst wohl ebenfalls von Loew als typisches Reagens auf Aminogruppen. Loew (l. c.) untersuchte Pepsin und Amylase und fand — allerdings mit sehr grossen Aldehydmengen — nach einem Tage vollständige Inaktivierung. Efferont¹⁾ fand eine recht starke Wirkung auf Amylase.

Die Gärungsenzyme des Hefenpresssaftes sollen nach Wroblewski geschädigt werden²⁾. Nach Kastle³⁾ ist Formaldehyd auf Leberbutyrase ohne Wirkung.

Nunmehr kommt diesen Angaben hauptsächlich historisches Interesse zu.

An Enzympräparaten von definierter Wirksamkeit haben Euler und Svanberg⁴⁾ Versuche angestellt, und zwar mit Saccharase.

Die Inaktivierung schreitet mit der Zeit fort. Wie Myrbäck⁵⁾ fand, ist die Inaktivierung bei pH=5,5 bedeutend stärker als bei 3,8.

Noch reinere Saccharaselösungen würden offenbar weniger Aldehyd verbrauchen. Immerhin ist die inaktivierende Wirkung des Formaldehyds erheblich schwächer als die der Amine.

An Malz-Amylase liegt eine Versuchsreihe von U. Olsson vor (H. 117, 91 und zwar 112).

Eine Malz-Amylase-Lösung von Sf = etwa 10 wurde bei 37° in 0,23 normaler Formaldehydlösung zur Hälfte vergiftet.

Urease wird durch Aldehyde gehemmt⁶⁾, durch Acetaldehydcyanhydrin aktiviert.

Angaben über die Schwächung weiterer Enzyme macht Price⁷⁾. Die meisten Daten über den Einfluss dieses Stoffes auf Verdauungsenzyme haben wenig Wert, da sie durch die Gegenwart von Eiweissstoffen oder deren Spaltprodukte wesentlich beeinflusst sind. Dieselben binden nämlich energisch Formaldehyd, so dass eine weitgehende Unempfindlichkeit der betreffenden Enzyme vorgetäuscht wird.

Vielleicht fand deswegen Freudenreich⁸⁾ nur eine schwache Wirkung auf Lab. — Trypsin-Wirkung wird verzögert nach Johannessohn⁹⁾.

Katalase wird nach Senter (l. c.) durch Formaldehyd wenig geschwächt (0,001 n Formaldehyd erniedrigt die Wirksamkeit um 20%). Eine ähnliche Wirkung hat Acetaldehyd nach E. Hammarsten¹⁰⁾.

Chloral und Chloralhydrat scheinen nach vorliegenden Angaben keine starken Enzymgifte zu sein. Sinigrinase wird ein wenig gehemmt¹¹⁾.

¹⁾ Efferont, Enzymes, S. 117.

²⁾ Wroblewski, JI. prakt Chem. (2) 64, 17; 1901.

³⁾ Kastle, Chem. Zentralbl. 77, 1554; 1906.

⁴⁾ Euler und Svanberg, Fermentf. 4, 29; 1920.

⁵⁾ Euler und Myrbäck, H. 125, 27 und zwar 306; 1923.

⁶⁾ Onodera, Biochem. JI 9, 544; 1915. — Jacoby, Biochem. Zs 85, 358; 1918.

⁷⁾ Price, Zentralbl. Bakt. (2) 14, 65; 1905.

⁸⁾ Freudenreich, Zentralbl. Bakt. (2) 4, 309; 1898.

⁹⁾ Johannessohn, Biochem. Zs 83, 28; 1917.

¹⁰⁾ E. Hammarsten, Skand. Arch. Physiol. 29, 46; 1913.

¹¹⁾ Guignard, Bull. Soc. Bot. de France (3) 1, 418; 1894.

Vollständige Hemmung (und Zerstörung?) tritt nach Kastle (l. c.) bei Lepiota-Oxydase ein; starke Schädigung bei Katalase (Burge).

Ketone, besonders Aceton, siehe S. 242. Ein Gemisch von α -Ketosäuren soll nach Neuberg (Biochem. Zs 71) die Co-Zymase ersetzen.

Phenole und Phenolderivate.

Der Einfluss dieser Stoffe, von welchen besonders Phenol selbst, ferner Thymol und Salicylsäure oft zur Anwendung kamen, da sie Bakterien bzw. Protoplasma-Gifte sind, scheint auf freie Enzyme gering zu sein. Nitrophenole vergiften nach Rona irreversibel (siehe S. 217).

Thymol. Hefenmaltase wird nach E. Fischer¹⁾ nicht gehemmt. Nach Kaufmann²⁾ ist nur bei schwacher Trypsinlösung eine Wirkung des Thymols nachweisbar. Dagegen soll nach Schlesinger und nach Pugliese Speichel-Amylase ungünstig beeinflusst werden, ferner nach Buchner Zymase und nach Freudenreich Chymosin.

Kresole sind für Leber-Lipase wenig schädlich [Kastle³⁾], aber Salicylsäure wird als Hemmungskörper angegeben. Trikresol hemmt Lipase; sonst unwirksam⁴⁾.

Phenol, Resorcin, Guajacol, Natrium-Salicylat und Saligenin hemmen Urease in verdünnten Lösungen (0,04 m.) nur wenig. Dagegen sind Hydrochinon und dessen Methyläther ausgesprochene Paralysatoren (H. E. Armstrong, Benjamin und Horton (Proc. Roy. Soc. B 86).

Salicylsäure soll nach Burian⁵⁾ schon in geringen Mengen die Autolyse beschleunigen, ebenso die Wirkung der Xanthin-Oxydase; vermutlich liegt hier eine Aciditätsbeeinflussung vor.

Tannin soll Sinigrinase und Amylase (?) hemmen, Pepsin schon in geringen Dosen [0,001 g; Ascher⁶⁾]. Dieser Einfluss hängt vielleicht mit Sorption oder Dispersitätsänderung des Enzyms selbst oder von Begleitstoffen zusammen.

Cholesterin ist ein einwertiger, sekundärer, polycyclischer Alkohol, welcher der Cholsäure nahesteht. Saccharase wird kaum gehemmt, auch nicht Trypsin, dagegen nach Dörle⁷⁾ Thrombin und Pepsin.

Wie schon in der 2. Aufl. (S. 153) erwähnt, hängt die hemmende Wirkung vieler Lipide wohl mit Adsorptionserscheinungen zusammen. Nach Dörle verhält sich Cholesterin als ein negatives Sorbens.

Höhere Fettsäuren bzw. deren Salze sind Aktivatoren der tierischen Lipasen (vergl. Tab. S. 194). So ist z. B. Calciumoleat sehr wirksam⁸⁾. Die

¹⁾ E. Fischer, Chem. Ber. 28, 1436; 1895.

²⁾ Kaufmann, H. 39, 434; 1903.

³⁾ Kastle, Chem. Zentralbl. 77, 1555; 1906.

⁴⁾ Graves und Kober, Am. Chem. Soc. 36, 751; 1914.

⁵⁾ Burian, H. 43, 494; 1905.

⁶⁾ Ascher, Boas Arch. 14; 1908.

⁷⁾ Dörle, Zs f. d. ges. exp. Med. 34, 406; 1923.

⁸⁾ Willstätter und Memmen, H. 133, 229; 1924.

Oleate wirken wie andere Seifen und Lipoide als Bindemittel zwischen Enzym und Substrat.

Schwefel-Verbindungen. Es ist noch unsicher, inwieweit die an Urease gefundenen Inaktivierungen reversibel sind. Siehe S. 217.

Diphenylphosphorsäure wurde im Anschluss an eine von Bernton¹⁾ ausgeführte chemische Untersuchung an Saccharase von Myrbäck (H. 126, 307) geprüft; die Säure inaktiviert ziemlich stark.

Stickstoffhaltige Paralysatoren und Aktivatoren.

Ammoniak. Diese (systematisch in den vorhergehenden Abschnitt gehörende) Base wurde von Myrbäck²⁾ im Anschluss an Versuche mit

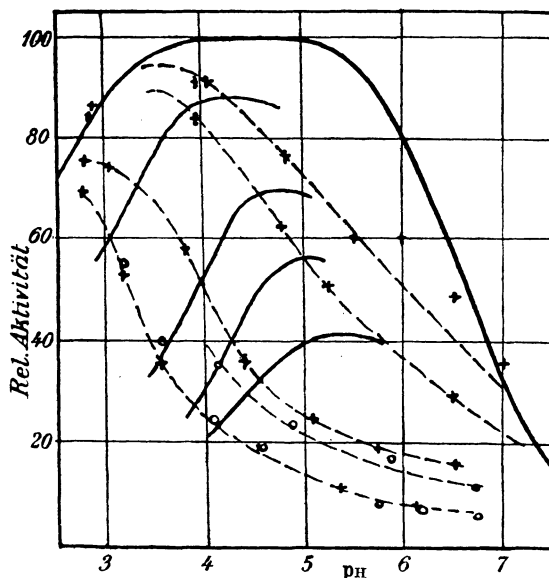


Fig. 28.

Aminen an Saccharase studiert. Die Inaktivierung ist bei neutraler Reaktion nicht unerheblich. Die Wirkung per g Mol freies Ammoniak ist etwa ebenso gross wie bei aromatischen Aminen; bei höherer Acidität ist die Wirkung verhältnismässig klein, da die Salzbildung vollständiger ist als bei den schwächeren Aminen.

Amine. Die sehr erhebliche Giftigkeit dieser Stoffgruppe, besonders der aromatischen Amine, ist zuerst von Euler und Svanberg³⁾ und dann mit höher gereinigten Saccharase-Präparaten von Myrbäck⁴⁾ eingehend untersucht worden. Zunächst seien zwei an Anilin von Myrbäck²⁾⁴⁾ angestellte Versuchsreihen mitgeteilt.

¹⁾ Bernton, Chem. Ber. 55, 3361; 1922.

²⁾ Myrbäck, Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi, 8, Nr. 32; 1923.

³⁾ Euler und Svanberg, Fermentf. 4, 29; 1920.

⁴⁾ Euler und Myrbäck, H. 125, 297; 1923.

Die Versuchslösung, insgesamt 100 ccm, bestand aus:

10 g Rohrzucker	Wechselnde Mengen Anilin
10 ccm 0,5 n Na-Acetat Lösung	Enzym Lösung + Wasser
Wechselnde Mengen 0,5 n Essigsäure	

Die beiden Saccharaselösungen hatten die Wirksamkeit $I_f = 55,7$ und $55,0$. Die Acidität der Lösungen wurde in jedem Falle elektrometrisch bestimmt.

Die Figur 28 gibt eine Zusammenfassung der Resultate. Die äussere, ausgezogene Kurve gibt die Wirksamkeit der unvergifteten Saccharase bei wechselndem p_H .

Die gestrichelten Kurven beziehen sich auf verschiedene Mengen insgesamt zugesetztes Anilin, und zwar auf die folgenden Mengen Amin:

1,86 mg	7,44 mg	
3,72 mg	18,6 mg	9,3 mg (kürzere Kurve)

Für jede Acidität ist die Menge freier Aminbase berechnet worden, und der Vergiftungsgrad ist als Funktion davon angegeben.

Die ausgezogenen Kurven der Fig. 28 entsprechen, von oben (links) an gerechnet, folgenden Konzentrationen:

$$0,6 \cdot 10^{-4} \quad 2 \cdot 10^{-4} \quad 3 \cdot 10^{-4} \quad 4 \cdot 10^{-4} \text{ g Mol/Liter Anilin.}$$

Wie aus der Figur hervorgeht, ist der Inaktivierungsgrad nicht nur von der Basenkonzentration abhängig.

Als weiteres Beispiel eines basischen Saccharase-Giftes sei ferner p-Toluidin angeführt. Eine von Myrbäck ausgeführte Versuchsreihe über den Einfluss der Acidität ergab (vgl. Fig. 29):

0,3 mg p-Toluidin	
p_H	Relative Aktivität
4,70	90,5
5,60	72,1
6,50	44
7,01	23

Die mit anderen Mengen der Base ausgeführten Versuche kann man der Figur 29 entnehmen.

Um zu untersuchen, wie sich der Vergiftungsgrad als Funktion der Menge freier Base darstellen lässt, hat Myrbäck (l. c.) folgende Berechnung angestellt:

Die (scheinbare) elektrolytische Dissoziationskonstante des p-Toluidins ist $K = 1,6 \cdot 10^{-9}$ (18°). Die grösste Änderung der Basenmenge fällt also in das Gebiet $p_{OH} = 8 - 10$ oder $p_H = 4 - 6$. Aus der Figur 29 ist ohne weiteres ersichtlich, dass die Kurven eben bei $p_H = 5$ einen Knick aufweisen. Bei jedem Versuch ist p_H elektrometrisch bestimmt worden. Die Hydroxylionenkonzentration ist dadurch auch bekannt. Aus der Formel

$$\frac{(a - x) \cdot 10^{-(14 - p_H)}}{x} = 1,6 \cdot 10^{-9}.$$

wo a die Totalkonzentration des Amins und x die Konzentration der freien Base bedeutet, können wir die zu jedem x gehörigen h berechnen. In der Fig. 29 verbinden die ausgezogenen Kurven Punkte gleicher Basenmenge. Die Mengen des *p*-Toluidins sind von oben gerechnet

I	II	III	IV	V
$2,25 \cdot 10^{-5}$	$4,5 \cdot 10^{-5}$	$9 \cdot 10^{-5}$	$13,5 \cdot 10^{-5}$	$18 \cdot 10^{-5}$ g Mol/Liter

Die Inaktivierung als Funktion der Basenmenge ist also von der Acidität ziemlich unabhängig. Es scheint jedoch, als ob die Kurven im sauren Gebiete ($p_H = 2 - 4$) wieder schräg verliefen, d. h. als ob der Ver-

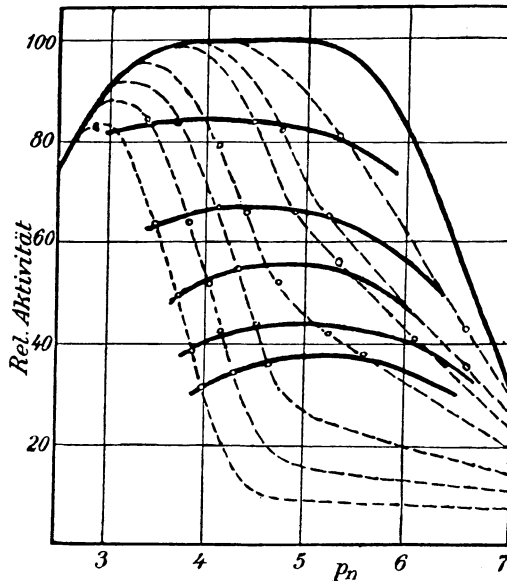


Fig. 29.

giftungsgrad hier grösser wäre. Bei der Inaktivierung mit Anilin (siehe oben) kommt dieses Verhalten deutlicher zum Ausdruck.

Beschränken wir uns auf das optimale Gebiet $p_H = 4 - 5$, so können wir eine Dissoziationskonstante der Enzym-Amino-Verbindung berechnen. Dabei wird die Annahme gemacht, dass nur das freie Enzym, nicht die Enzym-Substrat-Verbindung, Amine zu binden vermag. Diese Annahme wird auch dadurch gestützt, dass das Substrat eine starke Schutzwirkung ausübt (Myrbäck, H. 125, 295 und zwar 300).

Konzentrationen.

$[\Sigma]$ = des Enzyms	$[A]$ = des Amines
$[\sigma]$ = des freien Enzyms	$[\sigma S]$ = der Enzym-Substratverbindung
$[S]$ = des Substrates	$[\sigma A]$ = der Enzym-Aminverbindung.

Nur die Molekülart $[\sigma S]$ zerfällt.

Wir haben

$$\frac{[\sigma][S]}{[\sigma S]} = 0,03^2; \frac{[\sigma][A - \sigma A]}{[\sigma A]} = K.$$

Die Grösse σA ist in jedem Falle $< \Sigma$ und kann also gegen A vernachlässigt werden.

Wir erhalten somit:

$$K = \frac{0,03 [A]}{[S] \left[\frac{\Sigma}{[\sigma S]} - 1 \right] - 0,03}$$

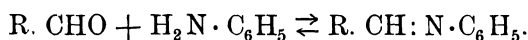
Die Substratkonzentration $[S]$ ist $8\% = 0,234$ n. Der Wert von $[\sigma S]$ ist ohne Amin in k-Einheiten gemessen $96 \cdot 10^{-4}$. Daraus berechnet sich für unendlich grosse Substratkonzentration $\Sigma = 108 \cdot 10^{-4}$. In folgender Tabelle sind die Werte von $[A]$ und $[\sigma S]$ nebst den daraus berechneten K-Werten verzeichnet.

$[A] \cdot 10^5$	$[\sigma S] \cdot 10^4$	$K \cdot 10^5$
2,25	81	1,3
4,5	66	1,1
9	54	1,2
13,5	44	1,3
18	37	1,2

Mittel von $K = 1,2 \cdot 10^{-5}$.

Unter den mit anderen Aminen erhaltenen Resultaten sind noch diejenigen mit p-Phenylendiamin deshalb bemerkenswert, weil hier die Giftwirkung besonders stark ist (etwa doppelt so stark wie diejenige des p-Toluidins).

Euler und Svanberg (Fermentf. 4) waren von der Annahme ausgegangen, dass sich bei der Einwirkung von aromatischen Aminen auf Saccharase ein Produkt vom Typus der Schiff'schen Basen bildet, also eine Reaktion von der Art



Eine solche Reaktion ist umkehrbar, und es konnte deshalb versucht werden, die Anilin vergiftete Saccharase durch andere Aldehyde oder durch Ketone zu regenerieren. Vollständig gelang eine Regeneration nicht. „Wenn die Regeneration also hier in quantitativer Hinsicht viel weniger auffallend ist als diejenige, welche nach Hg- und Ag-Vergiftung durch Zusatz von H_2S eintritt, so darf doch aus den erhaltenen Zahlen, sowie aus dem Umstand, dass die Anilinvorgiftung augenblicklich, und zwar bis zum Endwert verläuft, geschlossen werden, dass es sich auch hier nicht um eine katalytische, sondern nach stöchiometrischen Beziehungen verlaufende Inaktivierung handelt.“

Um Anhaltspunkte darüber zu gewinnen, welche Basen besonders für die Schiffsche Reaktion geeignet sind und welchen Bindungs- und demgemäss Vergiftungsgrad man an Amino-Derivaten von bekanntem Typus erwarten kann, haben Euler und Svanberg die Gleichgewichte zwischen Benzaldehyd resp. Formaldehyd einerseits und Aminen (Anilin) andererseits studiert. Für die Gleichgewichtskonstante

$$K = \frac{[\text{Anilin}] \cdot [\text{Formaldehyd}]}{[\text{Schiffsche Base}]}$$

ergab sich der Zahlenwert $100 K = 18 \pm 3$.

Eine Erweiterung dieser Versuche mit anderen Aldehyden und auf Konzentrationen, welche den bei Enzymvergiftungen herrschenden näher kommen, wäre wünschenswert.

Ebenso wäre es von Interesse, die von Svanberg (l. c. S. 43) angegebene Tabelle über verschiedene Anilinderivate, welche tatsächlich für die mehr oder weniger hydrolysierten Anilin-Salze gilt auf die freien Basen umzuarbeiten.

Amylasen. In Speichel-Amylasen fand Urban Olsson (H. 117) bei $p_H = 6,4$ eine ziemlich schwache, mit der Zeit zunehmende Inaktivierung. Das Enzym hatte in 0,0258 n. Anilininlösung folgende Wirksamkeits-Verluste:

Einwirkungsdauer bei 37°	70 Minuten	27 Stunden	48 Stunden
Verlust der ursprünglichen Wirksamkeit	9%	30%	42%

In Malz-Amylase fand Olsson die Einwirkung des Anilins noch schwächer (H. 114, 63).

Amino-Derivate.

Phenylhydrazin übt nach Senter (l. c.) auf Katalase nur $\frac{1}{4}$ der Giftwirkung der Hydroxylamins aus¹⁾. Die Messungen von Svanberg (Fermentf. 4) an Saccharase betreffen im wesentlichen Phenylhydrazinchlorhydrat.

An Malzamyase fand U. Olsson (H. 117, 98) bei einer Konzentration des freien Phenylhydrazins von etwa $3 \cdot 10^{-3}$ nach einer Einwirkungsdauer von 40 Minuten und 6 Stunden (37°) 77 und 90% der ursprünglichen Aktivität zerstört.

Hydrazin und Methylhydrazin inaktivieren nach Aso²⁾ Lösungen von Pepsin, Trypsin, Amylase und Emulsin in wenigen Stunden.

Semicarbazid. Zeitlich zunehmende Inaktivierung an Malzamyase. — (U. Olsson, H. 117, 99).

Hydroxylamin. Die ersten Versuche rühren wohl von O. Loew³⁾ her; sie beziehen sich auf Amylase und hatten ein zweifelhaftes Ergebnis. Auf seinen Vorschlag hat K. Aso ausser Amylase auch noch Pepsin, Trypsin und Emulsin untersucht. — Angaben über die Vergiftung von Gärungsenzymen machte 1889 Wroblewski.

¹⁾ Siehe auch Jacobson, H. 16, 340; 1892. — Einen Versuch gibt auch Bokorny an (Biochem. Zs 70, 213; 1915).

²⁾ K. Aso, Bull. Coll. Agric. 7, 1905. — Zitiert nach Loew. an (Biochem. Zs 70, 213; 1915).

³⁾ O. Loew, JI prakt. Chem. 37, 101; 1888. — Siehe auch „Die Giftwirkungen“ 1893.

Hydroxylamin vergiftet die Katalase nach Senter ebenfalls schon in kleinen Konzentrationen; in $\frac{1}{80\,000}$ normaler Lösung wird die Aktivität des Enzyms auf die Hälfte reduziert.

Bei Saccharase tritt mit Hydroxylamin eine sofortige Vergiftung nicht ein. Bei optimalem pH ist die Inaktivierung nach 10 Stunden gering; sie nimmt mit der Zeit langsam zu.

Auch bei Malzamylase steigt der Vergiftungsgrad mit der Zeit: einen quantitativen Versuch gibt U. Olsson an (H. 117, 98).

Cyanwasserstoffsäure.

Die auffallende Aktivierung von Papain durch HCN, die schon aus Vines¹⁾ Daten hervorgeht, ist weiter von L. B. Mendel und Blood²⁾ studiert worden.

Aktivierung des Papains. Wie Willstätter kürzlich nachwies, „beeinflusst Blausäure die Papainwirkung nicht einfach im Sinne einer Geschwindigkeitssteigerung, sondern das sog. Cyanhydrin des Papains ist als proteolytisches Enzym spezifisch für gewisse Substrate“; es sind nicht die Begleitstoffe des Papains auf welche die Blausäure wirkt, sondern das Enzym selbst (l. c. 195—196). Willstätter und Grassmann³⁾ bestätigten und erweiterten den qualitativen Befund von L. B. Mendel und A. F. Blood (l. c.), dass Substrate, wie Peptone aus Albumin, die gegen Papain resistent sind, durch das von Blausäure aktivierte Papain gespalten werden.

„Es scheinen im Pepton nur vereinzelte, für das nicht aktivierte Papain angreifbare Bindungen vorhanden zu sein, nach deren Lösung die Reaktion stillsteht. Papain und Cyanwasserstoff bewirkt dagegen in fortdauernder Hydrolyse einen langsamen, aber tiefgehenden Abbau“.

Nach Willstätter hat die Wirkung der Blausäure auf Papain grosse Ähnlichkeit mit der Beziehung zwischen Enterokinase und Trypsin. Auch die Aktivierung des Papains durch Blausäure erfordert Zeit (etwa 1 Stunde) wie die Wirkung der Enterokinase.

Eine starke Inaktivierung durch Blausäure tritt bei der Katalase ein. Nach Senter⁴⁾, dem wir genaue Versuche über die Giftwirkungen bei diesem Enzym verdanken, wird die Geschwindigkeit der enzymatischen Wasserstoffsperoxydspaltung durch HCN schon in der Normalität 1:1000000 auf die Hälfte erniedrigt. Zur Hemmung ist eine kurze, aber messbare Zeit erforderlich. Diese Giftwirkung ist von der Temperatur unabhängig. Wie schon Schönbein gefunden hatte und von Senter bestätigt werden konnte, ist die Wirkung reversibel. In ähnlicher Weise wird Muskel-Katalase gehemmt [Santesson⁵⁾]. Versuche an Milch-Katalase teilt Faitelowitz mit.

¹⁾ Vines, Ann. of Bot. 17, 605; 1903.

²⁾ Mendel und Blood, JI Biol. Chem. 8, 177; 1910.

³⁾ Willstätter und Grassmann, H. 138, 184; 1924.

⁴⁾ Senter, Zs physik. Chem. 44, 257; 1903; 51, 673; 1905.

⁵⁾ Santesson, Skand. Arch. Physiol. 23, 99; 1909.

Leberlipase wird nach Kastle nicht beeinflusst.

Nach Fuld und Spiro¹⁾ wird Chymosin nicht gehemmt, auch Pepsin bleibt unbeeinflusst.

Nach Abderhalden, Caemmerer und Pinkussohn²⁾ soll Hefen-Erepsin in seiner Wirkung auf Polypeptide durch kleine Mengen Cyankalium gefördert, durch grössere gehemmt werden; hieran ist das Alkali nicht unwesentlich beteiligt.

1% Lösung von Blausäure schwächt die proteolytischen Enzyme des Hefenpresssaftes, aber zerstört die Enzyme nicht [Geret und Hahn³⁾].

Jacoby⁴⁾ gibt an, dass Urease durch 0,01 mg Cyankalium in 20 ccm noch deutlich, etwa um 10% aktiviert wird. Ob daran eine Änderung der Acidität beteiligt ist, lässt sich nicht sagen, da Jacoby über die Aciditätsbedingungen keine Angaben macht.

Es erscheint nicht ausgeschlossen, dass die kleine Aktivierung der Urease [ebenso wie die beim Papain beobachtete Aktivierung⁵⁾] durch die Bindung eines in der Enzymlösung anwesenden Metallgiftes zustande kommt.

Andere hydrolysierende Enzyme sind gegen Blausäure wenig empfindlich, so z. B. Saccharase. 8 mg HCN rufen in 60 ccm Lösung eine Erniedrigung der Wirksamkeit um nur 10% hervor.

Die Wirkung auf Oxydationsenzyme hat schon Schönbein beobachtet.

Die starke Hemmung der Blausäure auf die Gärungsenzyme hört nach Buchner⁶⁾ auf, wenn die Blausäure aus dem Presssaft ausgeblasen wird.

Von besonderem Interesse ist das Verhalten der Blausäure zu Atmungs-Enzymen. Es bestehen hier bekanntlich zwei grosse Gruppen von Vorgängen, von welchen die eine in hohem Grad Blausäure-empfindlich ist, während die andere von HCN-Zusätzen wenig beeinflusst wird. Im ersteren Falle handelt es sich hauptsächlich um Vorgänge im heterogenen System; sie sind, wie auch die Hemmungen der Warburgschen Eisenkatalyse⁷⁾ durch Blausäure und der Inaktivierung kolloidaler Platins an anderer Stelle zu behandeln.

Dizyan übt nach Versuchen von Aso verhältnismässig schwache Giftwirkung auf Enzyme aus.

Alkaloide.

Chinin ist am meisten studiert; ältere Versuche bei Nasse⁸⁾ und Duclaux⁹⁾ (Saccharase), Wollberg¹⁰⁾, Asher (Pepsin), Gromow und Grigoriew¹¹⁾ (Gärungsenzyme).

Onodera studierte die Einwirkung von Chinin auf Urease unter modernen Gesichtspunkten. Er fand, dass die freie Base ausgesprochen hemmt.

Eine Reihe bemerkenswerter Untersuchungen über Chininwirkungen unter definierten Versuchsbedingungen verdankt man Rona und seinen Mit-

¹⁾ Fuld und Spiro, Hofm. Beitr. 5, 171; 1904.

²⁾ Abderhalden, Caemmerer und Pinkussohn, H. 59, 293; 1909.

³⁾ Geret und Hahn, Chem. Ber. 31, 202; 1898.

⁴⁾ Jacoby, Biochem. Zs 76, 275; 1916.

⁵⁾ Mendel und Blood, JI Biol. Chem. 8, 177; 1910.

⁶⁾ Buchner, Monographie, S. 182

⁷⁾ Siehe O. Warburg, Biochem. Zs 119, 134; 1921 u. 145, 461; 1924.

⁸⁾ Nasse, Pflüg. Arch. 11, 159; 1875.

⁹⁾ Duclaux, Traité de Microbiologie 2, 379; 1899.

¹⁰⁾ Wollberg, Arch. f. d. ges. Physiol. 22, 291; 1880.

¹¹⁾ Gromov und Grigoriew, H. 42, 299; 1904.

arbeiten. Rona¹⁾ konnte zeigen, dass die freie Base stark vergiftet, während die Salze wenig oder nicht wirksam sind.

An Saccharase stellten Rona und Bloch¹⁾ die vollständige Umkehrbarkeit der Giftwirkung fest; sie ist auch unabhängig von der Enzym- und der Rohrzuckerkonzentration. Trägt man die Logarithmen der Chininkonzentration auf die Abszisse, die Logarithmen der Hemmungen auf die Ordinate auf, so erhält man eine Gerade.

Die Chininderivate Optochin, Eucupin und Vuzin verhalten sich in ihrer Wirkung auf die Saccharase ganz so wie das Chinin. Chinidin wirkt stärker.

Bei der kombinierten Wirkung des Chinins und der Narkotica (aus der Alkohol- und Urethan-Reihe) auf Saccharase war die hemmende Wirkung der Giftkombinationen auf das Enzym stets geringer als die Summe der hemmenden Wirkung der einzelnen Gifte; Rona nimmt eine Verdrängung der einen hemmenden Wirkung durch die andere an²⁾.

Auch bei der Wirkung auf Serum-Lipase ist die hemmende Wirkung des Chininsalzes³⁾ von der Acidität der Lösung abhängig, indem sie bei stärker werdender alkalischer Reaktion zunimmt. Auch hier ist die Giftwirkung dem Logarithmus der Giftkonzentration proportional.

Die von Rona und Mitarb.⁴⁾ gefundenen, von Tier zu Tier wechselnden Einflüsse von Alkaloiden auf Lipasen scheinen, wie Willstätter⁵⁾ betont, von den natürlichen Begleitstoffen der Enzyme nicht unabhängig zu sein.

Kombiniert man Atoxyl und Chinin, so findet man, falls das Chinin zuerst dem Enzym zugesetzt wurde, eine Verdrängung des Atoxyls von dem Enzym (Rona).

Nach Laqueur⁶⁾, welcher besonders die Wirkung des Chinins auf Enzyme studiert hat, werden die Enzyme der Autolyse und die Oxydase des Blutes am stärksten durch Chinin gehemmt.

Andere Alkaloide.

Zahlreiche Versuche hat Chittenden ausgeführt. Von anderen Arbeiten seien hier zitiert: Hordeninsulfat, Camus⁷⁾ (Pepsin, Trypsin, Maltase, Saccharase, Lipase).

Aconitin, Bywaters⁸⁾, (Speichel, Amylase).

Atropin, Pilocarpin, Onodera⁹⁾ (Urease). Bodnár¹⁰⁾ (Amylase).

Nicotin, Morat¹¹⁾.

¹⁾ Rona und Bloch, Biochem. Zs 118, 185; 1921.

²⁾ Rona, Airila und Lasnitzki, Biochem. Zs 130, 582; 1922.

³⁾ Rona und Reinicke, Biochem. Zs 118, 213; 1921.

⁴⁾ Rona und Petow, Biochem. Zs 146, 28; 1924.

⁵⁾ Willstätter und Memmen, H. 138, 216; 1924.

⁶⁾ Laqueur, Arch. f. exp. Path. 55, 240; 1906.

⁷⁾ Camus, Soc. Biol. 60, 264; 1906.

⁸⁾ Bywaters, Jl of Physiol. 40, XIV; 1910.

⁹⁾ Onodera, Biochem. Jl 9, 544; 1916.

¹⁰⁾ Bodnár, Fermentf. 1, 347; 1915.

¹¹⁾ Morat, Soc. Biol. 45, 116; 1893.

Im Anschluss an die Studien von Rona hat Brockmeyer¹⁾ Versuche über die Einwirkung von Cocain und Strychnin auf Organlipasen angestellt.

Aminosäuren, Peptide, Peptone, Proteine.

Durch ihre Fähigkeit, als amphotere Elektrolyte sowohl mit Säuren als Alkalien Salze zu bilden, wirken indirekt Eiweissstoffe, Peptone und Aminosäuren oft beschleunigend, wenn auch selten besonders kräftig; sie regulieren, wie Verf. bereits 1908 in einem Referat (Ergebn. d. Physiol. 1907) betont hat, gewissermassen die Konzentration der freien Säuren und Basen.

Abgesehen von diesen Pufferwirkungen üben die Aminosäuren aber noch aktivierende Einflüsse spezieller Art auf Enzyme aus.

Über die aktivierende Wirkung von Aminosäuren auf Amylase²⁾ liegen Angaben vor, welche noch der Aufklärung bedürfen.

Sherman fand, dass Amylase durch gewisse Aminosäuren aktiviert wird. Dies wird durch neue Versuche von U. Olsson und von Haehn (Biochem. Zs 143, 520) bestätigt. Beförderung der Stärkespaltung fand Sherman ferner durch Glykokoll, Phenylalanin, Arginin und Cystin³⁾. Ob hierbei ein Hemmungskörper gebunden wird, bleibt noch zu entscheiden.

Zum grossen Teil handelt es sich hier um Schutzwirkungen der Aminosäuren gegen Temperatur-Inaktivierung⁴⁾ (siehe 6. Kap., Abschn. 4).

Sehr bemerkenswert, aber in chemischer Hinsicht noch nicht vollständig aufgeklärt sind die Hemmungen und Aktivierungen der Pankreaslipase (bei der Tributyrinhydrolyse) durch Proteine und deren Spaltprodukte⁵⁾. Gewisse Aminosäuren, wie Alanin, sowie einfache Peptide aktivieren. Ein ausserordentlich starkes Aktivierungsvermögen zeigt das Leucylglycylglycin; 30 mg Peptid erzeugen eine Steigerung der lipatischen Wirkung um 500—600%; für minimale Aktivierungen ist aber eine bedeutende Menge Tripeptid nötig.

Die Wirkung der Pankreaslipase auf Tributyrin wird bei alkalischer wie bei saurer Reaktion durch Proteine stark gehemmt, während die Ölspaltung durch Albumin in saurem Medium gehemmt, in alkalischem gesteigert wird.

„Dieser Unterschied ist aber nur scheinbar so einfach und wesentlich. Auf die Tributyrinhydrolyse übt nämlich Albumin bei Gegenwart von Natriumoleat auch den entgegengesetzten Einfluss aus, nämlich aktivierenden, und die Aktivierung, welche die Seife allein bewirkt, lässt sich durch Albumin noch steigern. Nun kommt bei der pankreatischen Fettspaltung in alkalischem Medium nie Albumin allein zur Wirkung, sondern nur in Kombination mit der entstehenden Seife. Die Aktivierung der lipatischen Ölspaltung durch Eiweiss findet also ein Analogon in der Aktivierung der Tributyrinspaltung durch Seife + Albumin.“

¹⁾ Brockmeyer, *Klin. Woch.* 3, 1526; 1924.

²⁾ Ford und Guthrie, *Jl Chem. Soc.* 1906. — Wohlgemuth, *Biochem. Zs* 1908.

³⁾ Sherman und Caldwell, *Am. Chem. Soc.* 43, 2469; 1921.

⁴⁾ Sherman und Florence Walker, *Am. Chem. Soc.* 45, 1960; 1923.

⁵⁾ Willstätter und Memmen, *H.* 129 und zwar 10 und ff.; 1923.

Urease wird nach Jacoby¹⁾ durch Aminosäuren stark beeinflusst; nach Rockwood²⁾ am stärksten durch α -Aminosäuren, weniger durch β -Aminosäuren, gar nicht durch γ -Aminosäuren. Dieser Effekt ist von der Acidität der Lösung abhängig, und zum grossen Teil dürfte es sich, wie Rona³⁾ nachgewiesen hat, um Pufferwirkungen handeln.

Atoxyl ist nach Rona und Pavlović (Biochem. Zs 134) gegenüber Pankreaslipase wirkungslos, während Leberlipase sehr empfindlich gefunden wurde; vermutlich sind diese Verschiedenheiten durch Fremdstoffe veranlasst (Willstätter).

Gallensäuren.

Die Aktivierung von Lipasen ist schon von Nencki, Pawlow, Rachford, Magnus⁴⁾, Loevenhart⁵⁾, Donath⁶⁾ u. a. studiert worden. Laqueur⁷⁾ und Boldyreff⁸⁾ hatten angegeben, dass gewisse Gallensalze nur die Pankreaslipase, nicht die Magenlipase und die Darmlipase aktivieren. Dagegen fanden Willstätter und Memmen⁹⁾ eine Aktivierung auch bei Magenlipase (Schwein), allerdings weniger günstig als bei Pankreaslipase und ungleichmässig. „Manche Präparate wurden durch glykocholsaures Natrium aufs Doppelte oder Dreifache aktiviert, andere gar nicht. Es liess sich zeigen, dass das Ausbleiben auf der Anwesenheit eines gallenähnlich wirkenden Aktivators beruht.“ „Die Lipase ist demnach schon aktiviert, wenn sie als nicht aktivierbar erscheint.“

„Glykocholsaures Natrium übt¹⁰⁾ schon in geringer Konzentration aktivierende Wirkung (auf die Tributyrinhydrolyse durch Pankreaslipase) aus, die 100—200% beträgt. Mit grösseren Mengen des gallensauren Salzes nimmt diese Wirkung nicht zu, sondern sie wird eher abgeschwächt.“ Für den Zweck der ausgleichenden Aktivierung erscheint das glykocholsaure Salz nicht geeignet. Es setzt im Gegensatz zum fettsauren Salze seine aktivierende Wirkung neben Proteinen nicht genügend durch.

Zusammenwirken mit anderen Aktivatoren siehe S. 193 u. 194.

Bereits in der ersten Auflage dieses Buches (Allg. Chemie der Enzyme, 1910, S. 81) wurde betont, dass es sich bei den meisten dieser Aktivierungen durch Gallenstoffe vermutlich um eine Beeinflussung des Lösungszustandes der beteiligten Stoffe in der Weise handelt, dass die Gallenstoffe Enzym und Substrat an sich konzentrieren und dadurch ein gemeinsames Medium, ein Bindeglied für dieselben schaffen. Diese Auffassung (die derjenigen von Twitchel für nicht enzymatische Fettspaltung durch Naphthalinstearosulfon-

¹⁾ Jacoby und Umeda, Biochem. Zs 68, 23; 1915.

²⁾ Rockwood und Husa, Am. Chem. Soc. 45, 2678; 1923.

³⁾ Rona und György, Biochem. Zs 111, 115; 1920.

⁴⁾ Magnus, H. 42, 149; 1902.

⁵⁾ Loevenhart, JI Biol. Chem. 2, 391; 1907.

⁶⁾ Donath, Hofm. Beitr. 10, 390; 1907.

⁷⁾ Laqueur, Hofm. Beitr. 8, 281; 1906.

⁸⁾ Boldyreff, H. 50, 394; 1907.

⁹⁾ Willstätter und Memmen, H. 133, 247; 1924.

¹⁰⁾ Willstätter und Memmen, H. 129, 1 und zwar 17; 1923.

säure entspricht) findet durch die eingehenden Untersuchungen von Willstätter und seiner Mitarbeiter ausgezeichnete Bestätigungen.

Über pflanzliche und tierische Amylasen liegen erst aus letzter Zeit methodisch einwandfreie Messungen vor.

Nach Wohlgemuth¹⁾ werden sie von Galle bei geringer Konzentration aktiviert, bei höherer gehemmt. Buglia²⁾ bestätigt die Aktivierung mit glykocholsaurem Natrium, Minami (Biochem. Zs 39) fand grössere Mengen davon hemmend.

Willstätter, Waldschmidt-Leitz und Hesse³⁾ fanden mit Pankreasamylasen im optimalen Medium, nämlich ganz schwach saurem, starke Hemmung durch gallensaures Salz, sogar in Gegenwart von NaCl (siehe folgende Tabelle).

Zusatz	mg Maltose in 10 Min. (37°) bei	
	p _H = 6,8	p _H = 8,0
1 ccm Wasser	18,8	3,1
10 mg glykochols. Na	10,3	4,8
1 ccm 0,2 n NaCl	39,0	25,6
1 ccm 0,2 n NaCl + 10 mg glykochols. Na	29,0	31,3

Bei schwach alkalischer Reaktion erfolgt bei gleichzeitiger Anwesenheit von NaCl eine geringe Aktivierung durch Glykocolat.

Dass Galle einen Aktivator für Trypsin enthält, wurde von Rachford⁴⁾ gefunden und von mehreren Forschern bestätigt.

Andere Seifen und Lipide.

Wie oben erwähnt wurde, ist die Wirkung der Gallensalze auf Lipasen reaktionskinetisch zu verstehen, indem sie ein Bindeglied, ein gemeinsames Medium bilden, an dem sich Substrat und Enzym konzentrieren. Es handelt sich demgemäss nicht eigentlich um einen durch seine chemische Konstitution⁵⁾ spezifischen Aktivator. Man findet auch Angaben, dass andere Lipide und hämolytisch wirksame Stoffe⁶⁾ Lipasen aktivieren.

Aktivatoren und Hemmungskörper chemisch unbekannter Art, Co-Zymase, Kinasen, Komplemente siehe S. 218.

Zieht man die Einwirkung organischer Stoffe bekannter Zusammensetzung auf isolierte, gelöste bezw. hochdisperse Enzyme in Betracht — sieht man also von der Einwirkung auf lebende oder getötete Zellen

¹⁾ Wohlgemuth, Biochem. Zs 21, 447; 1909.

²⁾ Buglia, Biochem. Zs 25, 239; 1910.

³⁾ Willstätter, Waldschmidt-Leitz und Hesse, H. 126, 143 und zwar 150; 1923.

⁴⁾ Rachford, Jl of Physiol. 25, 165; 1899.

⁵⁾ Immerhin wäre ein Vergleich zwischen der Wirkung der Glykocholsäure und der Cholsäure, welcher die Glykokollgruppe abgeht, von Interesse, besonders in Rücksicht auf die Mitwirkung der Peptide, Peptone und Albumine.

⁶⁾ Rosenheim und Shaw-Makenzie, Jl of Physiol. 25, 165; 1899.

ab —, so wird man von vornherein annehmen können, dass die Wirkung verschiedener organischer Stoffe im allgemeinen mit ihrer Reaktionsfähigkeit parallel gehen wird. Kohlenwasserstoffe reagieren schon wegen ihrer geringen Löslichkeit im Wasser und ihrem ganzen Charakter gemäss chemisch nicht mit gelösten Enzymen; tatsächlich ist von keinem gelösten Enzym bekannt, dass es durch Toluol geschädigt wird. (Im heterogenen System, überhaupt wo wahrnehmbare Grenzflächen zwischen Enzymsystem und Umgebung auftreten, können sich Kohlenwasserstoffe an der Oberfläche konzentrieren und den Sol- bzw. Gel Zustand im Enzymsystem beeinflussen; wir kommen hierauf S. 228 u. 235 zurück.)

Auch Alkohole, rein aliphatische oder solche, die cyclische, neutrale Kohlenwasserstoffreste enthalten (Typus Benzylalkohol) üben keine eigentlichen Giftwirkungen aus, sie kommen in Konzentrationen unter 1% als Hemmungskörper nicht in Betracht.

Von den als Hemmungskörper wirksamen organischen Stoffen lässt sich auf Grund der jetzt vorliegenden Messungen nicht immer genau angeben, ob die Hemmung streng reversibel ist. Nicht selten scheinen sich zunächst mit grosser Geschwindigkeit reversible Verbindungen zu bilden, welche sich dann langsamer in stabilere, nicht oder nur unvollständig zerlegbare Produkte umlagern. Die genaue Durcharbeitung eines solchen Falles wäre von erheblichem Interesse.

Mit einer gewissen Willkürlichkeit sind die oben behandelten Stoffe von den mehr ausgeprägten Destruktoren (S. 216) geschieden worden.

Wesentlich ist, dass bei Versuchen mit Hemmungskörpern und Aktivatoren die Versuchsbedingungen, also Acidität usw., genau definiert und konstant gehalten werden, und dass dann auf Grund solcher Messungen die wirklich hemmende oder aktivierende Molekülart erkannt wird (vgl. S. 200 u. ff.).

Eine gewisse Wirksamkeit wurde bei Phenolen und Phenolderivaten gefunden. Bei Aldehyden wurden an manchen Enzymen grössere Wirkungen konstatiert. Soweit Versuche mit mässig reinen Enzympräparaten Schlüsse zulassen, gehören aber Aldehyde nicht zu den kräftigsten organischen Enzymgiften.

Erheblich grösser ist die Wirksamkeit, also die prozentische Hemmung pro Gewichtseinheit „Gift“ bei den aromatischen Aminen; wenigstens gilt dies bei den bisher am eingehendsten daraufhin untersuchten Enzymen, Saccharasen und Amylasen. Bei ersterem Enzym tritt die maximale Hemmung sehr schnell ein. Man kann annehmen, dass es sich dabei um die Bildung von Schiff'schen Basen handelt. Was noch fehlt, sind ausreichende quantitative Versuche an chemisch bekannten Stoffen, welche Vergleiche mit den an Enzymen gefundenen Verhältnissen zulassen. So war es z. B. notwendig,

erst durch neue Versuche¹⁾ festzustellen, in welchem Umfang eine Schiffsche Reaktion bei gegebenen Konzentrationen der Komponenten eintritt.

Mit der Affinität zwischen Enzym und „Gift“, also mit dem Dissoziationsgrad dieser Verbindung hängt auch die in der Toxikologie wichtige „Giftbreite“ zusammen. Grosse Affinität (kleiner Dissoziationsgrad Enzym-Gift) und Abwesenheit von Schutzstoffen veranlassen kleine Giftbreite.

Wie bereits früher erwähnt wurde und durch Willstätters Ergebnisse an Lipasen bestätigt ist, existiert eine Gruppe von Fällen, in denen Aktivatoren das gemeinsame Lösungsmittel, also das Bindeglied für Enzym und Substrat liefern, wenn beide an und für sich kein homogenes System bilden können.

Manchmal sind es nicht tiefer gehende Reaktionen, durch welche die Wirksamkeit des Enzymmoleküls im positiven oder negativen Sinne verändert wird, sondern Anlagerungen von Salzen, etwa analog der bei manchen Proteinen (Globulinen) bekannten Komplexbildung mit Ampholyten u. dgl.

Bei den bisher angestellten Versuchen und theoretischen Erwägungen, bei denen überhaupt die chemischen Gesichtspunkte massgebend waren, ist man — in der Regel stillschweigend — davon ausgegangen, dass bei Aktivierungen oder Hemmungen das gehemmte Enzymmolekül unwirksam wird, dass also der Hemmungsgrad die prozentische Anzahl der veränderten Moleküle angibt. Es darf nicht übersehen werden, dass wir uns auch Enzymmoleküle mit gradweise veränderter — etwa halber oder doppelter — Aktivität denken können, so wie sich die Stärke (Affinitätskonstante) der Carboxylgruppe der Essigsäure ändert, wenn in den Methylrest andere Gruppen eintreten.

Neue und beachtenswerte Beobachtungen über kombinierte Wirkung zweier oder mehrerer Aktivatoren verdankt man Willstätter²⁾, welcher auch durch ein anschauliches Schema die Art dieser Aktivierung erläutert hat. Ferner haben Rona³⁾ und seine Mitarbeiter bei Saccharase und anderen Enzymen gefunden, dass die kombinierte Wirkung von Chinin und Narkoticis geringer war als die Summe der hemmenden Wirkung des einzelnen Giftes, was auf Verdrängung schliessen lässt.

2. Irreversible Inaktivierungen der Enzyme durch Zusätze fremder Stoffe.

Anorganische Oxydationsmittel.

Die Irreversibilität der Inaktivierung, bzw. die dauernde Zerstörung des Enzyms durch die im folgenden erwähnten Stoffe ist zwar nicht in allen Fällen besonders bewiesen, muss aber als wahrscheinlich bezeichnet werden.

¹⁾ Euler und Svanberg, *Fermentf.* 3, 330; 1920.

²⁾ Willstätter und Memmen, *H.* 125, 108 und 129, 3.

³⁾ Rona, Airila und Lasnitzki, *Biochem. Zs* 130, 582; 1922.

Es ist nicht immer sicher, dass die experimentell festgestellte Inaktivierung den eigentlichen Enzymteil getroffen hat; vielmehr kann eine Löslichkeitsverminderung oder sonstige Änderung an einer fest anhaftenden nicht unbedingt zugehörigen Gruppe den Dispersitätsgrad oder die sterischen Verhältnisse des Enzyms so beeinflussen, dass es seine Wirksamkeit ganz oder teilweise einbüsst.

Sauerstoff. Über Zerstörung der Enzyme durch Oxydation im schwachen, diffusen Licht ist wenig bekannt¹⁾. Unter der Einwirkung sichtbarer Strahlen wird die Aktivität der Saccharase und Peroxydase in Gegenwart von Sauerstoff etwas vermindert, bedeutend stärker unter Mitwirkung eines Sensibilisators wie Eosin [Jodlbauer²⁾].

Bemerkenswert ist, dass nach Laqueur Sauerstoff die Wirkung der autolytischen Leber-Enzyme hemmt³⁾; der chemische Vorgang bei dieser Hemmung ist noch unbekannt.

Die Einwirkung des Sauerstoffs wird durch zahlreiche Substanzen katalytisch beschleunigt; damit hängen wohl die mit messbaren Inkubationszeiten verlaufenden irreversibeln Vergiftungen durch Schwermetallsalze usw. zusammen.

Ferner wird die Oxydationsgeschwindigkeit an der Luft im hohen Grad von der Acidität der Lösung, also von der Gegenwart freier Säuren oder Basen beeinflusst.

Ozon ist hinsichtlich seiner Wirkung auf Enzyme von Sigmund studiert worden. Ozonisierter Sauerstoff (1—5 mg O₃ per Liter) wurde 1 Stunde mit einer Geschwindigkeit von 1—2 Liter per Stunde durch eine Enzymlösung geleitet; die Wirkungen des Ozons wurden mit denjenigen eines reinen Sauerstoffstromes verglichen und waren durchweg sehr viel grösser als letztere. Der Grad der Schädigung ist natürlich sehr stark von der Konzentration der Enzymlösungen bzw. der Aktivität der ursprünglichen Lösung abhängig. Verdünnte Saccharaselösungen wurden bis auf 2,5% ihrer anfänglichen Aktivität geschwächt. Untersucht wurden ausser Saccharase: Malzamylyase, Speichelamylase, Emulsin, Pepsin, Pankreatin, Lab, ferner die Gärungserreger in Hefe und in Essigbakterien. Kastle wies eine Schädigung der Lipase nach (1906), Buchner mit Hoffmann eine Zerstörung der Zymase⁴⁾.

In diesem Zusammenhang mag erwähnt werden, dass nach Harries und Langheld⁵⁾ von den hier in Betracht kommenden Gruppen die einen

¹⁾ Einige Angaben findet man bei Sigmund, Zbl. f. Bakt. (2) 14, 400; 1905.

²⁾ Jodlbauer, Biochem. Zs 3, 483; 1907. — Jamada und Jodlbauer, ebenda 8, 61; 1908.

³⁾ Laqueur, H. 79, 38; 1912.

⁴⁾ Buchner und Hoffmann, Biochem. Zs 4, 215; 1907.

⁵⁾ Harries und Langheld, H. 51, 373; 1907.

Benzolkern enthaltenen Aminosäuren, Tyrosin usw., besonders leicht von O_3 angegriffen werden.

Wasserstoffsperoxyd. Nach Vandeveld¹⁾ sollen viele Enzyme durch H_2O_2 aktiviert werden.

Mit Rücksicht auf die Munddesinfektion stellte Walbum²⁾ die Wirkung von H_2O_2 auf Speichelamylase und auf Katalase, und im Anschluss auch auf einige andere Enzyme fest. In Konzentrationen über 0,1% schädigt das Peroxyd sowohl die Speichelamylase als die Katalase. Auch Lab ist sehr empfindlich, dagegen sind Pepsin und Trypsin selbst gegen 2%ige H_2O_2 -Lösungen sehr resistent.

Was die Katalase betrifft, so ist jedenfalls durch zahlreiche Beobachtungen erwiesen, dass zu quantitativen Messungen keine stärkeren Wasserstoffsperoxydlösungen angewandt werden dürfen, als etwa 0,01 normale.

Katalase ist überhaupt gegen Oxydationsmittel offenbar sehr empfindlich. Sie wird nach Senter³⁾ durch

KNO_3	in der Normalität	1:40000,	durch
$KClO_3$	„ „ „	1:40000	

auf ihre halbe Aktivität reduziert. Siehe auch Santesson, l. c.

Halogene.

Am eingehendsten ist die Einwirkung von Jod auf Saccharase (und zwar von der Aktivität $If = 63$) untersucht⁴⁾. Jod hat sich als eines der wirksamsten Gifte der Saccharase erwiesen, und es könnte das Enzym durch Thiosulfat nicht regeneriert werden. Die Jodvergiftung ist stark abhängig von der Inkubationszeit. Bei den ersten Versuchen betrug die Inkubationszeit 60 Minuten, d. h. nachdem eine gewisse Menge Enzymlösung mit einer gewissen Menge Jodlösung gemischt war vergangen 60 Minuten, bevor der Inversionsversuch begonnen wurde. Es zeigte sich dann eine deutliche Inaktivierungsgrenze; nur wenn die Inkubationszeit auf mehrere Stunden ausgedehnt wurde, wuchs der Inaktivierungsgrad mit der Jodmenge so, dass die Saccharase bei Anwendung hinreichender Jodmengen und bei genügend langer Inkubationszeit vollständig inaktiviert wurde (Fig. 30). Bei Zusatz einer hinreichenden Menge von Jod wird die Aktivität der Saccharase bei kurzer Inkubationszeit auf die Hälfte erniedrigt, worauf die weitere Inaktivierung bedeutend langsamer erfolgt. Verf. und Josephson⁴⁾ nahmen an, dass eine Jodsaccharase gebildet wird, welcher eine gewisse Aktivität zukommt. Die auf die Hälfte

¹⁾ Vandeveld, Hofm. Beitr. 5, 558; 1904.

²⁾ Walbum, Deutsch. med. Wochenschr. 212; 1911. — Berl. klin. Wochenschr. 48 1929; 1911.

³⁾ Senter, Zs phys. Chem. 51, 673; 1905.

⁴⁾ Euler und Josephson, H. 127, 99; 1923. — Vet. Akad. Arkiv f. Kemi 8, Nr. 23; 1922. — Euler und Landergren, Biochem. Zs 131, 386; 1922.

vergiftete Saccharase (die Jodsaccharase) zeigt das gleiche p_H -Optimum wie die unveränderte Saccharase.

Bei der Vergiftung der Saccharase mit Brom wurde keine Inkubationszeit gemessen.

Im Anschluss an diese Versuche hat Urban Olsson¹⁾ die Einwirkung von Jod auf Malzamylase näher studiert, und zwar sowohl bezüglich der Verflüssigung¹⁾ der Stärke, als bezüglich der Verzuckerung²⁾.

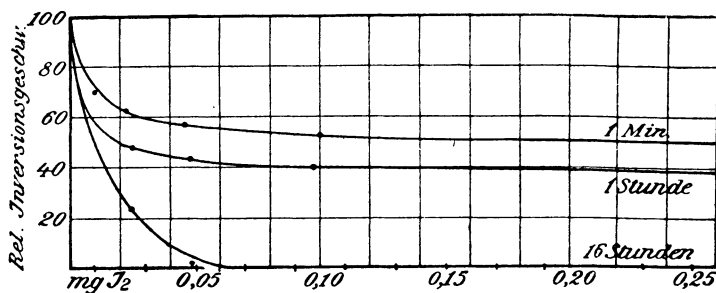


Fig. 30.

Folgendes Beispiel bzgl. der Verflüssigung sei angeführt: Von einer 0,00001 n Jodlösung wurden 20 ccm je einem Kolben zugesetzt, der vorher 20 ccm 0,29 n Natriumacetatlösung ($p_H = 4,97$) und 5 ccm Enzymlösung E_2 enthielt. (Enzymlösung E_2 enthält 1,07 mg Trockensubst. per ccm; $k = 0,0159$). Totalvolumen 35 ccm. Im Giftkolben war somit die Jodlösung

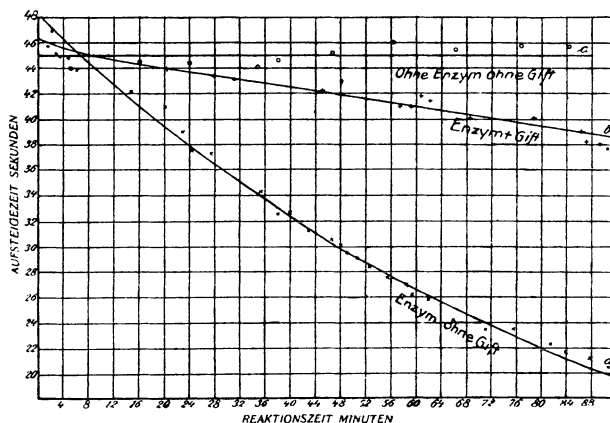


Fig. 31.

$5,71 \cdot 10^{-6}$ n; auf 1 mg Trockensubst. der Enzymlösung kommen $1,07 \cdot 10^{-6}$ g Mol. Jod. Nach einer Inkubationszeit von 30 Min. wurde dem Giftkolben 1 ccm Lösung entnommen und dem Reaktionskolben zugesetzt. Dieser enthielt vorher 75 ccm Kartoffelstärkelösung + 15 ccm Acetatlösung + 7 ccm Wasser und eine hohle Glaskugel. Die Mischung (37°) wurde in das Aufsteigerrohr des Apparats gegossen, und die Änderung der Viscosität wurde durch die Messungen der Aufsteigezeiten verfolgt. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe gehen aus Fig. 31 hervor.

¹⁾ Urban Olsson, a) H. 126, 29, 1923. — b) H. 114, 51; 1921.

²⁾ Urban Olsson, H. 117, 91; 1921.

Bezüglich der Umrechnung der Aufsteigezeit in umgesetzte Stärkemenge muss auf das Original (H. 126) und auf Teil II verwiesen werden.

An den auf verflüssigende Wirksamkeit untersuchten Enzymlösungen hat Olsson auch die verzuckernde Wirkung (Maltase-Bildung) bestimmt. Er fand, dass die Verflüssigung der Stärke nur etwa 1,7 mal schneller verläuft als die Verzuckerung.

Für die Verzuckerung der Stärke durch Malzamyase wurde zunächst besonders die Nicht-Regenerierbarkeit des Enzyms durch Thiosulfat und durch Anilin festgestellt [H. 117, 94; 1921¹⁾]. In einer Jodlösung der Konzentration $1 \cdot 10^{-6}$ n im Giftkolben verloren 10 ccm Malzamyasaelösung (Trockensubst. 0,72 mg pro ccm) bei 37° nach

10 Min.	80 Min.	21 Stunden
48%	56%	60% d. urspr. Aktivität.

Bei Blutkatalase (nicht bekannten Reinheitsgrades) ruft Jod in Jodkaliumlösung in der Normalität 1:50000 Inaktivierung von 50% hervor.

Einwirkung auf Autolyse: Steppuhn, Biochem. Zs 140.

KMnO₄ beschreiben Kastle und Loevenhart als starkes Gift für Lipasen.

Eine Reihe typischer Reduktionsmittel sind ebenfalls als ausgesprochene Destruktoren der Enzyme bekannt. Immerhin kann einstweilen noch in keinem Fall mit Sicherheit angegeben werden, ob die Zerstörung des Enzyms durch Reduktion oder durch einen anderen chemischen Vorgang erfolgt. So ist z. B. bei

N₂O₃ sowohl eine Reduktionswirkung möglich als auch die typische Reaktion mit Aminen unter Bildung von entsprechenden Hydroxylverbindungen [Loew²⁾].

As₂O₃ bzw. Arsenit schädigen — wie Buchner durch eine grosse Reihe von Versuchen (Monogr. S. 184—205) gezeigt hat — die zellfreie Gärung, aber Eiweisskörper und Zucker wirken als Schutzstoffe gegen dieses Gift.

Lipase des Blutserums wird durch arsenige Säure stark gehemmt [Rona³⁾], während Urease nach dem gleichen Forscher nicht beeinflusst wird.

Arseniat schädigt Amylase (Kjeldahl), ebenso Pepsin (Asher). Über eine eventuelle Reversibilität dieser Wirkung ist nichts bekannt.

Schwefelwasserstoff ist ein starkes Gift gegenüber Katalase, dagegen ohne Einfluss auf Pepsin, Trypsin, Amylase und Emulsin [Fermi und Pernossi⁴⁾], ohne Einfluss auf Saccharase⁵⁾ und Gärungsenzyme (Euler und Myrbäck, H. 136).

b) Organische Stoffe als Enzym-Destruktoren.

Hier ist die Abgrenzung gegen die umkehrbar wirkenden Gifte (vgl. S. 196) noch schwieriger als bei den anorganischen Stoffen. Wir stellen auch hier die stickstofffreien Substanzen

So dürften Phenole und Phenolderivate (Thymol, Polyphenole),

¹⁾ Angaben über die Wirkung der Halogene auf Amylasen haben neuerdings (Biochem. Zs 84, 42 und 139, 476; 1923) auch Berczeller und J. Freund gemacht.

²⁾ Loew, Biochem. Zs 31, 159; 1911.

³⁾ Rona und György, Biochem. Zs 111, 115 und zwar 132; 1920.

⁴⁾ Fermi und Pernossi, Zs für Hyg. 18, 83; 1894.

⁵⁾ Euler und Svanberg, Fermentf. 3, 330; 1920.

— soweit sie schädigen — z. T. irreversible Veränderungen an den Enzymen hervorrufen. Rona und E. Bach¹⁾ haben an Saccharase die irreversible Destruktion durch m- und p-Nitrophenol studiert. Sie tritt allmählich ein und hat nach Rona einen deutlichen Schwellenwert; von diesem Schwellenwert aufwärts ist die inaktivierende Wirkung proportional der Giftkonzentration. Die „Giftbreite“ ist sehr eng; bereits die doppelte Menge der kleinsten wirksamen Konzentration ruft eine totale Hemmung der Saccharase hervor. Da die Einwirkung des Giftes also eine zeitlich messbare Reaktion ausmacht, steigt die Inaktivierungsgeschwindigkeit mit der Temperatur.

Die Hemmungen durch Cholesterin verschwinden zwar bei Thrombin wieder *in vivo*²⁾, sind aber sonst wohl z. T. irreversibel.

Hemmungen durch Aldehyde, die zeitlich messbar verlaufen, konnten an Saccharase nicht vollständig aufgehoben werden (vgl. S. 198) und sind auch sonst, z. B. bei der Wirkung auf Urease³⁾, nicht vollständig umkehrbar.

Schwefel-Verbindungen. Senföl vergiftet, soweit sich beurteilen lässt, irreversibel, z. B. Urease⁴⁾. — Während für Urease Thiodiglykol ungiftig ist, hemmt Dichlordiäthylsulfid (abgesehen von Änderung der Acidität) ein wenig und Tetrachlordiäthylsulfid stark⁵⁾.

Arsen-Verbindungen. Eine Reihe eingehender Untersuchungen verdankt man Rona. Atoxyl, $\text{H}_2\text{N} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{AsO}(\text{OH})\text{ONa}$ hemmt die Wirkung von Serumlipase auf Tributyrin stark⁶⁾, lässt aber Urease unbeeinflusst. Diese Inaktivierung ist nicht momentan, erst nach etwa 15–30' stellt sich der Höchstwert der Vergiftung ein. Wird Atoxyl zuerst mit dem Tributyrin vermischt und dann mit dem Enzym, so ist die Wirkung geringer als wenn gleich Atoxyl und Enzym zusammenkommen. Bei Zunahme der Giftkonzentration nach einer geometrischen Reihe nehmen die Geschwindigkeitskonstanten k des enzymatischen Vorgangs nach einer arithmetischen Reihe ab; es besteht demnach die Beziehung $k_A - k_B = \text{Konst.} (\log B - \log A)$ (A und B = Giftkonzentration). Die Empfindlichkeit der Serumlipasen verschiedener Tiere gegen Atoxyl erwiesen sich verschieden. Ob dies auf Unterschieden des Enzyms selbst beruht oder auf Verschiedenheiten der gleichzeitig anwesenden anderen Serumbestandteile geht aus den vorliegenden Versuchen noch nicht hervor⁷⁾.

Leberlipase (von Menschen und verschiedenen Tieren) soll gegen Atoxyl viel empfindlicher sein als Serumlipase; bereits 0,0001 mg Atoxyl (in 55 ccm

¹⁾ Rona und E. Bach, *Biochem. Zs* 118, 232; 1921.

²⁾ Siehe Dörle, *Zs ges. exp. Med.* 34, 101 und 406.

³⁾ H. E. Armstrong, Benjamin und Horton, *Proc. Roy. Soc. B.* 86; 1913. — Onodera, *Biochem. JI* 9; 1915. — Jacoby, *Biochem. Zs* 85; 1918.

⁴⁾ Jacoby, *Biochem. Zs* 74, 107; 1916.

⁵⁾ Rona und Petow, *Biochem. Zs* 111, 104; 1920.

⁶⁾ Rona und E. Bach, *Biochem. Zs* 111, 166; 1920.

⁷⁾ Siehe hierzu Willstätter und Memmen, *H.* 138, 216, und zwar 243; 1924.

Gesamtvolumen) üben eine hemmende Wirkung auf die Lipase aus; der Vorgang ist irreversibel.

Stickstoffhaltige Substanzen.

Seite 203 ist bereits betont, dass Saccharase nach Amin-Einwirkung nicht vollständig regeneriert werden konnte. Auch Hydroxylamin und Phenylhydrazin dürften z. T. Destruktoren sein, und das Gleiche kann von Diazoniumhydrat bzw. Diazoniumsalz¹⁾ behauptet werden.

Auch freie Alkaloidbasen (vgl. S. 206) scheinen nach Ronas Ergebnissen bei manchen Enzymen nicht-umkehrbare Veränderungen am Enzym zu veranlassen.

C. Hemmungen und Aktivierungen durch chemisch unbekannte Stoffe.

Presssäfte und Extrakte aus tierischem und pflanzlichen Material, sowie tierische und pflanzliche Sekrete und Flüssigkeiten rufen oft starke Hemmungen und in anderen Fällen starke Aktivierungen von Enzymwirkungen hervor. Man führt diese Wirkungen auf Stoffe zurück, welche man bei höheren Temperaturen durch ihre Stabilität gegen verschiedene Säuregrade und gegen verschiedene Reagenzien mehr oder weniger eingehend gekennzeichnet hat. Da, wie wir im Abschnitt A gesehen haben, schon sehr kleine Konzentrationen eines Paralysators hinreichen können, um ein Enzym vollständig zu hemmen, so ist schon aus diesem Grund die Identifizierung zuweilen schwer. So ist es wohl möglich, dass der im Harn vorkommende Paralysator der Saccharase²⁾ die Menge 0,01 mg per 100 ccm nicht übersteigt und sich dadurch der Isolierung entzieht.

Hefesäfte und tierische Extrakte enthalten neben Aktivatoren auch Gärungsparalysatoren unbekannter Art; wie Verf. und Myrbäck³⁾ betont haben, ist dies zu beachten, wenn man aus der Wirkung solcher Säfte auf die darin enthaltene Menge eines Aktivators schliessen will. Diese chemisch noch wenig definierten Stoffe werden im speziellen Teil dieses Buches bei den einzelnen Enzymen eingehender besprochen. Es mag aber schon hier darauf hingewiesen werden, dass einem Teil der hierher gehörenden spezifischen Hemmungskörpern wohl eine wichtigere physiologische Rolle zukommt, als man bisher angenommen hat.

Viele andere gehören sicher irgend einer Klasse schon bekannter Paralysatoren an, und sie werden sich mit der Zeit in diese einordnen lassen; sie haben einstweilen keine allgemeinere Bedeutung und werden im speziellen Teil dieses Buches bei den einzelnen Enzymen erwähnt.

¹⁾ Euler und Svanberg, Fermentf. 4, 29, und zwar 55; 1920.

²⁾ Euler und Svanberg, H. 98, 202; 1917.

³⁾ Euler und Myrbäck, H. 117, 28; 1921.

Spezifische Paralytoren unbekannter Konstitution stehen den sog. Antikörpern nahe und werden im 9. Kapitel behandelt. Grosses Interesse verdienen solche spezifische Aktivatoren von Enzymen, welche für das Zustandekommen der Enzymwirkung unbedingt notwendig sind. Über ihre chemische Natur sind wir noch ganz im unklaren; die Wirkungsverhältnisse sind nur an wenigen Vertretern dieser Gruppe von Aktivatoren eingehend studiert; es wäre also verfrüht, eine Systematik dieser Stoffe zu versuchen.

Am besten bekannt sind das von Harden und Young 1906 entdeckte Co-Enzym der Gärung (die Co-Zymase) und die sog. Enterokinase des Trypsins, entdeckt 1899 durch Pawlows Schüler Schepowalnikow¹⁾.

Von den bis jetzt bekannt gewordenen Unterschieden zwischen den beiden genannten Aktivatoren ist der — gegenwärtig wenigstens — auffallendste der, dass die Aktivierung des Trypsins durch Enterokinase nicht momentan verläuft, sondern zwar kurze, aber messbare Zeit, etwa 30 Min., erfordert.

Waldschmidt-Leitz²⁾, der kürzlich eine eingehende Studie über die Wirkung der Enterokinase veröffentlicht hat, schreibt (l. c. 189): „Die Aktivierung des Trypsins nimmt insofern eine besondere Stellung ein, als die Gegenwart des Aktivators nur für die Spaltung gewisser Substrate, nämlich der genuinen Proteine und ihrer höheren Abbauprodukte, nicht dagegen für die Hydrolyse der Polypeptide unentbehrlich ist.“ Demgegenüber kann vielleicht gerade eine bemerkenswerte Analogie zur Co-Zymase geltend gemacht werden: Die Co-Zymase ist nur zur Vergärung von Zymohexosen (und der sie liefernden Biosen) notwendig, nicht aber zur Spaltung der Brenztraubensäure. Neuerdings ist erkannt worden, dass der jede Hexosegärung einleitende Phosphatumsatz die von der Co-Zymase bewirkte Teilreaktion ist³⁾; die mit der Enterokinase zusammenhängende Teilreaktion, welche zwischen dem genuinen Protein und dem Pepton liegt, bleibt noch aufzuklären.

Entero-Kinase.

Schepowalnikow wies nach, dass reiner pankreatischer Fistelsaft, der tryptisch vollständig inaktiv ist, nach Zugabe geringer Mengen Darmsaft⁴⁾ innerhalb einer gewissen Zeit stark aktiviert wurde; er nahm eine enzymatische Reaktion Trypsinogen-Trypsin an. Während die Enterokinase von mehreren Forschern, besonders Bayliss und Starling⁵⁾, sowie Zunz⁶⁾, als Enzym betrachtet wird, haben Hamburger und Hekma⁷⁾ wichtige Belege für ihre Ansicht beigebracht, dass es sich bei der Bildung der Tryptase nicht

¹⁾ Schepowalnikow, Inaug.-Diss. St. Petersburg 1899. Ref. in *Malys Jahresber.* 29, 378; 1899.

²⁾ Waldschmidt-Leitz, H. 132, 181; 1924.

³⁾ Euler und Myrbäck, H. 139, 15; 1924.

⁴⁾ Auch in anderem Material als Darmsaft sollen Stoffe vorkommen, welche Trypsinogen aktivieren: Nach Hongardy (*Arch. int. Physiol.* 3, 360; 1906) in der Milch, nach Delezenne (*Soc. Biol.* 55, 27 u. 132; 1903) in Leukozyten, Bakterien und Pilzen.

⁵⁾ Bayliss und Starling, *Jl of Physiol.* 32, 129; 1904.

⁶⁾ Zunz, *Mem. Acad. roy. de Méd. de Belge* 20, 69; 1909.

⁷⁾ Hamburger und Hekma, *Jl de Physiol. Pathol. gén.* 4, 805; 1902.

um eine neue Enzymwirkung auf das sog. Trypsinogen handelt, sondern dass eine bestimmte Menge von Enterokinase nur eine bestimmte Menge Trypsinogen aktivieren kann; die gleiche Ansicht vertreten Dastre und Stassano¹⁾.

Durch die bemerkenswerte Untersuchung von Waldschmidt-Leitz²⁾ ist die Auffassung von Hamburger und Dastre endgültig bewiesen worden. Auf die Einzelheiten kommen wir im II. Teil dieses Buches zurück; hier seien nur die wesentlichsten kinetischen Ergebnisse angeführt.

Lässt man auf getrocknete, an sich tryptisch unwirksame Pankreasdrüse einen wässrigen Extrakt aus getrockneter Darmschleimhaut einwirken, so findet man, dass jeder Kinasemenge eine bestimmte maximale Aktivierungsleistung entspricht, die nach etwa einer halben Stunde erreicht und dann nicht mehr überschritten wird. Dies zeigt z. B. folgende Tabelle (l. c. S. 207), welche die durch die Spaltung von 3%iger Gelatinelösung hervorgerufenen Aciditätszunahmen³⁾ (ausgedrückt in 0,2 n-Lauge) angibt.

Zeitlicher Verlauf der Aktivierung von 0,125 g Pankreas.

Temp. 30°.		p _H = 8,7.				
Einwirkungszeit Minuten	Angewandte Kinasemenge in ccm					
	0,00	0,02	0,06	0,10	0,20	
0	0,11	0,26	0,69	—	1,27	
10	—	0,45	0,94	1,03	1,58	
30	—	0,56	1,00	1,36	1,69	
60	—	0,58	1,01	1,40	1,65	
120	0,08	—	1,03	—	—	

„Prüft man ferner die Aktivierungsleistung bei verschiedener Reaktion, so fällt eine weitere wichtige Stütze für die enzymatische Erklärungsweise. Zwar findet man die Geschwindigkeit der Aktivierung neutral am höchsten, allein auch bei verschiedener Reaktion, beispielsweise bei p_H = 5,3 und p_H = 7, entspricht einer bestimmten Kinasemenge eine gleich grosse und doch unvollständige Aktivierung.“

Misst man nach 1/2-stündiger Einwirkungszeit bei neutraler Reaktion die zur Höchstaktivierung verschiedener Drüsenmengen erforderlichen Kinasenmengen, so findet man, wie der folgende Auszug aus Tabelle 6 zeigt, direkte Proportionalität zwischen Aktivator und Enzym.

¹⁾ Dieser letzte Satz ist wörtlich der vorhergehenden Auflage dieses Buches (1920) entnommen, was in Rücksicht auf eine neuere Darstellung (in Naturw. 12, 134) erwähnt sei.

²⁾ Waldschmidt-Leitz, H. 132, 131; 1924.

³⁾ Bei Anwendung der Methode von Willstätter und Waldschmidt-Leitz, nach welcher auf Aminogruppen in alkoholischer Lösung titriert wird (Chem. Ber. 54, 2983; 1921).

Höchstaktivierungen (Aciditätszunahmen in ccm 0,2 n-Lauge) (l. c. S. 210.)

(Kinase mit Wasser auf 2 ccm verdünnt.)

Kinaselösung ccm	Pankreas-Drüse (9)		
	0,062	0,125	0,250
0,00	0,06	0,10	0,16
0,06	1,18	1,13	1,19
0,07	1,25	—	—
0,08	1,31	1,51	—
0,10	1,30	—	—
0,12	1,30	1,74	2,08
0,14	—	1,84	—
0,16	—	1,98	2,66
0,18	—	1,96	—
0,28	—	—	3,00
0,32	—	—	3,10
0,36	—	—	3,09

Kinase-Einheit und Kinase-Wert. Als vorläufiges Mass für Menge und Konzentration der Enterokinase hat Waldschmidt-Leitz die „Kinase-Einheit (K.-E.)“ vorgeschlagen und definiert als das Tausendfache derjenigen Aktivormenge, die 62 mg eines normalen, an Hemmungskörpern armen Drüsenmaterials in $\frac{1}{2}$ stündiger Einwirkung bei 30° eine tryptische Aktivität, entsprechend einer Aciditätszunahme von 0,90 ccm 0,2 n-Lauge, erteilt, gemessen nach einstündiger Hydrolyse von 5,0 ccm 3%iger Gelatine bei 30° und $p_H = 8,7$.

Als Mass der Aktivorkonzentration eines Präparates diene der „Kinase-Wert (K.-W.)“, bestimmt durch die Zahl der Kinase-Einheiten in 1 g des Präparates.

Der Kinase-Wert der getrockneten Darmschleimhaut z. B. betrug 1,0. Bis jetzt sind Präparate von 30 mal höherer Konzentration hergestellt worden.

Anhang: Aktivierung von Proenzymen.

Ausser Trypsin wird noch eine Anzahl von Enzymen aus den lebenden Organen nicht in aktivem Zustand ausgeschieden, sondern in einer unwirksamen Modifikation, welche erst durch eine besondere Reaktion in die aktive Form übergeht. Man bezeichnet diese inaktiven Vorstufen der Enzyme als Proenzyme oder Zymogene.

So wird z. B. aus den Magendrüsen nicht das Pepsin selbst, sondern, wie schon aus den Beobachtungen von Langley¹⁾, sowie Ebstein und Grützner²⁾ zu vermuten war, ein Propepsin oder Pepsinogen secerniert, welches in schwach saurer Lösung in Pepsin übergeführt wird.

¹⁾ Langley, JI of Physiol. 3, 290; 1882.

²⁾ Ebstein und Grützner, Pflüg. Arch. 8, 122; 613; 1874.

Nach Hammarsten¹⁾ tritt Chymosin zunächst als Prochymosin im Magen auf, und wird ebenfalls erst durch verdünnte Säuren in das eigentliche Enzym verwandelt.

Schliesslich wird auch in den nicht spontan gerinnenden Blutplasmen nach Pekelharing (1892) ein Proenzym, von Alex. Schmidt Prothrombin genannt, angenommen, dessen Übergang in das aktive Enzym durch Kalksalze bewirkt wird; Hammarsten²⁾.

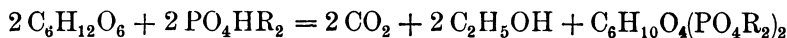
Über die Art und den Verlauf des Überganges dieser Proenzyme in das entsprechende Enzym sowie über dabei beteiligte Kinasen ist noch wenig bekannt; wir werden deshalb die einzelnen Proenzyme erst im speziellen Teil des Buches näher besprechen.

Eine Kinase unbekannter Natur spielt nach Morawitz³⁾ und anderen Autoren⁴⁾ bei der Bildung der Thrombase eine Rolle; sie soll Thrombogen in Prothrombase überführen, welche ihrerseits durch Kalk in Thrombase (= Thrombin) verwandelt wird. Diese Thrombokinase soll nicht hitzebeständig sein.

Nach Versuchen von E. W. A. Walker⁵⁾ koagulierte Oxalat-Plasma, welches während 2 Stunden auf 50° erhitzt worden war, nicht auf Zusatz von Calciumchlorid, koagulierte aber, wenn Blut oder frische Gewebe-Extrakte gleichzeitig zugefügt wurden. Demnach würde ein Thrombogen bei 50° stabil sein, während die Thrombokinase bei dieser Temperatur zerstört wird.

Co-Zymase.

Man verdankt Harden und seinem Mitarbeiter Young zwei Entdeckungen, welche für die Chemie der Gärung grundlegend geworden sind: Erstens die Erkenntnis der wesentlichen Rolle des Phosphates, welche in der Gärungsgleichung zum Ausdruck kommt:



und zweitens den Nachweis eines Co-Enzymes, ohne welches die normale Kohlehydrat-Gärung überhaupt nicht eintritt⁶⁾.

Diese letztere Entdeckung wurde am Presssaft englischer Oberhefe gemacht; wurde zu einem zuckerhaltigen Presssaft noch gekochter, an sich gärungsunwirksamer Saft (Kochsaft) zugesetzt, so wurde die Gärfähigkeit des Presssaftes wesentlich gesteigert. Druckfiltration des Presssaftes durch einen Gelatinefilm nach Martin⁷⁾ ermöglichte die Trennung des Presssaftes in ein Filtrat und einen Rückstand, welche getrennt unwirksam waren, aber vereint

¹⁾ Hammarsten, *Malys Jahresber.* 2, 118; 1872.

²⁾ Hammarsten, *H.* 28, 98; 1899.

³⁾ Morawitz, *Hofm. Beitr.* 4, 381; 1904 und 5, 133; 1905.

⁴⁾ Literatur bei Buckmaster, *Science Progress* 2, 51; 2907.

⁵⁾ E. W. A. Walker, *Jl of Physiol.* 33, 21; 1905. — Auch Speichel-Amylase, welche durch Erhitzen auf 50°—53° erhitzt worden war, soll nach Walker durch Blut reaktiviert werden, und er nimmt deswegen an, dass es sich auch hier um das Zusammenwirken eines thermostabilen Enzymogens und einer wärmeempfindlichen Kinase handelt. Einstweilen erscheint dieser Effekt zweifelhaft.

⁶⁾ Harden und Young, *Jl Physiol. Proc.* 12, XI 1904. — *Proc. Roy. Soc. B.* 77, 405; 1906.

⁷⁾ Martin, *Jl Physiol.* 20, 364; 1896.

eine gärfähige Mischung ausmachten. Den wirksamen Bestandteil des Filtrates, der dialysierbar ist und durch Aufkochen des Saftes nicht zerstört wird nannte Harden „Co-Enzym der alkoholischen Gärung“.

Harden fand auch, dass dieser Stoff aus Trockenhefe mit Wasser ausgezogen werden kann und dann gut ausgewaschene Trockenhefe wieder gärfähig macht.

Die Kinetik dieses Co-Enzyms (verkürzt Co-Zymase) ist in neuerer Zeit eingehend im Laboratorium des Verfassers bearbeitet worden, und zwar an ausgewaschener Unterhefe¹⁾. Myrbäck²⁾ konnte zunächst den für diese Untersuchung wichtigen Nachweis erbringen, dass Trockenhefe und auch das System: ausgewaschene Trockenhefe + Co-Zymasehaltige Lösung ein anderes p_H -Optimum besitzt, als frische Hefe. In der folgenden Figur 32 ist die Aktivitäts-

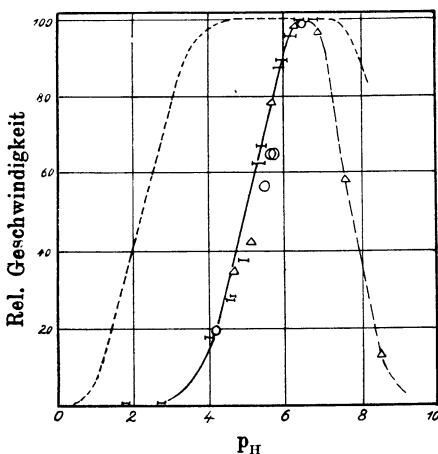


Fig. 32.

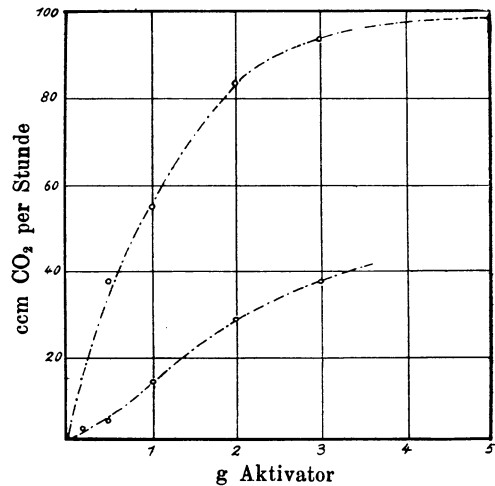


Fig. 33.

kurve der frischen Hefe (nach Euler und Heintze) gestrichelt, die Kurve der Trockenhefe ist ausgezogen.

„Es ist unmittelbar ersichtlich, wie notwendig die Innehaltung der optimalen Acidität, $p_H = 6,2-6,8$ für die Resultate ist.“

Gärungsgeschwindigkeit als Funktion der Co-Zymase-Menge. Alle untersuchten Trockenhefen werden durch weiteren Zusatz von Co-Zymase aktiviert, d. h. sie enthalten weniger Co-Zymase als der Zymase entspricht. Beim Zusatz steigender Mengen Kochsaft beobachtet man anfangs Proportionalität zwischen Geschwindigkeit und Co-Zymasemenge³⁾. Diese Proportionalität kann natürlich nicht für beliebig grosse Co-Zymasemengen

¹⁾ Nach der von Myrbäck (H. 131) ausgeführten Untersuchung über das Auswaschen ist die Wahl der Hefe sehr wesentlich. Aus den hier untersuchten Oberhefen hat sich Co-Zymase nicht auswaschen lassen, dürfte also an einen Zellbestandteil gebunden sein.

²⁾ Euler und Myrbäck, H. 131, 179; 1923.

³⁾ Tholin, H. 115, 235; 1921.

bestehen. Euler und Myrbäck¹⁾ fanden bei wachsendem Zusatz von Co-Zymase ein Maximum der Gärungsgeschwindigkeit.

Bei einer von Euler und Signe Karlsson²⁾ beschriebenen Hefe war das Maximum³⁾ beim Zusatz der zehnfachen natürlichen Co-Zymasemenge noch nicht erreicht.

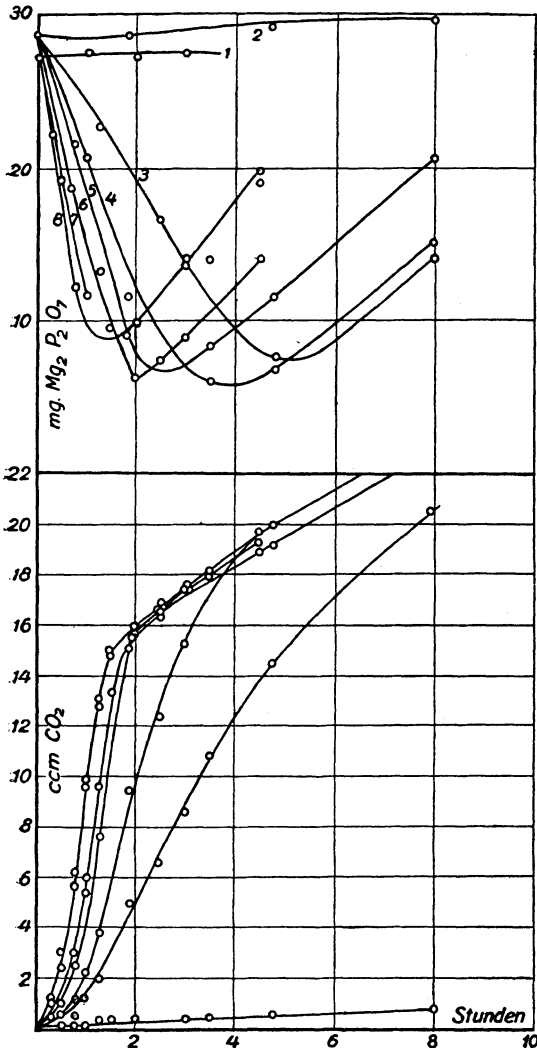


Fig. 34.

Figur 33 zeigt nach Myrbäcks Versuchen die Gärungsgeschwindigkeit als Funktion der Co-Zymasemenge.

Die lange unbeantwortete Frage, in welcher Phase der alkoholischen Gärung die Co-Zymase zur Wirkung kommt dürfte nunmehr dahin beantwortet sein, dass der Phosphatumsatz der Zymohexosen (oder möglicherweise eine noch frühere Umwandlung des Zuckers) die Mitwirkung der Co-Zymase erfordert⁴⁾. Besonders beweisend ist in dieser Hinsicht die Parallelität zwischen Kohlensäureentwicklung und Veresterung bei verschiedenen Co-Zymasemengen. (Fig. 34).

Co-Zymase kommt ausser in Kulturhefen (sowie in Muskel; Meyerhof, siehe unten) auch in lactosevergärenden Hefen, in Torula-Arten, in Milchsäurebakterien (*B. acidi lact.* und *B. casei* sowie in *B. propionicus*) vor⁵⁾, ferner in Hutpilzen und anderem Pflanzenmaterial von hoher Atmungsintensität. Dies ist bemerkenswert im Zusammenhang mit dem Befund von Virtanen, dass Milchsäurebakterien, besonders *B. casei*, Zymophosphat bilden. Ganz besonders

merkenswert im Zusammenhang mit dem Befund von Virtanen, dass Milchsäurebakterien, besonders *B. casei*, Zymophosphat bilden. Ganz besonders

¹⁾ Euler und Myrbäck, H. 117, 28 und zwar 38; 1921.

²⁾ Euler und Signe Karlsson, H. 123, 90; 1922.

³⁾ Auf den Einfluss von anwesenden Paralysatoren ist H. 117 hingewiesen.

⁴⁾ Euler und Myrbäck, H. 139, 15; 1924.

⁵⁾ Myrbäck und Euler, Chem. Ber. 57, 1073; 1924.

verdient aber darauf hingewiesen zu werden, dass dadurch das Vorkommen von Co-Zymase im Muskelsaft¹⁾ mit dem Nachweis Embdens²⁾ über das Zymophosphat (Lactacidogen) im Muskel in unmittelbaren Zusammenhang tritt.

Bezeichnung der Aktivität der Co-Zymase. Als Einheit für Co-Zymase-Menge (also die Menge der aktiven Co-Zymase unabhängig vom Reinheitsgrad) nehmen wir die Menge Co-Zymase, die unter gegebenen Versuchsbedingungen

0,2 g ausgewaschene Trockenhefe in 1 ccm 5⁰/₁₀iger Phosphatlösung von $p_H = 6,3$
+ 1 ccm Lösung von Co-Zymasepräparat oder anderer Zusätze

eine CO₂-Entwicklung von 1 ccm pro Stunde gibt. Diese Einheit nennen wir Co.

Als Bezeichnung für die Aktivität der Co-Zymase führen wir³⁾ ein

$$A \text{ Co} = \frac{\text{ccm CO}_2/1 \text{ Stunde}}{\text{g Co Zymasepräparat}}.$$

Die bisher ausgearbeiteten ersten Reinigungsmethoden⁴⁾ ergaben Präparate von folgender Aktivität:

Ausgangsmaterial	A Co etwa	200
Bleifällung, $p_H = 6$	„	700
Bleifällung, $p_H = 10$	2000—	6000
Tanninfällung	7000—	17000

Fällung mit Phosphor- und Kiesel-Wolframsäure 8000—40000.

Der von O. Cohnheim⁵⁾ beschriebene, vielfach bestrittene Aktivator des glykolytischen Enzyms aus Katzenpankreas ist noch nicht weiter definiert worden; er ist vielleicht der Co-Zymase oder einem der neueren Hormone (Insulin) oder Faktoren verwandt. Weitere Stoffe chemisch unbekannter Art, welche den beschriebenen angereicht werden könnten, z. B. das von Vahlen⁶⁾ angegebene Metabolin, sind noch nicht eingehender studiert.

Onodera⁷⁾ hat angegeben, dass ein Co-Enzym der Urease existiert, welches sich von dem Enzym selbst durch Thermostabilität und Diffusionsfähigkeit unterscheiden soll⁸⁾. Lövgren⁹⁾ hat einige Versuche über dieses eventuelle Co Enzym angestellt und neigt dazu, „Onoderas Co-Enzym sowie seinen Accelerator im Ochsen Serum hauptsächlich als einen p_H -Effekt anzusehen.“

¹⁾ Meyerhof, H. 101, 165 und Laquer, 102, 4 und 185; 1918.

²⁾ Embden, H. 93, 94; 1914 und ff. Arbeiten.

³⁾ Euler und Myrbäck, H. 136, 107, und zwar 111; 1924. — Euler und Karlsson, H. 123, 23; 1922.

⁴⁾ Euler und Myrbäck, H. 139, 281; 1924.

⁵⁾ O. Cohnheim, H. 39, 336; 1903; 42, 43, 47; 1904—1905.

⁶⁾ Vahlen, H. 59, 194; 1909. — 90, 158; 1914. — Münch. med. Wochenschr. 71, 1924.

⁷⁾ Onodera, Biochem. JI 9, 544; 1915.

⁸⁾ Auch Kato (Biochem. Zs 136, 498; 1923) erwähnt einen „Aktivator X“.

⁹⁾ Lövgren, Biochem. Zs 119, 215; 1921.

Pringsheim¹⁾ hat kürzlich über einen in der Hefe vorkommenden Aktivator der Amylasen Mitteilung gemacht, welcher bewirken soll, dass die enzymatische Verzuckerung nicht bei einem Umsatz von 78% stehen bleibt, sondern vollständig wird.

Nach Pringsheim unterscheidet sich dieser Aktivator von der Co-Zymase und der Enterokinase in folgenden zwei Punkten: „In den bekannten Fällen treten Ferment und Aktivator in demselben Individuum, sei es Tier oder Pflanze, in einem zweckdienlichen Zusammenhange auf. In dem von uns zu beschreibenden Falle zeigen jedoch Ferment und Aktivator keinen biologischen Zusammenhang, wenn auch der Mensch die nutzbringende Verwertung der Gemeinschaftswirkung empirisch aufgefunden und seit Jahrhunderten ausgebeutet hat. Der zweite Punkt, welcher den bekannten gegenüber einen Sonderfall darstellt, besteht darin, dass das einem Substrat gegenüber aktive Ferment einem Teilsubstrat gegenüber erst kräftig wirksam wird, wenn es der Zutritt des Aktivators hierzu befähigt. Da eine systematische Benennung der Fermentaktivatoren noch nicht eingeführt ist, haben wir unseren Aktivator zur Unterscheidung von den anders gearteten, bisher im allgemeinen als Koenzyme oder Kinasen bezeichneten, Komplement benannt“.

Schliesslich seien Arbeiten von M. Jacoby²⁾ über Auxostoffe und künstliche Zymogene erwähnt, die sich besonders auf Aktivatoren der Urease beziehen.

Sowohl Hefe als Organextrakte sowie Blutserum enthalten Stoffe, welche proteolytische Enzyme und Gärungsenzyme kräftig hemmen [Hedin³⁾, Northrop⁴⁾, Meyerhof⁵⁾, Euler und Myrbäck⁶⁾]. Eigenschaften und Grad der Spezifität sowie die Beziehungen zu den Anti-Enzymen sind noch nicht genügend festgestellt.

Über unbekannte Hemmungskörper siehe auch Bearn und Cramer, *Biochem. JI* 2, 174; 1907.

D. Hemmungen und Aktivierungen von Enzymreaktionen in Zellen.

Nur die Hemmungen bei definierten Enzymwirkungen (Hexosespaltung, Peptonabbau u. dgl.) werden hier in Betracht gezogen, nicht aber physiologische Erscheinungskomplexe, wie Tötung, Fortpflanzung, Anpassung.

Einleitungsweise mag gleich folgende allgemeine Bemerkung gemacht werden: Will man beim Studium der Enzymvergiftung in Zellen die Inaktivierung eines Enzyms in der Zelle zur „Gift“-Menge in Beziehung setzen, so ist das von der Zelle aufgenommene „Gift“ massgebend; in den meisten Arbeiten über die Vergiftung von Bakterien und anderen Mikroorganismen wird die Gesamtmenge des der umgebenden Lösung zugesetzten Giftes mit der tötenden oder inaktivierenden Wirkung verglichen.

¹⁾ H. Pringsheim und Walter Fuchs, *Chem. Ber.* 56, 1762; 1923. — Pringsheim und Schmalz, *Biochem. Zs* 142, 108; 1923. — Pringsheim und Beiser, *Biochem. Zs* 148, 336; 1924. — Zu Biedermanns „Komplement“ (*Fermentf.* 4, 258) besteht keine Beziehung.

²⁾ Jacoby, *Biochem. Zs* 140, 158; 1923. — Siehe auch Franco di Renzo, *Biochem. Zs* 144, 298; 1924.

³⁾ Hedin, *Jl of Physiol.* 32, 390; 1905. — *Biochem. JI* 1, 474; 1906.

⁴⁾ Northrop, *Jl Gen. Physiol.* 5, 335; 1923 und 4, 261; 1922.

⁵⁾ Meyerhof, *H.* 102, 1 und 185; 1918.

⁶⁾ Euler und Myrbäck, *H.* 142. Im Druck.

1. Anorganische Salze.

Was die Wirkung der Schwermetallsalze auf die in Zellen und Geweben befindlichen Enzyme betrifft, so liegen hier die Verhältnisse deswegen viel weniger klar als bei den isolierten Enzymen, weil die relativ grossen Mengen von Eiweiss in den Zellen und Geweben die Schwermetallionen binden und dadurch der Einwirkung auf die in den Zellen vorhandenen freien Enzyme, wie z. B. Saccharase, zum grossen Teil entziehen. Man findet demgemäss z. B. Saccharase in den Hefezellen viel weniger empfindlich gegen Schwermetallsalze als in den gereinigten Lösungen. Die Bestandteile der Zellen üben, mit anderen Worten, auf Enzyme wie Saccharase eine enorme Schutzwirkung aus.

Nachdem die Inaktivierung gelöster und hochgereinigter Saccharase ($I_f = 230$) durch die Untersuchungen aus diesem Laboratorium ziemlich eingehend bekannt geworden ist, wurden die dabei gewonnenen Ergebnisse dazu verwendet, in einen Fall der Vergiftung lebender Zellen durch Schwermetallsalze näher einzudringen¹⁾.

Die Schutzwirkung der Hefezelle gegenüber der Inaktivierung ihrer Saccharase durch Silbernitrat ist ganz ausserordentlich gross, wie folgende Überschlagsrechnung zeigt: Unter den bei den Versuchen von Walles gewählten Verhältnissen wird durch die Hefemenge von rund 0,35 g eine Inversionskonstante von etwa $150 \cdot 10^{-4}$ erzielt. Wird eine solche Inversionskonstante durch Saccharase vom Reinheitsgrad $I_f = 230$ unter Verhältnissen hervorgerufen, welche den hier vorhandenen entsprechen ($p_H = 4,5$), so ist zur halben Vergiftung nach den Messungen von Myrbäck eine Silbernitratmenge von etwa 0,06 mg AgNO_3 erforderlich. Nach den Versuchen mit Hefezellen reichen 10 mg zur halben Vergiftung noch nicht hin, in runder Zahl kann etwa der Wert 12 mg angegeben werden. Somit ist zur Inaktivierung der in der Hefe vorhandenen Saccharasemenge ein Überschuss von etwa 1 : 200 erforderlich.

Auffallend ist, dass trotz dieses grossen Silberüberschusses — die Hefe hat dann mehr als $\frac{4}{100}$ ihres Gewichtes an Silber aufgenommen — auch in der Zelle die Regeneration mit Schwefelwasserstoff schnell und vollständig verläuft.

In nicht oder nur teilweise gereinigten Saccharaselösungen tritt bei der Vergiftung mit Schwermetallsalzen, besonders Silbersalzen, eine Erscheinung auf, welche an den Danysz-Effekt erinnert: Die Bindung des Silbersalzes an das Enzym unterliegt einer zeitlichen Änderung, einer Selbstregeneration (vgl. S. 181). Diese Selbstregeneration²⁾ der Saccharase stellt nach der

¹⁾ Euler und Walles, H. 132, 167; 1924.

²⁾ Wie S. 183 bereits erwähnt, kann die Selbstregeneration so gedeutet werden, dass das Metallion in einer primären Reaktion von der Saccharase mit verhältnismässig grosser Geschwindigkeit gebunden wird, dass aber dann sofort eine mit geringerer Geschwindigkeit

Ag-Vergiftung von Hefezellen unter gewissen Bedingungen etwa 100% des inaktivierten Enzyms wieder her.

Wie unten noch erörtert wird, sind die meisten Enzyme in den Zellen mehr oder weniger fest an andere Zellbestandteile gebunden und werden dadurch in ihren Eigenschaften mehr oder weniger stark beeinflusst. So verhält sich z. B. der Zymasekomplex innerhalb der Zellen erheblich anders als in isoliertem Zustand. Diese Enzyme sind innerhalb der Zellen besonders empfindlich; es hat den Anschein, als ob ihre Wirksamkeit sofort gehemmt wird, sobald das Protoplasma als Ganzes vom Gift irgendwie beeinflusst wird. Bis jetzt lässt sich über diese Vorgänge noch nichts allgemeines sagen; vor allem fehlen quantitative Versuche darüber, welche Menge eines Metallsalzes, wie etwa CuSO_4 , einerseits in die Zelle eindringt und vom Eiweiss gebunden wird, andererseits eine gewisse enzymatische Hemmung hervorbringt. Auch über die Einwirkung der Gifte auf die Hilfsstoffe, besonders die Co-Zymase wissen wir noch nichts. Ohne diese Daten ist man kaum imstande, zu beurteilen, welche Giftmengen tatsächlich auf das betreffende Enzym einwirken.

Über die von Embden beschriebenen Wirkungen von Ionen auf das Kohlehydrat-Gleichgewicht im frischen Muskel siehe 7. Kapitel.

2. Organische Stoffe.

Im Abschnitt B. 1 c. S. 196 ist die vielfach bestätigte Beobachtung von E. Fischer erwähnt worden, dass Toluol die Wirkung isolierter Enzyme nicht beeinflusst.

Auch innerhalb lebender und toter Zellen sind gewisse Enzyme gegen Toluol und gegen andere Protoplasmagifte unempfindlich. So wird Saccharase in der Bierhefe durch Toluol u. a. nicht gehemmt.

Ein Versuch mit 10%iger Rohrzuckerlösung bei 20° ergab

mit Chloroform $k \cdot 10^4 = 94$,

ohne Chloroform $k \cdot 10^4 = 94$.

Anders verhält sich aber schon die Saccharase in *Monilia candida*; sie wird durch Chloroform und Äther stark gehemmt. Ferner wird der Zymasekomplex im Hefepresssaft durch Toluol nicht beeinflusst, wie E. Buchner festgestellt hat. Setzt man aber etwa 0,1 ccm Toluol zu einer Emulsion von 1 g Hefe in 100 ccm Zuckerlösung, so wird die Gärfähigkeit der Hefe bis auf etwa 1–5% des ursprünglichen Wertes herabgesetzt.

verlaufende Reaktion einsetzt, durch welche enzymatisch unwirksame Lösungsbestandteile mit den vergiftenden Metallionen reagieren und diese dem Enzym entziehen.

Von mehreren Seiten sind die bei Vergiftungen primär eintretenden Reaktionen als Adsorptionen bezeichnet worden. Nachdem es nun immer deutlicher wird, dass „Sorptionsen“ in den meisten Fällen chemische Reaktionen darstellen, welche auf eine Oberfläche begrenzt sind, liegt keinerlei Grund vor, hier von Sorption zu sprechen.

Man wird heutzutage nun nicht mehr in Abrede stellen wollen, dass die gesamte Gärtätigkeit der Hefe durch einen Enzymkomplex vermittelt wird; die in der früheren Literatur mehrfach betonte Behauptung, dass dieser Vorgang, wie andere vitale Reaktionen, eine Äusserung des Protoplasmas sei, kann ja nichts anderes bedeuten, als dass ein Teil des Protoplasmas die betreffenden enzymatischen Eigenschaften besitzt. Wesentlich ist jedenfalls die Feststellung folgender Tatsache:

Während, wie erwähnt, der Gärungskatalysator ausserhalb der Zelle keine Beeinflussung erfährt, wird seine enzymatische Wirkung innerhalb der frischen Zelle durch Protoplasmagifte wie Toluol und Chloroform zum grössten Teil unterdrückt.

Die im Stockholmer Laboratorium am öftesten angewandte Unterhefe H wird durch Toluol hinsichtlich ihrer Gärtätigkeit fast völlig inaktiviert, wie folgender Versuch zeigt:

0,4 g Hefe in 40 ccm 10%iger Rohrzuckerlösung bei 30° in 3 Stunden	
mit	0,0008 g CO ₂
ohne 1 ccm Toluol	0,3905 g CO ₂ .

Bei anderen Hefen, wie bei Münchener untergäriger Bierhefe, wird die Gärkraft nicht so vollständig unterdrückt; sie enthalten vielleicht etwas mehr „freie Zymase“.

Diese Tatsache ist nun nicht mit der Annahme vereinbar, dass die Gärkraft der lebenden Hefe nur die Äusserung eines freien Enzymkomplexes ist. Wie bereits S. 183 erwähnt, hatte sich in den Arbeiten des Stockholmer Laboratoriums über Saccharase gezeigt, dass sich ein in der Hefezelle befindliches freies Enzym innerhalb der Zelle nicht anders verhält als in isoliertem Zustand.

Nun hat man für die Beurteilung der Bindung eines Enzyms auch noch andere Anhaltspunkte, nämlich seine Extrahierbarkeit. Für die in dieser Hinsicht studierten Hefenenzyme haben Verf. und Kullberg¹⁾ folgende Angaben zusammengestellt (siehe S. 230).

Das Ergebnis unserer Versuche hatten wir so formuliert:

„Die Hefenenzyme sind ursprünglich Bestandteile des Plasmas und werden entweder schon in der lebenden Zelle vom Plasma abgeschieden und dann am Plasma wieder regeneriert; sie sind dann relativ leicht extrahierbar und sind in relativ grosser Menge in den Zellen vorhanden. Oder aber die Abtrennung erfolgt erst (teilweise) beim Entwässern der Hefe oder durch mechanische Mittel, überhaupt unter den Umständen, unter welchen das Plasma getötet wird. Gegen Antiseptika sind die Hefenenzyme in dem Masse unempfindlich, als sie vom lebenden Plasma befreit sind.“

Verf. und B. v. Euler-af Ugglas²⁾ haben 1911 aus den über die Wirkung von Protoplasmagiften vorliegenden Daten folgenden Schluss gezogen:

¹⁾ Euler und Kullberg, H. 73, 85; 1911.

²⁾ Euler und af Ugglas, H. 70, 279; 1911.

		Zymase	Monilia-Saccharase	Maltase	Bierhefen-Saccharase
Lebende Hefe	Relative Reaktionsgeschwindigkeit in 8%iger Zuckerlösung	1	1 (bis 2)	1 (bis 2)	170
	Extrahierbarkeit	0	0	0	Gering
	Giftwirkung:				
	Chloroform	Hemmt vollständig	Hemmt vollständig	Hemmt vollständig	Schwächt fast nicht
	Thymol	"	"	Schwächt sehr stark	Schwächt nicht
	Toluol	"	"	"	"
	Schwächung beim Trocknen	20:1	25:1	—	2:1
Trockenhefe	Extrahierbarkeit	Sehr gering	Sehr gering	Sehr unvollständig	40—80%
	Giftwirkung:				
	Chloroform	Schwächt	—	—	Schwächt nicht
	Toluol	"	Schwächt	Schwächt	"

Die Zymase ist in der lebenden Hefezelle als chemischer Komplex ganz oder teilweise an das Protoplasma gebunden; wird die vitale Tätigkeit der Zelle dauernd oder zeitweilig aufgehoben, so wird auch die gärungserregende Gruppe des Protoplasmas, also die an das Protoplasma gebundene Zymase, inaktiviert; wirksam bleibt nur derjenige Teil des Gärungsenzymes, welcher frei ist, oder bei der Entwässerung der Hefe im Vakuum oder durch Alkohol freigemacht wird.

Etwas später ist Rubner¹⁾, unabhängig vom Verf., durch energetische Betrachtungen seiner eigenen Versuche zu einem ähnlichen Resultat gekommen.

Auch J. Giaja²⁾ hat in einigen interessanten Mitteilungen zeitig den Standpunkt vertreten, dass die freie Zymase an der Gärung der lebenden Hefe nur unwesentlich beteiligt sein kann. Ferner sei auf eine neue Untersuchung von F. Hayduck und H. Haehn³⁾ verwiesen.

Der Anteil der freien Zymase in der frischen Hefe kann, wie wiederholt betont wurde⁴⁾, nur sehr klein sein; die Existenz einer minimalen Menge

¹⁾ Rubner, Arch. f. Physiol. Suppl. 1912.

²⁾ Giaja, Soc. Biol. 82, 719 und 804; 1919. — JI de Physiol. et Path. gén. 1920, 1094. — Giaja teilt auch die Beobachtung mit, dass Hefe, welche durch Einwirkung von Eingeweide-Saft der Schnecke *Helix pomatia* ihrer Membran beraubt ist, sich bei Toluolzusatz wie lebende Hefe verhält.

³⁾ F. Hayduck und H. Haehn, Biochem. Zs 128, 568; 1922.

⁴⁾ Euler und Myrbäck, H. 117, 28; 1921.

freier Zymase in der frischen Hefe kategorisch in Abrede zu stellen, wie dies neuerdings geschehen ist¹⁾, erscheint mir auf Grund der bis jetzt bekannten Tatsachen nicht berechtigt²⁾.

Die Frage, welcher Anteil der einzelnen Enzyme in den Zellen frei bzw. gebunden ist, besitzt für das Studium der Enzyymbildung und für eine Reihe physiologischer Probleme die höchste Bedeutung, und muss weiter eingehend studiert werden.

Auch in Zellen, die durch Entwässern getötet sind (Dauerhefen oder Trockenhefen nach Buchner), wird der Zymasekomplex durch Toluol und andere Protoplasmagifte stärker inaktiviert als im Hefepresssaft, während die Saccharase in Dauerhefe ebenso unbeeinflusst bleibt wie in vitro bzw. in lebender Hefe [(Euler und Kullberg³⁾].

Für die Beantwortung der Frage, weshalb die freien und die in Zellen gebundenen Enzyme von den besprochenen Protoplasmagiften so verschieden beeinflusst werden, liegen bis jetzt noch keine Anhaltspunkte vor.

Andere organische Stoffe sind besonders hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Gärfähigkeit vielfach untersucht worden; dabei hat sich aber wenig von allgemeinerem Interesse ergeben. Was wir über Aktivierung der Gärung durch chemisch bekannte Stoffe⁴⁾ wissen, hat hauptsächlich spezielles Interesse für die Gärungsenzyme, und wird mit diesen im II. Band besprochen.

Hier wie in anderen Fällen ist die Beeinflussung der Aktivität auch von der Acidität der Lösung abhängig, was sich z. T. durch die Salzbildung der Fremdstoffe und ihre dadurch veränderten chemischen und physikalischen Eigenschaften erklärt. So hat sich z. B. gezeigt, dass die Wirkung von Anilin und Salicylsäure auf die alkoholische Gärung bei $p_H = 8$ eine wesentlich andere ist als bei der Gärung in schwach saurer Lösung⁵⁾.

Aktivierungen.

Auch hier macht sich, wie bei den Hemmungen, der Einfluss der Acidität wesentlich bemerkbar; Aciditätsveränderungen haben viele Aktivierungen vorgetäuscht, und der Wert von Versuchen, bei welchen die Konstanz von p_H nicht garantiert ist, lässt sich oft schwer beurteilen⁶⁾.

Bis jetzt liegen über die Beeinflussung der Enzymwirkungen inner-

¹⁾ H. Sobotka, H. 134, 1; 1924.

²⁾ Vgl. Euler und Westling, H. 140, 164; 1924.

³⁾ Euler und Kullberg, H. 73, 85; 1911. — Die in dieser Arbeit mitgeteilten Tatsachen sind durch Buchner und Skraup (Biochem. Zs 82, 134; 1917) bestätigt worden. Die abweichende Deutung, welche diese Autoren ihren Versuchen und denen von Euler geben, kann Verf. nicht als stichhaltig anerkennen.

⁴⁾ Siehe z. B. Abderhalden, Fermentf. 6, 149; 1922.

⁵⁾ Euler und Svanberg, H. 105, 197; 1919.

⁶⁾ Siehe z. B. Orient, Biochem. Zs 132 und 144; 1922 und 1924.

halb von Zellen kaum andere Beispiele vor, als die bezüglich der alkoholischen Gärung gewonnenen. Zweifellos hängen sie eng zusammen mit den von Embden¹⁾ an Muskeln entdeckten Aktivierungen durch Salze.

Die Tatsache, dass gewisse Stoffe, welche in grösseren Mengen ausgesprochene „Giftwirkungen“ ausüben, in sehr kleinen Konzentrationen die Tätigkeit mancher Enzyme, darunter die Katalysatoren vitaler Vorgänge, wie Gärung, Atmung, Wachstum usw. beschleunigen, ist lange bekannt.

Für einige organische Stoffe hat Verf. mit Sahlén die Konzentrationen gemessen, bei welchen die Aktivierungen in Hemmungen übergehen. Wie die Fig. 35 zeigt, üben 0,085 g Natriumsalicylat (I) und Guajacol (II) auf 1 g Hefe die grösste Gärungsbeschleunigung aus.

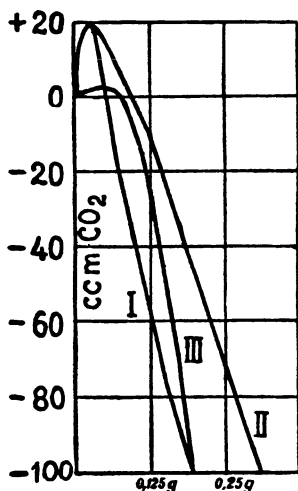


Fig. 35.

Eine befriedigende Theorie für diese Aktivierungs- oder Reizerscheinung besitzen wir noch nicht. Es ist denkbar, dass dieser Effekt mit der Enzyymbildung in der Zelle verknüpft ist²⁾.

Einen chemisch noch unbekanntem „Biokatalysator Z“ der Gärung hat Verf.³⁾ mit O. Swartz und Myrbäck studiert.

Über Atmungsaktivatoren haben Abderhalden und Wertheimer⁴⁾ bemerkenswerte Versuche angestellt.

Aktivierungen durch Toluol und Chloroform.

Grösser als die oben (Fig. 35) genannten Reizwirkungen sind Einflüsse von Protoplasmagiften wie Toluol und Chloroform, wie sie zuerst Verf. mit Löwenhamn⁵⁾ an der Vergärung der Brenztraubensäure gefunden und später an der Katalase der Hefe mit Blix⁶⁾ eingehender studiert hat.

Aus letzterer Arbeit sei als Beispiel ein Versuch mitgeteilt.

In 2 Parallelversuchen wurden 0,2 g frische Hefe (Trockensubst. 30,2%) in 100 ccm reinen Wassers bzw. in 100 ccm mit Chloroform gesättigten Wassers aufgeschlemmt. Je 50 ccm dieser Emulsion wurden unmittelbar darauf mit 50 ccm 0,0181 n H₂O₂-Lösung vermischt. Die Zersetzungsgeschwindigkeit des Wasserstoffsperoxyds (k) wurde titrimetrisch festgestellt. Es ergab sich:

	mit Chloroform	ohne Chloroform
k. 10 ⁴	158	22,5.

Demgemäss war die Katalase der Hefe auf das 7 fache aktiviert worden.

¹⁾ Embden und Lehnartz, H. 134, 243. — E. u. Haymann, H. 134, 154; 1924.

²⁾ Siehe Euler und Lindner, Chemie der Hefe. Leipzig, Akad. Verlag 1915.

³⁾ Euler und Swartz, H. 140, 146; 1924. — Euler und Myrbäck, H. 141. — Aktivierungen durch Formiate siehe Euler und Westling, H. 140, 164; 1924.

⁴⁾ Abderhalden und Wertheimer, Pflüg. Arch. 195, 480; 1922 und 198, 571; 1923.

⁵⁾ Euler und Löwenhamn, H. 97, 279; 1916.

⁶⁾ Euler und Blix, H. 105, 83; 1919. — Siehe auch Euler und Laurin, H. 106, 12; 1919.

Starke Aktivierungen durch Toluol treten an frischen Hefen hinsichtlich der Selbstgärung ein¹⁾.

1. Versuche mit frischer Hefe.

Hefenmenge: 5 g = 1,72 g Trockengewicht. Kein Pufferzusatz.

Zusätze	ccm CO ₂ in Minuten								
	60	75	110	140	250	275	320	380	560
Ohne Zusatz	—	12,5	18,0	18,5	20,5	22,5	25,5	27,5	32,0
5 ccm Toluol	—	25,5	34,0	40,0	47,0	53,5	56,0	57,0	57,0
5 ccm Toluol + 2 ccm Äthylacetat	—	3,0	5,0	5,5	7,5	10,0	11,0	12,0	15,0
5 ccm Toluol + 2 ccm Äthylacetat + 1 g Glucose	1,2	1,4	1,8	2,5	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0

Die Selbstgärung frischer Hefe wird also durch Toluol stark beschleunigt.

Im Gegensatz hierzu hemmt Äthylacetat die Selbstgärung unter den eingehaltenen Bedingungen auch in Gegenwart von Toluol. Nach den Ergebnissen von Willstätter und Racke²⁾ ist zu vermuten, dass hierbei die auftretende Essigsäure die Hauptursache ist; ferner hemmt, wie schon früher gefunden wurde, Chloroform.

2. Versuche mit getrockneter Hefe.

Zusätze	ccm CO ₂ in Minuten							
	45	80	110	170	245	290	350	530
Ohne Zusatz	23,0	39,5	49,0	54,5	56,5	57,0	58,0	59,5
5 ccm Toluol + 2 ccm Äthylacetat .	3,5	4,5	4,5	5,0	6,0	7,0	7,0	7,0
5 ccm Toluol + 2 ccm Äthylacetat + 1 g Glucose	3,0	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	6,5

Diese Versuchsreihe zeigt, dass die Selbstgärung der Trockenhefe auch ohne Zusatz eines Antiseptikums stark ist, und dass Toluol die Selbstgärung der Trockenhefe hemmt.

Der Unterschied gegen frische Hefezellen hängt wohl zum Teil mit der vergrößerten Permeabilität der Zellmembran getrockneter Zellen zusammen, wodurch die von den Zellen aufgenommene Toluolmenge beeinflusst wird.

Entsprechend dem bei frischer Hefe gemachten Befund wird die Selbstgärung der Trockenhefe auch durch einen Zusatz von Toluol + Äthylacetat gehemmt, und zwar sowohl in Gegenwart als in Abwesenheit von Glucose. Besonders bemerkenswert ist, dass die Gegenwart vergärbaren Zuckers in der umgebenden Lösung die Selbstgärung hemmt und zwar nicht nur die Geschwindigkeit, sondern auch die Lage des Endzustandes (Myrbäck).

Allgemein kann zu diesem Abschnitt etwa folgendes hervorgehoben werden:

Bei der Beeinflussung isolierter Enzyme durch fremde Stoffe kommen nur chemische Vorgänge, also Salzbildung, Dissoziationsbeeinflussung, doppelte Umsetzung, Komplexbildung oder organisch-chemische Reaktionen, wie

¹⁾ Euler und Myrbäck, H. 129, 195; 1923.

²⁾ Willstätter und Racke, Lieb. Ann. 425, 14; 1921.

Bildung von Estern, Oximen usw. in Betracht. Chemisch indifferente Stoffe, wie Benzol und andere Kohlenwasserstoffe werden deshalb im allgemeinen unwirksam sein.

Bei „Giftwirkungen“ innerhalb der lebenden oder toten Zelle machen sich noch andere Einflüsse stark geltend, nämlich Löslichkeit, Permeabilität, Dispersitätsgrad und Struktur.

In erster Linie spielt die Durchlässigkeit der äusseren Zellmembran bzw. der äusseren Zellschichten eine wesentliche Rolle. Jedenfalls wird ein Stoff, der schwer durch die äusseren Schichten durchgelassen wird, weniger kräftig auf Stoffe im Innern der Zelle wirken können.

Auf Änderung der Durchlässigkeit lässt sich folgende Tatsache¹⁾ zurückführen:

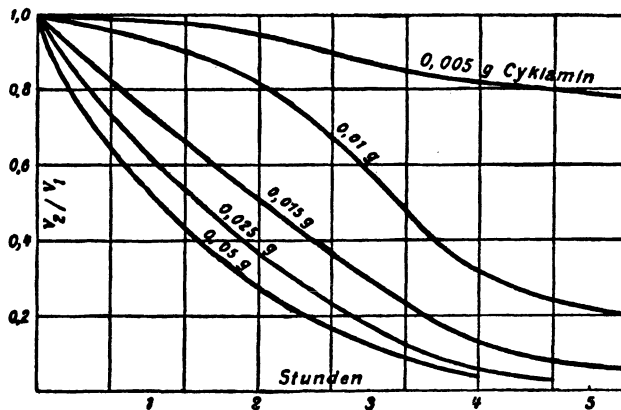


Fig. 36.

Wird Hefe mehrere Stunden in der Lösung eines Protoplasmagiftes, z. B. eines Saponins (Cyclamin) belassen, sodann daraus entfernt und in eine reine Zuckerlösung gebracht, so ist die Gärkraft der Hefe vollkommen intakt. Wird hingegen dieselbe Hefe in Zuckerlösungen gebracht, welche das Saponin enthalten, so tritt alsbald eine starke Hemmung der Gärung ein, und zwar um so rascher, je grösser die Giftkonzentration ist. Der Verlauf dieser Gärungshemmung geht aus Figur 36 hervor, in welcher unter v_2/v_1 die relative Geschwindigkeit der CO₂-Entwicklung angegeben ist.

Die Tatsache, dass gärende Hefe vergiftet wird, ruhende Hefe von Cyclamin unbeeinflusst bleibt — das gleiche gilt für Toluol, Chloroform u. a. —, ist offenbar darauf zurückzuführen, dass das Gift nur in die gärende Hefe eindringt.

Die Permeabilität lebender Zellen ist überhaupt weitgehend von ihrem physiologischen Zustand abhängig, und dadurch wird die Beurteilung, wieviel von einem Gift in die Zelle eingedrungen ist, noch unsicherer, als dies sonst der Fall wäre.

¹⁾ Lundberg, Zs f. Gärungsphysiol. 2, 223; 1913.

Die Forschung auf diesem Gebiet wird also weiter dahin streben müssen, darüber Aufschluss zu erhalten, wieviel von einem Gift in die Zelle eingedrungen¹⁾ und mit einer Enzymgruppe wie dem Zymasekomplex in Berührung gekommen ist. Bis dahin müssen die erhaltenen Ergebnisse als rein empirische behandelt werden.

In zweiter Linie können chemisch indifferente Stoffe wie Benzol, Toluol u. a. die Löslichkeitsverhältnisse innerhalb der Zellen beeinflussen. Man hat Anlass anzunehmen, dass das Innere der Zellen stark lipoidhaltig ist; werden diese Lipide von Toluol, Chloroform usw. gelöst, so können Veränderungen in den Grenzschichten eintreten, so dass Bestandteile des Zellinneren, welche unter normalen Umständen getrennt sind, miteinander in Berührung kommen²⁾. Koagulationen, Fällungen u. dgl. werden die sekundären Folgen sein, mit welchen dann Störungen im Protoplasma verknüpft sind.

Teilweise in Zusammenhang mit einer solchen Herauslösung von Bestandteilen aus Membranen und Organen steht die dritte, bisher noch wenig studierte Art der Einwirkung von chemisch anscheinend wenig aktiven, aber destruirend wirkenden Stoffen: Es ist die Veränderung bzw. Zerstörung der feineren Struktur der mit dem Plasma noch verbundenen Enzymkomplexe. Wir kommen auf diesen Einfluss im letzten Kapitel dieses Bandes noch zurück.

Einfluss organischer Lösungs-, Extraktions- und Fällungsmittel auf Enzyme.

Die Zahl der hier in Betracht kommenden Stoffe ist nicht gross; hauptsächlich handelt es sich um die Wirkung von reinem und wässrigem Äthylalkohol und in zweiter Linie um Glycerin; Aceton hat zuweilen bei präparativen enzymatischen Arbeiten gute Dienste geleistet. Andere Flüssigkeiten, wie Methylalkohol, Glykol sind weniger verwendet worden und haben sich bis jetzt als weniger brauchbar erwiesen.

Äthylalkohol.

In der älteren Literatur wird der hemmende Einfluss des Alkohols auf Enzymreaktionen in der Regel stark hervorgehoben. Auch vom theoretischen

¹⁾ Siehe hierzu das S. 228 Gesagte, sowie Euler und Waller (H. 132).

Verf. hat mit N. Florell versucht, diesen Verhältnissen dadurch näher zu kommen, dass er die Einwirkung von Farbstoffen auf die alkoholische Gärung der Hefe untersuchte (Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi Bd. 7, Nr. 18; 1919). Farbstoffe werden von Hefe in zweifacher Weise gebunden:

Erstens können die Farbstoffe in die Zellen eindringen und werden darin durch chemische Bindung oder Ausfällung verfestigt oder durch Lösung nach dem Verteilungssatz festgehalten.

Zweitens können Farbstoffe an der Zelloberfläche gebunden werden durch chemische Reaktion mit den Eiweissstoffen oder durch andere Art von Adsorption.

²⁾ Dabei mögen auch Änderungen der Oberflächenspannungen an Grenzschichten im Sinne Czapeks (Bot. Ber. 28, 480; 1910) eine Rolle spielen.

Standpunkt aus wäre eine beträchtliche Einwirkung auf Enzymreaktionen zu erwarten, in den Fällen, in welchen dieser Alkohol einen wesentlichen Anteil des Lösungsmittels ausmacht.

Die Enzyme besitzen, soviel bis jetzt bekannt ist, den Charakter von Elektrolyten. Nun übt bekanntlich Alkohol einen starken Einfluss auf den Dissoziationszustand schwacher Elektrolyte aus. So wird z. B. die Dissoziationskonstante der Salicylsäure durch Äthylalkohol folgendermassen beeinflusst:

Vol.-Proz. Alkohol	0	20	40	60
Dissoz.-Konst K. 10 ⁵	100	83	32	11

Ein ähnlicher Einfluss auf schwache Elektrolyte ist, so viel man weiss, allgemein.

Auch die Geschwindigkeit nichtenzymatischer Hydrolysen wird durch Alkoholzusätze bedeutend verringert. Ferner wird die Solvation und der Dispersitätsgrad von kolloiden Stoffen durch Alkoholzusatz verändert.

Aus diesen verschiedenen Gründen ist eine bedeutende Wirkung auf die Enzymreaktionen zu erwarten.

Die ersten genauen Untersuchungen über den Einfluss des Äthylalkohols auf ein Enzym, die Saccharase, verdankt man C. S. Hudson und Paine¹⁾.

Diese Forscher studierten zunächst die Aktivität der Saccharase unmittelbar nach Zusätzen von Alkohol, und erhielten bezüglich der reversiblen Inaktivierung folgende Ergebnisse:

Konzentration d. Alkohols	0	4,3	9,1	18,2	27,3	50,0	70,0
Rel. Aktivität	100	76	60	38	26	11	8

Mit einem Präparat von höherem Reinheitsgrad (If=140) hat Josephson²⁾ den Einfluss des Alkohols auf die Inversionsgeschwindigkeit untersucht und eine völlige Übereinstimmung mit der von Hudson und Paine ermittelten Kurve gefunden.

Das nachstehende Diagramm (Fig. 37) ist mit unseren Werten erhalten.

% Alkohol . . .	0	2	5	10	20
Rel. Inv.-Geschw.	100	82	72	56	35

Bei diesen Versuchen kann die irreversible Zerstörung der Saccharase keinen Einfluss auf die Inversionsgeschwindigkeit gehabt haben, da das angewandte Enzympräparat in Alkohol unter 20% nicht irreversibel inaktiviert wird (vgl. S. 237), wenigstens nicht in einer so kurzen Zeit wie in der eines Inversionsversuches.

Der Einfluss des Alkohols ist hier etwa von der gleichen Grössenordnung wie auf die elektrolytische Dissoziation.

Eine eingehendere Berechnung dieses Einflusses lässt sich kaum geben; wenn wir an der zuerst von Michaelis quantitativ verwendeten Vorstellung

¹⁾ Hudson und Paine, Am. Chem. Soc. 32, 1350; 1910.

²⁾ Euler, Josephson und Myrbäck, H. 130 (Kossel-Festschr.) 87; 1923.

über die reaktionsvermittelnde Rolle der Molekülarart Enzym-Substrat festhalten, so käme auch noch der Einfluss des Alkohols auf die Affinitätskonstante dieser Verbindung in Betracht¹⁾.

Was die irreversible Zerstörung der Saccharase betrifft, so war zu erwarten, dass das Enzym, nachdem es von Schutzmitteln, wie Hefengummi und von den aus der Hefe stammenden verunreinigenden Eiweissstoffen befreit ist, eine andere Empfindlichkeit gegen organische Lösungsmittel (überhaupt andere physikalische Eigenschaften) besitzt als vorher. Aus diesem Grunde wurden die älteren eingehenden Messungen Hudsons kürzlich mit einem reineren Enzympräparat von Josephson wiederholt²⁾.

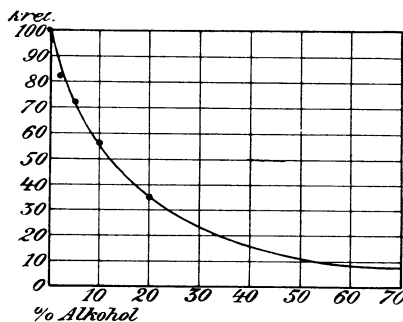


Fig. 37.

Unsere Versuche wurden so ausgeführt, dass 1 ccm der Enzymlösung ($I_f = 140$) zu einer bestimmten Menge Alkohol von bekannter Konzentration zugesetzt wurde. Nach Umschütteln liess man die Mischung eine gewisse Zeit (30 Minuten) stehen, wobei der Alkohol auf die Saccharase einwirkte (Inkubationszeit). Nach Verlauf der Inkubationszeit wurde die Mischung der gewöhnlichen Inversionslösung zugesetzt und die Inversionskonstante wurde wie sonst gemessen; wegen der Gegenwart von Alkohol bei der Inversion wurde eine Korrektur eingeführt.

Die folgende Versuchsreihe wurde bei 19° ausgeführt:

% Alkohol	0	20	40	50	60	80	90
k rel.	100	85	60	44	39	40	31
% Alkohol bei der Inversion	0	1,7	3,3	4,2	5,0	6,7	15
rel. k korr.	100	99	77	59	55	62	69

Die nachstehenden Figuren 38 verdeutlichen die Abhängigkeit der Inaktivierung von der Alkoholkonzentration. Wie aus der Fig. 38a ersichtlich, ist in unserer Versuchsreihe das Maximum der Zerstörung bei weitem nicht so ausgeprägt, wie

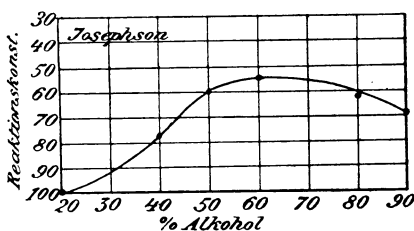


Fig. 38a.

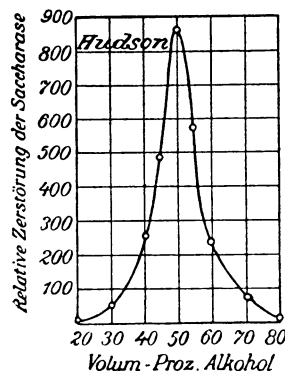


Fig. 38b.

bei Hudson und Paine³⁾ (Fig. 38b). Wir finden die Inaktivierung für Alkoholkonzentrationen zwischen 50 und 80% beinahe gleich gross.

¹⁾ Vgl. Kuhn, in Oppenheimer: Die Fermente und ihre Wirkungen. 5. Aufl. 1924.

²⁾ Euler, Josephson und Myrbäck, H. 130, 87; 1923.

³⁾ Hudson und Paine, Am. Chem. Soc. 32, 1350: 1910.

Eine zweite, bei 0° ausgeführte Versuchsreihe zeigte, dass auch bei dieser Temperatur die Inaktivierung in höheren Alkoholkonzentrationen erheblich ist.

Bei allen diesen Versuchen war die Enzymlösung so verdünnt, dass eine Ausfällung der Saccharase nicht beobachtet werden konnte. In diesem Fall wirken somit auch höhere Alkoholkonzentrationen (20–90%) auf die Aktivität stark erniedrigend.

Auch hier übt Rohrzucker eine erhebliche Schutzwirkung aus.

Sehen wir auch hier von der Destruktionswirkung ab und halten uns an die reversible Hemmung der enzymatischen Reaktion, so kommen besonders noch folgende Angaben in Betracht.

Willstätters¹⁾ Chlorophyllase ist in 80- und sogar noch in 90%igem Alkohol-Wasser-Gemisch sehr wirksam und dürfte in dieser Hinsicht zu den am wenigsten empfindlichen Enzymen gehören.

Durch grosse Aktivität in Alkohol zeichnet sich nach Angaben von Bourquelot²⁾ die β -Glucosidase aus, welche selbst in 90%iger Lösung auf Salicin und Gentiopikrin noch wirksam sein soll. Auch synthetisch ist dieses Enzym noch in einer Lösung tätig, welche Glucose in 90%igem Äthyl- oder Methylalkohol enthält. Die synthetische Wirkung der α -Glucosidase ist nach dem gleichen Forscher³⁾ gegen Alkohol sehr viel empfindlicher.

Auch die Thermostabilität von Emulsin (β -Glucosidase) ist nach Bourquelot und Bridel in absolutem Alkohol auffallend gross; das Enzym wird durch 2 Minuten langes Erhitzen auf den Siedepunkt des Alkohols in seiner Wirksamkeit nicht wesentlich beeinflusst. Das Maximum der zerstörenden Wirkung scheint auch beim Emulsin zwischen 40% und 60% Alkohol zu liegen.

Kurze Zeit wird Alkohol bei niedriger Temperatur wohl von den meisten löslichen Enzymen vertragen, wie aus den gebräuchlichen Ausfällungsmethoden hervorgeht.

Bei den mit Plasma- oder anderen Zellbestandteilen enger verbundenen Enzymen tritt bei der Entwässerung durch Alkohol neben anderen Einflüssen auch mehr oder weniger weitgehende Änderung der Struktur ein, welche eine starke, dauernde Verminderung der enzymatischen Wirksamkeit hervorruft. Diese Wirkung macht sich z. B. bei der Herstellung der „Dauerhefen“ durch Alkohol (auch durch Aceton) stark geltend; diese Inaktivierung hat früher, als man den Umstand, dass solche Zellen überhaupt noch Gärkraft besitzen, hervorhob, zu wenig Beachtung gefunden.

Trockene Enzympräparate und trockene „Dauerzellen“ werden von

¹⁾ Willstätter und Stoll, Lieb. Ann. 378, 18; 1910 und 380, 148; 1911.

²⁾ Bourquelot, JI de Pharm. et de Chim. (7) 4, 385; 1911 und 5, 388, 534; 1912. — C. r. 154, 944; 1912. — Siehe auch Bourquelot und Bridel, C. r. 156, 1104; 1913. — Siehe auch JI de Pharm. et de Chim. (7) 7, 27 u. 65; 1913.

³⁾ Bourquelot, C. r. 157, 1024; 1914.

absolutem Alkohol in der Regel wenig geschädigt; doch kommen Ausnahmen vor; so finden z. B. Willstätter und Waldschmidt-Leitz¹⁾ die Lipase der getrockneten Pankreasdrüsen noch alkoholempfindlich.

Ausgewaschene Trockenhefe, welche durch Co-Zymase wieder für Zymohexosen gärungsaktiv gemacht wird, wird durch Alkoholbehandlung in folgender Weise geschwächt.

Die Fähigkeit zur Brenztraubensäurespaltung (Carboxylasewirkung) wird dabei weniger beeinträchtigt.

Amylase spaltet nach Sherman, Kendall und Clark²⁾ Stärke noch in Lösungen von 50 Volumprozent Alkohol. Leider geben die genannten Autoren keine Messungen an über die Aktivität (Sf) ihrer Amylase in diesem Lösungsmittel.

Tyrosinase soll noch in 50%-igem Äthylalkohol imstande sein, ihre Wirkung auszuüben.

Nach einer Angabe von Giezelt³⁾ soll das lipolytische Enzym des Pankreassaftes in seiner Wirkung durch gewisse Alkoholzusätze verstärkt werden. Wenn die Beobachtung zutrifft, handelt es sich vermutlich um eine Veränderung des Lösungszustandes wie beim Glycerin.

Dass Pankreaslipase von Alkohol geschädigt wird, geht aus der Untersuchung von Willstätter und Waldschmidt-Leitz⁴⁾ hervor.

Bei ungereinigten Enzymlösungen kommt schon von etwa 20% Alkoholzusatz an die Fällung der Verunreinigungen, besonders der Proteine in Betracht, welche mehr oder weniger Enzym mitführen, so dass die Lösung enzymatisch schwächer zurückbleibt.

Bei anderen Angaben ist es in der Regel schwer zu entscheiden, in welchem Grad die Destruktion des Enzyms beteiligt ist.

Die Aktivität von Urease in hohen Alkoholkonzentrationen ist neuerdings von N. N. Iwanoff⁵⁾ untersucht worden.

Proteolytische Enzyme scheinen gegen Alkohol verhältnismässig empfindlich zu sein, bei 10% dürfte die deutliche Einwirkung beginnen. Hinsichtlich der Wirkung geringerer Konzentrationen liegen divergierende Angaben vor, welche bei den einzelnen Enzymen in dem speziellen Teil erwähnt werden.

Pepsin. Eine starke Beeinflussung dieses Enzyms schon durch 2% Alkohol (?) findet Laborde⁶⁾.

Proteolytische Enzyme der Hefen sollen nach Gromow und Grigoriew⁷⁾ schon durch wenige Prozent Alkohol gehemmt werden. Nach Effront⁸⁾ scheinen jedoch die proteolytischen Enzyme der Hefe gegen grössere Alkoholmengen weniger empfindlich zu sein als die Zymasen, was in dem quantitativen Verlauf der Autolyse bei Alkoholzusatz hervortritt.

¹⁾ Willstätter und Waldschmidt-Leitz, H. 125, 132 und zwar 148; 1923.

²⁾ Sherman, Kendall und Clark, Am. Chem. Soc. 32, 1073; 1910. — Kendall und Sherman, ebenda 32, 1087, 1910.

³⁾ Giezelt, Pflüg. Arch. 111, 620; 1906.

⁴⁾ Willstätter und Waldschmidt-Leitz, H. 125, 132 und zwar 148; 1923.

⁵⁾ N. N. Iwanoff, Biochem. Zs 150, 108; 1924.

⁶⁾ Laborde, Soc. Biol. 51, 821; 1899.

⁷⁾ Gromow und Grigoriew, H. 42, 299; 1904.

⁸⁾ Effront, Bull. Soc. Chim. 33, 847; 1905.

Über die Schädigung des Trypsins durch Alkohol macht Giezelt¹⁾ Angaben. Erepsin, gegen Alkoholzusatz unter 2% unempfindlich, wird durch höhere Konzentrationen gehemmt²⁾.

Chymosin ist nach Reichel und Spiro³⁾ gegen Alkohol ziemlich empfindlich.

Glycerin. Im Glycerin ist die Geschwindigkeit enzymatischer Reaktionen nicht so gross, wie man vielleicht nach der hohen Dielektrizitätskonstante, $DE = 56$, erwarten könnte. (Eine eigentliche Aktivitätsmessung eines Enzyms im Glycerin liegt meines Wissens noch nicht vor.)

Die Löslichkeit der Enzyme in Glycerin wird sehr verschieden gefunden. So kann aus Pankreas sowohl Lipase, wie Amylase und Trypsin in guter Ausbeute extrahiert werden (Willstätter und Mitarbeiter H. 125, 153), während Ricinus-Lipase (H. 134, 220) nicht in Lösung geht.

Der Vorzug dieses Lösungsmittels liegt in der grossen Haltbarkeit der Lösungen. Die proteolytischen Enzyme des Pankreas und des Darms behalten, in Glycerin aufbewahrt, nach älteren Beobachtungen, welche Verf. nach eigener Erfahrung bestätigen kann, jahrelang ihre Wirksamkeit fast unverändert⁴⁾.

Quantitative Angaben über die reversible Aktivierung durch grosse Glycerinzusätze zu wässrigen Lösungen liegen bezüglich der Pankreas-Lipase⁵⁾ vor. „Einerseits ist Lipase ausgesprochen glycerinophil, andererseits ist Glycerin imstande, grosse Mengen Seife zu lösen, und diese wieder vermag Fett zu adsorbieren.“

Hemmend wirkt Glycerin auf Ricinus-Lipase. Wir führen die betreffende Stelle der Arbeit von Willstätter und Waldschmidt-Leitz wörtlich an:

„Neben der unmittelbaren Wirkung des Glycerins auf das entfettete Enzymmaterial, die in allen Fällen stark schädigend gefunden wird, ist der Einfluss dieses Mittels auf das Ausmass der Fettspaltung selbst zu beachten; hier findet man beträchtliche Unterschiede bei der Bestimmung von Spermato- und Blastolipase. Während für die Aktivität des Keimungsenzymes im neutralen Mittel selbst eine Konzentration von 50% Glycerin fast ohne Einfluss bleibt, setzt diese den beim sauren Optimum ermittelten Spaltungswert auch bei den z. B. durch Pepsineinwirkung schon teilweise veränderten Präparaten stark herab. Wir stellen unsere an verschiedenen Präparaten ausgeführten Versuche in der nachstehenden Tabelle zusammen, deren Angaben die prozentische Hydrolyse von 2,50 g Olivenöl in 20 Minuten bei 20° durch die 1,0 g Rohsamen äquivalente Menge der Präparate ausdrücken; die Menge des im Bestimmungsansatz vorhandenen Wassers bzw. wässrigen Glycerins betrug 4,0 ccm.“

¹⁾ Giezelt, Zentralbl. f. Physiol. 19, 769, 851; 1905.

²⁾ Kobzarensko, Biochem. Zs 66, 344; 1914.

³⁾ Reichel und Spiro, Hofm. Beitr. 7, 485; 1905.

⁴⁾ Vgl. Knaffl-Lenz, Arch. f. exp. Pathol. 97, 292; 1922/23.

⁵⁾ Willstätter, Waldschmidt-Leitz, H. 134, 161 u. zw. 221; 1924.

Beeinflussung der Fettspaltung durch Glycerin.

Angewandtes Präparat	Spaltung in 0% Glycerin bei		Spaltung in 50% Glycerin bei	
	pH = 4,7	pH = 6,8	pH = 4,7	pH = 6,8
Samen entölt	16,5	—	2,6	—
Sahne, frisch	23,8	—	14,2	—
Samen nach 5 tägiger Keimung, entölt und getrocknet	—	5,5	—	5,5
Trockenpräparat aus gestandener Sahne nach 48- stündiger Behandlung mit Pepsin	14,8	15,4	1,2	14,1
Trockenpräparat aus frischer Sahne nach 48 stündiger Behandlung mit Pepsin	15,7	13,1	4,8	15,1

„Es erscheint indessen unsicher, ob die beobachteten Unterschiede auf einem verschiedenen Verhalten der beiden Enzymformen selbst beruhen oder ob nicht vielmehr der Einfluss des Glycerins sich mit der Reaktion der Bestimmungslösung an sich ändert. So hat es sich bei der Untersuchung der pankreatischen Lipase ergeben, dass Glycerin und andere Stoffe bei saurer Reaktion die Enzymwirkung unbeeinflusst lassen oder hemmen, während sie in alkalischer Lösung stark aktivierend wirken.“

Diese Aktivierung in alkalischer Lösung hängt vielleicht mit dem Umstand zusammen, dass Glycerin nicht zu vernachlässigende saure Eigenschaften besitzt (Diss.-Konst. K bei 20° = 10⁻¹⁴), so dass schon in 10%iger Lösung von Alkali ein nicht unwesentlicher Teil des Glycerins als Glycerinat vorhanden ist¹⁾.

Mit ausgewaschener Trockenhefe und zugesetzter Co-Zymase hat Myrbäck²⁾ den Einfluss von Glycerin untersucht. Man sieht aus nebenstehender Figur 39, dass in 50%iger Glycerinlösung noch die halbe Gärungsgeschwindigkeit erreicht wird.

Reichel und Spiro³⁾ geben an, dass Lab nicht unerheblich durch Glycerin gehemmt wird. Auch in Saccharaselösung tritt (bei Aufrechterhaltung optimaler Acidität) durch Glycerinzusatz nach eigenen Erfahrungen Hemmung ein.

Glykol hat sich bis jetzt für enzymatische Arbeiten als Lösungs- und Extraktionsmittel wenig vorteilhaft erwiesen. Diesbezügliche Erfahrungen an

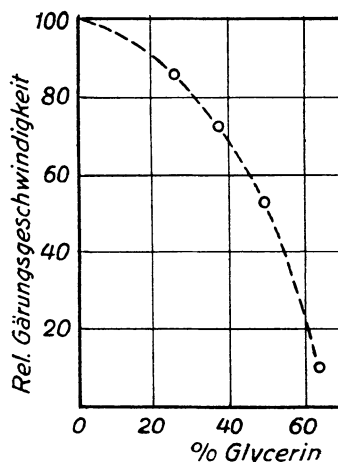


Fig. 39.

¹⁾ Siehe hierzu auch Willstätter, Waldschmidt-Leitz und Memmen, H. 125, 93; 1922.

²⁾ Euler und Myrbäck, H. 136, 107 und zwar 129; 1924.

³⁾ Reichel und Spiro, Hofm. Beitr. 7, 485; 1905.

Saccharase bestätigen die Angaben von Willstätter und Waldschmidt-Leitz (H. 125, 155; 1924).

„Ähnlich wie gegen Alkohol ist das Verhalten der (Pankreas-) Lipase gegen Glykol, welches in seiner Wirkung auf das Enzym ganz verschieden vom Glycerin ist. In Glycerinextrakten und in der trockenen Drüse ist die Lipase gegen Glykol sehr empfindlich.“

Aceton. An mehreren Enzymen hat sich Aceton als ein Extraktionsmittel erwiesen, welches weniger schädigt als Alkohol und dessen Anwendung daher vorzuziehen ist. So vermieden z. B. Willstätter und Waldschmidt-Leitz¹⁾ die Zerstörung der Lipase bei der Entfettung der getrockneten Pankreasdrüse durch Verwendung von Aceton.

Mit Wasser nicht (oder unvollständig) mischbare Flüssigkeiten (Toluol u. a.): Siehe S. 228.

E. Zusammenfassung.

Eine Übersicht über die vorhergehenden Abschnitte zeigt, wie ausserordentlich verschiedenartig die Aktivierungen, Hemmungen und die sonst als „Vergiftungen“ zusammengefassten Veränderungen sind, welche die Enzyme durch fremde Stoffe erfahren können.

Einfache Gesetzmässigkeiten sind erst in relativ wenigen Fällen und zwar in solchen, wo die chemische Reaktion zwischen Enzym und „Gift“ leicht verfolgbar ist, wie z. B. bei den Schwermetallen, zutage getreten.

Bei vielen Inaktivierungen, und zwar bei denen, welche gegenwärtig für die Enzymforschung am interessantesten sind, handelt es sich um chemische Reaktionen zwischen Enzym und Aktivator oder Paralysator. In diesen Fällen werden im allgemeinen die Fremdstoffe proportional ihrer vom Enzym chemisch gebundenen Menge, also stöchiometrisch aktivierend oder hemmend wirken²⁾.

Oft kann der Aktivator ein Bindeglied sein zwischen Enzym und Substrat, sei es, dass sich nach stöchiometrischer Gesetzmässigkeit eine Molekular-Enzym-Aktivator-Substrat bildet, sei es, dass der Aktivator im Überschuss vorhanden ist und als Lösungsmittel fungiert. (Vgl. S. 209 und 212.)

Die Acidität bestimmt das Gleichgewicht zwischen der aktivierenden oder hemmenden Molekularart und ihren Salzen und gewinnt dadurch einen wesentlichen Einfluss auf den Wirkungsgrad. Die Temperatur bestimmt bei reversiblen Inaktivierungen oft die Lage des Gleichgewichts Paralysator-Enzym. Bei irreversiblen Destruktionen, die oft mit zeitlich messbarer Geschwindigkeit

¹⁾ Willstätter und Waldschmidt-Leitz, H. 125, 132 und zwar 148; 1923.

²⁾ Die Annahme einer Adsorption des inaktivierenden Stoffes an das Enzym dürfte selten einen Vorzug vor derjenigen einer gewöhnlichen chemischen Bindung zwischen den beiden Komponenten besitzen (vgl. Wo. Ostwald, Koll. Zs. 6, 297; 1910).

Vgl. das S. 226 und 227 Gesagte, sowie Euler und Walles (H. 132).

verlaufen, ist diese (die Inkubationszeit) wie die anderer chemischer Reaktionen von der Temperatur abhängig. Auch viele der irreversibeln Zerstörungen von Enzymen durch Fremdstoffe dürften nach stöchiometrischen Verhältnissen erfolgen; nicht selten wirken kleine Mengen von Metallsalz oder von organischen Stoffen als Katalysatoren der oxydativen Enzym-Zerstörung.

Für das weitere Eindringen in die Chemie der Enzyme ist die Frage von Bedeutung, an welcher Stelle des Enzymmoleküls das Gift angreift. In einzelnen Fällen scheinen sich Paralysator und Substrat aus ihrer Bindung an das Enzym zu verdrängen; in anderen Fällen dürfte das Gift sich an eine andere Gruppe des Enzyms anlagern als das Substrat; es wäre dann auch mit Molekülararten Gift-Enzym-Substrat zu rechnen¹⁾.

In diesem Zusammenhang mag auch darauf hingewiesen sein, dass die gebräuchliche Vorstellung, dass der angelagerte Paralysator zu einer vollständigen Inaktivierung führt, nicht die einzig mögliche ist; die Reaktionsfähigkeit des Enzyms kann auch durch angelagerte Gruppen gradweise modifiziert werden.

Im übrigen finden wir verschiedenartige Strukturveränderungen als Ursachen von reversibeln Inaktivierungen und irreversibeln Destruktionen.

¹⁾ Ich verweise auf die Diskussion über den Mechanismus der Inaktivierung in der Mitteilung IV von Euler und Svanberg (Fermentf. 4, 142; 1920).

6. Kapitel.

Einfluss der Temperatur und Strahlung auf enzymatische Reaktionen.

A. Einleitung: Temperaturkoeffizienten nichtenzymatischer Reaktionen.

Die Temperatur beeinflusst nichtenzymatische, chemische Systeme auf zweierlei Art:

Sie ist zunächst einer der Faktoren, welche die Lage des Gleichgewichtes zwischen den Komponenten einer umkehrbaren Reaktion bestimmen. Wie stark sich das Gleichgewicht in jedem Fall mit wechselndem Wärmegrad ändert, steht bekanntlich mit der Wärmetönung der betreffenden Reaktion in engstem Zusammenhang. Wir kommen hierauf in Kapitel 8 zurück.

Gleichgewichtsverschiebungen noch unbekannter Art zwischen kolloiden Stoffen und Molekülen des Lösungsmittels treten bei variierender Temperatur in Solen und Gelen auf; sie können offenbar erhebliche Beträge erreichen, und daher wesentlich auf die Eigenschaften der kolloidalen Systeme einwirken.

Sehr stark ändert sich mit der Temperatur die Geschwindigkeit, womit ein System seinem Gleichgewichts- bzw. Endzustande zustrebt. In den meisten Fällen wird durch einen Temperaturzuwachs von 10° die Geschwindigkeit verdoppelt oder verdreifacht, eine Erscheinung, auf welche van't Hoff zuerst die Aufmerksamkeit gelenkt hat. Indessen kommen auch bei nichtenzymatischen Reaktionen noch höhere Temperaturkoeffizienten vor. Aus dem reichen experimentellen Material erwähnen wir ein paar biologisch interessante Reaktionen:

Autor	Reaktion	Temperaturintervall	$\frac{k_t + 10}{k_t}$	Q
Price, Svenska Vet. Akad. Förh. 1899	Äthylacetat + H ₂ O	28—50 ^o	2,4	17 390
Euler, Chem. Ber. 38	Formaldehyd + NaOH	50—85 ^o	3,6	24 900
Spohr, Zeitschr. physik. Chem. 2	Inversion d. Rohrzuckers	25—55 ^o	3,6	25 600

Besonders klein ist der Temperaturkoeffizient photochemischer Reaktionen (vgl. S. 287).

Die Quotienten $\frac{k_{t+10}}{k_t}$ (Spalte 4) gelten nur für ein gewisses Temperaturintervall. Der Zuwachs der Reaktionsgeschwindigkeit pro Grad nimmt ab, wenn die Temperatur steigt. In einem grösseren Bereich der Wärmeskala ist der Wert Q (Spalte 5) einer von Arrhenius aufgestellten Formel¹⁾ konstant:

$$k_2 = k_1 e^{\frac{Q(T_2 - T_1)}{R \cdot T_1 T_2}} \dots \dots \dots (29)$$

In dieser Formel bedeuten k_1 und k_2 die Reaktionskonstanten bei den absoluten Temperaturen T_1 und T_2 . Ferner ist R die Gaskonstante und e die Basis der natürlichen Logarithmen.

Als allgemeinsten Ausdruck für den Temperatureinfluss schlug van't Hoff²⁾ die Formel vor:

$$\frac{d \ln k}{dT} = \frac{A}{T^2} + \frac{B}{T} + C,$$

welche bis jetzt an Enzymreaktionen noch nicht geprüft ist.

Die Aufgabe, den Temperaturkoeffizienten einer chemischen Reaktion quantitativ aus dem Einfluss der Temperatur auf die Komponenten zu berechnen, hat Verf. mit Rudberg und Myrbäck³⁾ an folgendem Beispiel zu lösen versucht:

Für die durch H- und HO-Ionen katalysierte Umwandlung der α - in β -Glucose hat Verf. schon einer früheren Behandlung die Annahme zugrunde gelegt, dass Glucose in saurer Lösung als Base, in alkalischer Lösung als Säure fungiert, und zwar mit den Dissoziationskonstanten (der reaktionsvermittelnden Ionen I. Ordnung)

$$K_a = 6,6 \cdot 10^{-13} \quad \text{und} \quad K_b = 10^{-19}.$$

Es sind also in saurer Lösung die Kationen, und auf der alkalischen Seite des Stabilitätsmaximums die Anionen der Glucose, welche die Umwandlung vermitteln.

Nach Messungen von Myrbäck ist im Temperaturgebiet 0° bis 25° der Quotient K_w/K_a , welcher bekanntlich der Hydrolysekonstante des Salzes proportional ist, innerhalb der Versuchsfehlergrenzen konstant, so dass sich in einem System, welches eine gegebene Menge Glucose und NaOH enthält, der Grad der Salzbildung bzw. der Hydrolyse nicht wesentlich ändert. Die Geschwindigkeit der Reaktion ist demgemäss bei jeder Temperatur gegeben durch das Produkt aus der (temperaturunabhängigen) Konzentration der Glucose-Anionen und dem Ionenprodukt des Wassers.

Der Temperaturkoeffizient der Mutarotation würde also durch den Temperaturkoeffizienten von K_w bestimmt sein.

Bei einer erneuten Messung dieses Temperaturkoeffizienten hat sich gezeigt, dass er auf der sauren Seite des Reaktionsmaximums grösser ist als auf der alkalischen, dass also die Katalyse durch H-Ionen in diesem Fall einen grösseren Temperaturkoeffizienten besitzt als die durch HO-Ionen. Folgende Zahlen wurden einerseits experimentell ermittelt und andererseits nach obigem Prinzip berechnet:

¹⁾ Aus der obigen Temperaturformel ergeben sich die folgenden Hilfsformeln:

$$Q = \frac{\log(k_2/k_1) \cdot T_1 \cdot T_2 \cdot R}{M(T_2 - T_1)} \quad \text{und} \quad \log k_2 = \log k_1 + \frac{QM(T_2 - T_1)}{R \cdot T_1 \cdot T_2},$$

wo $M = \log e = 0,434$.

²⁾ Siehe van't Hoff, Vorlesungen, Braunschweig 1898, S. 230.

³⁾ Euler, Myrbäck und E. Rudberg, Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi, 8, 28; 1923. — Euler und Rudberg, Zs f. Physik 16, 54 und zwar 59; 1923.

	0°	10°	15°	20°	
$10^{14} \cdot K_w$	0,12	0,31	0,50	0,71	
$10^3 \cdot \text{Reakt. konst.}$ {	Gefunden	50,1	135	215	340
	Ber. ($Q_{\text{Wasser}} = 14\,400$)	50,1	131	212	302
		50,6	134,8	212	328,6

Wie ersichtlich, ist die Übereinstimmung zwischen Versuch und Berechnung bei 0°, bei 10° und bei 15° vollständig, bei 20° lässt sie zu wünschen übrig. Ein Versuchsfehler ist aber hier nicht ausgeschlossen.

Wie sich das Ionenprodukt des Wassers mit der Temperatur ändert, haben wir bereits S. 24—25 gesehen: Zwischen 10° und 20° wird durch eine Temperaturerhöhung von etwa 7,5° das Ionenprodukt verdoppelt.

Im allgemeinen ist der Temperaturkoeffizient der elektrolytischen Dissoziation der sehr schwachen Elektrolyte von der gleichen Grössenordnung wie derjenige der Reaktionsgeschwindigkeit, worauf Verf. 1904 aufmerksam gemacht hat¹⁾.

B. Die Temperaturstabilität der Enzyme.

1. Die für Enzymreaktionen wesentlichen Temperatureinflüsse.

Wir betrachten hier vollständig verlaufende Reaktionen, deren Gleichgewicht sich nicht nachweisbar mit der Temperatur verschieben kann.

Die Geschwindigkeit solcher Enzymreaktionen ändert sich mit der Temperatur:

einerseits, wie diejenige aller (organischen) Reaktionen, wegen der reversibeln Steigerung der Reaktionsfähigkeit des chemischen Systems mit steigendem Wärmegrad, wobei sich verschiedene Einflüsse superponieren (vgl. S. 279);

andererseits wegen der irreversiblen Veränderung des Enzyms, durch welche dasselbe inaktiviert wird.

Wir machen zunächst die vereinfachende Annahme, dass die Inaktivierung des Enzyms, z. B. der Saccharase, durch eine monomolekulare Reaktion vor sich geht²⁾, unabhängig von Substrat und Reaktionsprodukten der katalysierten Enzymreaktion, also unabhängig von Rohrzucker und Invertzucker. Wenn dann E die anfängliche Enzymkonzentration bedeutet, y die Konzentration des zur Zeit t zerstörten Enzyms, so wird man setzen können:

$$\frac{dy}{dt} = k_c(E - y), \dots \dots \dots (30 a)$$

und man erhält durch Integration

$$k_c = \frac{1}{t} \ln \frac{E}{E - y} \dots \dots \dots (30 b)$$

Wir bezeichnen die Konstante k_c als die „Inaktivierungskonstante“ des Enzyms.

Bedeutet ferner, wie gewöhnlich, a die Konzentration des ursprünglich

¹⁾ Euler, Zs physik. Chem. 47, 353; 1904.

²⁾ Wir werden S. 248 u. ff. sehen, dass diese Voraussetzung keineswegs allgemein zutrifft.

vorhandenen Substrates, welches nach einer Reaktionsgleichung 1. Ordnung gespalten wird, so ist

$$v = \frac{dx}{dt} = k(a - x)(E - y), \quad \dots \quad (31)$$

d. h. die Geschwindigkeit, mit welcher sich die Reaktion zur Zeit t vollzieht, muss proportional sein dem Produkt der noch vorhandenen Konzentration des Enzyms und des sich umwandelnden Substrates (Rohrzuckers).

Will man den Einfluss der Temperatur auf eine Enzymreaktion studieren, so müssen also die beiden Konstanten k_c und k ermittelt werden. Wir werden bald sehen, dass bei Temperaturen unterhalb etwa 45° die meisten gelösten Enzyme unter geeigneten Bedingungen ziemlich stabil sind; lässt man also z. B. die enzymatische Rohrzuckerspaltung unterhalb dieser Temperatur vor sich gehen, und zwar unter solchen Bedingungen, dass die Inversion innerhalb weniger Stunden bei optimaler Acidität verläuft, so kann man sicher sein, dass während der Reaktionszeit die Gesamtkonzentration des aktiven Enzyms, E , unverändert bleibt.

Soweit die enzymatische Inversionsgeschwindigkeit der Konzentration der wirksamen Saccharase proportional ist — was innerhalb gewisser Konzentrationsgebiete oft ziemlich angenähert zutrifft — können wir aus der Inversionsgeschwindigkeit die relative Saccharasekonzentration berechnen.

Die Formel (30b) geht dann über in

$$k_c = \frac{1}{t} \ln \frac{k_a}{k_t}, \quad \dots \quad (32)$$

wenn wir mit k_a die mit der ursprünglichen, nicht erhitzten Saccharaselösung erhaltene Inversionskonstante bezeichnen und mit k_t die Inversionskonstante, die sich nach einer Erhitzungsdauer von t Minuten ergibt.

Wegen der über 50° eintretenden, fortschreitenden Inaktivierung des Katalysators mit steigender Temperatur erhält die Temperaturkurve enzymatischer Reaktionen ein anderes Aussehen als diejenige der meisten anderen chemischen Prozesse. Es tritt nämlich ein Optimumpunkt auf; der Temperaturkoeffizient wird also bei einem gewissen Wärmegrad $= 0$, d. h. der Geschwindigkeitszuwachs der Substratspaltung wird durch den Geschwindigkeitszuwachs der Enzymzerstörung gerade kompensiert; bei weiterer Wärmezufuhr sinkt dann die Reaktionsgeschwindigkeit (vgl. S. 281).

Historisch sei erwähnt, dass Tammann¹⁾ als erster die Vorgänge, welche sich aus den beiden obengenannten Wirkungen ergeben, theoretisch und experimentell behandelt hat.

Aus Gleichung (30a) folgt:

$$E - y = E \cdot e^{-k_c t};$$

¹⁾ Tammann, Zs physik. Chem. 18, 436; 1895. — Siehe auch die eingehende Berechnung von Tammann und Svanberg, H. 111, 49; 1929. — Ferner die Notiz von Brownlee, Biochem. JI 18, 16; 1924.

setzt man hieraus den Wert von $E-y$ in (31) ein, so gelangt man zu der von Tammann aufgestellten Integralgleichung

$$\ln \frac{a-x}{a} = \frac{k}{k_c} \cdot E(1 - e^{-k_c t}).$$

Aus dieser Gleichung hat Tammann das „falsche Gleichgewicht“, also den enzymatischen Endzustand einer Reaktion berechnet und diesen mit dem am System Emulsin-Salicin experimentell bestimmten verglichen. Folgende Tabellen sind ein Auszug aus den von Tammann gegebenen.

Zu einer vorgewärmten Lösung von Salicin wurden verschiedene Emulsinmengen gesetzt, so dass 100 ccm Mischung 3,007 g Salicin und die tabellierten Mengen von Emulsin enthielten.

Emulsin in g	Gespartene Salicinmengen in %			
	72 Stunden	104 Stunden	148 Stunden	
0,250	63,4	65,1	65,4	} Temp. = 65°
0,125	48,3	50,2	50,4	
0,0312	16,4	17,0	16,8	
Emulsin in g	45 Stunden	86 Stunden	166 Stunden	} Temp. = 45°
	(101,2)	99,2	—	
0,125	97,5	97,5	(100,2)	}
0,0156	59,3	65,7	67,6	
Emulsin in g	45 Stunden	93 Stunden	334 Stunden	} Temp. = 26°
	96,5	98,0	100,2	
0,125	96,5	97,5	99,6	}
0,0156	85,8	92,1	98,0	

Wie man sieht, kommt die Reaktion um so früher zum Stillstand, je höher die Temperatur ist, also je schneller das Enzym inaktiviert wird.

Northrop¹⁾ verdankt man neue Messungen über Edestinverdauung durch Trypsin und über die Inaktivierung von Trypsin unter konstant gehaltenen physikalischen und chemischen Bedingungen (auch konstantem Salzgehalt, NaCl). Die beiden hier in Betracht kommenden Vorgänge scheinen monomolekular zu verlaufen.

2. Der zeitliche Verlauf der Inaktivierung der Enzyme.

Wir haben S. 246 die vereinfachende Annahme gemacht, dass die Inaktivierung eines Enzyms bei höherer Temperatur ein monomolekular verlaufender Vorgang ist, dass also die Geschwindigkeit durch eine Reaktionskonstante 1. Ordnung, k_c , ausgedrückt werden kann.

Tammann²⁾ hat zuerst diesbezügliche Versuche angestellt, und zwar mit Emulsin. Er findet bei 40° und 50° (während 50 bzw. 25 Stunden) sehr starke Abnahmen, während bei 60°, 65° und 70°, wo allerdings die Zeitfehler gross werden, die k_c -Werte recht konstant sind.

$t = 60^\circ$	Dauer der Erhitzung Stunden	Nach Erhitzung übrige relative Emulsinmenge	k_c
	0,25	64,6	0,76
	0,5	36,3	0,88
	0,75	23,9	0,88
	1	17,7	0,75

¹⁾ Northrop, JI Gen. Physiol. 6, 639; 1924.

²⁾ Tammann, Zs physik. Chem. 18, 426; 1895.

Berechnet man den Mittelwert von k_c unter Zugrundelegung von Minuten als Zeiteinheit, so ergibt sich $k_c = 13 \cdot 10^{-3}$.

In seiner eingehenden Untersuchung über Katalase hat Senter¹⁾ auch den Verlauf der Hitze-Inaktivierung bei 45°, 55° und 65° untersucht. Die Berechnung seiner Versuchsreihen ergibt, wie folgendes Beispiel zeigt, eine starke Abnahme von k_c .

$t = 45^\circ$	Dauer der Erhitzung Minuten	Nach Erhitzen übrige katalyt. Wirksamkeit	$k_c \cdot 10^3$
	0	0,0425	—
	60	0,0276	3,1
	180	0,0218	2,4
	300	0,0161	1,4
	480	0,0105	1,2

Senter hat den Verlauf der Inaktivierung selbst sachgemäss diskutiert (l. c. S. 294).

Für die Gültigkeit der Formel (32) bei Lab, Pepsin und Trypsin sprechen mehrere Versuchsreihen von Madsen und Walbum. Wir lassen hier die von Arrhenius²⁾ angegebenen Versuche folgen:

Schwächung von Lab in 2%iger Lösung bei 47,55°.

Minuten	Stärke, beob.	Stärke, ber.
0	20	17,9
2,5	14,3	14,3
5	10,5	11,4
7,5	8,3	9,1
10	7,1	7,1
12,5	5,9	5,9
15	5,0	4,8
17,5	4,0	3,7

Arrhenius gibt die Konstante $k_c = 0,0386$ an; mit dieser sind die in der letzten Spalte verzeichneten Werte nach der Formel (32) berechnet.

Auch für die Schwächung des Pepsins waren Madsens und Walbums³⁾ Ergebnisse analog, wie folgende Tabelle zeigt ($k_c = 0,0305$):

Schwächung einer 5%igen Pepsinlösung bei 66,8°.

Minuten	Stärke, beob.	Stärke, ber.
0	17,5	17,6
5	11,1	12,8
10	8,33	8,71
20	4,35	4,34
30	2,22	2,15
40	1,11	1,06

Die Messungen von Michaelis und Rothstein bei konstant gehaltener Acidität beziehen sich auf alkalische Lösungen (Biochem. Zs 105, 60; 1920).

¹⁾ Senter, Zs physik. Chem. 44, 257; 1903.

²⁾ Arrhenius, Immunochemie, Leipzig 1907, S. 57—59.

³⁾ Madsen und Walbum, Festschr. f. Hammarsten, Uppsala 1906.

Auch die Inaktivierung des Trypsins ist nach Arrhenius eine Reaktion 1. Ordnung; als Beleg gibt er folgende Versuchszahlen an:

Zerfall von Trypsin bei 64,03°

Minuten	Stärke, beob.	Stärke, ber.
0	12,5	12,1
5	11,8	11,6
11	11,1	11,1
15	10,5	10,8
20	10,0	10,4
30	9,1	9,6 $k_e = 0,00317$
40	8,7	9,0
50	8,3	8,3
60	7,7	7,7
80	6,7	6,7
100	5,9	5,9
120	5,6	5,0

„Die Konzentration der Trypsinlösung“ — schreibt Arrhenius — „hat hier keinen merklichen Einfluss auf die Zersetzungsgeschwindigkeit, Lösungen mit einem Gehalt von 2-, 4-, 6-, 8- und 10%igem Trypsin gaben alle befriedigende Resultate, wenn sie mit dem Wert $k_e = 0,0073$ bei 67,15° berechnet wurden. Die Stärke des Trypsins wurde durch sein Vermögen, Thymogelatine zu verdauen, gemessen.“

Unter welchen besonderen Umständen dieser theoretisch einfachste Verlauf der Inaktivierung und der ausgezeichnete Anschluss an die monomolekulare Formel bei Lab, Pepsin und Trypsin gilt, ist nicht näher angegeben. Zweifellos ist, dass die absoluten Werte von k_e je nach Anwesenheit und Konzentration der Aktivatoren und Schutzstoffe variieren¹⁾.

Für alle Enzyme gilt die Beziehung (30) bzw (32), also dieser einfachste Verlauf des Zerfalls keinesfalls. Dies geht deutlich aus den Versuchen mit dem in dieser Hinsicht am eingehendsten untersuchten Enzym, der Saccharase, hervor²⁾.

Die Prüfung geschah bei einer für das Enzym geeigneten Temperatur, und zwar in der Weise, dass die Enzymlösung, welche durch Zusatz von KH_2PO_4 auf die Acidität der maximalen Stabilität (vgl. S. 254 u. ff.) gebracht worden war, während der in folgender Tabelle angegebenen Anzahl Minuten auf der Temperatur 59° gehalten wurde. Die so erhitzte Enzymlösung wurde nach Abkühlung in der gewöhnlichen Weise mit Rohrzuckerlösung gemischt und auf ihre Aktivität durch Ermittlung der Inversionskonstanten k (2. Spalte) untersucht. In der 3. Spalte findet man die relativen Werte von k , und in der 4. Spalte ist k_e nach Formel (32) ausgerechnet.

¹⁾ Nach Shaklee (Zentralbl. f. Physiol, 23, 4; 1909) verliert Pepsin bei 37° seine Wirksamkeit nach der Formel für bimolekulare Reaktionen: $k = \frac{1}{at} \frac{x}{(a-x)}$, wo a die ursprüngliche Pepsinmenge, x die zur Zeit t umgesetzte (zerstörte) Pepsinmenge bedeutet.

²⁾ Euler und Laurin, H. 108, 64; 1919.

Erhitzungsdauer Minuten	$k \cdot 10^4$	Rel.	$k_c \cdot 10^3$
1. Versuchsreihe.			
0	37,6	100	—
30	24,0	64	6,6
60	18,0	48	5,3
120	14,4	38	3,5
2. Versuchsreihe.			
0	43,0	100	—
30	27,4	64	6,5
60	22,3	52	4,8
90	19,3	45	3,9
120	17,1	40	3,3
3. Versuchsreihe.			
0	86	100	—
30	38,2	43	12,3
60	21,7	26	9,7
120	18,7	21	5,7

Die Werte von k_c nehmen also hier durchweg mit steigender Erhitzungsdauer stark ab, mit anderen Worten, die Inaktivierung geht mit steigender Erhitzungsdauer immer langsamer vor sich.

Die 3. Versuchsreihe ist mit konzentrierterer Enzymlösung ausgeführt, als die beiden ersten; auch hier nimmt k_c stark ab; ausserdem bemerkt man, dass die absoluten Werte der Konstanten k_c ungefähr doppelt so gross sind, als in der 1. und 2. Versuchsreihe. Die Temperaturempfindlichkeit scheint also mit steigender Enzymkonzentration zuzunehmen, was in Übereinstimmung mit früheren Angaben Effronts¹⁾ steht²⁾. Eine Aciditätsänderung, welche etwa den normalen Verlauf der Inaktivierung stören könnte, trat bei der Erhitzung nicht ein³⁾.

Was die experimentelle Bestimmung der Temperaturempfindlichkeit betrifft, so wird man den Inaktivierungskoeffizienten k_c , wie er eingangs definiert wurde, als Mass beibehalten, muss aber, da der Ausdruck $\frac{1}{t} \ln \frac{k_a}{k_t}$ sich mit k_a und t ändert, die Bedingungen, unter denen k_c bestimmt werden

¹⁾ Effront, Die Diastasen, Deutsche Übers. 1900, S. 62. — Dagegen haben Madsen und Walbum bei Lab eine mit der Verdünnung des Enzyms zunehmende Empfindlichkeit gefunden. Bisher ist in der Regel bei solchen Untersuchungen nicht berücksichtigt worden, dass gleichzeitig mit dem Enzym Schutzstoffe und Hemmungskörper verdünnt werden. Bei künftigen systematischen Untersuchungen ist also der oft sehr grosse Einfluss dieser Stoffe konstant zu halten oder auszuschalten.

²⁾ Die hier gefundene Konzentrationsfunktion erinnert an eine ähnliche Beziehung, welche Chick und Martin in ihrer grundlegenden Arbeit über die Koagulation der Proteine (Jl of Physiol. 40, 404; 1910) an Lösungen von Eieralbuminkristallen festgestellt haben.

³⁾ Siehe Sørensen und Jürgensen, Biochem. Zs 31, 397; 1911.

soll, festlegen, um die Ergebnisse verschiedener Untersuchungen vergleichbar zu machen ¹⁾.

Es empfiehlt sich die Einhaltung folgender Bedingungen:

Erhitzungszeit: 50–70 Minuten; Interpolation auf 60 Minuten. Die Enzymkonzentration wird so gewählt, dass bei Zimmertemperatur die Inversionskonstante unter Normalbedingungen (8 g Rohrzucker, $p_H = 4,5$) etwa den Wert $40 \cdot 10^{-4}$ bekommt. Durch den hieraus erhaltenen Wert von k_c und die Angabe der Erhitzungstemperatur ist dann die Temperaturempfindlichkeit der Saccharase annähernd festgelegt.

Es hat sich aber gezeigt, dass verschiedene Saccharaselösungen, welche z. B. nach 60 Minuten langem Erhitzen übereinstimmende Werte für k geben ²⁾, eine ganz andere Temperaturstabilität zeigen, wenn man den gesamten Verlauf der Inaktivierung berücksichtigt.

Was die Ursache der Abweichung von der monomolekularen Formel der Temperaturinaktivierung bzw. den Abfall der Inaktivierungskonstanten k_c betrifft, so kann man vermuten, dass bei der Inaktivierung die wirksamsten Teile der Saccharase zuerst angegriffen werden ³⁾.

Man kann die Annahme machen, dass sich nicht alle Moleküle der Saccharase, welche durch den Proteinteil eine hochmolekulare Substanz ist, im gleichen Zustand der Hydratation befinden, sondern wie z. B. Eialbumin (Sørensen und Höyrup) verschiedene Mengen Wasser binden, so dass sich tatsächlich verschiedene Arten von Saccharasemolekülen in der Lösung befinden, welche miteinander im Gleichgewicht stehen ⁴⁾.

Diesen verschiedenen Hydratationsformen wird eine verschiedene Stabilität zukommen, und bei Erhitzung müssen die labilsten Moleküle zuerst der Inaktivierung unterliegen. Wenn nun die Einstellung des Hydratationsgleichgewichts langsamer verläuft als die Inaktivierung, so wird die Folge sein, dass der nicht inaktivierte Anteil der Enzymmoleküle immer stabiler wird.

Myrbäck hat deswegen den Inaktivierungsverlauf weiter untersucht ⁵⁾. In einem Versuch (l. c. S. 99) mit Saccharase $I_f = 55$ verlief die Hitzeinaktivierung vollkommen monomolekular, und k_c fiel der Grössenordnung nach mit früher erhaltenen Werten zusammen:

Erhitzungsdauer, Minuten	60	120	180	285
$k_c \cdot 10^4$	46	47	44	48

¹⁾ An einigen Enzymen, wie Urease, Lipase u. a., glaubte Groll (Kolloid-Zs 21, 138; 1917) periodische Schwankungen bei der Inaktivierung gefunden zu haben. Die betreffenden Befunde dürften sich in einfacherer Weise erklären lassen (Euler und Brandting, Biochem. Zs 96; 1919). — Über Schwankungen bei der Inaktivierung siehe ferner De Bruijne, Arch. Néerl. Physiol. 2, 358; 1918 und besonders E. Sluiter, Arch. Néerl. Physiol. 8, 34; 1923.

²⁾ Es ist also mit Rücksicht auf die Bezeichnung k_c besonders zu betonen, dass dieser Wert zunächst nur für die festgelegten Bedingungen gilt. Für die Fälle, in welchen die Konstanz von k_c nicht weiter untersucht ist, könnte man auch die Zeit der halben Zerstörung angeben.

³⁾ Der Umstand, dass bei mehreren Enzymen starke Aktivierungen durch Erhitzen auftreten, lässt die Möglichkeit offen, dass in anderen Fällen die Inaktivierung durch einen Aktivierungsvorgang teilweise aufgehoben wird.

⁴⁾ Sørensen und Höyrup, H. 103, 267; 1918. Man vergleiche die sehr interessanten Ausführungen S. 289 u. ff.

⁵⁾ Euler, Josephson und Myrbäck, H. 130, 87; 1923. Siehe auch Euler und Myrbäck, H. 120, 61; 1922.

Bei einem zweiten Versuch mit einem Enzym von nahe gleicher Aktivität ($I_f = 55,7$) fiel dagegen die k_c sehr schnell ab, wie folgender Auszug aus den erhaltenen Zahlen zeigt:

Erhitzungsdauer, Minuten	32	60	105	152	180	250	300
$k_c \cdot 10^4$	83	65	48	39	35	30	28

Zunächst fällt auf, dass k_c nicht gleichmässig sinkt, sondern im Anfang stark abfällt, um dann recht angenähert konstant zu bleiben. Diese oft wiederkehrende Tatsache bestätigt den Schluss, dass in solchen Enzymlösungen, zwei Modifikationen (oder Gruppen von Modifikationen) vorhanden sind, von welchen die eine eine bedeutend grössere Thermolabilität besitzt als die andere¹⁾. Unter der Annahme, dass ein Teil der Enzymlösung (45%) stabiler ist (extrapoliert aus dem zweiten Teil der Kurve), lässt sich mit guter Annäherung der Verlauf der Inaktivierung berechnen, wenn wir annehmen, dass jede der beiden Saccharasen in einer monomolekularen Reaktion inaktiviert wird. Die Werte für k_c werden dann:

$$\begin{aligned} \text{für 45\% des Enzyms} & \dots k_{e_1} = 16,4 \cdot 10^{-4} \\ \text{„ 55\% „} & \dots k_{e_2} = 185 \cdot 10^{-4} \end{aligned}$$

Erhitzungsdauer Minuten	Gefundene Werte der Aktivität	Berechnete Werte
0	137	137
32	74,3	73,8
60	57,0	56,2
105	43,4	42,5
122	39,1	39,2
152	35,1	34,9
180	31,8	31,4
225	25,5	26,4
250	23,9	23,1
300	20,2	20,0

Die folgende Versuchsreihe ist mit einem hochgereinigten Präparat, $I_f = 240$, angestellt. Temp. 15,5°.

Erhitzungsdauer, Minuten	33	60	90	120	180	240	305
$k_c \cdot 10^4$	75	62	61	59	51	48	42

Auch bei diesem Versuch fiel k_c , jedoch nicht so stark wie beim vorhergehenden. Auch hier lassen sich die Beobachtungen gut an eine Berechnung anschliessen, welche die Gegenwart von zwei Saccharasen von verschiedener Stabilität voraussetzt.

Über den Einfluss von Schutzwirkungen siehe S. 256 u. ff.

¹⁾ Die Tatsache, dass Lösungen von gleichem I_f sich bezüglich der Stabilität unterscheiden, ist auch in anderen Fällen beobachtet worden; siehe Myrbäck, Sv. Vet. Akad. Ark. f. Kemi. Bd. 8, Nr. 32; 1923.

Amylasen. Auch für Malzamylyase und Speichelamylyase liegen nunmehr Versuche vor, welche bei konstanter Acidität und definiertem Salzgehalt angestellt sind und also für die Beurteilung der Frage, ob und wie sich k_c mit der Inaktivierungszeit ändert, in Betracht kommen.

Ernström¹⁾ fand an Malzamylyase bei 55° und $p_H = 5,9$ in zwei Versuchen folgende Werte:

I.		II.	
Erhitzungsdauer Min.	$k_c \cdot 10^4$	Erhitzungsdauer Min.	$k_c \cdot 10^4$
30	70	35	96
60	50	60	80
90	30	120	69

Auch hier nimmt k_c mit steigender Erhitzungsdauer stark ab, die Inaktivierung geht also immer langsamer vor sich.

Ein ähnliches Fallen von k_c fand Ernström (l. c. S. 243) bei Ptyalin.

Auch bei den Versuchen von Lüers und Lorinser²⁾ zeigt sich eine deutliche Abnahme der Konstanten k_c (l. c. S. 490).

3. Abhängigkeit der Temperatur-Empfindlichkeit der Enzyme von der Acidität.

Von der hier zu besprechenden irreversiblen Einwirkung der Acidität resp. Alkalinität auf die Zerstörungsgeschwindigkeit der Enzyme ist die bereits im 2. und 4. Kapitel behandelte reversible Abhängigkeit der Wirksamkeit der Enzyme vom Säuregrad (p_H) ihrer Lösungen streng zu unterscheiden.

Eine erste systematische Untersuchung über die Abhängigkeit der Enzymzerstörung von der Konzentration zugesetzter Säure- und Alkalimengen, ausgeführt an Saccharase, verdankt man C. S. Hudson und Paine³⁾, welche in wesentlichen Punkten bereits zu einer richtigen Auffassung der Verhältnisse gelangt sind. Durch die Mängel der älteren Methodik der Aciditätsbestimmung konnten sie indessen das Optimum der Stabilität nicht genau festlegen.

Noch früher haben Madsen und Walbum (l. c.) den Einfluss der Alkalinität auf den Verlauf der Zerstörung des Labs und des Trypsins untersucht. Der Zerfall wird, wie zu erwarten, beschleunigt durch Alkaliüberschuss. Hier finden die genannten Forscher, dass der Zerfall langsamer fortschreitet, als der Formel für eine monomolekulare Reaktion entspricht.

Für die Zerstörung durch 0,02 n HCl hatte Hudson bei Saccharase Reaktionskonstanten 1. Ordnung erhalten.

Für Peroxydase liegt ein ähnliches Resultat von van Eck⁴⁾ vor.

An Saccharase haben Verf. und Laurin (l. c.) die Acidität der optimalen Stabilität exakt festgelegt. In der Figur 40 ist die relative Aktivität dieses Enzyms dargestellt, welche sich nach 1-stündiger Erhitzung auf 45°, 50° und 55° bei wechselnden p_H -Werten ergibt. Wie ersichtlich, liegt das Maximum der Stabilität bei etwa $p_H = 4,5$, also bei der Acidität der grössten Wirksamkeit (vgl. Fig. 12, S. 65).

¹⁾ Ernström, H. 119, 190; 1922.

²⁾ Lüers und Lorinser, Biochem. Zs 133, 487, 1922.

³⁾ Hudson und Paine, JI Amer. Chem. Soc. 32; 774; 1910.

⁴⁾ van Eck, Zs f. Nahr. u. Gen. 22, 393; 1911.

Dieses Stabilitätsmaximum gilt, wie erwähnt, für 45°—55°. Bei 25° haben Nelson¹⁾ und seine Mitarbeiter und gelegentlich auch Willstätter, Graser und Kuhn²⁾ „abnorme“ Aktivitätsabnahmen gefunden, Nelson auch ein Stabilitätsoptimum bei $p_H = 5,8$.

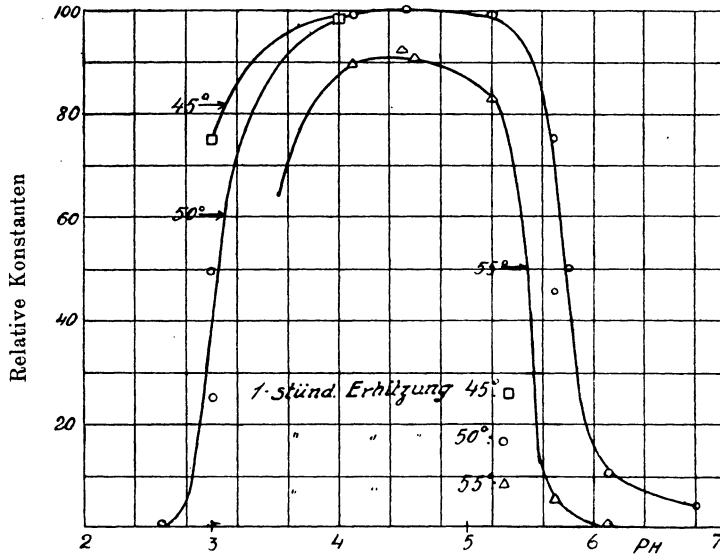


Fig. 40.

Relative Aktivität nach 1-stündiger Erhitzung auf 45°, 50° und 55°.

Bei den Malzamyhasen haben Ernström, sowie Lüers³⁾⁴⁾ und Mitarbeiter (l. c.) die Aciditätsfunktion der Hitze-Inaktivierung eingehender untersucht. Die Ergebnisse der beiden Arbeiten unterscheiden sich etwas bezüglich der Breite des Stabilitäts-Optimums, wie die Figur 41 zeigt.

Bei der Malzamylase liegt das Optimum der Stabilität bei angenähert der gleichen Acidität wie das Wirkungsoptimum; die Verhältnisse sind also ähnlich wie bei der Saccharase.

Das Ptyalin fand Ernström (l. c. S. 228) am stabilsten bei $p_H = 6,0 - 6,1$, in etwas saurerer Lösung als der maximalen Wirkung (6,4—6,5) entspricht.

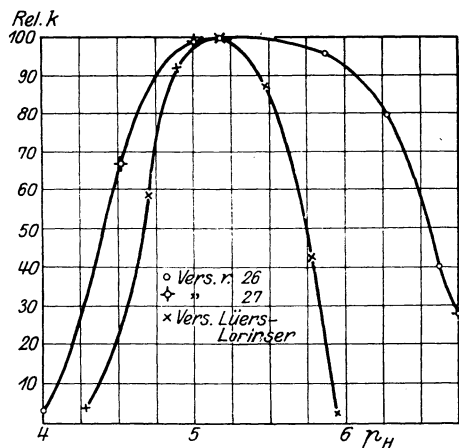


Fig. 41.

¹⁾ Nelson und Hitchcock, Amer. Chem. Soc. 43, 2632, 1921. — Nelson und Hollander, Biol. Chem. 58, 291; 1923.

²⁾ Willstätter, Graser und Kuhn, H. 123, 1; 1922.

³⁾ Lüers und Wasmund, Fermentf. 5, 169; 1922.

⁴⁾ Lüers und Lorinser, Biochem. Zs 133, 487; 1922 u. 144, 212; 1924.

Einen sehr grossen Einfluss auf die Stabilität des Ptyalins hat, wie Ernström feststellte, das Kochsalz. Die relativen Aktivitäten nach 60 Minuten langem Erhitzen auf 55° bei $p_H = 6,0$ gehen aus folgenden Zahlen hervor.

Relative Aktivität	3,6	59	96	100	58,5	17
mg NaCl in 11 ccm Lösung	0	5	25	100	1000	2000

In etwa 0,1 normaler Kochsalzlösung ist die Stabilität am grössten.

Malzamylase, deren Wirksamkeit durch NaCl nicht beeinflusst wird, erfährt durch dieses Salz auch keine Steigerung der Stabilität.

4. Schutzwirkungen.

Dass Substrate auf ihre spezifischen Enzyme eine Schutzwirkung ausüben, bzw. die bei höheren Temperaturgraden eintretende Inaktivierung verzögern oder, mit anderen Worten, die Temperatur-Toleranz der Enzyme erhöhen, ist wohl gerade im Fall Rohrzucker-Saccharase zuerst konstatiert worden, und zwar in der bekannten Untersuchung von O'Sullivan und Tompson¹⁾. Analoge Effekte sind von Vernon²⁾, Bayliss und Starling³⁾ bei Trypsin, von Wohl und Glimm⁴⁾ bei Amylase und seitdem bei vielen Enzymen gefunden worden.

Über die chemischen oder physikalischen Grundlagen solcher Schutzwirkungen ist wenig bekannt, und es liegen ihnen, wie Willstätter richtig betont, wohl verschiedene Ursachen zugrunde.

a) Schutzwirkungen von Substrat und Reaktionsprodukten.

Hudson und Paine⁵⁾ haben einen diesbezüglichen starken Einfluss von Fructose auf Saccharase gemessen, und schreiben diese Wirkung einer Verbindung mit dem Enzym zu, wie dies O'Sullivan und Tompson für Rohrzucker und Saccharase angenommen hatten. Solche Verbindungen zwischen Saccharase und Rohrzucker, Fructose und verschiedenen anderen Stoffen sind dann in neuerer Zeit von Michaelis und Menten (siehe S. 141 u. ff.) eingehender studiert worden. Vergleicht man die Ergebnisse dieser Forscher über die Hemmung der Saccharasewirkung durch Substrat bzw. Reaktionsprodukte⁶⁾ mit den Tatsachen, welche über die Schutzwirkung dieser und anderer⁷⁾ Stoffe bekannt geworden sind, so findet man eine

¹⁾ O'Sullivan und Tompson, Trans. Chem. Soc. 57, 834; 1890.

²⁾ Vernon, JI of Physiol. 27, 28, 31; 1901—1904.

³⁾ Bayliss und Starling, JI of Physiol. 30, 61; 1903.

⁴⁾ Wohl und Glimm, Biochem. Zs 27, 365; 1910.

⁵⁾ Hudson und Paine, Amer. Chem. Soc. 32, 988; 1911.

⁶⁾ Siehe hierzu auch Michaelis und Pechstein, Biochem. Zs 60, 79; 1914.

⁷⁾ Man vergleiche z. B. die geringe Hemmungswirkung der Lactose (Michaelis und Menten l. c.) mit der geringen Schutzwirkung dieser Biose (Euler und Kullberg, H. 71, 134; 1911).

durchgehende Parallelität, was für die Richtigkeit der Grundannahme spricht.

Um eine Vorstellung von der Grösse einer solchen Schutzwirkung zu geben, sei noch ein Versuch an Saccharase angeführt, dessen Ergebnis durch folgende kleine Tabelle ohne weiteres klar gemacht wird:

	Nicht erhitzt k · 10 ⁴	1 Stunde auf 60° erhitzt		
		k · 10 ⁴	Rel.	k _c · 10 ³
Ohne Zucker . . .	42,4	19,3	45	5,8
Mit 4% Rohrzucker .	37,4	23,8	64	3,3

Ein Vergleich der k_c-Werte 5,8 und 3,3 der letzten Spalte zeigt, dass unter den angegebenen Bedingungen schon durch 4% Invertzucker eine Schutzwirkung von etwa 40% der gesamten Inaktivierung erreicht wird.

Dadurch wird es verständlich, dass die für die Temperatur von 52,5° geltende Kurve von Sørensen und Koefoed (siehe Fig. 11, S. 64), welche die Abhängigkeit der Saccharasewirkung von der H⁺-Konzentration darstellt, so gut mit der von Michaelis und Davidsohn bei 22,3° gefundenen Kurve (Fig. 12) übereinstimmt. Nur auf der sauren Seite des Optimums liegen die Werte von Sørensen bedeutend unter denen von Michaelis.

Die Schutzwirkung des Rohrzuckers auf Saccharase wurde von Euler und Laurin (H. 108, 95) auf der alkalischen Seite des p_H-Optimums grösser gefunden, als auf der sauren. Dies steht im Einklang mit einer von Hudson und Paine (Am. Chem. Soc. 32, 988) ausgeführten Versuchsreihe bezüglich der Schutzwirkung von Fructose auf Saccharase.

Eine weitere Ausdehnung der Versuche über Stabilisierung durch solche Substanzen, welche eine spezifische Affinität zu den betreffenden Enzymen besitzen, verspricht interessante Ergebnisse.

b) Schutzwirkung durch Salze.

Bereits S. 256 ist eine Tabelle von Ernström angegeben worden, welche zeigt, dass Speichelamylase, welche bekanntlich nur in Gegenwart von Neutralsalzen, besonders Chloriden, wirksam ist, durch dieses Salz auch eine sehr bedeutende Stabilisierung erfährt¹⁾.

Bei Saccharase fand Willstätter in Lösung (nicht aber beim Abdampfen) starke Schutzwirkung.

Ein Präparat vom Zeitwert 7,5 (If = 7,7) verlor bei dreitägigem Stehen 22% seiner Wirkung. Darauf versetzte man diese 0,15%ige Enzymlösung, deren Zeitwert jetzt 9,6 (If = 6,2) war, mit verschiedenen Schutzstoffen, nämlich mit 50% ihres Trockengewichts. Zur vergleichenden Bestimmung der trockenen Präparate wurden Proben bei Zimmertemperatur im Luftstrom abgedampft, andere Proben nach 14- und 20tägigem Stehen der Lösung bestimmt. Calciumchlorid schützte beim Eindampfen nicht. Hefengummi mit Chlorcalcium wirkt ähnlich günstig wie Gummi allein.

¹⁾ Nach Vernon liegt das Optimum der Pankreasdiastase in einer Stärkelösung, welche 0,2% Kochsalz enthält bei 50°, während in reiner wässriger Stärkelösung die Optimumtemperatur bei 35° gefunden wurde. Er fand schon 0,5% Phosphat deutlich stabilisierend. (Jl of Physiol. 27 u. 31, 349; 1904.)

Zusatz	Aktivitätsverlust nach		
	14 tägigem Stehen	20 tägigem Stehen	dem Abdampfen
Ohne Zusatz	35	35	—
Chlorcalcium	1,5	14	91
Glykokoll	5	15	0,0
Leucylglycin	2,5	9	0,0
Hefegummi	6	14	5
Glycerin	7	16	6

c) Schutzwirkungen durch übrige Stoffe.

Von organischen Schutzstoffen allgemeiner Wirksamkeit sind zunächst aliphatische Aminosäuren, Peptide und Peptone¹⁾ zu erwähnen. Ihre Schutzwirkung an Saccharase wird in obiger Tabelle von Willstätter durch zwei Beispiele gezeigt. Diese Wirkung beruht möglicherweise auf der Bindung von Spuren von Schwermetallsalz (Cu), wie dies Sherman bei Amylasen annimmt²⁾. An diesen ist die Schutzwirkung durch Sherman und Mitarbeiter²⁾ mehrmals untersucht worden³⁾.

Auch in manchen anderen Fällen dürften durch die schützenden Aminosäuren Gifte gebunden werden.

Bei den Eiweisskörpern kommt zu dieser Wirkung noch vielleicht eine andere, welche mit ihrem kolloiden Zustand zusammenhängt. Die Proteine wirken dann als „Schutzkolloide“. Die Art ihrer Wirkung ist noch wenig erforscht; man spricht gelegentlich von „Ladungsausgleich“.

Bei dem vermutlich ebenfalls als Kolloid wirkenden Hefegummi hat Willstätter⁴⁾ die Zsigmondysche Goldzahl (vgl. S. 125) festgestellt. Es bleibt weiter zu untersuchen, ob die Schutzwirkung von derartigen Stoffen auf kolloides Gold mit der Schutzwirkung auf Enzyme in quantitativer Beziehung steht.

Auch die Schutzwirkung von Proteinen ist auf der sauren und der alkalischen Seite des Aciditätsoptimums der Aktivität verschieden; einen Beleg hierfür geben Versuche von Lüers und Lorinser (Biochem. Zs 144, 214) mit Malzamyase und Gelatine.

Zweifellos üben viele Kolloide⁵⁾ stabilisierende Wirkungen aus, und darauf beruht wohl zum grossen Teil der günstige Einfluss von ungereinigten Autolysesäften, Extrakten, unreinen Enzympräparaten usw. Der Zustand der Kolloide spielt dabei natürlich eine grosse Rolle; schützende Wirkungen von

¹⁾ Von ihrer Rolle als Puffer-Substanzen wird hier abgesehen.

²⁾ Kendall und Sherman, Am. Chem. Soc. 32, 1087 und zwar 1103; 1910. — Sherman und Caldwell, Am. Chem. Soc. 43, 2469; 1921. — Besonders Sherman und Florence Walker, Am. Chem. Soc. 45, 1960; 1923. — P. A. Kober und Sugiura, Am. Chem. JI 48.

³⁾ Siehe auch Urban Olsson, H. 117, 91 und zwar 112; 1921.

⁴⁾ Willstätter, Graser und Kuhn, H. 123, 1 und zwar 78; 1922.

⁵⁾ Vernon, JI of Physiol. 31, 346; 1904.

Kolloidsolen können durch Ausflockung in Inaktivierungen übergehen¹⁾. Die kolloidchemische Grundlage scheint dem Verf. hier noch zu unsicher zu sein, um eine Systematik der an Enzymen vorkommenden Erscheinungen zu versuchen.

d) Einfluss der Enzymkonzentration.

Den Einfluss der Verdünnung auf k_c hat Laurin²⁾ näher untersucht (vgl. auch S. 251); k_c wurde um so grösser gefunden, je höher die Enzymkonzentration war. Umgekehrt hat Ernström (l. c. S. 246) an Ptyalin eine Steigerung der Temperaturempfindlichkeit mit zunehmender Verdünnung gefunden; dies hängt zweifellos mit dem abnehmenden Kochsalzgehalt zusammen. Überhaupt beruhen die Konzentrationsfunktionen der Enzyme wohl eigentlich in erster Linie auf den gleichzeitigen Konzentrationsänderungen von Schutzstoffen und Destruktoren (vgl. 5. Kap.).

5. Vorläufige Angaben zum Vergleich der Stabilität der verschiedenen Enzyme.

In den vorhergehenden Abschnitten sind die wichtigsten Umstände besprochen worden, welche die Temperatur-Stabilität der Enzyme beeinflussen. Während sich die Acidität verhältnismässig leicht konstant halten lässt, sind andere Einflüsse, wie z. B. die Schutzwirkung der Kolloide, schwer in Rechnung zu setzen, da sie sich von Fall zu Fall ausserordentlich verschieden geltend machen und von unbekanntem Faktoren abhängig sind.

Es ist deshalb, wie schon in der 2. Auflage betont wurde, sehr schwer, die Enzyme hinsichtlich ihrer Temperaturempfindlichkeit zu vergleichen. Sie sind in Lösungen verschiedenen Reinheitsgrades untersucht, und es kann nicht in allen Fällen kontrolliert werden, ob dabei die Bedingungen der grössten Stabilität genau eingehalten worden sind. Um keine missverständlichen Vorstellungen aufkommen zu lassen, gebe ich hier die Zahlenwerte von k_c nicht an, sondern nur die Reihenfolge (und zwar unter Ausschaltung der unsichersten Ergebnisse) und die Temperaturen, bei welchen in 60 Minuten das Enzym auf etwa die Hälfte seines Ausgangswertes inaktiviert wird.

Enzym	Temperaturgebiet der halben Inaktivierung in 60 Minuten
Ricinuslipase	etwa 40°—45°
Dehydrogenasen	etwa 40°—45°
Blutkatalase	45°—50°
Trypsin	
Malzamyase	50°—55°
Speichelamylase	
Darmsaccharase	

¹⁾ Siehe W. Cramers und Bearns (Jl of Physiol. 34; 1906) Angabe, dass wirksames Pepsin gehemmt wird durch Zusatz von solchen Pepsinlösungen, welche bei 60° inaktiviert wurden, wogegen bei 100° inaktivierte Präparate kaum oder gar nicht hemmen.

²⁾ Euler und Laurin, H. 108, 64 und zwar 73; 1919.

Enzym	Temperaturgebiet der halben Inaktivierung in 60 Minuten
Leberkatalase	55°—60°
β -Glucosidasen	
Hefensaccharasen	
Pepsin	60°—65° (?)
Peroxydase der Milch	65°—75°
Samenureasen	
Nucleosidase	
Papain, Suiigrinase	70°—80°
Oxynitrilase	

Zahlenmässige Angaben über die Temperaturinaktivierung findet man u. a. in folgenden neueren Arbeiten:

Ricinuslipase: Willstätter und Waldschmidt-Leitz, H. 134, 161, und zwar 175; 1924.

Katalasen: Senter, Zs physik. Chemie 44, 257; 1903. — Hennichs, Biochem. Zs 145, 286, 1924.

Trypsin: J. H. Long und W. A. Johnson, Am. Chem. Soc. 35, 1196; 1917. — Northrop, JI Gen. Physiol. 4, 227—275. — 6, 429—452; 1922—24.

Amylasen: Ernström, H. 119, 190; 1922; Biochem. Zs 141, 40; 1923. — Lüers und Wasmuth, Fermentf. 5, 169; 1922. — Lüers und Lorinser, Biochem. Zs 133, 487; 1922 144, 212; 1924.

Saccharasen: Hudson und Paine, Am. Chem. Soc. 32, 774; 1910. — Euler und Laurin, H. 108, 64; 1919; 110, 55; 1920; Biochem. Zs 102, 258; 1920. — Euler, Josephson und Myrbäck, H. 130, 87; 1923. — Willstätter, Graser und Kuhn, H. 123, 1, 1922. — Euler und Myrbäck, H. 115, 68; 1921.

Ureasen: D. D. van Slyke und Cullen, Biol. Chem. 19, 141; 1914. — Onodera, Biochem. JI 9, 38; 1915. — Lövgren, Biochem. Zs 119, 215; 1921. — Nakagawa, Mitt. Univ. Tokyo, 28, 547; 1922.

Nucleosidase der Niere: Levene, Yamagawa und Weber, Biol. Chem. 60, 693, und zwar 704; 1924.

Peroxydase der Milch: Zilva, Biochem. JI 8, 656; 1914. — van Eck, Zs f. Unters. d. Nahr- u. Genussm. 22, 393; 1911. — Siehe auch Willstätter u. Mitarb., Lieb. Ann. 416—430, 1917—23.

Reduktasen, Dehydrogenasen: Barthel, Zs f. Unters. d. Nahr- u. Genussm. 34, 137; 1917. — Thunberg, Skand. Arkiv f. Physiol. 40, 71; 1920.

Wie diese Tabelle zeigt, bestehen zwischen den angeführten Enzymen, oder genauer, zwischen den untersuchten Präparaten bzw. Lösungen dieser Enzyme immerhin grosse Unterschiede¹⁾.

Auch Präparate derselben Enzymgruppe, aber verschiedener Herkunft, zeigen zuweilen Verschiedenheiten in der Temperaturstabilität, die weit ausser-

¹⁾ Über die Temperaturbeständigkeit der Amylasen liegen zahlreiche voneinander abweichende Angaben vor, unter welchen diejenigen von Biedermann (Fermentf. 4 u. Biochem. Zs) wohl die auffallendsten sind. Eine abschliessende Klarstellung der Arbeiten von Biedermann wäre sehr erwünscht. Siehe ferner S. 270, sowie Münch. Med. Woch. 68, 692; 1924.

halb der Versuchsfehler liegen. So war z. B. die Temperatur der halben Inaktivierung bei einstündiger Erhitzung¹⁾ für eine

Darmsaccharase 51°

Hefensaccharase 58,3°.

Diese Verschiedenheit kann, wie schon früher erwähnt (2. Aufl., 2. Teil, S. 168), auf dem Einfluss von Fremdstoffen beruhen, die mit dem in beiden Präparaten evtl. identischen Enzym verbunden sind.

Diese Möglichkeit hebt auch Willstätter²⁾ hervor. Ob also etwa Hefen, die an verschiedene Temperaturen angepasst³⁾ sind, die Temperaturstabilität ihrer Enzyme nur durch Regulierung der Schutzstoffe ändern, oder ob Veränderungen in wesentlichen Teilen des Enzymmoleküls eintreten, bleibt dahingestellt.

Interessante Einflüsse des Keimungszustandes von Samen auf die Stabilität der Phytolipase haben neuerdings Willstätter und Waldschmidt-Leitz⁴⁾ gefunden; die Blastolipase, die während der Keimung aus der Spermato-lipase entsteht, zeigt grössere Beständigkeit.

Trocken-Enzym-Präparate sind — insofern sie wirklich wasserfrei sind — bei Zimmertemperatur meist unbegrenzt haltbar, d. h. die Dauer ihres Verharrens im trockenen Zustand verändert ihre Eigenschaften nicht, was der im allgemeinen minimalen Reaktionsfähigkeit trockener organischer Substanzen entspricht. Über Trocken-Enzympräparate bei höherer Temperatur siehe S. 271.

6. Abhängigkeit des Inaktivierungskoeffizienten k_c von der Temperatur.

Die Temperaturkoeffizienten der Enzyminaktivierung, also die Zunahme des Koeffizienten k_c mit der Temperatur, gehören zu den grössten, welche wir bei chemischen Vorgängen überhaupt kennen. Während wir S. 244 gesehen haben, dass die Konstanten chemischer Reaktionen sich im allgemeinen verdoppeln, wenn die Temperatur um 10° steigt, so verdoppeln sich die Werte k_c im Durchschnitt für je 1 bis 2 Temperaturgrade.

Es liegt nahe, nach chemisch bekannten Analogiefällen zu suchen. Chick und Martin⁵⁾ haben zuerst in einer Reihe sehr gründlicher Untersuchungen unter Berücksichtigung der Aciditätsverhältnisse den Einfluss der Temperatur auf die Koagulation der Proteine untersucht, und sie fanden ausserordentlich hohe Temperaturkoeffizienten. Berechnet man ihre Zahlen nach der Formel (29)

¹⁾ Vgl. Euler und Myrbäck, H. 115, 68; 1921.

²⁾ Willstätter, Graser und Kuhn, H. 123, 1; 1922.

³⁾ Siehe Euler und Laurin, Biochem. Zs 97, 156; 1919. — Siehe hierzu auch Euler und Kullberg, H. 71, 134, und zwar 142; 1911.

⁴⁾ Willstätter und Waldschmidt-Leitz, H. 134, 161, und zwar 205; 1924.

⁵⁾ Chick und Martin, JI of Physiol. 40, 404; 1910. — 43, 2; 1912 und 45; 1913. — Kolloidchem. Beih. 5, 49; 1913.

S. 245, so erhält man die in der nachstehenden Tabelle (1. und 2. Zeile) angegebenen Werte für Q.

Reaktion	Autor	k_c bei 60°	Q
Koagulation des Hämoglobins	Chick und Martin	0,009	60 000 (60—70°)
Koagulation des Eialbumins	Chick und Martin (extrap. Verf.)	0,0001	135 000 (69—76,3°)
Denaturation des Leucosins	Lüers und Landauer	0,02	—
Hydrolyse des Äthylacetats	Laurin	0,0001	18 000
Umwandlung der d-Glukose	Euler und Hedelius	0,03	19 000 (12—20°)
Inaktivierung der Hefensaccharase	Euler und Laurin	0,008	100 000

Die Zahlen von Chick und Martin gelten für die natürliche Acidität der beiden Proteine.

Temperaturkoeffizienten von gleicher Grösse wie Chick und Martin fanden Lepeschkin¹⁾ an Eialbumin sowie Lüers und Landauer²⁾ am Pflanzeneiweiss Leucosin (zwischen 52,9° und 57,05° war bei $p_H = 6,09$ der Temperaturkoeffizient pro Grad 1,47).

Welcher chemische Vorgang der Proteinkoagulation zugrunde liegt, ist noch nicht ganz aufgeklärt. Chick und Martin, Hardy, neuerdings auch Lepeschkin, sowie Lüers und Landauer nehmen an, dass es sich um zwei Vorgänge handelt, nämlich eine Denaturation (welche vermutlich eine Hydrolyse ist) und eine Agglutination oder Gerinnung des denaturierten Proteins.

Chick und Martin, sowie Sörensen und Jürgensen³⁾ fanden übereinstimmend, dass die Konzentration der Wasserstoffionen einer Proteinlösung bei der Hitze koagulierend abnimmt, und zwar wegen der Konzentrationsverminderung des überwiegend sauren Proteins.

Dass der hohe Temperaturkoeffizient der Koagulation keine Besonderheit der Proteine ist, sondern vermutlich mit einer Dehydratation der hydrophilen Sole überhaupt zusammenhängt, geht aus Versuchen des Verf. mit U. v. Euler⁴⁾ über den Vorgang $Cu(OH)_2 \rightarrow CuO$ hervor.

In der obigen Tabelle sind auch zwei Reaktionen chemisch gut definierter Stoffe, Äthylacetat und α -Glucose angegeben, deren Umwandlung beim Stabilitätsmaximum untersucht ist. Ein Vergleich der k_c -Werte der 3. Spalte zeigt, dass die Labilität der Enzyme in wässriger Lösung keineswegs ohne Analogien bei chemisch bekannten Stoffen ist.

Neben inneren Anhydridbildungen im spezifischen Bestandteil der Enzymmoleküle kommen wohl auch noch Umlagerungen in Betracht⁵⁾.

¹⁾ Lepeschkin, Kolloid-Zs 31, 342; 1922 und Biochem. JI 16, 678; 1922.

²⁾ Lüers und Landauer, Zs angew. Chem. 35, 469; 1922.

³⁾ Sörensen und Jürgensen, Biochem. Zs 31, 397; 1911.

⁴⁾ H. v. Euler und U. v. Euler, Zs anorg. Chem. 124, 70; 1922. — H. v. Euler, Sv. Kem. Tidsk. 33, 37; 1921.

⁵⁾ Siehe hierzu Euler und B. af Ugglas, H. 65, 124, und zwar 133; 1910.

Im vorhergehenden haben wir stillschweigend angenommen, dass die Inaktivierung, welche gelöste Enzyme bei höheren Temperaturen erfahren, irreversible Vorgänge sind. Tatsächlich ist dies bei den diesbezüglich bestuntersuchten Enzymen nachgewiesen, bei anderen ist dies vermutlich der Fall. A priori liegt aber kein Grund vor, weshalb nicht die Hitzeinaktivierung in wässriger Lösung ganz oder zum Teil reversibel sein soll, entsprechend Verschiebungen des chemischen Gleichgewichts mit der Temperatur.

Der folgende Versuch¹⁾ gibt ein gutes Beispiel für das Ansteigen von k_c mit der Temperatur.

Saccharase aus Oberhefe. Optimale Acidität ($p_H = 4,5$).

Temperatur °	Dauer der Erhitzung Minuten	$k_c \cdot 10^3$	
		gefunden	berechnet
50,0	60	0	0,06
55,0	60	0,68	* 0,68
55,1	60	0,6	0,7
56,1	60	1,1	1,1
57,5	60	2,3	2,2
59,0	60	5,3	4,4
59,2	60	4,8	4,8
59,9	60	6,62	* 6,62
61,8	30	20	16
64,3	30	43	47

Die Werte der letzten Spalte sind aus den mit * bezeichneten Koeffizienten nach der Formel

$$k_{c2} = k_{c1} \cdot e^{\frac{Q \cdot (T_2 - T_1)}{2T_2 T_1}}$$

berechnet, wobei $Q = 101000$ gesetzt wurde.

Wir haben im vorigen Abschnitt gesehen, dass die Inaktivierung durch freie Säuren und Alkalien stark beschleunigt wird. In Gegenwart dieser

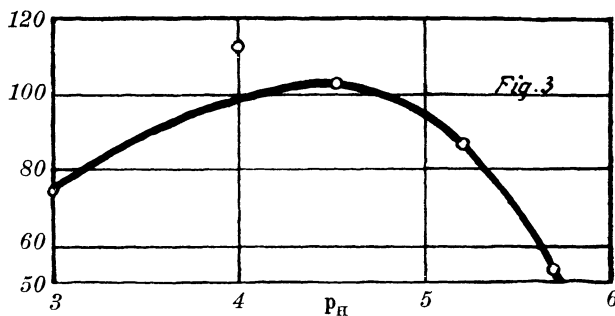


Fig. 42.

Stoffe wird schon bei verhältnismässig niederen Temperaturen schnell eine völlige Zerstörung der Enzyme erreicht. Demgemäss findet man Q , den Temperaturkoeffizienten von k_c , beim Stabilitätsoptimum am grössten und zu

¹⁾ Euler und Laurin, H. 108, 64; 1919.

Enzym	Q	Autor
Emulsin in 5%iger Lösung	45 000	Tammann
Blutkatalase	ca. 50 000	Senter
Trypsin	62 000	Madsen und Walbum
Pepsin	75 000	Madsen und Walbum
Lab	90 000	Madsen und Walbum
Peroxydase der Milch	189 000	Zilva ¹⁾ , van Eck.

Nach Nicloux²⁾ würde sich für eine Lipase der auffallend kleine Wert $Q = 26\,000$ ergeben; er bedarf der Nachprüfung.

Da die meisten Messungen an wenig gereinigten Enzymlösungen angestellt wurden, können die Zahlen natürlich nur zur ersten Orientierung dienen.

7. Anormale Änderungen der Enzymlabilität (k_c) mit der Temperatur.

In diesem Abschnitt soll nicht die grosse Zahl von Beobachtungen gesammelt werden, welche mit dem für Enzyme als charakteristisch angesehenen Verhalten nicht übereinstimmt; denn ein grosser Teil dieser Beobachtungen ist auf Fehler, Zufälligkeiten oder unzuweckmässige Versuchsbedingungen zurückzuführen. Wir können uns darauf beschränken, drei Gruppen von Besonderheiten kurz zu besprechen, welche mit den im vorhergehenden zugrunde gelegten allgemeinen Beziehungen in gewissem Widerspruch zu stehen scheinen.

I. Kryolabilität.

Die Stabilität der Enzyme muss nach Formel 29 mit fallender Temperatur zunehmen. Zerstörungen durch sehr tiefe Temperaturen dürften dadurch eintreten, dass das kolloide oder kolloidhaltige Material beim Ausfrieren Veränderungen der Zusammensetzung, der Struktur oder des Dispersitätsgrades, evtl. unter Dehydratation oder dgl. erleidet, welche nicht reversibel sind. Demgemäss kennt man solche Kälte-Inaktivierungen, wie sie Thunberg beschreibt, nicht in homogenen Lösungen.

Man verdankt T. Thunberg³⁾ die erste systematische Untersuchung über die Kryolabilität einer Gruppe von Enzymen, und zwar der Dehydrogenasen. Seinen eigenen Ergebnissen hat dieser Forscher eine Übersicht über frühere Beobachtungen bezüglich der Kältewirkungen auf Enzyme vorangestellt. Wir entnehmen derselben folgendes:

Pozerski⁴⁾ gibt an, dass Lab, Speichelamylase, Saccharase, Trypsin und Pepsin nach 45 Minuten dauernder Abkühlung auf die Temperatur der flüssigen Luft ihre Aktivität beibehalten hatten. Zu einem ähnlichen Ergebnis kam Bickel⁵⁾ mit Pepsin.

¹⁾ Zilva, Biochem. JI 8, 656; 1914. — Siehe auch van Eck, Zs f. Nahr. u. Genussm. 22, 393; 1911; sowie Bouma und van Dam, Biochem. Zs 92, 385; 1918.

²⁾ Nicloux, Soc. Biol. 56, 701, 839, 868; 1904.

³⁾ Thunberg, Skand. Arch. f. Physiol. 40, 1, und zwar 71; 1920.

⁴⁾ Pozerski, Soc. Biol. 52, 714; 1900.

⁵⁾ Bickel, Deutsche med. Wochenschr. 31, 1323; 1905.

Schaffnit¹⁾ fand pflanzliche Oxydasen, Amylasen und Proteinasen nach 8-stündiger Behandlung bei -17° unverändert wirksam.

Nach Hepburn²⁾ ist jedoch eine Reihe von Enzymen bei der Temperatur der flüssigen Luft nicht länger als etwa 1 Stunde haltbar.

Thunberg hat in grösseren Versuchsserien je 0,2 g Muskulatur mit 0,3 ccm Wasser in seinen Vakuumröhren auf 70° — 80° abgekühlt und liess den Röhreninhalt nach 5 Minuten wieder auftauen, worauf sie gleichzeitig mit den Kontrollproben untersucht wurden. Als Resultat gibt Thunberg folgende Tabelle; die Fähigkeit der Muskulatur, nach der Abkühlung die nachstehenden Substanzen zu oxydieren, ist mit + bezeichnet, während das Zeichen — angibt, dass diese enzymatische Wirkung verschwunden ist.

Bernsteinsäure	+	Linksweinsäure	—
Oxyglutarsäure	+	Mesoweinsäure	—
Zitronensäure	—	α -Oxybuttersäure	—
Glutaminsäure	—	Fumarsäure	—
β -Oxybuttersäure	—	Apfelsäure	—
Maleinsäure	—		

Im trockenen Zustande sind solche Veränderungen nicht zu erwarten und sind auch nicht beobachtet worden. Miss Withe fand z. B., dass die Enzyme in Getreidekörnern, welche 2 Tage der Temperatur der flüssigen Luft ausgesetzt waren, nicht zerstört wurden. Bekanntlich überdauern auch Sporen sehr tiefe Kältegrade.

II. Gegenseitige Beeinflussung von Enzymen.

Die zweite Gruppe betrifft die Fälle, in welchen gelöste Enzyme bei Zimmertemperatur viel schneller ihre Aktivität verlieren, als ihrer Inaktivierungskonstanten k_c bei 50 oder 60° entspricht. Die Ursache dieser Erscheinung ist, dass sich bei der niedrigeren Temperatur enzymzerstörende Einflüsse geltend machen, welche bei höheren Temperaturen verschwinden; der einfachste Fall besteht darin, dass ein thermolabileres Enzym etwa bei 18° ein thermostabileres spaltet, oxydiert oder koaguliert oder etwa einen Schutzstoff des letzteren Enzyms angreift. Allgemeinere Beziehungen kennen wir noch nicht, von Einzelheiten mögen folgende³⁾ Erwähnung finden.

Trypsin soll die Zymase der Hefe zerstören (Buchner), ebenso Papayotin⁴⁾. Nach Mellanby und Woolley⁵⁾ greift das Trypsin des Pankreassaftes die gleichzeitig darin vorkommende Lipase an. Nach Willstätter und Memmen⁶⁾ ist die Wirkungsabnahme der tierischen Lipase nicht

¹⁾ Schaffnit, Zs f. allg. Physiol. 12, 322; 1911.

²⁾ Hepburn, Malys Jahresber. 45, 422; 1915. Zitiert nach Thunberg.

³⁾ Ältere Literatur: Wroblewski, Bednarski und Wojczinski, Hofm. Beitr. 1, 289; 1901.

⁴⁾ van Laer, Zs f. Gärungsphysiol. 6, 168; 1918.

⁵⁾ Mellanby und Woolley, JI of Physiol. 48, 287; 1914.

⁶⁾ Willstätter und Memmen, H. 138, 216 und zw. 239; 1924. Über Aktivitätsänderungen bei Ricinuslipase s. Willstätter und Waldschmidt-Leitz, H. 134, 161 und zwar 216; 1924.

ausschliesslich durch die Gegenwart des Trypsins bedingt (H. 125, 132), „denn die enzymatisch homogenen Lösungen der Pankreaslipase waren noch zersetzlicher“.

Trypsin wird nach Edie¹⁾ von Pepsin inaktiviert, auch abgesehen von der Einwirkung der hohen Acidität. J. H. Long²⁾, W. A. Johnson und andere Mitarbeiter haben die Stabilität verschiedener Enzyme (Amylase, proteolytische Enzyme) und ihre gegenseitige Einwirkung untersucht. Biedermann (Biochem. Zs 127) macht Angaben über die Schädigung von Amylase durch Pepsin.

Katalase wird von begleitenden Enzymen schnell angegriffen und ist deshalb in Autolysesäften und Organextrakten wenig haltbar³⁾. Waentig und Steche fanden, dass die Zerstörung der Katalase durch Darmerepsin und Trypsin stark beschleunigt wird; ob aber Blutkatalase durch die Proteasen des Blutes angegriffen wird, bezweifelt Steppuhn wohl mit Recht; wahrscheinlicher ist, dass sowohl im Blut als in Autolysesäften die oxydierenden und reduzierenden Enzyme die hauptsächlichste zerstörende Wirkung ausüben⁴⁾.

Das Verhalten hochgereinigter Saccharase zu tierischem Trypsin und Pepsin ist von Josephson⁵⁾ eingehend untersucht worden; die Einwirkung erwies sich gering.

Allgemein sei noch folgendes bemerkt: Wo ein Einfluss eines Enzyms auf die Aktivität eines anderen nachgewiesen ist, braucht dies keinen chemischen Eingriff in die spezifisch wirkenden Gruppen zu bedeuten; anhaftende Kolloide oder sonstige Molekülreste können durch die enzymatischen Veränderungen, welche sie erfahren, Löslichkeit, Dispersitätsgrad oder sonstige Eigenschaften des ganzen Komplexes sekundär beeinflussen.

III. Stabilität bei hoher Temperatur (vgl. S. 273).

Die dritte Gruppe der hier zu erwähnenden Literaturangaben betrifft die ausnehmend hohe Stabilität genuiner Enzyme bei Temperaturen bis zu 100°.

Eine Lecithinase fand Morgenroth sehr stabil. Sonst handelt es sich hier besonders um Beobachtungen an Amylasen.

Haferamylase bewahrt nach Klempin⁶⁾ während Erhitzung auf 90° noch einen Teil ihrer Wirksamkeit. Manche Amylaselösungen scheinen sogar durch

¹⁾ Edie, Biochem. Jl 8, 193; 1914. — Ältere Literatur: Kühne. Malys Jahresber. 1876. — Langley, Jl Physiol. 3, 246; 1881.

²⁾ J. H. Long und W. A. Johnson, Am. Chem. Soc. 35, 895 u. 1188; 1913. — Long und Mitarb., ebenda 38 u. 39; 1916—1917.

³⁾ Vgl. Batelli und Stern, Soc. Biol. 58, 235; 1905. — K. Winkler, Fermentf. 1, 105; 1916. — Bach und Zubkova, Biochem. Zs 125, 283; 1921. — Steppuhn und Timofejewa, Biochem. Zs 136, 213; 1923 und 146, 108; 1924.

⁴⁾ Vgl. Keizo Nakamura, H. 139, 140; 1924.

⁵⁾ Euler und Josephson, H. 138, 11 u. 33; 1924.

⁶⁾ Klempin, Biochem. Zs 10, 204; 1908.

kürzere Erhitzungen auf 100° noch nicht vollkommen inaktiviert zu werden. Chrzaszcz¹⁾, dem man eingehende Arbeiten über Malzamyasen verdankt, gibt ebenfalls hohe Inaktivierungstemperaturen an ($80-90^{\circ}$); es müssen sich hier sehr starke Schutzwirkungen geltend machen. — Die Angaben von Biedermann²⁾ haben bis jetzt zu keiner Klärung der Verhältnisse geführt.

8. Steigerung der Wirksamkeit enzymhaltigen Materials durch Erhitzen.

Der Effekt, um den es sich hier handelt, besteht darin, dass die enzymhaltige Flüssigkeit oder die enzymhaltige Masse, nachdem sie eine gewisse Zeit für sich — also in Abwesenheit des entsprechenden Substrates — erhitzt wurde, nach Abkühlen und Zugabe des Substrates eine höhere Wirksamkeit zeigt als vorher.

Vor längerer Zeit hatten Verf. und Ohlsén³⁾ beobachtet, dass die enzymatische synthetisierende Wirkung von Phosphateslösungen durch $\frac{1}{2}$ stündiges Erhitzen auf 45° etwa verdoppelt wurde.

Eine sehr viel stärkere Hitzeaktivierung wurde an der Katalase von Hefezellen gefunden⁴⁾. Der Einfluss der Temperatur wird am besten durch die Mitteilung einer Versuchsreihe ersichtlich.

0,2 g Hefe wurden in 100 ccm 0,4%iger Natriumphosphatlösung aufgeschlemmt, worauf die Emulsion auf die für Katalase optimale Acidität gebracht wurde. In Versuch A bleibt die Hefe auf Zimmertemperatur. Die entsprechenden Versuchslösungen B, C, D und E wurden 1 Stunde auf genau gemessenen Temperaturen zwischen 55 und 64° gehalten. Unmittelbar hierauf wurde abgekühlt; 60 ccm der Emulsionen wurden mit je 50 ccm 0,02 n- H_2O_2 Lösung versetzt, worauf die Spaltungsgeschwindigkeit (Reaktionskonstanten k der Fig. 43) durch Titration gemessen wurden.

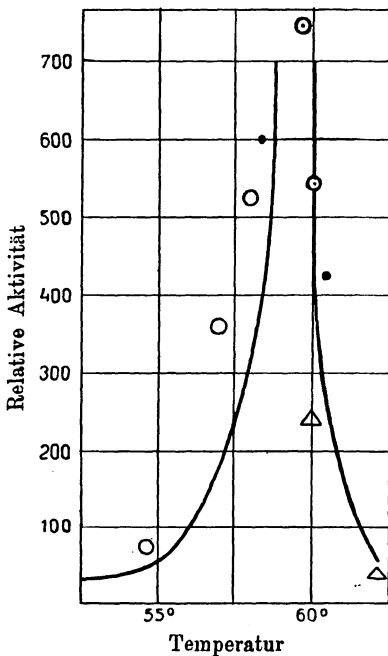


Fig. 43.

Die Fig. 43 enthält die Ergebnisse von 4 mit ○, ., ⊙ und △ bezeichneten Versuchen (siehe auch Paechtner und A. Hinrichs, Diss. Hannover 1922).

Bei etwa 59° findet man ein starkes Maximum der katalysierenden Wirksamkeit. Jenseits desselben macht sich die Enzymzerstörung mit einem ausserordentlich grossen Temperaturkoeffizienten geltend (k_c steigt in dem allerdings kleinen untersuchten Gebiet um etwa das 3,5fache per Grad).

¹⁾ Chrzaszcz, Biochem. Zs 150, 60; 1924.

²⁾ Biedermann, Fermentf. 1, 385; 1916.

³⁾ Euler und Ohlsén, Biochem. Zs 37, 313; 1911.

⁴⁾ Euler und Blix, H. 105, 83; 1919.

Nicht bei allen Hefen tritt dieser Effekt ein. Dagegen fanden Verf. und Borgenstam¹⁾ eine ähnliche Aktivierung der Katalase bei roten Blutkörperchen.

Die Ursache dieser Aktivierungen ist noch nicht genügend aufgeklärt. Es ist möglich, dass die höhere Temperatur den Zustand der Katalase selbst ändert. In Berücksichtigung anderer Tatsachen der Gärungschemie hält es Verf. aber wahrscheinlicher, dass innerhalb der aktivierenden Temperaturgrade ein Hemmungskörper zerstört wird, so dass das Enzym selbst in höherem Grade zur Wirkung kommt. In anderen Fällen mag ein Co-Enzym oder Aktivator in dieser Weise freigemacht werden.

Dieser Effekt besitzt insofern ein allgemeines Interesse, als die mit steigender Temperatur zunehmende Inaktivierung eines Hemmungskörpers auch in anderen Fällen den Temperaturkoeffizienten von k_c und auch den Temperaturkoeffizienten der enzymatischen Reaktionen selbst wesentlich beeinflussen kann.

Ein Vorgang ähnlicher Art ist vielleicht die, allerdings geringe, Verstärkung der Trypsinwirkung, über welche Cesana²⁾ berichtet.

Auch an Saccharase wurde Temperatur-Aktivierung gefunden (Lindstål).

Nach N. Iwanoff³⁾, können in kurz gekochten Hefenextrakten die proteolytischen Enzyme der Hefe durch Phosphat wieder aktiviert werden. Vermutlich handelt es sich hier um Lösungen, in welchen die betreffenden Proteasen von vornherein nicht vollständig aktiviert waren.

Ein eigentümliches Verhalten hohen Temperaturen gegenüber haben Delezenne, Mouton und Pozerski⁴⁾ beim Papain beobachtet. Bei gewöhnlichen Temperaturen bis zu 40° hinauf übt Papain keine Verdauungswirkung auf Eialbumin oder Blutserum aus. Erst bei weiterer Erhitzung der Lösung tritt Verdauung und zwar mit rapider Geschwindigkeit ein. Diese Resultate wurden von Jonescu⁵⁾ völlig bestätigt, der die verschiedenen Inaktivierungsvorgänge verglichen hat.

Nach einer grösseren Anzahl von Beobachtern soll in Amylaselösungen, und zwar verschiedener Herkunft, welche durch Erhitzen mehr oder weniger vollständig inaktiviert worden waren, die enzymatische Wirksamkeit zum Teil wieder eintreten. In dieser Richtung hat sich wohl Gramenitzki⁶⁾ zum erstenmal geäußert. Auch nach Chrzaszcz (l. c.) nimmt von einem höheren Temperaturgrad an die Geschwindigkeit der Stärkespaltung wieder zu. An (geschwächten) Lösungen einer tierischen Amylase hat Lowartz⁷⁾ Beobachtungen gemacht, welche er als Regeneration des Enzyms auffasst.

¹⁾ Euler und Borgenstam, Biochem. Zs 102, 124; 1920.

²⁾ Cesana, Archivio di Fisiologia, 11, 130; 1913.

³⁾ N. Iwanoff, Zs f. Gärungsphysiol. 1, 230; 1912.

⁴⁾ Delezenne, Mouton und Pozerski, Soc. Biol. 60, 68 u. 390; 1906.

⁵⁾ Jonescu, Biochem. Zs 2, 177; 1906.

⁶⁾ Gramenitzki, H. 69. 286; 1910.

⁷⁾ Lowartz, Fermentf. 3, 241; 1920.

Zahlreiche weitere Versuche über solche und ähnliche Erscheinungen hat Biedermann¹⁾ angestellt. Nach letzteren, in mancher Hinsicht unzureichenden Versuchen wäre es wünschenswert, dass die Inaktivierungsverhältnisse der Amylasen, welche offenbar in mancher Hinsicht Besonderheiten enthalten, einer dem modernen Standpunkt der Enzymchemie entsprechenden eingehenden Untersuchung unterworfen werden.

Die bis jetzt bekannt gewordenen Tatsachen reichen nicht hin, um eine „Regeneration“ einer Amylase annehmen zu dürfen. Sofern nicht Schutzstoffe oder Hemmungskörper an solchen Vorgängen beteiligt sind, dürfte es sich um die bei 90—100° schon mehr und mehr hervortretende nichtenzymatische Stärke- und Dextrinspaltung (bzw. solche Veränderungen, welche die Blaufärbung durch Jod beeinflussen) handeln.

Auf nichtenzymatische Reaktionen (etwa das Hervortreten eines thermostabilen Katalysators) lassen sich wohl auch die bei gewissen Oxydationen beobachteten Anomalien (Kulpsohn; Gramenitzki) zurückführen.

9. Temperatureinflüsse auf die Affinität zwischen Enzym und Substrat (Temperaturkoeffizient von K_M).

Bei der theoretischen Behandlung des Einflusses der Temperatur auf enzymatische Reaktionen ist die Änderung von K_M mit der Temperatur zu berücksichtigen.

Für Saccharase hat Laurin genaue diesbezügliche Messungen ausgeführt. Das Resultat lässt sich durch folgende Zahlen darstellen:

Temperatur	1°	15°	25°	39°
K_M	48	40	38	31
$K_m(=1/K_M)$	0,021	0,025	0,026	0,032

Wie ersichtlich, ändert sich die Affinität zwischen Rohrzucker und Saccharase mit der Temperatur wenig, die Konstante nimmt rund 1% pro Grad ab. Es handelt sich hier, wie betont sei, um einen reversiblen Temperatureinfluss.

Wie in einem vorhergehenden Abschnitt erwähnt wurde, hatte der Verlauf der Temperaturinaktivierung der Saccharase die Annahme möglich erscheinen lassen, dass bei Versuchen mit der Stockholmer Hefensaccharase zwei Enzyme von verschiedener Stabilität vorhanden waren.

Es lag nahe zu vermuten, dass die beiden verschiedenen Saccharasen, welche durch ihr k_c charakterisiert sind, auch eine verschiedene Affinität zum Substrat besitzen und somit eine verschiedene Konstante

$$K_M = \frac{[\text{Enzymsubstrat}]}{[\text{Enzym}] \times [\text{Substrat}]}$$

¹⁾ Biedermann, Fermentf. 1, 385; 1916. — Biochem. Zs 135, 288; 1923. — H. Haehn, Biochem. Zs 135, 587; 1923.

ergeben. Es war dies um so wahrscheinlicher, als eine Untersuchung verschiedener Saccharasen bereits zu verschiedenen Werten für K_M geführt hatte¹⁾.

Ein Versuch wurde mit der Enzymlösung 7 a AA ($I_f = 55,7$) angestellt, bei welcher wegen des grossen Abfalls von k_c ein starker Effekt zu erwarten war. Erhitzung 60 Minuten auf 58,8°.

Um zum Parallelversuch eine Lösung von angenähert gleicher Aktivität zu erhalten, wurde von der teilweise inaktivierten Lösung die doppelte Menge verwendet.

In den folgenden Tabellen bedeutet [S] die Konzentration des Rohrzuckers.

[S]	$k \cdot 10^4$	$k \times [S]$	$k \times [S]$ relativ	[S]	$k \cdot 10^4$	$k \times [S]$	$k \times [S]$ relativ
Nicht erhitzte Lösung.				Erhitzte Lösung.			
0,152	131,6	20	100	0,305	57,4	17,5	94
0,062	274	17	85	0,152	124	18,8	100
0,031	416	12,9	65	0,062	261	16,2	86
				0,031	408	12,6	67

Zunächst ergibt sich, daß $k \times [S]$ für die erhitzte und die nicht erhitzte Lösung innerhalb der Versuchsfehler übereinstimmt. Es ist zur Beurteilung des Enzymmoleküls wohl bemerkenswert, dass sich die Stabilität erheblich ändern kann, ohne dass die Affinität zum Substrat eine andere wird.

Die naheliegende Folgerung, dass die Stabilität durch eine andere Gruppe der Enzymmoleküle bestimmt wird als die Affinität, ist nicht zwingend.

Gewisse bemerkenswerte Beeinflussungen der Affinitätskonstante K_M von Hefen-Saccharasen durch arteigene und artfremde Kochsäfte hat Kuhn²⁾ gefunden.

10. Stabilität trockener Enzympräparate.

Trockene Enzyme sind, was mit chemischen Tatsachen übereinstimmt, sehr viel beständiger gegen höhere Temperaturen als gelöste. So hat Tamman schon 1895 gezeigt, dass Emulsin 1 Stunde auf 100° erhitzt werden kann, ohne mehr als ca. 40% seiner Wirksamkeit zu verlieren.

Getrocknetes Labpulver gab nach Arrhenius-Madsen bei 158° $k_c = 0,0414$. Auffallend ist, dass der monomolekulare Reaktionsverlauf so deutlich hervortritt; bei so stark verunreinigten Stoffen, wie bei derartigen Enzympräparaten dürfte in der Regel der Verlauf der Zersetzung von den Beimengungen wesentlich beeinflusst werden.

Die Stabilität (der Wert von k_c bei gegebener Temperatur) ist natürlich in hohem Grad von Wasserspuren, also von der Art der Trocknung abhängig³⁾.

An Saccharase von $I_f = 55$ hat Myrbäck⁴⁾ folgenden Versuch angestellt:

¹⁾ Euler, Josephson und Myrbäck, H. 130, 84 u. zw. 103; 1923.

²⁾ Kuhn, H. 125, 28 u. zw. 54; 1923.

³⁾ Siehe z. B. Camillo Artom, Arch. Farmacol. sperm. 33, zitiert nach Chem. Zbl. 1922, III 1012.

⁴⁾ Euler, Josephson und Myrbäck, H. 130, 87 und zwar 105; 1923.

1. Erhitzung an der Luft. 2,121 mg Präparat (abgewogen auf der Mikrowage) wurden 1 Stunde lang auf einem Preglschen Trockenblock auf 110° erhitzt. Das Rohr war während der ganzen Zeit mit einer Luftpumpe in Verbindung, welche einen Druck von 2,5 mm hielt. Das Vakuum war schon lange vor der Erhitzung angesetzt worden, so dass die Substanz von vornherein tatsächlich wasserfrei war. Nach der Erhitzung gab die Substanz $k = 55,1$; hieraus $If = 25,9$. Es sind somit unter den gegebenen Umständen 32% der Saccharase inaktiviert worden.

$$k_c = \frac{1}{t} \log \frac{If_0}{If_t} = 28 \cdot 10^{-4}.$$

Bei solchen Inaktivierungen von Präparaten über 100° an der Luft muss die Oxydation eine wesentliche Rolle spielen. Diese Einwirkung wird vermieden, wenn man die Erhitzung unter einer chemisch indifferenten Flüssigkeit, wie etwa Toluol vornimmt. Auch einen solchen Versuch hat Myrbäck (l. c.) an Saccharase ausgeführt. Die Resultate sind in folgender Tabelle angegeben.

Temperatur	If	% inaktiviert	$k_c \cdot 10^4$
18—19°	38,0	0	—
79°	34,9	8	6
100°	26,5	30	26
111°	13,6	64	75

Aus der Steigerung von k_c mit der Temperatur eine Temperaturkonstante Q nach Formel (29) zu berechnen, ist kaum gerechtfertigt, da die Inaktivierung sich hier vermutlich aus einer Reihe ineinander übergreifender Reaktionen zusammensetzt, welche durch zufällige Verunreinigungen in nicht reproduzierbarer Weise katalysiert werden. Solche Verunreinigungen können auch die Stabilität gut getrockneter Enzyme wesentlich herabsetzen.

Dies geht z. B. aus offenbar zuverlässigen Versuchen von Falk und Sugiura¹⁾ über eine Esterase aus Castorölbohnen hervor, welche in trockenem Zustande durch Erhitzen auf 100°—110° den grössten Teil ihrer Aktivität verlor.

Solche Differenzen zwischen dem Verhalten der verschiedenen Enzyme können auch keineswegs auffallen, wenn man bedenkt, wie verschieden die Zersetzungstemperaturen definierter und reiner organischer Substanzen sind. Mit der Inaktivierung in wässriger Lösung hat eine solche Zerstörung trockener Enzympräparate keinen inneren Zusammenhang.

Zunahme der Enzymwirkung, 20—50% betragend, fanden Willstätter und Pollinger²⁾ bei monate- und jahrelangem Aufbewahren von Peroxydase-Präparaten geringerer enzymatischer Konzentration, während höherwertige Präparate mit der Zeit an Wirksamkeit verloren.

11. Tötungstemperaturen.

Wir haben in diesem Abschnitt gesehen, dass die Temperatur, bei welcher ein Enzym bis zu einem gewissen Grad inaktiviert, „geschwächt“ wird, von zahlreichen Faktoren abhängt. Die Labilität der Enzyme wird, wie schon

¹⁾ Falk und Sugiura, Am. Chem. Soc. 37, 217; 1915.

²⁾ Willstätter und Pollinger, Lieb. Ann. 430, 269, und zwar 289; 1923.

erwähnt, am besten durch die Koeffizienten k_e (wo solche einigermaßen konstant sind) charakterisiert.

Die Frage, wann ein Enzym vollkommen zerstört, bzw. „getötet“ wird, lässt sich allgemein überhaupt nicht beantworten; zu den die Konstanten k_e beeinflussenden Faktoren kommt noch in erster Linie die Erhitzungsdauer; ausserdem müsste natürlich festgelegt werden, wie die vollständige Tötung methodisch nachzuweisen wäre. Die Frage nach einer „Tötungstemperatur“ in diesem Sinne hat aber kaum eine Bedeutung.

Um allgemein verwendbare Daten zu erreichen, empfiehlt es sich, als „Tötungstemperatur“ diejenige zu bezeichnen, bei welcher das Enzym in wässriger Lösung [ohne Substrat¹⁾, bei festgelegtem, optimalen p_H] nach 60 (bzw. 30) Minuten langer Erhitzung auf die Hälfte seiner Aktivität sinkt. (Vgl. auch Abschn. 2, S. 252.)

Die älteren Angaben über Tötungstemperaturen geben zum grössten Teil nur unsichere Anhaltspunkte zur Beurteilung der Labilität eines Enzyms.

Im allgemeinen dürften die „Tötungstemperaturen“ zwischen 60° und 75° liegen.

Die grosse Hitzebeständigkeit des Trypsins und anderer proteolytischer Enzyme, welche von verschiedenen Autoren gefunden wurde, zeigt sich besonders in Gegenwart von Schutzstoffen, welche ja überhaupt die Stabilität der Enzyme sehr wesentlich erhöhen. So gibt E. W. Schmidt²⁾ an, dass ein Präparat von Trypsin (Schuchardt) in Gegenwart von Pepton oder Gelatine bis auf 100° erhitzt werden kann, ohne seine Wirksamkeit auf Fibrin ganz zu verlieren.

Eine ganz ausserordentliche Temperaturtoleranz scheint nach v. Gröers³⁾ Angaben eine Gelatinase aus *Bacillus Prodigiosus* zu besitzen. Über einen temperaturstabilen in der Muskel und Leber vorkommenden Katalysator der Spaltung des Imidazolringes in Proteinen berichtet Clifford⁴⁾.

Gerber⁵⁾ fand eine auffallende Widerstandsfähigkeit des Papains hohen Temperaturen gegenüber.

Noch resistenter scheint Myrosin zu sein, welches nach einem Versuch von Guignard⁶⁾ bei 81° noch nicht zerstört wird, wobei freilich eine Angabe der Erhitzungszeit erwünscht wäre.

Die Labenzyme der Basidiomyceten, welche C. Gerber untersucht hat, lassen sich in zwei Gruppen teilen: Die eine (stark calciphile) Gruppe

¹⁾ Auch die Konzentration evtl. anwesender Co-Enzyme, Neutralsalze, Proteine usw. ist möglichst genau anzugeben.

²⁾ E. W. Schmidt, H. 67, 314; 1910. — Seine Angaben konnten von K. Ohta (Biochem. Zs 44, 472; 1912) allerdings nicht bestätigt werden.

³⁾ v. Gröer, Biochem. Zs 38, 252; 1912.

⁴⁾ Clifford, Biochem. J 17, 549; 1923 und 18, 669; 1924.

⁵⁾ Gerber, Soc. Biol. 66, 227; 1909.

⁶⁾ Guignard, C. r. 111, 249 und 920; 1890 und Bull. Soc. Bot. de France (3) 418; 1894.

verliert ihr Koagulationsvermögen bei 50° in 5 Minuten völlig, die andere (wenig calciphile) bei 85° noch nicht völlig in 10 Minuten.

Manche Oxydasen vertragen auffallend hohe Wärmegrade. Der als *Medicago-Laccase* bezeichnete Stoff ist überhaupt hitzebeständig, wie ja der Zusammensetzung nach zu erwarten ist (vgl. II. Teil). Andere Oxydasen werden erst bei 80°—90° zerstört [Kastle]¹⁾.

Auch Peroxydasen in den natürlichen Pflanzensäften werden durch Erwärmen nur wenig geschädigt. So zeigte ein Vorversuch mit Meerrettichpresssaft, dass zweistündiges Erhitzen auf 60° die Wirksamkeit der Peroxydase auf Guajaconsäure nur im Verhältnis 7:5 erniedrigt hatte. Q wurde in diesem Temperaturgebiet viel niedriger gefunden als bei Milchperoxydasen.

In Anbetracht der vielen Faktoren, welche auf die „Tötungstemperaturen“ einwirken, können dieselben zur Charakterisierung von Enzymen nur dann benützt werden, wenn die einwirkenden Faktoren genau bekannt sind und bei Vergleichen konstant gehalten werden können.

Handelt es sich darum, in einem Präparat zwei verschiedenartige Enzymwirkungen durch Erhitzen der betreffenden Lösung auf höhere Temperaturen zu trennen, so wird man verhältnismässig leichter einen Erfolg erzielen²⁾. So ist z. B. versucht worden, die verflüssigende und die verzuckernde Komponente pflanzlicher Amylasen durch ihre Wärmestabilität zu scheiden³⁾.

Soll aber durch Feststellung der Temperaturempfindlichkeit entschieden werden, ob Verschiedenheiten zwischen Enzymen, welche auf das gleiche Substrat wirken, vorliegen⁴⁾, so müssen die Versuche unter den grössten Vorsichtsmassregeln angestellt werden, und den Schlussfolgerungen haftet trotzdem noch eine gewisse Unsicherheit an. Diese Mahnung zur Vorsicht ist neuerdings von Willstätter noch weiter unterstrichen worden. Immerhin scheint es, als ob man auf diesem Wege zuweilen auch kleinere Unterschiede zwischen Enzympräparaten verschiedener Herkunft messen könnte. In einer Untersuchung von Laurin⁵⁾ zeigten sich zwischen den Koeffizienten k_t der Saccharasen aus gewöhnlicher Oberhefe, aus Unterhefe und einer thermophilen Hefe Unterschiede, welche einer Temperaturdifferenz von mehreren Graden entsprechen und ausserhalb der Versuchsfehlergrenze lagen. Grössere „Anpassungserscheinungen“, deren Existenz früher behauptet worden ist, konnten noch nicht bestätigt werden⁶⁾.

¹⁾ Kastle, Chem. Zbl. 77, I, 1554; 1906.

²⁾ Vgl. Caldwell und Courtauld, Proc. Roy. Soc. 79, 350; 1907.

³⁾ C. E. Ohlsson, Soc. Biol. 87, 1183; 1922.

⁴⁾ Siehe z. B. die Versuche über verschiedene Blutkatalasen von van Italie, Soc. Biol. 60, 148; 1906.

⁵⁾ Euler und Laurin, Biochem. Zs 97, 156; 1919 und 102, 258; 1920.

⁶⁾ Die recht grossen Verschiedenheiten, welche nach R. Huerre (C. r. 148, 300; 1909) die Maltase des weissen und des gelben Maises aufweist, kann sehr wohl durch irgendwelchen Fremdstoff veranlasst sein. Hiermit soll jedoch keineswegs in Abrede gestellt werden, dass beide Maissorten verschiedene Maltasen enthalten können.

C. Temperaturkoeffizienten enzymatischer Reaktionen.

1. Ältere Arbeiten.

Während die Temperaturkoeffizienten der Enzyminaktivierung, also die aus k_c berechneten Q -Werte, ausserordentlich gross sind, steigen die Geschwindigkeitskonstanten enzymatischer Reaktionen mit der Temperatur ungefähr im gleichen Grade meistens etwas weniger, wie diejenigen nicht enzymatischer Prozesse. Man wird stets versuchen, den Temperaturkoeffizienten in einem Bereich der Wärmeskala zu messen, in welchem die Zerstörung des Enzyms möglichst wenig in Betracht kommt. Bei den meisten der älteren Messungen war der Abstand vom Optimum so gering, dass die Konstanten Q durch die Enzymzerstörung beeinflusst sind und deswegen zu klein ausfielen. Auch die Beobachtungsfehler sind meist sogar in Arbeiten zuverlässiger Experimentatoren sehr gross, wie folgende Beispiele zeigen.

Auld¹⁾ Messungen an Amygdalin-Emulsin ergaben:

$$\begin{array}{ll} k_{25} : k_{15} = 2,37 & k_{45} : k_{35} = 1,37 \\ k_{30} : k_{20} = 1,81 & k_{50} : k_{40} = 1,71 \\ k_{35} : k_{25} = 2,14 & k_{55} : k_{45} = 1,04 \\ k_{40} : k_{30} = 1,68 & \end{array}$$

Von Kastle und Loevenhart²⁾ wurden Röhren, enthaltend 4 ccm Wasser, 0,1 ccm Toluol und 1 ccm eines 10⁰/oigen Leber- und Pankreasextraktes 5 Minuten lang im Bade bei bzw. 40°, 30°, 20°, 10°, 0° und —10° gelassen, um diese Temperatur anzunehmen. Dann wurden 0,26 ccm Äthylbutyrat zugesetzt und die Lösungen nach 30 Minuten titriert.

Temp.	Prozent hydrolysiert	
	durch Leberextrakt	durch Pankreasextrakt
40°	11,29 (?)	2,82
30°	5,96	3,16
20°	5,27	2,51
10°	3,89	1,88
0°	2,26	1,25
—10°	0,70	

Der mit Leberextrakt bei 40° erhaltene Wert dürfte auf einem Versuchsfehler oder auf Aktivierung beruhen. Ähnliche Resultate hat Hanriot³⁾ für seine Esterase aus Serum und Pankreas erhalten.

Schliesslich sei noch eine Versuchsserie von Chodat⁴⁾ erwähnt, welche die Einwirkung von Thyrosinase auf Tyrosin betrifft. In der zweiten Reihe sind die Zeiten angegeben, in welchen die Lösung eine gewisse Färbung angenommen hat.

Temperatur:	0°	10°	20°	30°	40°	45°	50°
Zeit (Minuten):	180	100	60	40	30	20	10

Sehr unsicher sind die quantitativen Temperaturangaben von Hanriot und Camus (C. r. 124) über Serumesterase und Monobutyryn, und von Miquel (siehe Herzog l. c.) über Urease, sowie die mit der Mettschen Methode ausgeführten Versuche.

¹⁾ Auld, JI Chem. Soc. 93, 1275; 1908.

²⁾ Kastle und Loevenhart, Amer. Chem. JI 24, 501; 1900.

³⁾ Hanriot, Compt. rend. 124, 778; 1897.

⁴⁾ Chodat, Arch. Sc. Phys. Nat. 23, 113; 1907.

Es sei deshalb nur auf die Berechnung der betreffenden Versuche durch Herzog¹⁾ verwiesen.

Unter den älteren Versuchen seien auch noch die von Gerber²⁾ angeführt, welche zeigen sollen, wie der Temperaturkoeffizient einer enzymatischen Reaktion von der Enzymmenge abhängen kann. Wo in der Tabelle keine Zahlen stehen, tritt keine Koagulation nach 360 Minuten ein.

Konzentration des Labenzym	Koagulationszeit der Milch bei verschiedenen Temperaturen						
	25°	30°	33°	36°	39°	42°	45°
	min. sek.	min. sek.	min. sek.	min. sek.	min. sek.	min. sek.	min. sek.
0,005	30 20	29 00	— —	— —	— —	— —	— —
0,010	14 45	11 30	7 00	— —	— —	— —	— —
0,015	9 40	7 25	4 40	5 35	— —	— —	— —
0,020	7 30	5 00	2 30	3 15	5 30	— —	— —
0,025	6 15	3 30	2 05	2 20	2 40	— —	— —
0,030	4 40	2 50	1 40	1 30	1 40	— —	— —
0,040	3 40	2 20	1 30	1 00	0 50	— —	— —
0,050	3 00	1 50	1 10	0 55	0 40	2 05	— —
0,075	2 20	1 20	0 50	0 40	0 30	1 00	— —
0,100	1 40	1 00	0 40	0 30	0 25	0 35	0 45

2. Neuere Messungen.

Zunächst sei eine Reihe von sicheren Messungen über den Temperaturkoeffizienten enzymatischer Reaktionen angegeben (siehe Seite 277).

Während die für nichtenzymatische Reaktionen nach Formel (29) berechneten Temperaturkonstanten Q innerhalb eines grossen Temperaturintervalls den gleichen Wert behalten, trifft dies für enzymatische Reaktionen durchaus nicht zu. Darauf deuten, wie Verf. früher betonte, schon die älteren Versuche von Müller-Thurgau, ferner neuere von van Laer³⁾, Terroine u. a.

Es handelt sich aber keineswegs um spezielle oder zufällige Inkonzanz der berechneten Q -Werte, sondern um ein durchgehendes Abfallen der „Konstanten“, und zwar mit etwa 15—100% innerhalb 10°. Wir sehen von den an instabileren Enzymen, wie Lipasen erhaltenen Resultate ab und führen nur folgende zwei Beispiele an:

Pankreasamylase, Stärke
Lüers und Wasmund⁴⁾

Temp.	Q (abger.)
20—30	12100
30—40	9700
40—50	7300

Hefenerepsin
Abderhalden⁵⁾

Temp.	Q (abger.)
25—35	14800
35—45	8600

¹⁾ Herzog, Zs allgem. Physiol. 4, 189; 1904.

²⁾ Gerber, Soc. Biol. 63, 375; 1903.

³⁾ H. van Laer, Bull. Soc. Chim. Belgique 26, 1912.

⁴⁾ Lüers und Wasmund, Fermentf. 5, 169; 1922.

⁵⁾ Abderhalden, Caemmerer und Pincussohn, H. 59, 293; 1909.

Zur Erledigung dieser Frage hat Verf. mit Laurin¹⁾ eine Untersuchung an Saccharase über die Änderung von Q mit der Temperatur angestellt, wobei sich zeigte, dass sich der Gang von Q mit der Temperatur durch folgende Interpolationsformel darstellen lässt:

$$Q = 11400 (1 - 0,009 t)$$

Mit dieser Formel stimmen auch die alten Versuche von Kjeldahl und O'Sullivan ausgezeichnet überein. Es ist nämlich

nach Kjeldahl bei 30—40° $Q = 7800$, ber. 35° 7810;
 nach O'Sullivan und Tompson bei 40—50° $Q = 6800$, ber. 45° 6840.

Jedenfalls kann nunmehr als bewiesen gelten, dass die Arrheniussche Temperaturformel auf die durch Enzyme katalysierten Reaktionen nicht anwendbar ist.

In der Tabelle S. 277 sind die Werte von Q für ein mittleres Temperaturintervall von 25—35° noch angegeben, und zwar stark abgerundet, da eine Angabe mit mehr als etwa 10% Genauigkeit bedeutungslos wäre. Da die nach Formel (29) berechneten Werte Q keine grössere Konstanz zeigen als die Quotienten $k_{t+10} : k_t$, so wird es sich — bis ein befriedigender Ausdruck für den Temperatureinfluss gefunden ist — empfehlen, künftig anstelle von Q diesen Quotienten für die untersuchten Temperaturintervalle anzugeben.

Es soll auch bei dieser Gelegenheit bemerkt werden, dass die Unabhängigkeit der Konstanten Q von der Temperatur keineswegs eine theoretische Forderung ist.

Vergleicht man für die Inversion des Rohrzuckers die Werte von Q welche sich (bei 20°) einerseits aus den Konstanten der enzymatischen Reaktion, andererseits aus der durch einen anorganischen Katalysator vermittelten Reaktion berechnen, so erhält man folgendes recht bemerkenswerte Ergebnis (Euler und af Ugglas, H. 65):

Rohrzucker-Salzsäure

$$Q = 25600$$

Rohrzucker-Saccharase

$$Q = 9400$$

Auch die enzymatische Esterspaltung hat einen viel kleineren Temperaturkoeffizienten als die durch Säuren katalysierte.

Diese Tatsache²⁾ und die starke Abnahme von Q mit der Temperatur haben zu folgender Überlegung Veranlassung gegeben:

Gehen wir von der Annahme aus, dass die Geschwindigkeit der Rohrzuckerinversion proportional der Konzentration des Molekülkomplexes Rohrzucker-Saccharase ist, so wird der Temperaturkoeffizient der Inversion [bei gegebener optimaler Acidität der Reaktion³⁾] durch folgende Grössen bestimmt:

¹⁾ Euler und Laurin, H. 110, 55; 1920.

²⁾ Temperaturkoeffizienten, welche mit dem Katalysator wechseln, fand bei nicht enzymatischen Reaktionen Slatov, Zs physik. Chem. 45, 547; 1903.

³⁾ Eine auf mehrere Enzyme ausgestreckte Untersuchung, in welchem Grad sich das p_H -Optimum mit der Temperatur ändert, fehlt bis jetzt.

I. Durch den Einfluss der Temperatur auf die Konzentration des aktiven Enzyms (bzw. auf die Aktivität des Enzyms);

II. durch den Einfluss der Temperatur auf die Reaktionsfähigkeit der Verbindung Rohrzucker-Enzym (und die Reaktionsfähigkeit des Wassers), also durch die Geschwindigkeit des Übergangs der reaktionsvermittelnden Moleküle I. Ordnung (Moleküle-Enzym-Substrat) in die reaktionsvermittelnden Moleküle II. Ordnung;

III. durch die Änderung des Gleichgewichts: Rohrzucker-Enzym mit der Temperatur.

Von diesen drei Einflüssen lässt sich der letztere gesondert quantitativ bestimmen, wenn wir uns auf den Boden der im vierten Kapitel gegebenen Theorie stellen (siehe Seite 142 u. ff.). Nach dieser ist die Inversionsgeschwindigkeit v proportional der Konzentration φ der Verbindung Rohrzucker-Enzym, und diese Konzentration ist gegeben durch die Gleichung

$$\frac{[R][\Phi - \varphi]}{[\varphi]} = K_m = \frac{1}{K_M}.$$

In derselben ist (vgl. S. 143):

$[R]$ = Konzentration des freien Substrates, bzw., da nur ein kleiner Teil durch das Enzym gebunden wird, der Gesamtkonzentration des Substrates,

$[\Phi]$ = die gesamte molare Enzymkonzentration,

$[\varphi]$ = die Konzentration des gebundenen Enzyms bzw. der Verbindung Rohrzucker-Enzym,

K_m = die Gleichgewichtskonstante (Dissociationskonstante).

Dieser Theorie zufolge ist also:

$$v = C[\varphi] = C[\Phi] \cdot \frac{[R]}{[R] + K_m} \quad \dots \quad (3 M),$$

wo C einen Proportionalitätsfaktor darstellt.

Verändern wir die Temperatur, so bleibt $[R]$ konstant. Nehmen wir ferner in erster Annäherung an, dass $[\Phi]$, die Gesamtkonzentration des (aktiven) Enzyms, konstant bleibt (dass also Einfluss I zu vernachlässigen ist), so macht sich geltend

Einfluss II im Proportionalitätsfaktor C ,
Einfluss III in der Konstanten K_m .

Wie ersichtlich, ändert sich also die Anfangsgeschwindigkeit v nicht proportional mit K_m , sondern nur mit $\frac{[R]}{[R] + K_m}$, und es ergibt sich also, dass der Einfluss III und damit der Temperaturkoeffizient von v von der Substratkonzentration $[R]$ abhängig ist.

Da der Temperaturkoeffizient des Gleichgewichts Substrat-Enzym noch in keinem Fall untersucht war, haben Verf. und Laurin die Konstanten K_m bzw. K_M für das Temperatur-Intervall 0° — 40° gemessen.

Die für 4 verschiedene Temperaturen erhaltenen Konstanten K_M des Gleichgewichts

$$[R] \cdot [\Phi - \varphi] = K_m \cdot [\varphi] = \frac{1}{K_M} [\varphi]$$

sind in folgender Tabelle zusammengefasst.

Daneben sind die Dissoziationswärmen Q nach der Gleichung (36)

$$Q = -RT^2 \frac{d \ln K}{dT} = - \frac{4,58 (\log K_2 - \log K_1) T_1 T_2}{T_2 - T_1} \text{ cal.}$$

berechnet (vgl. Kap. 8).

Unter Voraussetzung, dass Q sich mit der Temperatur nicht ändert, erhalten wir als Mittelwert $Q = 2000$ und gelangen durch Ausgleichung zu den in der letzten Spalte angegebenen Werten.

Temperatur	$K_M \cdot 10^3$	
	Gefunden (Mittel)	Berechnet ($Q = 2000$)
1°	21	20
15°	25	24
25°	26	27
39°	32	31

Wie ersichtlich, ändert sich die Affinitätskonstante K_M nur wenig mit der Temperatur.

Da sich die Anfangsgeschwindigkeit v nicht proportional mit K_m , sondern mit

$$\frac{[R]}{[R] + K_m}$$

ändert, und der Temperaturkoeffizient von K_m nur etwa 1% per Grad beträgt, so reichen die bis jetzt angestellten Versuche, die sich nur auf eine einzige Rohrzuckerkonzentration beziehen, zu einer Untersuchung über die Formel (3 M) noch nicht aus.

Hinsichtlich des S. 278 erwähnten Vergleiches zwischen den Temperaturkoeffizienten der enzymatischen Inversion und der Inversion durch Mineralsäure kann man auf Grund der eben mitgeteilten Messungen sagen, dass der Unterschied nicht auf einer abnormen Änderung des Gleichgewichtes Saccharase-Rohrzucker beruhen kann.

Optimaltemperaturen.

Wie aus dem Vorhergehenden ersichtlich wird, ist der Einfluss der Temperatur auf enzymatische Reaktionen exakt definiert nur durch die Inaktivierungskoeffizienten k_c bei gegebenen Temperaturen¹⁾ und die Anfangsgeschwindigkeiten der Reaktion selbst, bei Temperaturen, welche wenigstens

¹⁾ In den Fällen, in welchen k_c nicht konstant ist, muss die Inaktivierungsgeschwindigkeit v unter bestimmten Bedingungen festgestellt und angegeben werden.

10° tiefer liegen als die, bei welchen das Enzym in derselben Zeitdauer merkbar zerstört wird.

Die Wirkungen der beiden genannten Vorgänge müssen sich übereinander superponieren, und da Enzyminaktivierungen, wie S. 261 u. ff. gezeigt, einen sehr viel grösseren Temperaturkoeffizienten besitzen als die enzymatischen Reaktionen selbst, so muss die Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeiten mit der Temperatur bei irgend einem Punkt der Wärmeskala durch die mit der Temperatur zunehmende Zerstörung des katalysierenden Enzyms gerade kompensiert werden. Jenseits dieses Punktes, also bei noch höherer Temperatur, überwiegt die Vernichtung des Enzyms, und die Geschwindigkeit des Umsatzes muss mit steigender Temperatur abnehmen und schliesslich auf den Betrag Null sinken, wenn das Enzym ganz zerstört ist.

Aus dem Gesagten geht hervor, dass also bei enzymatischen Vorgängen ein Maximum der Umsatzgeschwindigkeit irgendwo auf der Temperaturskala eintreten muss. Ferner erhellt aus den vorigen Abschnitten, dass sich die Lage dieses Punktes berechnen lässt, wenn wir die Temperaturkoeffizienten der beiden in Betracht kommenden Vorgänge, also die Temperaturkoeffizienten der Konstanten k und k_e kennen.

Tatsächlich hat man schon lange sog. Optimaltemperaturen bei enzymatischen Vorgängen gefunden. Das Auftreten derselben ist früher oft als ein Charakteristikum für Lebensprozesse dargestellt worden; offenbar werden wir derartige Maxima immer finden, wenn die Konzentration der katalysierenden Substanz mit steigender Temperatur stärker abnimmt als die Reaktionsgeschwindigkeit selbst wächst.

Nun sind der Temperaturkoeffizient enzymatischer Reaktionen und derjenige der Enzymzerstörung, wie bereits mehrfach erwähnt wurde, von äusseren Faktoren, Acidität, Konzentration des Substrats und des Enzyms, anwesenden Schutzstoffen u. a. stark abhängig, und zwar in sehr verschiedenem Grade; daraus folgt, dass auch die Optimaltemperaturen von diesen Faktoren abhängig sein müssen, und also nur unter genau angegebenen Bedingungen reproduzierbar sind. Ausserdem ist die Lage der Optimaltemperatur in der Regel davon abhängig, welche Versuchszeiten bzw. welches Stadium der Reaktion man ins Auge fasst. Da bei der Optimaltemperatur das Enzym während der Reaktion schon teilweise zerstört wird, so liegt das Optimum offenbar tiefer, wenn man die Zeiten vergleicht, in welchen die Reaktion zur Hälfte abgelaufen ist, als wenn man nur etwa das erste Fünftel der Reaktion berücksichtigt. Die eigentliche Anfangsgeschwindigkeit wird überhaupt kein Optimum aufweisen, wenn nur die Beobachtungszeit kurz genug gemacht wird¹⁾. Den an sich interessantesten Ergebnissen von Compton²⁾, welcher mit

¹⁾ Vgl. hierzu Versuche von Bertrand, Ann. Inst. Pasteur 26, 161; 1912.

²⁾ Compton, Proc. Roy. Soc. 87, 245; 1914.

Salicin und Emulsin Unabhängigkeit der Optimaltemperatur von der Versuchszeit fand, kann eine allgemeine Gültigkeit nicht zukommen.

Tammann und Svanberg¹⁾ haben diese Verhältnisse einer eingehenden mathematischen Behandlung unterworfen.

Für manche praktische Zwecke kann es von Interesse sein, die Temperatur zu kennen, bei welcher die Reaktion am schnellsten abläuft, und es wäre dann wohl das günstigste, die Zeiten zu berücksichtigen, nach welchen 90% oder 95% des Substrates gespalten sind. Jedenfalls muss bei Angaben der Optimumtemperaturen gesagt werden, für welches Reaktionsstadium sie gelten.

Die Lage der Optimaltemperatur wird für die Mehrzahl der Enzyme zwischen 37° und 53° angegeben; bei einzelnen Enzymen, wie Amylase, liegt in Gegenwart von viel Substrat das Temperaturoptimum höher.

Angaben über spezielle Optimaltemperaturen haben in diesem Zusammenhang wenig Interesse und werden erst im zweiten Teil erwähnt.

D. Einfluss von Strahlungen auf Enzyme und Enzymreaktionen.

Die mannigfaltigen Einwirkungen, welche das Licht auf die Vorgänge in lebenden Zellen und Geweben ausübt, hat naturgemäss zeitig die Vermutung wachgerufen, dass die Enzyme für Strahlen verschiedener Wellenlänge empfindlich sind. Die Erfolge der phototherapeutischen und aktinotherapeutischen Methoden mit sichtbaren und ultravioletten Strahlen (Finsen u. a.), Kathodenstrahlen, Röntgenstrahlen und Radiumstrahlen verleihen diesem Gebiet neben dem rein wissenschaftlichen Interesse auch eine besondere praktisch medizinische Bedeutung.

Ein Versuch zu einer zusammenfassenden theoretischen Behandlung dieses Erscheinungsgebietes der Enzymologie wäre verfrüht. Es mögen daher nur die folgenden Sätze aus der allgemeinen Photochemie vorausgeschickt werden, welche auch für die Beurteilung der Lichtempfindlichkeit von Enzymwirkungen die Grundlagen bilden müssen:

1. Nur derjenige Anteil der in ein chemisches System einfallenden Strahlen ist chemisch wirksam, welcher von einem an der Lichtreaktion irgendwie beteiligten Stoff absorbiert wird.

2. Vorgänge an organischen Stoffen, welche durch Strahlen beeinflusst werden, setzen sich in der Regel aus mehreren Teilreaktionen zusammen, von welchen nur eine im eigentlichen Sinne strahlenempfindlich ist. Die mit dieser gekuppelten oder sonstwie verknüpften (vgl. S. 165 u. ff.) Teilvorgänge sind Dunkelreaktionen, welche durch die photochemische Teilreaktion indirekt veranlasst sind.

Von grösster Bedeutung für die Entwicklung der theoretischen Photo-

¹⁾ Tammann und Svanberg, H. 111, 49; 1920.

chemie ist die Einführung der Quantentheorie. Nach Einstein wird für eigentliche photochemische Reaktionen die Beziehung gelten:

$$N = \frac{Q}{h\nu}, \quad \dots \dots \dots (33)$$

wo N die Zahl der von den Strahlen umgewandelten Moleküle bedeutet, Q die absorbierte Energie, ν die Schwingungszahl des absorbierten Lichtes und h die Plancksche quantentheoretische Konstante.

Wie Nernst¹⁾ darlegt, nimmt bei photochemischen Vorgängen eine Molekülart bei der Belichtung primär ein Elementarquantum auf, und die dadurch entstandenen energiereicheren Moleküle besitzen einen höheren Grad von Reaktionsfähigkeit für weitere Umsetzungen (Dunkelreaktionen) als die übrigen.

Die Bestätigung der Quantentheorie an speziellen Fällen stösst oft auf Schwierigkeiten, besonders durch sekundäre Energieübertragungen. Rein quantenmässig verlaufende Reaktionen haben Noddack²⁾ und neuerdings Erik Rudberg³⁾ gefunden. Eine ausgezeichnete Anwendung quantentheoretischer Betrachtungen auf einen biochemischen Vorgang verdankt man Otto Warburg⁴⁾.

Was die Kinetik photochemischer Reaktionen betrifft, so findet man nicht selten Reaktionen „nullter Ordnung“, d. h. dx/dt unabhängig von $a-x$; die Geschwindigkeit des Vorgangs ist also nur von der absorbierten Lichtmenge abhängig.

Wie beim Studium des Temperatureinflusses auf Enzyme müssen wir auch bei Untersuchung der Lichtwirkung folgende Vorgänge unterscheiden:

1. Destruktion des Enzyms selbst,
2. Beeinflussung der enzymatischen Reaktion.

Vorläufig sind besonders Einflüsse der ersten Art bekannt, die beobachteten Hemmungen der Enzymwirkungen werden also der Hauptsache nach auf einer teilweisen Vernichtung des Enzymmoleküls beruht haben. Den meisten bis jetzt vorliegenden Beobachtungen über Lichtdestruktion von Enzymen kommt insofern nur orientierender Charakter zu, als sie mit ungereinigten Enzymlösungen angestellt sind. Durch Messungen, welche Svanberg⁵⁾ vor einiger Zeit ausgeführt hat, wurde nachgewiesen, dass die Beimengungen von Hefensaccharasepräparaten als Schutzstoffe wirken. Es muss durch eine Fortsetzung dieser einleitenden Versuche erst festgestellt werden, ob reine

¹⁾ Nernst, Lehrbuch, 8.—10. Aufl. 1922. 9. Kapitel. — Nernst und Noddack, Sitz-Bericht Preuss. Akad. 1923, 110. — Siehe auch Nernst, Physik. Zs 21, 602; 1920.

²⁾ Noddack, Zs f. Elektrochem. 27, 359; 1921.

³⁾ Erik Rudberg, Zs f. Physik, 24, 247; 1924.

⁴⁾ O. Warburg, Biochem. Zs 100, 230; 1919 und 103, 188; 1920. — Warburg und Negelein, Zs f. physik. Chemie, 102, 235; 1922.

⁵⁾ Svanberg, Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi, 8, Nr. 6; 1921.

Enzyme selbst lichtempfindlich sind. Vermutlich handelt es sich bei vielen Photodestruktionen der Enzyme um sekundäre, oft um Oxydationsvorgänge.

Die Grösse der Lichtdestruktion lässt sich im allgemeinen durch eine Reaktionskonstante 1. Ordnung darstellen, welche wir als „Licht-Inaktivierungskonstante“ mit k_L (und der Wellenlänge in $\mu\mu$ als Index, also etwa k_{L300}) bezeichnen wollen.

Photoreversible Hemmungen enzymatischer Reaktionen sind noch kaum bekannt. Aktivierungen von Enzymreaktionen im Licht, welche zweifellos existieren und eine biologische Rolle spielen (z. B. für das Phosphatgleichgewicht), müssen erst systematisch erforscht werden.

An obengenannte Vorgänge reiht sich dann noch eine dritte Art von Lichtwirkungen an, für deren Auftreten in pflanzlichen Organen wir Anhaltspunkte haben, die Umwandlung von Zymogenen in aktive Enzyme.

1. Strahlen des sichtbaren Spektrums (360—640 $\mu\mu$).

Es mag gleich einleitend erwähnt werden, dass die Enzyme im allgemeinen keinen so hohen Grad von Lichtempfindlichkeit zu besitzen scheinen wie die Toxine. Zu diesem Ergebnis ist schon vor mehreren Dezennien O. Emmerling¹⁾ gekommen.

Auch Hertel²⁾ hat eine Reihe von Enzymen und Toxinen der Bestrahlung unterworfen und unter anderem gefunden, dass sowohl Trypsin wie Diastase und Labferment durch Strahlen der Wellenlänge 280 $\mu\mu$ geschwächt werden. Es zeigte sich aber auch bei dieser Untersuchung, dass die Enzyme zu ihrer Zerstörung eine bedeutend längere Zeit erfordern als die Toxine, und dass also Enzyme bedeutend photostabilere Stoffe sind als Toxine.

In seiner bereits erwähnten Arbeit gibt Emmerling an, dass Saccharase, Laktase, Emulsin, Amylase, Trypsin³⁾ und Pepsin von Tageslicht bei Ausschluss der Luft nur wenig geschädigt werden; etwas empfindlicher zeigten sich Hefemaltase und Lab. Bei letzterem Enzym war die Wirkungsfähigkeit der 1%igen wässrigen Lösung durch fünftägige Einwirkung von diffussem Sonnenlicht auf die Hälfte, durch ebenso lange Einwirkung von direktem Sonnenlicht auf ein Drittel gesunken.

Auch Downes und Blunt⁴⁾ fanden bei Saccharase nur geringe Lichtwirkung in Abwesenheit von Sauerstoff; Fr. Weis⁵⁾ kam bezüglich der proteolytischen Enzyme des Malzes und Schmidt-Nielsen⁶⁾ bezüglich des Chymosins zum gleichen Resultat. Die nur bedingt richtige Behauptung von F. G. Kohl⁷⁾, dass die Saccharasewirkung schon durch zerstreutes Tageslicht gehemmt werde, wird verständlich durch ein bereits im Kap. 5 erwähntes Ergebnis von Jamada und Jodlbauer; diese Forscher konnten feststellen, dass die sichtbaren, durch Glas durchtretenden Strahlen des Sonnenlichts für sich allein imstande sind, Saccharase zu schädigen, aber ausgesprochen nur dann, wenn Sauerstoff zugegen ist.

1) O. Emmerling, Chem. Ber. 34, 3811; 1901.

2) Hertel, Zs. allgem. Physiol. 4, 1; 1904. Biol. Zbl. 27; 1907.

3) Nach Fermi und Pernossi (Zs. f. Hygiene 18, 83; 1894) werden Pepsin und Trypsin durch Sonnenlicht geschwächt.

4) Downes und Blunt, Proc. Roy. Soc. 28, 205; 1879.

5) Fr. Weis, Medd. Carlsberg Lab. 5, 135; 1903.

6) Schmidt-Nielsen, Medd. fra Finsens med. Lysinstitut, 1903.

7) F. G. Kohl, Beitr. Bot. Zbl. 23, 64; 1908.

Über die Stabilität der Katalase im Licht liegt eine umfassende Untersuchung von Lockemann, Thies und Wichern¹⁾ vor. Die hemmende Wirkung, welche das Licht auf die Blutkatalase sowohl während der Aufbewahrung der Blutlösung als auch während der Reaktion mit H_2O_2 ausübt, ist in folgender Weise von der Wellenlänge abhängig: Weiss > Blau > Rot > Dunkel²⁾. Nach Zeller und Jodlbauer³⁾ tritt jedoch auch hier eine erhebliche Schädigung durch sichtbare Strahlen nur dann ein, wenn Sauerstoff zugegen ist.

Zu einem analogen Ergebnis kamen Zeller und Jodlbauer und fast gleichzeitig Bach⁴⁾ hinsichtlich der Peroxydase, auch hier wirken die sichtbaren Strahlen nur in Gegenwart von Sauerstoff.

Auch innerhalb frischer Hefezellen ist Katalase recht empfindlich gegen Sonnenlicht. Schon nach einer 30 Minuten dauernden Bestrahlung trat bei einem Versuch (bei welchem die Temperatur der Hefe nicht über 35° stieg) eine Verminderung der Katalasewirkung um 30% ein, während die Gärtätigkeit nur wenig (unter 5%) gehemmt wurde⁵⁾.

Interessant sind die Versuche v. Tappeiners und seiner Mitarbeiter über die Einwirkung des Sonnenlichtes auf Amylasen und Saccharase in Gegenwart von fluoreszierenden Substanzen (Sensibilisatoren). Schon sehr geringe Mengen Eosin, Magdalarot, Chinolinrot reichen hin, um einen stark schädigenden Einfluss des an sich unwirksamen Sonnenlichtes hervorzubringen.

Die Gärungsfähigkeit der Hefe wird in zerstreutem Tageslicht durch fluoreszierende Stoffe aufgehoben. Während aber die lebende Hefe sich den einzelnen fluoreszierenden Stoffen gegenüber auswählend verhält, riefen bei Acetondauerhefe und noch mehr bei Hefepresssaft alle untersuchten fluoreszierenden Stoffe, wie Eosin, Methylenblau, Fluorescein, Dichloranthracendisulfonat durchgehends eine starke Abnahme des Gärungsvermögens hervor [v. Tappeiner⁶⁾].

Auch auf Katalase wirkten sämtliche untersuchten fluoreszierenden Stoffe sensibilisierend, auf Peroxydase hingegen nur Eosin und Rose bengale, und beide Wirkungen treten nur ein, wenn die ultravioletten Strahlen möglichst fehlen [Jamada und Jodlbauer, Zeller und Jodlbauer (l. c.), Karamitsas⁷⁾].

Man kann mit Jodlbauer und v. Tappeiner⁸⁾ zwei Arten von

¹⁾ Lockemann, Thies und Wichern, H. 58, 390; 1909.

²⁾ Zusätze von Natriumchlorid wirken in Abwesenheit von Katalase auf die Zersetzung des Wasserstoffsperoxydes durch Licht hemmend ein, steigern also die Lichtstabilität des Wasserstoffsperoxydes. Für die Lichtempfindlichkeit der katalasefreien und katalasehaltigen Superoxydlösung findet Wo. Ostwald (Biochem. Zs 10, 1; 1908) folgenden Einfluss der Lichtart: Hell > Violett > Gelb > Dunkel.

³⁾ Zeller und Jodlbauer, Biochem. Zs 8, 84; 1908.

⁴⁾ Bach, Chem. Ber. 41, 225; 1908.

⁵⁾ Euler und Laurin, H. 106, 312; 1919.

⁶⁾ v. Tappeiner, Biochem. Zs 8, 47; 1908.

⁷⁾ Karamitsas, Diss. München 1907.

⁸⁾ Jodlbauer und v. Tappeiner, Deutsch. Arch. klin. Med. 85, 386; 1906.

biologischer Lichtwirkung unterscheiden: Die eine ist an die Anwesenheit von Sauerstoff geknüpft und wird durch fluoreszierende Substanzen beschleunigt. Die andere wird nur durch ultraviolette Strahlen hervorgerufen, ohne dass Sauerstoff oder fluoreszierende Substanzen eine Rolle spielen.

Neuere Untersuchungen über die Einwirkung des Sonnenlichts auf verschiedene Enzyme hat Pincussohn angestellt, und zwar an Serumlipase¹⁾, Urease²⁾ und einer (nicht näher bezeichneten) Amylase³⁾.

Als enzymatische Lichtreaktion muss hier die CO₂-Assimilation erwähnt werden, über welche seit einiger Zeit die ausgezeichneten Untersuchungen von Willstätter und Stoll⁴⁾ vorliegen. Da die Beteiligung des Enzyms noch nicht endgültig aufgeklärt ist, mag hier ein Hinweis auf die genannte Arbeit genügen. Hervorgehoben sei jedoch der kleine Temperaturkoeffizient der Assimilation (l. c. S. 156), welcher dem allgemeinen Befund bei photochemischen Vorgängen entspricht (vgl. S. 244 u. 287).

2. Ultraviolette Strahlen.

Das Gebiet der ultravioletten Strahlen erstreckt sich von der Wellenlänge 90–360 $\mu\mu$. Die meisten Beobachtungen sind mit der Quecksilberlampe angestellt, deren wirksamé Strahlen zwischen den Wellenlängen 200 und 300 $\mu\mu$ liegen.

Ultraviolette Strahlen sind nach unseren gegenwärtigen Erfahrungen einerseits im allgemeinen chemisch wirksamer als die sichtbaren Strahlen und rufen andererseits in organischen Stoffen überwiegend Spaltungen hervor. Demgemäss werden Enzyme durch ultraviolette Strahlen nach mehreren übereinstimmenden Ergebnissen stärker als durch Strahlen grösserer Wellenlängen zerstört resp. inaktiviert.

Eine einleitende, gründliche Arbeit über die Einwirkung dieser Strahlen verdankt man R. Green⁵⁾, welcher nachwies, dass Amylase durch dieselben zerstört wird⁶⁾, während die sichtbaren Strahlen im Gegenteil dieses Enzym durch Aktivierung des Zymogens fördern. Chymosin, Katalase und Peroxydase, welche, wie erwähnt, durch sichtbare Strahlen nur wenig gehemmt werden, erleiden in ultravioletter Bestrahlung⁷⁾ schnell eine dauernde Inaktivierung

¹⁾ Pincussohn und Anagnostu, *Biochem. Zs* 128, 268; 1922.

²⁾ Pincussohn und N. Kato, *Biochem. Zs* 134, 470; 1922.

³⁾ Pincussohn und Fr. di Renzo, *Biochem. Zs* 144, 366; 1924.

⁴⁾ Willstätter und Stoll, *Untersuchungen über die Assimilation der Kohlensäure*. Berlin, 1918.

⁵⁾ R. Green, *Trans. Roy. Soc.* 188, 167; 1897.

⁶⁾ Nach Chauchard, *C. r.* 158, 1575; 1914 wird im Hundepankreassaft die Lipase durch ultraviolette Strahlen mehr geschwächt als die Amylase.

⁷⁾ Nach Agulhon (*Ann. Pasteur*, 26, 38; 1912) soll Saccharase durch ultraviolettes Licht in Gegenwart von O₂ viel schneller inaktiviert werden als ohne Sauerstoff, und zwar durch Bildung von H₂O₂.

(Schmidt-Nielsen, Zeller und Jodlbauer). Signe und Sigval Schmidt-Nielsen¹⁾ haben die Destruktion des Labs durch ultraviolettes Licht in reaktionskinetischer Hinsicht eingehender studiert. Georges Dreyer und Olav Hanssen²⁾ hatten kurz vorher gezeigt, dass die Zerstörung von Enzymen durch Bestrahlung nach dem Gesetz für monomolekulare Reaktionen verläuft.

Von Schmidt-Nielsens Versuchen, welche im Finsen-Institut mit einer Quecksilberbogenlampe angestellt worden waren, seien im folgenden einige wiedergegeben.

Zur Verwendung kamen 1%ige Lösungen eines käuflichen, trockenen Labpulvers, und gemessen wurde die Zeit, welche nach einer gewissen Belichtungsdauer zur Koagulation von Kuhmilch erforderlich war. Diese Zeiten werden als direktes Mass für den Gehalt der Lösung an unverändertem Enzym angesehen.

Temperatur °C	Belichtungsdauer		Koagulationszeit Minuten	1000 k
	Minuten			
24,2	0		8,5	—
24,2	1,0		23,5	442
24,2	1,5		39,25	443
24,2	2,0		71,0	461
0	0		7,7	—
12,75	1,0		19,5	405
12,80	1,5		34,5	434
12,85	2,0		59,0	442
13,90	2,0		56,0	431
12,95	2,0		54,5	425

Diesen Zahlen zufolge ist die Lichtdestruktion des Labs eine monomolekulare Reaktion. Beachtung verdient der ausserordentlich kleine Temperaturkoeffizient dieser Lichtreaktion. Dass photochemische Vorgänge kleine Temperaturkoeffizienten besitzen, hat sich schon vielfach gezeigt³⁾; es liegt hier eine allgemeine Gesetzmässigkeit vor⁴⁾.

Man kann diese Tatsache so deuten, dass die aufgenommene Energie der bestrahlten Enzymmoleküle einer höheren Temperatur entspricht als der mittleren Temperatur der bestrahlten Lösung, und von der Temperatur wenig abhängt.

Die Lichtinaktivierungskonstante, k_L , nahm bei den Versuchen Schmidt-Nielsens mit steigender Enzymkonzentration ab. Hierzu möchte Verf. bemerken, dass dieser Befund ganz der an Lichtreaktionen im allgemeinen beobachteten Tatsache entspricht⁵⁾, dass die Zersetzungsgeschwindigkeit

¹⁾ Signe und Sigval Schmidt-Nielsen, H. 58, 235; 1908.

²⁾ Georges Dreyer und Olaf Hanssen, C. r. 145, 564; 1907.

³⁾ Siehe z. B. Messungen an Malzamylyase von Lüers und Lorinser, Biochem. Zs 144, 212; 1924.

⁴⁾ Siehe hierzu D. Berthelot, C. r. 160, 440 u. 519; 1915.

⁵⁾ Siehe z. B. Euler und Cassel, Zs phys. Chem. 84, 371; 1913.

belichteter Stoffe nicht wie bei Dunkelreaktionen von der Konzentration unabhängig ist, sondern mit steigender Konzentration sinkt, offenbar weil nur der durch die absorbierten Quanten aktivierte Anteil reagiert¹⁾.

Schliesslich haben S. und S. Schmidt-Nielsen noch festgestellt, dass 96% der Gesamtwirkung ihrer Quecksilberlampe von den Strahlen zwischen 220 und 250 $\mu\mu$ ausgehen, etwa 4% von den Strahlen 250–313 $\mu\mu$, und nur etwa 0,3% von den sichtbaren Strahlen.

Bekannt ist die starke keimtötende Wirkung der ultravioletten Strahlen (Barnard und Morgan, Browning und Russ u. a.).

Nach Lüers und Lorinser (l. c.) „folgt die Inaktivierung der Malz-amylase durch ultraviolette Strahlung weder dem mono- und bimolekularen Gesetz noch der Schützschen Regel. Sie gleicht hinsichtlich ihrer Kinetik ganz der Thermoinaktivierung“.

Einige weitere Beiträge zu dieser Frage liefern Francesco di Renzo²⁾ und Pincussen³⁾.

Unter den wenigen chemischen Anhaltspunkten, welche man für die Deutung der physiologischen und medizinischen Wirkung der Lichtstrahlen hat, seien die von Young⁴⁾ und im Höberschen Laboratorium von E. Mond⁵⁾ gewonnenen Ergebnisse genannt. Young fand zu beiden Seiten des Punktes $p = 5,8$ Aciditätsänderungen von Lösungen krystallisierten (nach Hopkins dargestellten) Eier- und Serumalbumins im Sonnenlicht. Nach Mond verursachte die Bestrahlung mit ultraviolettem Licht bei verschiedener Wasserstoffzahl eine Verschiebung der H^+ -Konzentration, und zwar

bei Lösungen von p_H 4,6 nach der sauren Seite,

bei Lösungen von p_H 4,3 nach der alkalischen Seite.

Die Acidität von Lecithinsuspensionen nimmt durch die Bestrahlung in beträchtlicher Weise zu.

Aus dem bestrahlten Serum wurden Substanzen abgespalten, welche gefässerweiternd wirkten.

Vermutlich handelt es sich hier um hydrolytische Vorgänge.

Über lichtelektrische Empfindlichkeit nach Bestrahlung mit ultraviolettem Licht haben Zwaardemaker und Hogewind Messungen angestellt (Akad. v. Wet., Amsterdam 1919).

3. Röntgenstrahlen.

Die chemischen Vorgänge, welche den medizinisch so wichtigen Wirkungen der Röntgenstrahlen zugrunde liegen, sind bis jetzt noch unbekannt.

¹⁾ Siehe hiezu auch W. E. Burge, W. R. Fischer und A. J. Nell, Am. J. Physiol. 40, 426; 1916.

²⁾ Francesco di Renzo, Biochem. Zs 144, 366; 1924.

³⁾ Pincussen, Biochem. Zs 134, 459; 1923 und 144, 372; 1924.

⁴⁾ E. G. Young, Proc. Roy. Soc. 93 B, 235; 1922.

⁵⁾ E. Mond, Pflüg. Arch. 196, 540, 1922; 197, 574 u. 200, 374; 1923.

Der Grund, weshalb in einem Lehrbuch der Enzymchemie die Einwirkung der Röntgen- und damit verwandten Strahlen nach Ansicht des Verf. nicht übergangen werden darf, ist folgender: Die sehr geringen Energiebeträge, mit welchen Röntgenstrahlen physiologisch und medizinisch starke Wirkungen hervorbringen, legen die Annahme nahe, dass diejenigen Stoffe, welche diese kleinen Energiemengen absorbieren, in kleinen Konzentrationen eine lebenswichtige Rolle spielen; man wird also mit der Möglichkeit oder sogar mit der Wahrscheinlichkeit rechnen, dass es sich um Veränderungen an Enzymen, Hormonen, Vitaminen oder Wachstumsfaktoren handelt, welche eine chemische Veränderung erfahren.

Röntgenstrahlen entstehen bekanntlich durch das Aufprallen der negativ geladenen Elektronen der Kathodenstrahlen auf die Antikathode. Die Natur der Röntgenstrahlung als elektromagnetische Wellen ist 1912 durch v. Laue, Friedrich und Knipping endgültig bewiesen worden. Die primäre Röntgenstrahlung setzt sich zusammen aus Strahlen der Wellenlängen von $0,1 \mu\mu$ bis unter $0,01 \mu\mu$ und ist in hohem Grade inhomogen.

Demgemäss kann für die Strahlengruppe einer Röntgenröhre nur ein mittlerer Absorptionskoeffizient bestimmt werden, und statt dessen gibt man zu biologischen Zwecken oft die sog. „Halbwertschicht“ an¹⁾, d. h. die Schicht eines Stoffes, welche die Hälfte der eindringenden Röntgenstrahlenenergie absorbiert. Bei Strahlen verschiedener Wellenlänge ergibt sich die Halbwertschicht einer gewissen Substanz, z. B. des Muskelgewebes, um so grösser, also das Durchdringungsvermögen der Strahlen um so grösser, je kleiner die Wellenlänge ist; die Absorption steigt mit der Wellenlänge stärker, als proportional dem Quadrat derselben. Das Durchdringungsvermögen der Strahlen wird gewöhnlich als „Härte“ ausgedrückt, und zwar bezeichnet man die Strahlengruppen

von $0,1 \mu\mu$ bis $0,05 \mu\mu$ als sehr weich	von $0,03 \mu\mu$ „ $0,01 \mu\mu$ als sehr hart
„ $0,05 \mu\mu$ „ $0,03 \mu\mu$ „ mittelhart	unter $0,01 \mu\mu$ „ ultrahart.

Die Wirkung der weichen Strahlen beschränkt sich auf die oberen Schichten des bestrahlten Mediums; in je tieferen Schichten man chemische Wirkungen erzielen will, um so „härtere“ Strahlen muss man erzeugen.

Was das absorbierende Material betrifft, so wird die Absorption durch die „Atomzahlen“ der in demselben vorhandenen Atome bestimmt. Da die gewöhnlichen Bestandteile organischer Stoffe, H, C, N, O, niedrige Atomzahlen besitzen (1, 6, 7, 8), so ist die Absorption durch organische Stoffe klein. Ausserdem ist mehrfach die Auffassung geäussert worden (Gauss und Lemke u. a.), dass die biochemische Wirkung der Strahlung mit steigender Härte zunimmt.

Die Absorption der Röntgenstrahlen ist im allgemeinen sehr viel geringer, die „Halbwertschicht“ sehr viel grösser als bei den ultravioletten Strahlen. Dies ist eine der Ursachen, weshalb die chemische Wirksamkeit der Röntgenstrahlen eine viel beschränktere ist als diejenige der ultravioletten Strahlen²⁾. Dementsprechend werden gelöste Enzyme von Röntgenstrahlen nicht oder nur wenig geschwächt.

Die Inaktivierung von Enzymen durch Röntgenstrahlen dürfte, wie diejenige durch Lichtstrahlen, mit ihrer Entladung und Koagulation zusammenhängen³⁾.

¹⁾ Christen, Messung und Dosierung der Röntgenstrahlen. Hamburg 1912. — Auch für längere Strahlen wird vielfach die „Halbwertschicht“ festgestellt.

²⁾ Andererseits vermag man mit Röntgenstrahlen noch in relativ tiefen Gewebsschichten zu wirken, in welche ultraviolette Strahlen nicht mehr eindringen.

³⁾ Vgl. die Ergebnisse von H. Nordenson (Zs physik. Chem. 90, 603; 1915) an kolloidem Gold.

Richter und Gerhartz¹⁾ haben an Chymosin, Pepsin, Pankreatin und Papayotin keinen Einfluss nachweisen können; Lockemann, Thies und Wichern haben das gleiche negative Ergebnis an Blutkatalase gewonnen.

Wels²⁾ fand neuerdings Hemmung an gereinigter Katalase.

Schwarz und Friedrich³⁾ fanden an Katalase nach Röntgenbestrahlung eines Präparates von Leber-Katalase zunächst Schwächung, dann Reaktivierung über die ursprüngliche Wirksamkeit hinaus. Letzterer Effekt erinnert an die vom Verfasser durch Erhitzen erzielten Aktivierungen (vgl. S. 268). Bei den Erscheinungen liegt vielleicht die Zerstörung eines Hemmungskörper zugrunde⁴⁾.

A. Richards⁵⁾ beschreibt eine geringe beschleunigende Wirkung, die aber deutlich sein soll, auf die Verdauung von Eialbumin durch Pepsin und auf die Verzuckerung der Stärke durch Amylase; dieselbe soll nur bei kurzer Bestrahlung eintreten; längere Bestrahlung soll schädigen. Stärker ist die Einwirkung auf Blut, besonders Leukozyten (Gudzent, Marg. Levy).

Nach einer Untersuchung von H. Meyer und Fr. Bering⁶⁾ ist die Wirkung der Röntgenstrahlen auf Pepsin und Pankreatin sehr gering; nur die Autolyse wird durch intensive Röntgenbestrahlung etwas beschleunigt. Oxydasen werden nach Offermann⁷⁾ kaum beeinflusst. Man könnte vermuten, dass die Enzyme innerhalb von Zellen, in welchen die Umwandlung der Röntgenstrahlen in sekundäre Strahlen eine andere ist, gegen Röntgenstrahlen empfindlicher sind. Dies ist, wie Versuche von Laurin⁸⁾ gezeigt haben, wenigstens mit Katalase nicht der Fall.

In neuerer Zeit hat sich die Auffassung Wilsons immer mehr Bahn gebrochen, dass die biochemischen Wirkungen der Röntgenstrahlen und der γ -Strahlen auf sog. „Sekundärstrahlungen“ zurückzuführen sind, und zwar einerseits auf die Fluoreszenzstrahlung im Sinne Barklas, besonders aber auf die von Sagnac (1900) entdeckte, von Dorn⁹⁾ eingehend studierte sekundäre Strahlung. Nach dieser Auffassung sind die in den bestrahlten Medien gebildeten Elektronen das eigentlich biochemisch wirksame Agens. Man gelangt vielleicht hiermit zu einer allgemeinen Darstellung der biophotchemischen Strahlenwirkungen.

¹⁾ Richter und Gerhartz, Berl. klin. Wochenschr. 45, 646; 1908.

²⁾ P. Wels, Pflüg. Archiv 201, 459; 1923. — Strahlenther. 16, 617; 1924.

³⁾ Rob. Schwarz und Walter Friedrich, Chem. Ber. 55, 1040; 1922. — Hierzu A. Kailan, Chem. Ber. 55, 2492; 1922. — Über Enzymaktivierung im Serum durch kleine Röntgendosen berichten auch William F. Petersen und C. C. Saelhof (Amer. JI med. Sc. 163)

⁴⁾ Wie Röntgenstrahlen auf das Substrat Wasserstoffsperoxyd einwirken, scheint nicht genau untersucht zu sein. Bzgl. Radiumstrahlen siehe v. Körösy, Pflüg. Archiv 137, 123; 1910.

⁵⁾ A. Richards, Amer. JI Physiol. 35, 224; 1914. — Eine Beeinflussung des Magenchemismus durch Röntgenstrahlen, durch Einwirkung im Sinne einer Sekretionsbeschränkung, hat Bruegel beobachtet (Münch. med. Wochenschr. 1917, 379).

⁶⁾ H. Meyer und Bering, Fortschr. a. d. Geb. d. Röntgenstr. 17, 33; 1911.

⁷⁾ Offermann, Strahlenther. 5, 321; 1915.

⁸⁾ Euler und Laurin, H. 106, 312; 1919.

⁹⁾ Dorn, Arch. Néerl. 5, 595; 1900. — Siehe auch Levy und Dorn, Naturwiss. 7, 721; 1919.

Es kann hier weder auf die physikalische noch auf die medizinische Seite dieses hochinteressanten Gebietes näher eingegangen werden, und es sei deshalb nur auf einige zusammenfassende Darstellungen der neueren Ergebnisse von Sommerfeld¹⁾, Gerlach²⁾, Voltz³⁾ und Dessauer⁴⁾ und besonders auf das Handbuch von P. Krause⁵⁾ verwiesen.

4. Strahlung radioaktiver Elemente.

Die Strahlung radioaktiver Stoffe setzt sich bekanntlich zusammen aus den α -, β - und γ -Strahlen.

Die γ -Strahlen schliessen sich an die harten Röntgenstrahlen an und bilden mit den Wellenlängen um 0,001 $\mu\mu$ gegenwärtig den Abschluss des elektromagnetischen Gesamtspektrums.

Die β -Strahlen bestehen, ebenso wie die Kathodenstrahlen, aus negativ geladenen Elektronen, deren Geschwindigkeit aber diejenige in den Kathodenstrahlen noch übertrifft.

Die α -Strahlen werden aus einem Schwarm von Heliumatomen gebildet.

Die physikalische Aufklärung dieser Strahlen ist noch so neuen Datums, dass eine exakte Durcharbeitung der mit radioaktiven Stoffen unter verschiedenen Umständen gewonnenen biochemischen Wirkungen und medizinischen Erfolge noch kaum vorliegen kann. So muss einstweilen darauf verzichtet werden, die Wirkungen auf das Enzym von denjenigen auf die enzymatische Reaktion zu scheiden und besonders die Wirkungen der α -, β - und γ -Strahlen zu sondern. Immerhin muss es schon als ein Fortschritt bezeichnet werden, wenn aktinchemische Vorgänge in Organen und Geweben auf bestimmte Enzymreaktionen zurückgeführt werden können.

Im folgenden sei angeführt, was über die Wirkung radioaktiver Stoffe bzw. radioaktiver Strahlung auf Enzyme bekannt ist.

Radiumsalze hat Bergell schon 1905 auf einige Enzyme wirken lassen; Trypsin wurde aktiviert; die Saccharasewirkung blieb ungeändert.

Nach Schmidt-Nielsen übt auf Chymosin sogar ein sehr kräftiges Radiumpräparat nur eine sehr schwache Wirkung aus, und Henri und Mayer⁶⁾ geben nur an, dass Emulsin und Trypsin nicht geschädigt werden.

Radiumemanation. Die erste fördernde Wirkung radioaktiver Substanzen auf einen enzymatischen Prozess fanden Neuberg⁷⁾ und Wohlgemuth, nämlich eine Beschleunigung der autolytischen Vorgänge durch

¹⁾ Sommerfeld, Strahlenther. 7, 34; 1916.

²⁾ Gerlach, Strahlenther. 7, 537; 1916.

³⁾ Voltz, Strahlenther. 8, 337; 1918. — Ferner: Strahlentherapie 1921.

⁴⁾ Dessauer, Dosierung und Wesen der Röntgenstrahlenwirkung in der Tiefentherapie. Steinkopff 1924.

⁵⁾ P. Krause, Handbuch der Röntgentherapie. Teil I. 1924.

⁶⁾ Henri und Mayer, C. r. 138, 521; 1904.

⁷⁾ Neuberg, Verh. d. deutsch. path. Ges. 1904.

Radiumbestrahlung. Loewenthal und Edelstein¹⁾ beschrieben die Begünstigung dieses Vorganges durch Emanation. Dann haben Bergell und Bickel²⁾ gezeigt, dass die peptische Verdauung durch Emanation gefördert wird. Neuerdings wiesen nun Loewenthal und Wohlgemuth³⁾ nach, dass die Radiumemanation imstande ist, die Wirkung des diastatischen Enzymes, sei es des Blutes, der Leber, des Speichels oder des Pankreassaftes, zu begünstigen. „Diese Begünstigung ist nicht immer sofort zu beobachten, sondern sehr oft begegnet man während der ersten 24 Stunden einer Hemmung, die sich im weiteren Verlauf allmählich ausgleicht, und erst bei genügend langer Fortführung des Versuchs findet man eine Beschleunigung. In einer anderen Reihe von Fällen war unter dem Einfluss der Emanation nur eine Hemmung zu konstatieren, die sich selbst bei noch so langer Ausdehnung des Versuches nicht wieder auszugleichen vermochte.“

Bemerkenswert ist auch der Befund von Gudzent, dass auch die Enzyme des Purinstoffwechsels durch Radiumemanation aktiviert werden⁴⁾. Ohne Einfluss wurde die Radiumemanation gefunden auf Saccharase, Pepsin und Trypsin⁵⁾, ferner auf Leberlipase und eine pflanzliche Lipase⁶⁾.

Radiumbestrahlung soll nach Henri Saccharase und Emulsin schwächen, dagegen Trypsin, Lab und Thrombase nicht schädigen. Nach Wilcock sind Radiumstrahlen auf Tyrosinase ohne Einfluss⁷⁾.

In diesem Zusammenhang mag erwähnt werden, dass es Dreyer und O. Hanssen⁸⁾, sowie Fernau und Pauli⁹⁾ gelungen ist, indirekte und direkte Einwirkungen intensiver Radiumstrahlung auf native Eiweisskörper nachzuweisen, nachdem schon vorher Henri und A. Mayer (l. c.), sowie Jorissen und Woudstra¹⁰⁾ gefunden hatten, dass elektropositive Kolloide durch die β -Strahlen des Radiums ausgeflockt werden.

Wirkung von Mesothorium.

Das von O. Hahn entdeckte Mesothoriumbromid sendet drei Strahlenarten aus: α -Strahlen, β -Strahlen und γ -Strahlen. Von diesen Strahlenarten durchdringen die β - und γ -Strahlen eine nicht zu dicke Glimmerplatte ohne weiteres, durch dünnes Glas gehen sie ebenfalls durch, wenn sie zum Teil

¹⁾ Loewenthal und Edelstein, *Biochem. Zs* 14, 484; 1908.

²⁾ Bergell und Bickel, *Verh. d. Kongr. f. inn. Med., Wiesbaden 1906.*— Siehe hierzu auch Th. R. Brown, *Arch. Int. Med.* 10, 406; 1912.

³⁾ Loewenthal und Wohlgemuth, *Biochem. Zs* 21, 476; 1909.

⁴⁾ Siehe auch A. Schulz, *Biochem. Zs* 48, 86; 1913.

⁵⁾ Jansen, *Nord. Tidskr. Terapi* 7, 65; 1908.

⁶⁾ E. K. Marshall und Roventree, *Jl Biol. Chem.* 16, 379; 1913.

⁷⁾ Wilcock, *Jl of Physiol.* 34, 207; 1907.

⁸⁾ Dreyer und Hanssen, *C. r.* 145, 234; 1907.

⁹⁾ Fernau und Pauli, *Biochem. Zs* 70, 426; 1915.

¹⁰⁾ Jorissen und Woudstra, *Kolloid-Zs* 10, 280; 1912.

bei der Passage auch etwas abgeschwächt werden. Bickel und Minami¹⁾ fanden, dass durch die Bestrahlung von Karzinom, Sarkom und Leber mit Mesothoriumbromid unter Ausschluss einer Emanationswirkung und der α -Strahlen eine Beeinflussung der autolytischen Enzyme nicht stattfindet. Die Autoren heben hervor, dass diese Ergebnisse von prinzipieller Bedeutung sind. Wenn es nämlich richtig ist, dass die β - und γ -Strahlen des Mesothoriums mit den β - und γ -Strahlen des Radiums in jeder Beziehung identisch sind, so muss der Schluss gezogen werden, dass die durch die Einwirkung von Radium beobachtete Aktivierung der autolytischen Enzyme lediglich eine Wirkung der Emanation bzw. der α -Strahlen ist. Das gleiche gilt wahrscheinlich auch für die anderen Enzyme. Nach Minami²⁾ sind die β - und γ -Strahlen des Mesothoriums von sehr geringem Einfluss auf die Verdauungsenzyme, Amylase, Pepsin und Trypsin³⁾. Die biologische Wirkung der Thoriumemanation studierte Bickel⁴⁾; sie äussert sich wie diejenige der Radiumemanation bald in einer Hemmung, bald in einer Aktivierung der Enzymwirkung; sie ist intensiver als die Wirkung der β - und γ -Strahlen.

Hussey und William R. Thompson⁵⁾ haben die Einwirkung von radioaktiver Strahlung und Röntgenstrahlung auf Trypsin und Pepsin eingehender studiert. Für die Strahlenwirkung auf Trypsin wurde ein monomolekularer Verlauf gefunden. Die Inaktivierung des Trypsins geht proportional der Enzymkonzentration und der Emanationsmenge. Auch durch γ - und β -Strahlen allein wird sowohl Trypsin als Pepsin zerstört.

Nach Sokolowski⁶⁾ wird das lipolytische Enzym des Blutserums durch die harten Strahlen des Mesothoriums geschwächt, während die weichen Strahlen der Radiumemanation und des Thoriums X eine aktivierende Wirkung auf das Enzym ausüben.

Über den Einfluss von Röntgenstrahlen auf Organlipasen siehe ferner Krömeke (Arch. exp. Path. u. Pharm. 100; 1923).

Der fördernde Einfluss der Emanation auf das Pflanzenwachstum⁷⁾ dürfte auf Enzymaktivierung zurückzuführen sein.

Von einigen Forschern werden die spezifischen physiologischen Wirkungen des Kaliums mit den radioaktiven Eigenschaften dieses Metalls⁸⁾ in Zusammenhang gesetzt⁹⁾, jedenfalls verdienen die hier naheliegenden Beziehungen eine eingehende Prüfung.

¹⁾ Bickel und Minami, Berl. klin. Wochenschr. 48, 1413, 1911.

²⁾ Minami, Berl. klin. Wochenschr. 48, 1798, 1911.

³⁾ Eine Wirkung der γ -Strahlen auf tierische Oxydasen hat Offermann festgestellt (l. c.).

⁴⁾ Bickel, Berl. klin. Wochenschr. 48, 2107; 1911.

⁵⁾ Hussey und William R. Thompson, Jl Gen. Physiol. 5, 647 u. 6, 1; 1923.

⁶⁾ Sokolowski, Strahlenther. 6, 419; 1915.

⁷⁾ Falta und Schwarz, Berl. klin. Wochenschr. 48; 1911.

⁸⁾ Siehe hierzu Zwaardemaker, Pflüg. Archiv 173, 28; 1918. — Zwaardemaker und Feenstra, Soc. biol. 84, 377; 1921.

⁹⁾ Stoklasa hat mit zahlreichen Mitarbeitern die Bedeutung der Radioaktivität des Kaliums für die Pflanzenzellen behandelt (Biochem. Zs 108 u. 109; 1920).

Sekundärstrahlung.

In neuerer Zeit hat sich die Überzeugung Bahn gebrochen, dass bei den biologischen Wirkungen der Röntgenstrahlen und der γ -Strahlen der radioaktiven Substanzen die Sekundärstrahlen¹⁾ eine sehr wesentliche Rolle spielen; dieselben würden demnach für die Strahlentherapie in hohem Grade in Betracht kommen.

Man unterscheidet nunmehr zwei Arten von eigentlichen sekundären Röntgenstrahlen, nämlich

1. die Fluoreszenz-Röntgenstrahlung,
2. die sekundäre β -Strahlung.

Beide Strahlungen sind Funktionen der Atome des absorbierenden Mediums und die Wirkungen werden demgemäss durch die in die Gewebe injizierten Stoffe, besonders durch Schwermetallatome wesentlich beeinflusst.

Besonders den sekundären β -Strahlen, welche den Kathodenstrahlen in der Röntgenröhre entsprechen (Elektronen, welche aus dem bestrahlten Material losgelöst werden), schreiben Leduc und andere Forscher die charakteristischen physiologischen Wirkungen der Röntgenstrahlen zu.

Hinsichtlich der Wirkungsweise der sekundären Strahlen, welche uns hier besonders interessieren würde, sind besonders die Annahmen diskutiert worden, dass die getroffenen Moleküle zerfallen und Anlass zur Bildung von Toxinen geben, ferner dass unter der Einwirkung dieser Strahlen „Schutzkörper“ entstehen. Über die Beeinflussung der Enzyme durch sekundäre Strahlung liegt leider bis jetzt noch keine eingehendere Untersuchung vor. Nach den sehr interessanten Feststellungen Neubergs über die Beeinflussung der Autolyse bei Karzinomen versprechen solche Untersuchungen mancherlei Aufklärung.

¹⁾ Siehe hierzu Voltz, Strahlenther. 8, 337; 1918.

7. Kapitel.

Gleichgewichte und Endzustände bei enzymatischen Reaktionen. Enzymatische Synthesen.

A. Umkehrbare Reaktionen.

Wir haben im Kapitel 4 die hydrolytischen Enzymreaktionen so behandelt, als verliefen sie vollständig in einer Richtung, oder genauer, als sei die synthetische Gegenreaktion so unbedeutend, dass sie vernachlässigt werden kann. Wir wissen, dass die Spaltung des Rohrzuckers durch Säuren, diese klassische Reaktion der chemischen Dynamik, unter gewöhnlichen Umständen praktisch vollständig verläuft, und erwarten zunächst, dass dies auch bei der enzymatischen Inversion der Fall ist. Wir greifen hier wieder auf das Prinzip der unabhängigen chemischen Energien zurück (S. 166), nach welchem zwei im gleichen Medium nebeneinander verlaufende Reaktionen nur dann voneinander abhängen, wenn sie eine Komponente gemeinsam haben. Der Gang, mit welchem eine nicht vollständig verlaufende, reversible Reaktion ihrem Gleichgewicht zustrebt, ergibt sich durch Superposition zweier gleichzeitig in entgegengesetzter Richtung verlaufender Reaktionen.

Es ist z. B. die Geschwindigkeit der Esterspaltung v_1 gegeben durch die Gleichung

$$v_1 = k_1 [\text{Ester}] [\text{Wasser}],$$

wenn wir mit [], wie immer, die Konzentration bezeichnen.

Die Geschwindigkeit der Esterbildung v_2 ist ausgedrückt durch

$$v_2 = k_2 [\text{Säure}] [\text{Alkohol}],$$

und der tatsächliche zeitliche Fortschritt in einem nicht im Gleichgewicht befindlichen System, das Ester, Säure, Alkohol und Wasser enthält, ist

$$v = v_1 - v_2 = k_1 [\text{Ester}] [\text{Wasser}] - k_2 [\text{Säure}] [\text{Alkohol}],$$

bzw., wenn wir von einer reinen Esterlösung von der Konzentration a ausgegangen sind, und die zur Zeit t umgewandelte Menge mit x bezeichnen:

$$\frac{dx}{dt} = v = v_1 - v_2 = k_1 (a - x) - k_2 x^2 \quad (34)$$

Das Verhältnis der beiden Geschwindigkeitskonstanten ist, wie van't Hoff gezeigt hat, die Konstante des chemischen Gleichgewichtes, also

$$K = \frac{k_1}{k_2} = \frac{[\text{Säure}] [\text{Alkohol}]}{[\text{Ester}] [\text{Wasser}]} \dots \dots \dots (35)$$

Die Gleichgewichtslage ist unabhängig von der Schnelligkeit, mit welcher sie erreicht wird, unabhängig — wie genaue Versuche gezeigt haben — von der Gegenwart und Konzentration eines (idealen) Katalysators, von welchem durch die Komponenten des Systems nur ein sehr geringer Anteil gebunden wird.

Ist die Konstante der „Gegenreaktion“ nicht verschwindend klein, so ändert sich, wie leicht ersichtlich, der zeitliche Verlauf des totalen Vorganges v , wenn Reaktionsprodukte, x , dem System von vornherein zugesetzt werden, und zwar muss allgemein ein Zusatz von Reaktionsprodukten den Fortschritt einer umkehrbaren Reaktion in der einen der beiden Richtungen hemmen.

Diese Hemmung muss theoretisch unterschieden werden von derjenigen, welche durch die Beschlagnahme des Katalysators eintritt, und welche wir bereits im Kapitel 4, S. 147 u. ff. besprochen haben.

Einige Differenzen zwischen enzymatischem und nicht enzymatischem Gleichgewicht.

Wirkliche chemische Gleichgewichte sollten nach unseren theoretischen Voraussetzungen unter der Einwirkung von Enzymen nur dann einen anderen Wert annehmen, als unter der Einwirkung von anderen Katalysatoren, wenn wesentliche Anteile der Gleichgewichtskomponenten vom Katalysator bzw. den Katalysatoren gebunden werden.

Nach den Forderungen der Thermodynamik darf ein Katalysator, wenn er nur einen verschwindenden Bruchteil der Reaktionskomponenten bindet, praktisch überhaupt keine Gleichgewichtsveränderung hervorrufen. Denn man könnte sonst unter abwechselnder Entfernung und Zuführung des Katalysators das Gleichgewicht sich verändern lassen und so ein Perpetuum mobile konstruieren.

Bis jetzt liegen nur die folgenden experimentellen Anhaltspunkte vor:

Bodenstein und Dietz¹⁾ haben das Gleichgewicht, welches sich zwischen Amylbutyrat, Wasser, Amylalkohol und Buttersäure einstellt, mit dem Endzustand verglichen, welchen dieses System unter der Einwirkung eines Lipase-Präparates (Pankreas-Lipase des Schweines) erreicht. Die Messungen der Geschwindigkeitskonstanten k_1 und k_2 , mit welchen die Bildung und die Spaltung des Esters verläuft, ergaben die Mittelwerte:

$$k_1 = 0,015 \qquad k_2 = 0,0072$$

Wie es die Theorie fordert, war der Quotient dieser beiden Geschwindigkeitskonstanten gleich der direkt bestimmten Gleichgewichtskonstanten²⁾.

¹⁾ Bodenstein und Dietz, Zs Elektroch. 12, 605; 1906. — Dietz, H. 52, 279; 1907.

²⁾ Da Wasser und Amylalkohol im Überschuss vorhanden waren, so vereinfacht sich die Konstante K zu

$$K = \frac{[\text{Buttersäure}]}{[\text{Amylbutyrat}]}$$

Also nach (35)

$$\frac{k_1}{k_2} = K \quad \text{und} \quad \frac{k_2}{k_1} = K'.$$

Dietz hebt hervor (l. c. S. 314), dass in vorliegendem Falle das Enzym den Charakter eines echten Katalysators hat; dafür spricht besonders die Gültigkeit der eben erwähnten Beziehung $k_1/k_2 = K$.

Der so auf zweierlei Weise ermittelte Endzustand zeigte indessen starke und regelmässige Abweichungen vom natürlichen, stabilen Gleichgewicht. Während nämlich die natürliche Gleichgewichtskonstante 1,96 beträgt, ergaben die Enzymversuche:

Anfangskonzentration der reagierenden Substanzen	K
0,05	0,45
0,10	0,74
0,20	1,12

Wie erwähnt, handelt es sich aber hier nicht wie bei Tammanns Versuchen (vgl. S. 302) um Reaktionsverzögerungen oder sog. „falsche Gleichgewichte“.

Als empirische Beziehung fand Dietz

$$\frac{\sqrt{[\text{Amylbutyrat}]}}{[\text{Buttersäure}]} = \text{Konst.}$$

Dass Bodenstein und Dietz diese Beziehung auf die „Adsorption“ des Amylbutyrates an das Enzympräparat zurückführen, sei der Vollständigkeit halber erwähnt.

Etwa gleichzeitig mit Dietz hat Pottevin¹⁾ das Gleichgewicht untersucht, welches Pankreaslipase im System Methylalkohol, Wasser, Ölsäure, Monooleat einstellt; er fand die gebildeten Monoolein-Mengen von Enzymgehalt der Lösung unabhängig.

Äquimolekulare Mengen Ölsäure und Methylalkohol wurden gemischt.

Menge des angew. Pankreatins auf 100 g Mischung	Gebildete Menge Ester in %			Temp. 33°.
	1 Tag	3 Tage	20 Tage	
1	8	56	84	
2	12	66	82	
5	21	66	84	
10	43	74	85	

Über Pottevins Synthese des Trioleins siehe S. 314.

Jalander²⁾ ist mit Ricinuslipase im System Triolein, Ölsäure, Glycerin, Wasser von beiden Seiten her zu einer identischen Gleichgewichtslage gekommen (vgl. den speziellen Teil dieses Buches 1. Abschnitt Lipasen).

A. E. Taylor³⁾ scheint mit einer etwas feiner verteilten Suspension, gleichfalls von Ricinuslipase, gearbeitet zu haben.

Er verwandte zu seinen Versuchen das Triacetin, das Glyceryltriacetat der Essigsäure. Die natürliche Gleichgewichtslage ist von Taylor für 0,5-, 1,0- und 2,0%ige Lösungen von Triacetin bestimmt worden.

¹⁾ Pottevin, Ann. Inst. Pasteur, 20, 901; 1906.

²⁾ Jalander, Biochem. Zs 36, 635; 1911.

³⁾ A. E. Taylor, JI Biol. Chem. 2, 87; 1906.

Er liess gleiche Volumina von 1 norm. Schwefelsäure und der Glyceryltriacetat-Lösung mehrere Monate stehen und fand dann:

Anfangskonzentration des Esters	Zusammensetzung im Gleichgewicht
0,5%	12% Ester, 88% gespalten
1,0%	18% „ 82% „
2,0%	22% „ 78% „

Für den enzymatischen Endzustand ergaben sich folgende Zahlen:

Anfangskonzentration des Esters	Zusammensetzung im Endzustand
0,5%	14% Ester, 86% gespalten
1,0%	21% „ 79% „
2,0%	30% „ 70% „

Taylor selbst schliesst aus diesen Zahlen, dass das Enzym den Gleichgewichtszustand nicht verschiebt; indessen sind die Differenzen zwischen den zwei obigen Zahlenreihen doch so gross, dass sie nach meiner Ansicht keinen Beweis für die Identität des nicht enzymatischen und des enzymatischen Gleichgewichts bilden.

Über den Endwert der lipatischen Tributyrathydrolyse siehe Willstätter und Memmen, H. 129, 1 und zwar 6; 1923.

Einfluss der Spaltprodukte auf den Endzustand.

Unter den Versuchen, welche die hemmende Einwirkung der Spaltprodukte zeigten, ist der von W. Kühne¹⁾ angegebene wohl einer der ersten: Bringt man eine vom überschüssigen, unverdauten Fibrin abfiltrierte Verdauungsflüssigkeit auf einen Dialysator, so diffundiert der grösste Teil der Peptone in das Wasser, während das Pepsin auf dem Dialysator zurückbleibt. Die während des Diffusionsprozesses wasserreicher gewordene Lösung löst dann nach dem Verdunsten auf ihr ursprüngliches Volumen und Herstellung ihres anfänglichen Säuregrades fast genau ebensoviel Fibrin auf, als sie schon einmal gelöst enthielt. Die Peptone sind es folglich, welche die Verdauung hindern, z. T. allerdings wohl durch Aciditätsbeeinflussung (Bindung der Salzsäure).

Wir erinnern sodann an die bereits früher zitierte Untersuchung von Tammann²⁾, welcher zur Überzeugung gelangte, dass im allgemeinen die Spaltprodukte die Vollständigkeit der enzymatischen Reaktionen beeinträchtigen; aber, wie er sagt, „nicht nur durch Entfernung und Vernichtung der Spaltungsprodukte ist man imstande eine Fermentreaktion vollständig zu machen, sondern auch durch wiederholten Zusatz von Ferment wird dasselbe Ziel erreicht“.

Von seinen zahlreichen Versuchen seien folgende erwähnt:

Zu verschiedenen Lösungen, die je 0,51 g Amygdalin enthalten, fügt man immer die gleiche Menge Emulsin, aber verschiedene Mengen von gesättigter Benzaldehydlösung und bringt alle Lösungen auf 25 ccm. Im Endzustande waren dann (bei 20°) folgende Amygdalinmengen zersetzt:

¹⁾ W. Kühne, Lehrb. d. physiol. Chem. 1866, S. 39.

²⁾ Tammann, H. 16, 271; 1891.

Menge der Lösung von Aldehyd	Zersetzte Amygdalinmenge in %	
0 ccm	20,3	
1 „	18,8	
5 „	14,7	
10 „	11,3	} Fällung von Emulsin.
In mit Benzaldehyd gesättigter Lösung	5,5	

Noch stärker wirkt Blausäure.

In 25 ccm Lösung bei 30° je 0,50 g Emulsin auf 0,001 g-Mol. Amygdalin:

Zusatz von Blausäure	Amygdalin gespalten
0,0000 g-Mol.	23,7
0,0001	18,7
0,0002	16,4
0,0003	12,1

Erheblich weniger stark als Blausäure hemmt das dritte Spaltprodukt, der Traubenzucker.

Wie gross die Hemmung ist, zeigt folgende Tabelle von Auld:

Minuten	g zugesetzte Glucose	hydrol. Amygdalin in %
30	0,0	13,5
30	0,2	13,3
30	0,75	11,8
30	1,0	11,6

Zur weiteren Erforschung dieser Beeinflussung ist wohl zu berücksichtigen, dass sich das Emulsin aus mehreren spezifisch wirkenden Enzymen zusammensetzt.

Die Reaktionshemmung durch die Spaltprodukte ist, wie S. 152 und 153 gezeigt, ausgeprägt spezifisch, ein Befund, welcher schon sehr scharf in einer von E. F. Armstrong¹⁾ gegebenen Tabelle über die Hemmungen von Zuckerspaltungen durch Hexosen zum Ausdruck kam. Vgl. auch Kap. 9.

Schon oben haben wir Kühnes Versuch über den Einfluss der Spaltprodukte auf die peptische Fibrinverdauung zitiert. Über die Hemmung der tryptischen Caseinverdauung durch Albumosen, Peptone und Aminosäuren hat Bayliss²⁾ Versuche angestellt; nach ihm sollen die Aminosäuren — Glykokoll und Leucin wurden geprüft — am wirksamsten sein.

Bei der Untersuchung der Dipeptidspaltung durch Erepsin hat Verf. auch einige Versuche über den Einfluss der Aminosäuren gemacht.

Es handelte sich um Glycylglycin und Glykokoll. Dabei zeigte es sich, dass ein Zusatz von Glykokoll nur eine untergeordnete Rolle spielt³⁾.

0,10 n · Glycylglycin; 0,04 n · Na			0,05 n · Glycylglycin; 0,10 n · Glykokoll; 0,04 n · Na		
Minuten	1000 (a-x)	1000 k	Minuten	1000 (a-x)	1000 k
0	955	—	0	480	—
8	852	6,25	10	414	6,40
16	766	6,00	18	372	6,20
25	678	5,95	27	329	6,08

¹⁾ Armstrong, Proc. Roy. Soc. 73, 516; 1904.

²⁾ Bayliss, Arch. d. Sciences Biol. 9, Suppl. 261 u. ff.; 1904.

³⁾ Euler, H. 51, 213; 1907.

0,20 n · Glycylglycin; 0,05 n · Na			0,10 n · Glycylglycin; 0,2 n · Glykokoll; 0,05 n · Na		
Minuten	1000 (a—x)	1000 k	Minuten	1000 (a—x)	1000 k
0	1860	—	0	900	—
6	1692	6,9	6	829	5,9
12	1545	6,7	12	767	5,8
20	1376	6,55			
30	1210	6,2			

Hierbei ist natürlich wesentlich, dass man durch den Zusatz des Glykokolls das Verhältnis zwischen NaOH und den anwesenden Säuren (Dipeptid + Aminosäure) nicht merkbar ändert.

Besondere Erwähnung verdienen noch die Arbeiten von Abderhalden und Gigon¹⁾ über die Spaltung von Glycyl-l-tyrosin. Hier hemmt das in Lösung befindliche Tyrosin erheblich. Auch von vornherein zugesetzte aktive Aminosäuren verzögern bedeutend, besonders diejenigen, welche in der Natur vorkommen: d-Alanin, l-Serin, l-Leucin, d-Glutaminsäure, l-Phenylalanin, d-Tryptophan, l-Diaminotrioxododekansäure.

Die Grössenordnung der Hemmung geht aus folgenden Versuchen hervor:

0,1 g Glycyl-l-Tyrosin + 1 ccm Hefepresssaft		0,1 g Glycyl-l-Tyrosin + 1 ccm Hefepresssaft + 0,05 g d-Glutaminsäure		Drehungsvermögen der Glutaminsäure abgezogen
Minuten	Abgelesene Drehung	Minuten	Abgelesene Drehung	
0	+ 0,70°	0	+ 0,70°	+ 0,55°
9	+ 0,51	7	+ 0,55	+ 0,47
23	+ 0,20	19	+ 0,54	+ 0,46
34	+ 0,00	29	+ 0,54	+ 0,46
		49	+ 0,53	+ 0,45
		79	+ 0,53	+ 0,45
		105	+ 0,47	+ 0,39

Glykokoll, l-Alanin und d-Leucin zeigen dagegen keinerlei hemmende Wirkung, die Racémkörper, wie d-l-Alanin, hemmen schwach. Aus den spezifischen Einflüssen, welche somit die Spaltprodukte gegenüber der Polypeptidverdauung zeigen, lässt sich wiederum schliessen, dass das hydrolysierende Enzym in direkte Bindung mit den genannten Eiweissabbauprodukten tritt. Etwa gleichzeitig hat Chodat²⁾ ähnliche Messungen mit l-Tyrosinanhydrid und Glycyl-l-tyrosinanhydrid ausgeführt. In grösster Verdünnung beschleunigen die Aminosäuren³⁾. Ferner weisen Abderhalden und Gigon auf den Unterschied hin, welcher zwischen der Verdauung in vitro besteht, wo die Spaltprodukte der Proteine intensiv hemmen, und der Verdauung im Darmkanal, wo die hemmenden Spaltprodukte durch Resorption schnell entfernt werden.

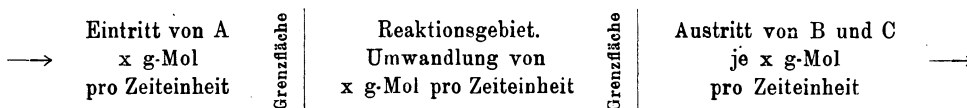
Mit anderen Worten: Im Organismus haben wir (in gewissen Zeiträumen) sog. stationäre Zustände, in welchen die Stoffe, welche durch die

¹⁾ Abderhalden und Gigon, H. 53, 251; 1907.

²⁾ Chodat, Arch. sc. phys. nat. 26, 112; 1907.

³⁾ Möglicherweise durch Aciditätsbeeinflussung.

Enzyme verarbeitet werden und dann durch Diffusion oder in anderer Weise aus dem Wirkungsbereich des Enzyms austreten, kontinuierlich durch eine äquivalente Menge neuen Ausgangsmaterials ersetzt werden. Solche Fälle stationärer chemischer Vorgänge lassen sich etwa durch folgendes Schema veranschaulichen, wenn wir die monomolekulare Reaktion $A \rightarrow B + C$ betrachten.



Unter den angegebenen Umständen gilt die einfache Beziehung:

$$\frac{dx}{dt} = \text{Konst.}$$

Damit ein derartiger stationärer Zustand eintritt, braucht ein System keineswegs durch feste Wände abgegrenzt zu sein. H. Goldschmidt¹⁾ hat einen chemischen Vorgang studiert, in welchem obige Gleichung realisiert ist:

Schüttelt man eine im Überschuss angewandte Menge eines in Wasser schwer löslichen Esters mit einer verdünnten Salzsäurelösung, in welcher der Ester (soweit er gelöst ist) mit einer gewissen Geschwindigkeit hydrolytisch gespalten wird, so hält man eben durch das Schütteln die Konzentration des gelösten Esters konstant, da diejenigen Mengen, welche durch die hydrolytische Spaltung verschwinden, durch Diffusion der Lösung stetig wieder zugeführt werden. Ist die Reaktionsgeschwindigkeit nicht sehr gross, so kann durch Diffusion stets der Ester, der durch die Reaktion aus der wässrigen Phase verschwindet, vollständig nachgeliefert werden, und der Ester wird also in der wässrigen Lösung stets auf konstanter Konzentration erhalten, nämlich derjenigen, welcher der Sättigung entspricht.

Die sonst gültige monomolekulare Reaktionsgleichung

$$\frac{dx}{dt} = (a - x) \cdot k \text{ geht über in } \frac{dx}{dt} = k''$$

da hier ja stets $a - x = a = \text{Konst.}$

Bedingung für einen solchen Reaktionsverlauf ist also, dass die Phase, in welcher die Reaktion sich abspielt, stets in bezug auf das Substrat gesättigt ist; man kann dies ausser durch kräftiges Rühren des heterogenen Systems auch durch äusserst feine Verteilung des sich lösenden Körpers erreichen, so dass die Berührungsfläche zwischen ihm und der Lösung sehr gross wird. Derartige ausserordentlich grosse Grenzflächen kommen besonders in sogenannten kolloiden Lösungen vor.

Schliesslich muss in diesem Zusammenhang nochmals der verschiedenartige Einfluss hervorgehoben werden, welchen der Zusatz von Spaltprodukten

¹⁾ H. Goldschmidt, Zs physik. Chem. 31, 235; 1899.

einer umkehrbaren Reaktion ausübt. Nehmen wir als Beispiel den Zusatz von Aminosäuren zu der proteolytischen Spaltung von Eiweisskörpern, so haben wir

1. nach den Forderungen der Statik die Beeinflussung des Gleichgewichts (35);

2. die Beeinflussung der Geschwindigkeit durch Bindung des Enzyms an die Reaktionsprodukte;

3. die Beeinflussung der Geschwindigkeit durch die Änderung der Acidität infolge von Salzbildung der Aminosäuren mit den sekundären Aktivatoren wie HCl oder NaOH.

B. Endzustände und stationäre Zustände.

Wir müssen zweierlei Endzustände unterscheiden:

Bei der ersten Gruppe von Fällen handelt es sich darum, dass das Enzym während des Verlaufs der enzymatischen Reaktion durch einen äusseren Einfluss zerstört wird. Dies tritt besonders bei denjenigen Vorgängen ein, welche bei verhältnismässig hoher Temperatur vorsich gehen, wo also die Inaktivierungskonstante k_0 schon im Vergleich zur enzymatischen Reaktionskonstante k in Betracht kommt, also bei und über den „Optimaltemperaturen“.

Mit der wirklichen Gleichgewichtslage der betreffenden Systeme haben solche Endzustände nichts zu tun; wie leicht ersichtlich, kann man je nach Wahl der Temperatur, der Enzymkonzentration usw. zu jedem beliebigen Endzustand gelangen.

Wie S. 298 erwähnt, hat Tammann¹⁾ die Abhängigkeit des Endzustandes von der Menge des Enzyms und der Reaktionskomponenten eingehend untersucht und festgestellt.

Bei der Einwirkung von Emulsin auf Arbutin und Coniferin ergab sich, dass die im Endzustand gespaltene Substanzmenge mit wachsender Enzymmenge wächst und schliesslich ein Maximum erreicht.

Löst man gleiche Emulsinmengen und verschiedene Mengen von Amygdalin in 25 ccm Wasser, so werden bei 40° folgende Amygdalinmengen zersetzt:

Ursprüngliche Amygdalinmenge	Davon werden gespalten	
	Absolute Mengen	Prozentische Mengen
0,51 g	0,11 g	20 %
1,02 „	0,15 „	15 %
2,04 „	0,24 „	12 %

Ähnliche Verhältnisse findet man für die Endzustände der Reaktionen bei der Wirkung von Emulsin auf Arbutin wieder. In 100 ccm Lösung befanden sich 0,0625 g Emulsin und folgende Arbutinmengen bei 35°:

Ursprüngliche Arbutinmenge	Nach 48 Stunden	Nach 72 Stunden
	gespalten	gespalten
0,576 g	52,3 %	52,3 %
4,000 „	44,0 %	44,0 %

¹⁾ Tammann, H. 16, 271; 1892.

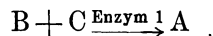
Bei konstanter Enzymmenge wurde in verdünnten Lösungen von Amygdalin und Arbutin relativ mehr gespalten als in konzentrierten Lösungen; für die Spaltung des Coniferins durch Emulsin gilt wahrscheinlich dieselbe Beziehung.

Bemerkenswert sind hiezu auch die von Willstätter und Memmen an Serumlipase gewonnenen Erfahrungen (l. c. S. 6): „Wenn die lipatische Wirkung nicht bis zu diesem Ende führt, so dürfte es sich nicht um die Einstellung eines Gleichgewichts handeln, sondern um die grössere Beständigkeit des noch capillaraktiven Produktes partieller Hydrolyse gegenüber der geringen Enzymmenge.“

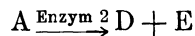
Auch abgesehen von den Fällen, in welchen ein Enzym im Verlauf der Reaktion und unabhängig von dieser, zerstört wird, treten nicht selten Endzustände auf, welche sich vom natürlichen Gleichgewicht mehr oder weniger stark unterscheiden.

Zunächst kann der Katalysator durch die Reaktionsprodukte so weitgehend (reversibel) gebunden werden, dass die Reaktion aus Mangel an Katalysator lange Zeiten erfordert.

Schliesslich müssen stationäre Zustände eintreten, wenn zwei Enzyme wirksam sind, von welchen das eine die Bildung eines Stoffes A nach einer Reaktion



katalysiert, während das andere Enzym diese Reaktionskomponente nach einer anderen Reaktion



verbraucht. In solchen Fällen können sich offenbar die verschiedensten stationären Zustände einstellen, je nach den relativen Konzentrationen der Enzyme 1 und 2. Ein solcher Fall liegt vermutlich beim Umsatz des Kohlehydratphosphorsäureesters vor, welcher durch eine Phosphatase gebildet und durch eine Phosphatase wieder gespalten wird. Auch am Oxynitrilgleichgewicht, über das man Rosenthaler die ersten Angaben verdankt und das dann eingehend von Nordefeldt studiert wurde, sind offenbar mehrere Katalysatoren beteiligt; wir kommen darauf im 9. Kapitel zurück.

Ein sehr interessantes und präparativ wichtiges Beispiel für die Beeinflussung eines stationären Zustandes durch einen ein Reaktionsprodukt bindenden Stoff liegt in der Neubergschen Abfangemethode vor. Die nähere Bearbeitung dieses Verfahrens von reaktionskinetischen Gesichtspunkten aus würde sicher zu weiteren Aufschlüssen über den Gärungsmechanismus führen¹⁾.

In lebenden Zellen und Geweben wechseln Aufbau und Abbau eines Stoffes oft rasch miteinander ab. Besonders ist hier das Gleichgewicht der Hexosen mit Glykogen bzw. Stärke im lebenden Muskel und in der lebenden Pflanze zu erwähnen. Schon bei geringfügigen Variationen der Temperatur oder durch Narkose wird das Glykogen- bzw. Stärke-Gleichgewicht in hohem Grade beeinträchtigt.

Die verschiedenartige Weise, in welcher die Vorgänge des Aufbaues und des Abbaues in Pflanzenzellen auf äussere Einflüsse reagieren, kann — wie Verfasser²⁾ an anderer Stelle betont hat — auf die durchaus verschiedenartige Beschaffenheit der Medien zurück-

¹⁾ Siehe hiezu auch die Diskussion zwischen Wo. Ostwald und C. Neuberg in Biochem. Zs. Bd. 100; 1919.

²⁾ Euler, Pflanzenchemie. 1. Aufl., 1908, 2. Bd., S. 237.

geführt werden, in welchen Kondensationen und Hydrolysen verlaufen. Wir denken uns dabei den Katalysator und die reagierenden Stoffe zwischen dem wässrigen Zellsaft und das protoplasmatische Hydrosol verteilt. Im ersteren kann zufolge des grossen Wasserüberschusses die Hydrolyse sehr weit gehen; im lipoid- und proteinreichen Protoplasten löst sich aber verhältnismässig so wenig Wasser, dass bei einer bestimmten, erreichbaren Grösse der Zuckerkonzentration die (entgegengesetzt gerichteten) Reversionen vorherrschen.

Natürlich ist es für die Beurteilung von Zuständen, welche sich unter Mitwirkung von Enzymen einstellen, wichtig, sich über die Lage des natürlichen Gleichgewichtes orientieren zu können.

Nach dem Vorgang von van't Hoff¹⁾ kann man sich in manchen Fällen eine Vorstellung über die Lage des Gleichgewichtes aus der Wärmetönung der Reaktion verschaffen.

Enzymatische Vorgänge sind, wie im Kap. 8 gezeigt wird, meist von sehr kleiner Wärmetönung begleitet. Für derartige Umwandlungen liegt aber das Gleichgewicht bekanntlich einfach. „Die optischen Antipoden, welche kein Racemat bilden, sind hier wohl das ideale Beispiel, und theoretisch wie experimentell hat sich gezeigt, dass im festen Zustand beide Antipoden miteinander im Gleichgewicht sind und in Dampf, Schmelze und Lösung also die beiden Antipoden in gleicher Menge, eine inaktive Mischung bilden.“ Thermodynamisch lässt sich der Zusammenhang zwischen der Gleichgewichtskonstanten K, also dem Quotienten der Konzentrationen der beiden Antipoden und der Umwandlungsarbeit E so ausdrücken:

$$\ln K = -\frac{E}{2T} \dots \dots \dots (36)$$

Hier wird also $E = 0$, wenn $K = 1$.

Was nun bei optischen Antipoden streng zutrifft ist bei Reaktionen mit kleiner Wärmetönung noch annähernd der Fall, und das Gleichgewicht liegt unweit des für Thermoneutralität gültigen.

Eine Arbeit, welche van't Hoff²⁾ kurz vor seinem Tode in der Berliner Akademie veröffentlicht hat, behandelt das Glucosid-Gleichgewicht, das sich unter der Einwirkung von Emulsin einstellt. Die Messungen wurden zunächst an dem natürlichen Glucosid Salicin angestellt, in Gegenwart von festem Salicin und festem Saligenin. Das dilatometrisch ermittelte Ergebnis war, dass die Spaltung des Salicins praktisch vollständig verläuft; das Gleichgewicht war jedenfalls nicht messbar. [Auch Visser³⁾ hatte ja früher nur Andeutungen einer Synthese von Salicin erhalten.] Bei Arbutin und Äsculin war die Spaltung gleichfalls praktisch vollständig. Dagegen schien sich im System Glycerin-Glucose-Wasser-Glyceringlucosid ein messbarer Gleichgewichtszustand einzustellen.

„Versuche mit dem Molekularverhältnis zwischen Glucose und Glycerin

¹⁾ van't Hoff, Sitzungsber. Preuss. Akad. Wiss. 42, 1065; 1909.

²⁾ van't Hoff, Sitzungsber. Preuss. Akad. Wiss. 48, 963; 1910.

³⁾ Visser, Zs physik. Chem. 52, 257; 1905.

1:4 wurden mit steigender Wassermenge versetzt; ist dieselbe (im ganzen) in Molekülen b, und der umgewandelte Glucosebruchteil a, so entspricht:

$$\frac{\text{Glucosid} \times \text{Wasser}}{\text{Glucose} \times \text{Glycerin}} = \frac{a(b+a)}{(1-a)(4-a)}$$

Glucosidbildung fand nach van't Hoff noch statt für $b=15$ und $a=0,38$, was für K den Wert 2,6 brächte. Im molekularen Verhältnis würden sich hiernach Glycerin und Glucose bis zu etwa 70% umwandeln können.“ Hierzu macht Bourquelot (vgl. S. 320) aber mit Recht geltend, dass van't Hoff bei diesen Versuchen wohl überhaupt keine Glucosidbildung beobachten konnte, sondern dass vermutlich die Glucose zur Bildung einer Glucobiose Veranlassung gegeben hat.

C. Enzymatische Gleichgewichte.

Bei den nicht enzymatischen Hydrolysen, bei welchen durch die Salzbildung des Substrates mit der katalysierenden Säure eine Vermehrung der reaktionsvermittelnden Ionen eintritt (vgl. S. 133), ist die Konzentration der Verbindung Substrat-Katalysator so gering, dass weder die Konzentration des Substrates, noch (im allgemeinen) die des Katalysators dadurch erheblich geändert wird.

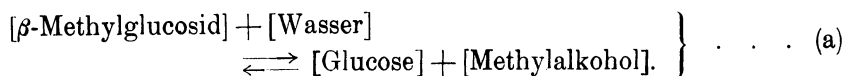
In enzymatischen Systemen wird ein prozentisch viel grösserer Anteil des Katalysators an das Substrat und die Reaktionsprodukte gebunden.

Auch bei der theoretischen Behandlung der durch Enzyme eingestellten Gleichgewichte muss die Affinität des katalysierenden Enzyms zu Substrat und Reaktionsprodukten zugrunde gelegt werden [Euler und Josephson¹⁾]. Das experimentelle Material, an welchem eine Theorie des enzymatischen Gleichgewichtes geprüft werden kann, ist bisher noch klein. Es standen hauptsächlich die von Bourquelot gewonnenen Versuchsergebnisse zur Verfügung, welche an Beobachtungen von Willstätter, Kuhn und Sobotka angeschlossen werden konnten. Im folgenden sei der Inhalt unserer einleitenden Mitteilung wiedergegeben.

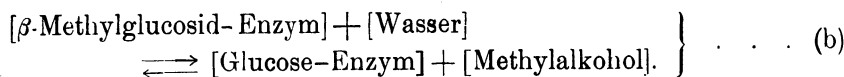
1. Gleichung für das enzymatische Gleichgewicht unter Berücksichtigung der Affinitäten des Enzyms zu den Reaktionskomponenten.

In nachstehenden Formeln, welche wir am Beispiel β -Methylglucosid entwickelt haben, schreiben wir vorläufig Glucose und meinen damit nur die an der Reaktion teilnehmende Form, in diesem Falle also β -Glucose. Auf den Übergang der mutameren Formen ineinander kommen wir später zurück. Für die nichtenzymatische Spaltung von β -Methylglucosid gilt folgende Reaktionsformel:

¹⁾ Euler und Josephson, H. 136, 30; 1924 und Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi 9, Nr. 7; 1924.



Betrachten wir dagegen die nach der bestehenden Auffassung an den enzymatischen Reaktionen teilnehmenden Stoffe, so gilt:



Ausserdem bestehen folgende Gleichgewichte:

$$\frac{[\text{Methylglucosid-Enzym}]}{[\text{Methylglucosid}] \cdot [\text{Enzym}]} = K_1, \dots (c)$$

$$\frac{[\text{Glucose-Enzym}]}{[\text{Glucose}] \cdot [\text{Enzym}]} = K_2. \dots (d)$$

Die Spaltung des Glucosids folgt der Geschwindigkeitsgleichung:

$$v_1 = k_1 [\text{Glucosid-Enzym}] \cdot [\text{Wasser}]. \dots (e)$$

Für die Synthese gilt:

$$v_2 = k_2 [\text{Glucose-Enzym}] \cdot [\text{Alkohol}]. \dots (f)$$

Der Fortschritt der Reaktion im System Glucosid, Glucose, Alkohol, Wasser, Enzym ist somit bestimmt durch den Ausdruck

$$\left. \begin{array}{l} \frac{dx}{dt} = v_1 - v_2 = k_1 [\text{Glucosid-Enzym}] \cdot [\text{Wasser}] \\ \quad - k_2 [\text{Glucose-Enzym}] \cdot [\text{Alkohol}]. \end{array} \right\} \dots (g)$$

Aus den Gleichungen (c) und (d) führen wir die Konzentrationen des Glucosids bzw. der Glucose ein und erhalten:

$$\left. \begin{array}{l} \frac{dx}{dt} = k_1 \cdot K_1 \cdot [\text{Glucosid}] \cdot [\text{Enzym}] \cdot [\text{Wasser}] \\ \quad - k_2 \cdot K_2 [\text{Glucose}] \cdot [\text{Enzym}] \cdot [\text{Alkohol}]. \end{array} \right\} \dots (h)$$

Beim Gleichgewicht ist $\frac{dx}{dt} = 0$ und somit

$$\frac{k_1}{k_2} = \frac{K_2 [\text{Glucose}] \cdot [\text{Alkohol}]}{K_1 [\text{Glucosid}] \cdot [\text{Wasser}]} = K. \dots (i)$$

Diese Gleichung (i) zeigt, dass das enzymatische Gleichgewicht im allgemeinen mit dem nicht-enzymatischen (natürlichen) Gleichgewicht nicht streng identisch ist¹⁾. Nur wenn $K_1 = K_2$, fallen die beiden Gleichgewichtslagen zusammen.

2. Prüfung der Gleichgewichtsgleichungen am System β -Methylglucosid, Glucose, Methylalkohol und Wasser.

Bourquelot hat gezeigt, dass sowohl bei der Spaltung als bei der Synthese des β -Methylglucosides dieselbe Gleichgewichtslage erreicht wird. Die Geschwindigkeit der beiden entgegengesetzten Reaktionen wurden bei einem Gehalt von 30,2% Methylalkohol in der Reaktionsmischung gemessen. Bourquelots Versuchsziffern waren folgende:

¹⁾ Siehe hierzu Euler, Arkiv f. Kemi 9, Nr. 13; 1924.

Synthese.

1 g Glucose pro 100 ccm.

Zeit in Tagen	Drehung	Drehungsänderung
0	+64'	0'
1	+58	6
2	+48	16
4	+40	24
8	+28	36
13	+16	48
18	+12	52
	(Endwert)	

Hydrolyse.

1,077 g Glucosid pro 100 ccm.

Zeit in Tagen	Drehung	Drehungsänderung
0	-42'	0'
1	-36	6
2	-26	16
4	-18	24
8	- 6	36
13	+ 6	48
18	+10	52
	(Endwert)	

Offenbar ist die Geschwindigkeit für die Synthese dieselbe wie für die Hydrolyse. Für die Gleichgewichtslage ergibt sich also:

$$K = k_1 : k_2 = 1.$$

Die Lage des Gleichgewichts wird aus nebenstehender Figur 44 ersichtlich. Zur Prüfung dieser Beziehung drücken wir die Konzentrationen der an der Reaktion teilnehmenden Stoffe in g Mol/Liter aus. In der folgenden Tabelle sind die aus der Bourquelotschen Kurve von Josephson berechneten molekularen Konzentrationen der am Gleichgewicht teilnehmenden Stoffe angegeben. In der letzten Spalte findet man die berechneten Werte K' des Ausdrucks

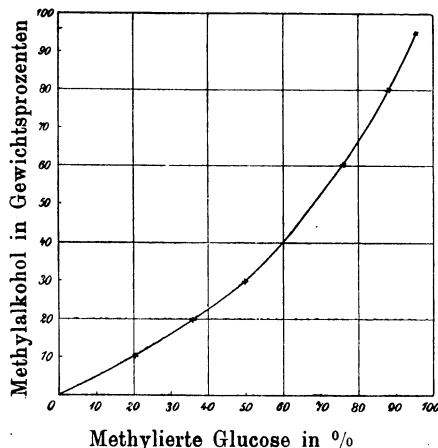


Fig. 44.

$$[\text{Alkohol}] \cdot [\text{Glucose}] = K' \cdot [\text{Wasser}] \cdot [\text{Glucosid}].$$

Konzentration des Methylalkohols		Konzentration des Wassers	Konzentration der Glucose	Konzentration des Glucosids	K'
%	Norm.	Norm.	Norm.	Norm.	
10	3,13	49,4	0,0439	0,0116	0,240
20	6,25	43,8	0,0355	0,0200	0,253
30	9,38	38,3	0,0278	0,0277	0,246
40	12,50	32,7	0,0216	0,0339	0,244
50	15,63	27,2	0,0172	0,0383	0,258
60	18,75	21,7	0,0133	0,0422	0,272
70	21,88	16,1	0,0100	0,0455	0,299
80	25,00	10,6	0,0067	0,0488	0,324
90	28,13	5,0	0,0033	0,0522	0,356

Die Übereinstimmung zwischen den verschiedenen Werten für K' ist, wie ersichtlich, auffallend gut bis zu einem Alkoholgehalt von etwa 50%. Dann beginnen jedoch die Werte für K' langsam mit dem Alkoholgehalt zu steigen. Nun treten in so starken Alkohollösungen veränderte Verhältnisse ein, indem das Enzym mehr und mehr inaktiviert wird; dadurch kann der Endzustand geändert werden, indem ein falsches Gleichgewicht erreicht wird. Betrachten wir nur die Versuche bei den niederen Alkoholkonzentrationen, so können wir den Wert 0,25 als Mittelwert für K' annehmen. Dieser Wert unterscheidet sich, wie ersichtlich, bedeutend von der aus den Geschwindigkeiten der beiden Reaktionen hergeleiteten Gleichgewichtskonstanten K , welche ja 1 sein soll. Nach unseren Voraussetzungen soll also die Affinität der β -Glucosidase zur Glucose etwa 4mal so gross sein, wie die Affinität zum Methylglucosid.

Gegen vorstehende Berechnung könnte eingewendet werden, dass es ja nur die β -Glucose ist, die an der Reaktion teilnimmt, und dass der angewandte Wert für die Konzentration der Glucose den wirklichen Verhältnissen nicht entspricht. Wir haben in diesem Falle vorläufig mit der ganzen Glucosekonzentration gerechnet. Wie aus den angeführten Werten der Reaktionsgeschwindigkeit für sowohl die Synthese wie Hydrolyse ersichtlich ist, gehen diese Reaktionen im Verhältnis zur Mutarotation äusserst langsam vor sich. Aus diesem Grunde muss auch die α -Glucose als an der Reaktion teilnehmend betrachtet werden. Wenn nämlich ein kleiner Teil der β -Glucose durch Bildung von Glucosid verschwindet, wird unmittelbar wieder β -Glucose gebildet durch das, im Vergleich mit dem langsamen Verlauf der Hauptreaktion, schnelle Einstellen des Gleichgewichts α -Glucose \rightleftharpoons β -Glucose. Wir können also die α -Glucose als eine Quelle betrachten, aus welcher β -Glucose für die betreffende Reaktion entnommen werden kann. Als den richtigsten Wert für $[Glucose]$ nehmen wir in diesem speziellen Fall (Mutarotationsgeschwindigkeit viel grösser als die Geschwindigkeit der Hauptreaktion) die totale Glucosekonzentration an.

Leider kennen wir nun nicht die Affinitäten zwischen der von Bourquelot angewandten β -Methylglucosidase und den reagierenden Stoffen. Wir können indessen mit ziemlich grosser Wahrscheinlichkeit das Verhältnis zwischen diesen Affinitäten berechnen mit Hilfe der von Willstätter, Kuhn und Sobotka¹⁾ ausgeführten Untersuchungen über die β -Glucosidase. Wie aus der obigen Formel (i) für das enzymatische Gleichgewicht hervorgeht, brauchen wir die absoluten Beträge der Affinitätskonstanten nicht zu kennen, sondern nur deren Verhältnis unter sich. Höchst wahrscheinlich variiert dieses Verhältnis in nicht allzu hohem Grade von Enzympräparat zu Enzympräparat. Die letztgenannten Forscher haben indessen die Affinitätskonstanten zwischen einerseits Emulsinpräparaten verschiedenen Ursprungs und andererseits verschiedenen Glucosiden wie Salicin, Phenylglucosid und β -Methylglucosid berechnet. Ausserdem liegen Versuche vor von Kuhn²⁾ über die Hemmung der Wirkung der Salicinase bei Zusatz der beiden verschiedenen Formen von Glucose. Nun scheinen diese verschiedenen Glucosidspaltungen nach Willstätter und Kuhn in Wirklichkeit von einem und demselben

¹⁾ Willstätter, Kuhn und Sobotka, Zs f. physiol. Chem. 129, 33; 1923.

²⁾ Kuhn, Zs f. physiol. Chem. 127, 234 und zwar 240; 1923.

Enzym (Salicinase = β -Phenylglucosidase = β -Methylglucosidase) bewirkt zu werden. Aus diesen verschiedenen Resultaten können wir also das Verhältnis zwischen den verschiedenen Affinitäten für das betreffende Enzym berechnen, das wir β -Methylglucosidase nennen können, ohne Rücksicht auf das spezielle Glucosid.

Die folgenden Affinitätskonstanten sind von Willstätter, Kuhn und Sobotka bestimmt:

Substrat	Enzympräparat			
	a	b	c	d
Salicin	29	29	24	25 (59) ¹⁾
β -Phenylglucosid . .	15	25	—	—
β -Methylglucosid . .	1,7	2,5	1,5	0,9

Die Präparate waren dargestellt:

- a) aus bitteren Mandeln,
- b) Emulsin „Merck“,
- c) aus Aprikosenkernen,
- d) aus süßen Mandeln.

Wenn wir den letzten Versuch mit dem Enzympräparat d weglassen, bei welchem andere Enzymmengen als in den anderen Versuchen verwendet wurden (vgl. Willstätter, Kuhn und Sobotka), wodurch in diesem Falle die Versuche nicht ganz vergleichbar sind, finden wir, dass die Affinitäten zwischen Enzym und Salicin bzw. Methylglucosid sich zueinander verhalten wie 17:1, 12:1 und 16:1, also: das Verhältnis für diese Präparate variiert nur unwesentlich.

Für die Berechnung des Verhältnisses der Affinitäten zu einerseits β -Glucose und andererseits β -Methylglucosid können wir uns der Kuhnschen Versuche bedienen¹⁾. Mit Emulsin „Merck“ bestimmte Kuhn die Spaltungsgeschwindigkeit in einer 0,025 n-Salicinlösung, teils ohne, teils mit 0,055 n- β -Glucose. Kuhns Versuchsergebnisse waren folgende:

Salicin. 0,025 n.			Salicin. 0,025 n + β -Glucose 0,055 n.		
Min.	Spaltung %	k 10 ⁴	Min.	Spaltung %	k 10 ⁴
2,3	—	—	2,6	—	—
11,7	5,7	22,2	11,8	4,8	18,7
24,4	11,4	21,7	22,0	8,0	16,8
33,5	17,1	24,5	30,7	12,2	18,6
Mittel:		22,8	Mittel:		18,0

Wir sehen, dass die Spaltungsgeschwindigkeit auf Grund der Gegenwart von Glucose herabgesetzt war im Verhältnis 22,8:18,0 = 1,27:1. Hieraus können wir die Affinität des Enzyms zur β -Glucose berechnen, da wir die

¹⁾ Siehe die Originalmitteilung.

Affinitätskonstante zum Salicin kennen. Für Emulsin „Merck“ war $K_M = 29$ ($K_m = 0,035$). Die Berechnung von K_m für β -Glucose-Enzymverbindung, stellt sich nach Michaelis und Menten¹⁾ folgendermassen:

Sind v_0 und v die beiden Anfangsgeschwindigkeiten, φ_0 und φ die entsprechenden Konzentrationen der Glucosid-Enzymverbindung, so ist $v_0 : v = \varphi_0 : \varphi$.

Wenn sich nun die Enzymmenge Φ zwischen der Glucosidmenge M und der Glucosemenge G verteilt, und wenn φ die Konzentration der Glucosid-Enzymverbindung und ψ die der Glucose-Enzymverbindung ist, so ist nach dem Massenwirkungsgesetz

$$\begin{aligned} M(\Phi - \varphi - \psi) &= K_m \cdot \varphi \\ G(\Phi - \varphi - \psi) &= K'_m \psi \end{aligned}$$

wo K_m und K'_m die Dissoziationskonstanten sind.

Aus diesen beiden Gleichungen folgt durch Elimination von ψ

$$K'_m = \frac{G \cdot K_m}{M \left(\frac{\Phi}{\varphi} - 1 \right) - K_m} \dots \dots \dots (k)$$

$\frac{\Phi}{\varphi}$ erhält man auf folgende Weise: Macht man einen Parallelversuch ohne Glucose, so habe dieser die Anfangsgeschwindigkeit v_0 und die Konzentration der Glucosid-Enzymverbindung sei φ_0 ; im eigentlichen Hauptversuch mit Glucose seien diese beiden Grössen gleich v bzw. φ , so ist $v : v_0 = \varphi : \varphi_0$

$$\text{und } \varphi = \frac{v}{v_0} \cdot \varphi_0.$$

In dem glucosefreien Kontrollversuch ist nun

$$\varphi_0 = \Phi \cdot \frac{M}{M + K_m} \text{ und so wird } \varphi = \frac{v}{v_0} \cdot \Phi \cdot \frac{M}{M + K_m}$$

oder

$$\frac{\Phi}{\varphi} = \frac{v_0}{v} \cdot \frac{(M + K_m)}{M}$$

und schliesslich durch Einsetzen dieses Wertes in (k)

$$K'_m = \frac{G \cdot K_m}{(M + K_m) \left(\frac{v_0}{v} - 1 \right)} \dots \dots \dots (l)$$

Bei Kuhns Versuchen gingen folgende Ziffern in die Formel (l) ein:

$$G = 0,055$$

$$K_m = 0,035$$

$$M = 0,025$$

$$v_0 : v = 1,27.$$

¹⁾ Michaelis und Menten, Biochem. Zs 49, 333; 1913.

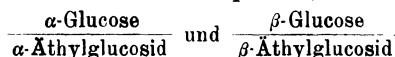
Durch Einsetzen dieser Werte in Formel (1) finden wir somit

$$K_m' = \frac{0,055 \cdot 0,035}{0,060 \cdot 0,27} = 0,12.$$

Die Affinitätskonstante $K_M = 1/K_m$ der Glucose-Enzymverbindung beträgt somit 8,3.

Für dasselbe Enzympräparat, nämlich Emulsin „Merck“, war für die β -Methylglucosid-Enzymverbindung $K_M = 2,5$. Wir finden somit, dass das Verhältnis zwischen den beiden Affinitätskonstanten $8,3 : 2,5 = 3,3$ ist, während wir früher gefunden haben, dass für das von Bourquelot angewandte Enzympräparat dasselbe Verhältnis ca. 4 sein sollte. Wäre das Verhältnis zwischen den beiden Affinitätskonstanten bei den Bourquelotschen β -Glucosidasepräparaten auch 3,3, so würde die Gleichgewichtskonstante für das untersuchte enzymatische Gleichgewicht den Wert $0,25 \cdot 3,3 = 0,83$ annehmen. Die Abweichung von dem aus den Reaktionsgeschwindigkeiten berechneten Werte 1 ist ja ziemlich unwesentlich und kann auf den Verschiedenheiten der Enzympräparate beruhen. Natürlich ist zur endgültigen Prüfung der Theorie eine eingehende Untersuchung über das enzymatische β -Methylglucosid-Gleichgewicht erforderlich und ist auch bereits hier im Gange.

Sehr interessant ist der Befund von Bourquelot, dass die Gleichgewichtswerte:



sich wesentlich voneinander unterscheiden. Siehe 9. Kap.

3. Beziehung zwischen den Affinitätskonstanten eines Enzyms zum Substrat und zu den Reaktionsprodukten.

Der von einigen Forschern als realisiert angesehene, experimentell nicht erwiesene Fall, dass ein Stoff durch einen enzymatischen Katalysator gespalten, durch einen anderen synthetisiert wird, wäre im Sinne der hier vertretenen Grundannahme, dass jede enzymatische Reaktion durch eine Verbindung der reagierenden Molekülart mit dem Enzym bedingt ist, nach den im vorhergehenden erwähnten Voraussetzungen nicht prinzipiell ausgeschlossen.

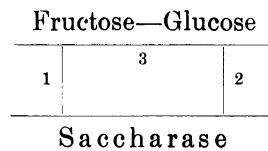
Formell würde sich folgende Konsequenz ergeben: Sei $AB + H_2O \rightleftharpoons BOH + AH$ die umkehrbare Reaktion, so würde ein ausschliesslich spaltendes Enzym nur zu AB eine Affinität besitzen, ein ausschliesslich synthetisierendes Enzym nur zu BOH und zu AH. Man könnte dann, je nach Zusatz wechselnder relativer Mengen der beiden Enzyme beliebige Endzustände (falsche Gleichgewichte) herstellen. Schon in der zweiten Auflage S. 218 wurde betont, dass diese Folgerung aus allgemeinen Gesichtspunkten nicht befriedigend ist.

Die Zwei-Enzym-Theorie könnte nur aufrecht erhalten werden, wenn es gelänge, Enzympräparate zu bereiten, welche z. B. das nunmehr bekannte Ester- oder Methylglucosid-Gleichgewicht nur von einer Seite aus — synthetisierend oder spaltend — herstellen, wenn also eine Scheidung des ev. Enzymgemisches in seine beiden hypothetischen Komponenten gelänge. Eine solche Scheidung ist durch partielle Inaktivierung von Bourquelot an Glucosidasen ohne Erfolg versucht worden. Auch die Acidität der Lösung scheint auf Synthese und Hydrolyse von Glucosiden in gleicher Weise einzuwirken, was ebenfalls gegen die Existenz zweier Enzyme spricht¹⁾.

¹⁾ Bourquelot und Aubry, C. r. 160, 742 und 161, 184; 1915.

Die eingehendere Behandlung enzymatischer Reaktionen führt nun zur Folgerung, dass in dem durch ein Enzym katalysierten System $AB \rightleftharpoons A + B$ die Affinitäten des Enzyms zu AB, A und B voneinander nicht unabhängig sind¹⁾.

Am Beispiel der Rohrzuckerinversion hat Verf. kürzlich entwickelt, dass wir uns die experimentell gemessene Affinität zwischen Rohrzucker und Saccharase nicht von einer zwischen je einer Stelle des Enzyms und Substrates bestehenden Bindung veranlasst zu denken haben, sondern dass die Affinitätskonstante K_M sich zusammensetzt aus zwei solchen Konstanten, die das Mass von zwei getrennt wirkenden Affinitätskräften sind. Die Auffassung ist durch folgendes Schema zum Ausdruck gebracht worden:



Die durch die Michaelissche Konstante K_M gemessene Affinität betrifft also nicht etwa die Bindung des Rohrzuckers an die Stelle der Aufspaltung²⁾, sondern enthält zwei Affinitätskonstanten K_M^1 und K_M^2 entsprechend zwei Bindungen, von welchen die eine zum Fructose-, die andere zum Glucoserest geht. Tritt dann, etwa an der Stelle 3, die Spaltung ein, so bleiben Fructose und Glucose nach Massgabe ihrer eigenen (schon früher gemessenen) Affinität zum Teil am Enzym. Die Konstante K_M ist, wie ersichtlich, eine Funktion der beiden Konstanten K_M^1 und K_M^2 ; die drei Konstanten können unter keinen Umständen voneinander unabhängig werden, sondern sie nehmen von Präparat zu Präparat miteinander ab und zu³⁾. Bei Berechnung der Konzentration der reaktionsvermittelnden Moleküle resp. Ionen, r_i , sind K_M^1 und K_M^2 zu berücksichtigen.

Unentbehrlich scheint diese Erweiterung der Auffassung von der Affinität zwischen Enzym und Substrat für die Behandlung reversibler Reaktionen und enzymatischer Gleichgewichte. Offenbar wird für den einfachsten Fall, dass $K_M = K_M^1 \cdot K_M^2$ ist, das „natürliche“ Gleichgewicht durch das Enzym nicht geändert. Zunächst dürfte sich die genannte Auffassung für die Glucosid-Gleichgewichte verwerten lassen, welche hier durch K. Josephson bearbeitet werden. Weitere Prüfungen am Lipase-Gleichgewicht⁴⁾ und am Gleichgewicht Harnstoff \rightleftharpoons Ammoniumcarbonat (vgl. S. 324) auf Grund der Affinität der Urease zu Harnstoff, NH_4^+ und CO_3^{2-} sind ebenfalls im Gange.

¹⁾ Euler, Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi 9, Nr. 13; 1924.

²⁾ Euler und Josephson, H. 133, 279; 1924.

³⁾ Siehe hierzu auch Kuhn, H. 129, 57; 1924 sowie Willstätter, Kuhn und Sobotka, H. 129, 33; 1924.

⁴⁾ Siehe die Bemerkungen von Euler und Josephson (H. 136, 30 und zwar 42, 1924), wo auch auf den Einfluss der Acidität auf das Gleichgewicht hingewiesen ist.

D. Enzymatische Synthesen.

van't Hoff's¹⁾ 1898 ausgesprochene Vermutung, dass Enzyme auch chemische Synthesen auszuführen bzw. zu beschleunigen vermögen, ist bald durch zahlreiche Versuche bewiesen worden.

Schon im gleichen Jahr war es bekanntlich Croft Hill²⁾ gelungen, die synthetische Wirkung eines Hefenzyms auf Glucose nachzuweisen. Croft Hill beobachtete, dass ein Hefenmaltase enthaltendes Präparat während monatelanger Einwirkung auf eine 40%ige Glucoselösung bei 30° das Reduktions- und Drehungsvermögen derselben im Sinne einer Maltosebildung ändert. Bald darauf behauptete indessen Emmerling³⁾, dass der von Croft Hill beobachtete Effekt nicht auf der Bildung von Maltose, sondern von Isomaltose und von dextrinartigen Produkten beruht. Isomaltose selbst wird durch Maltase nicht wieder gespalten.

Einen ähnlichen Fall beschrieben E. Fischer und E. F. Armstrong⁴⁾. Kefirlactase soll aus Galaktose und Glucose nicht Lactose synthetisieren, sondern Isolactose, welche letztere durch Kefirlactase nach Angabe der genannten Forscher nicht zerlegt wird. Die enzymatische Synthese der Lactose erfordert nach Pringsheims neueren Ergebnissen (vgl. S. 320) ein wiederholtes Studium.

Eine Angabe von E. F. Armstrong⁵⁾ schien schliesslich Emmerlings oben erwähnten Befund zu ergänzen: Emulsin, welches Isomaltose spaltet, soll nach Armstrong Glucose zu Maltose synthetisieren.

Die oben erwähnten Daten haben Armstrong zu der Verallgemeinerung veranlasst, dass „Enzyme gerade diejenigen Moleküle aufbauen, welche sie nicht zu spalten vermögen.“ Nach den während der letzten 20 Jahren gewonnenen Tatsachen kann diese Hypothese aber nicht mehr aufrecht erhalten werden.

Wie im Kapitel 9 gezeigt werden wird, handelt es sich bei synthetischen Enzymwirkungen in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle um asymmetrische Synthesen. Da das Kapitel 9 die asymmetrischen Reaktionen speziell behandelt; so soll hier nur eine Zusammenstellung derjenigen Vorgänge gegeben werden, bei welchen Synthesen überhaupt beobachtet sind, ohne Rücksicht auf die sterischen Verhältnisse bzw. auf die Asymmetrie der entstehenden Produkte.

1. Synthesen von Estern und Fetten.

Äthylbutyrat entsteht aus Buttersäure und Äthylalkohol durch Pankreaslipase⁶⁾. Auch Glycerinbutyrat bildet sich aus den Komponenten⁷⁾ und ebenso Amylbutyrat (Bodenstein und Dietz, vgl. S. 296).

¹⁾ van't Hoff, *Zs anorg. Chem.* 18, 1; 1898.

²⁾ Croft Hill, *Jl Chem. Soc.* 73, 634; 1898.

³⁾ Emmerling, *Chem. Ber.* 34, 600 und 2207; 1901.

⁴⁾ Fischer und Armstrong, *Chem. Ber.* 35, 3144; 1902.

⁵⁾ E. F. Armstrong, *Proc. Roy. Soc. B* 73, 516; 1904.

⁶⁾ Kastle und Loevenhart, *Amer. Chem. Jl* 24, 491; 1900.

⁷⁾ Hanriot, *C. r.* 132, 112; 1901.

Glycerintriacetat entsteht aus den Komponenten durch Ricinuslipase¹⁾ (vgl. S. 297–298), welche auch Fette bzw. Öle synthetisiert²⁾.

H. E. Armstrong und Gosney³⁾ haben mit Ricinuslipase und Lipase von *Chelidonium majus* das Gleichgewicht zwischen Glycerin und den Fettsäuren des Olivenöls studiert und sich besonders mit der Frage beschäftigt, ob Neutralfette oder Mono- und Diglyceride im Gleichgewicht vorhanden sind; sie halten es für nicht unwahrscheinlich, dass ein Diglycerid das Hauptprodukt bildet (Proc. Roy. Soc. 88 S. 186).

Mit *Chelidoniumlipase* hat Bournot⁴⁾ mehrere Ester dargestellt, so Ölsäure-Isobutylester, Palmitinsäure-Äthylester, Myristinsäure-Amylester.

Ausführliche Versuche über die Esterbildung aus Methylalkohol und Ölsäure durch Pankreaslipase verdankt man Pottevin⁵⁾.

Auf die Synthese eines wirklichen Fettes beziehen sich folgende Versuche. Sie geben über den Einfluss der angewandten Wassermenge Aufschluss.

40 g Ölsäure + 3 g Pankreaspulver.	
Versuchsdauer 20 Tage. Temp. = 33°.	
Angewandt	Esterifiziert
130 g Glycerin + 0 g Wasser	3 %
120 " " + 10 " "	77
110 " " + 20 " "	64
100 " " + 30 " "	51
64 " " + 66 " "	20
28 " " + 102 " "	5
8 " " + 122 " "	0

Synthesen von Fetten aus höheren Fettsäuren und Glycerin wurden ferner von Welter⁶⁾ beschrieben.

Hamsik⁷⁾ hat mit Organpulvern von Rind, Hund usw. Versuche angestellt, positive Resultate aber nur mit Leber von Rind und Lunge von Hund erhalten.

Über asymmetrische Wirkungen der Lipasen siehe 9. Kapitel.

2. Synthese von Glucosiden⁸⁾ und Galaktosiden.

Nachdem die Untersuchungen von Visser (1907) und auch diejenigen von van't Hoff (1912 von Bayliss wiederholt) zu keinen endgültigen

¹⁾ Taylor, JI Biol. Chem. 2, 87; 1906.

²⁾ S. Iwanow, Bot. Ber. 29, 595; 1911.

³⁾ H. E. Armstrong und Gosney, Proc. Roy. Soc. B. 86, 589; 1913 und 88, 176; 1915.

⁴⁾ Bournot, Biochem. Zs 52, 172; 1913.

⁵⁾ Pottevin, Bull. Soc. Chim. 35, 693; 1906

⁶⁾ Welter, Zs angew. Chem. 24, 385; 1911.

⁷⁾ Hamsik, H. 90, 489; 1914.

⁸⁾ Eine sehr lehrreiche kurze Darstellung der neueren Biochemie der Glucoside hat M. Bergmann in den Naturwissenschaften (10, 838; 1922) gegeben. — Im übrigen sei auf die ausgezeichnete Monographie von E. F. Armstrong (The simple Carbohydrates and the Glucosides, 4. Aufl. 1924) verwiesen.

Ergebnissen geführt hatten, wurde die Aufgabe in grösserem Umfang von Bourquelot und seinen Mitarbeitern, besonders Bridel und Hérissé in Angriff genommen und in einer Reihe von ausgezeichneten Untersuchungen entscheidend gefördert¹⁾.

Schon 1914 konnte Bourquelot (l. c.) folgendes Verzeichnis der enzymatisch synthetisierten Glucoside der β -Serie (vgl. Kap. 9) angeben²⁾:

Aliphatische Reihe.	Cyklische Reihe.
Methyl-Glucosid β	Benzyl-Glucosid β
Äthyl-Glucosid	Phenyläthyl-Glucosid
Propyl-Glucosid	Cinnamyl-Glucosid
Isopropyl-Glucosid	o-Oxybenzyl-Glucosid
Butyl-Glucosid	o-Methoxybenzyl-Glucosid
Isobutyl-Glucosid	m-Nitrobenzyl-Glucosid
Isoamyl-Glucosid	p-Methoxybenzyl-Glucosid
Allyl-Glucosid	Naphthyl-Glucosid
Geranyl-Glucosid	Cyklohexanyl-Glucosid
Glycyl-mono-Glucosid	o-Methylecyklohexanyl-Glucosid
Glycyl-di-Glucosid	Thymotinyl-Glucosid
α -Oxypropyl-Glucosid	o-, m-, p-Xylylglycyl-mono-Glucosid.
Glyceryl-mono-Glucosid.	

Seitdem ist besonders durch Bourquelot und durch E. Fischer und ihre Mitarbeiter noch eine grosse Anzahl von Glucosiden ein- und mehrwertiger aliphatischer und aromatischer Alkohole dazugekommen, deren Aufzählung hier zu weit führen würde. Erwähnt sei nur, dass diese biochemischen Glucosidsynthesen Bourquelot und seine Mitarbeiter auch zur Entdeckung zahlreicher natürlicher Glucoside geführt haben.

Ebenso ist es Bourquelot gelungen, eine grosse Reihe von α -Glucosiden enzymatisch zu synthetisieren³⁾. Besonders genannt seien die Glucoside der einwertigen Radikale: Propyl, Allyl, Butyl und Isobutyl. Ferner haben Bourquelot, Bridel und Aubry⁴⁾ die α -Glucoside des Glykols, des Isopropylglykols und des Glycerins dargestellt. — Betreffend Glyceringlucoside siehe auch Karrer (Helv. 5, 864; 1922).

Als Beispiel für die Methodik sei folgende Darstellung von α -Methylglucosid angegeben.

Die Lösung der α -Glucosidase wird dargestellt durch 24stündiges Macerieren von 10 Teilen getrockneter Unterhefe mit 200 Teilen Toluol-gesättigtem Wasser, worauf filtriert wird.

¹⁾ Bourquelot und Bridel, Ann. de Chim. (8) 28, 145; 1913. — Siehe die von Bourquelot gegebene Übersicht über die enzymatischen Synthesen von Glucosiden und besonders Biosen in Rev. gén. Sci. pures et appl. 31, 745; 1920.

²⁾ Bourquelot, JI de Pharm. et de Chim. (7) 10, 361 und 393; 1914.

³⁾ Bourquelot, Hérissé und Bridel, C. r. 156, 491; 1913. — Bourquelot, Ann. de Chim. (9) 3, 287; 1915.

⁴⁾ Bourquelot, Bridel und Aubry, C. r. 161, 41; 1915 (Glycerin). — Bourquelot, Ann. Chim. (9) 4, 310, 1915.

Andererseits bereitet man eine 10prozentige wässrige Glucoselösung.

Diese beiden Flüssigkeiten werden gemischt und dann mit Wasser und Alkohol nach folgender Vorschrift versetzt:

Hefenextrakt	200 ccm
Glucoselösung	100
Dest. Wasser	450
Methylalkohol, 99,5%	200
Dest. Wasser	ad 1000

Die Lösung enthielt also in 100 ccm 20 ccm = 16 g reinen Methylalkohol. Sie wird bei Zimmertemperatur (15°–18°) sich selbst überlassen und von Zeit zu Zeit umgeschüttelt. Folgende Drehungen wurden beobachtet:

Tage:	0	3	6	9	15
Drehung:	+ 1°4'	1°32'	1°50'	2°2'	2°12'

also eine Drehungsänderung von 68', entsprechend der Umwandlung von 48,5% der Glucose im Methylglucosid.

Die Flüssigkeit wird filtriert und dann nach Zusatz von etwas Calciumcarbonat aufgekocht. Man filtriert von neuem, dunstet unter vermindertem Druck auf 200 ccm ein und fügt nach Abkühlung 2 g frischer Bäckerhefe zu, um die nicht in Methylglucosid verwandelte Glucose zu vergären.

Die unmittelbar eintretende Gärung dauert 18–20 Stunden. Man filtriert, kocht auf, setzt etwas Calciumcarbonat zu und dunstet im Vakuum ein. Der Rückstand wird mit 400 ccm wasserfreiem Essigäther unter Rückfluss gekocht. Man filtriert und lässt das Filtrat bei Zimmertemperatur stehen. Über Nacht haben sich lange prismatische, farblose Nadeln abgesetzt, deren Gewicht nach Trocknen über Schwefelsäure 1,2 g beträgt. Neue Extraktionen liefern noch etwa 2 g. Smp. + 166°. $[\alpha]_D^{15} = +156,8^\circ$.

Einige Zahlen mögen die Lage des Gleichgewichtes veranschaulichen:

Alkoholgehalt in g } per 100 ccm Lösung	10	12	14	16	18	20	22	24
Methylierte Glucose in } % der Gesamt-Glucose	45	45	50,2	54,0	59,0	59,6	60,1	54,0

(Von 24 g Alkohol an macht sich die zerstörende Wirkung auf die Glucosidase bemerkbar.)

Bemerkenswert ist der Nachweis, dass die gefundene Gleichgewichtslage in verdünnten Glucoselösungen von der Konzentration der Glucose unabhängig ist, wie es die Theorie fordert.

Bei nicht zu geringem Enzymzusatz wurde die Gleichgewichtslage auch von der anwesenden Menge α -Glucosidase unabhängig gefunden.

Sehr beträchtlich ist der Einfluss der Natur des Alkohols, wie die folgende Tabelle zeigt:

Alkohol	Alkoholgehalt (in g per 100 ccm) beim Maximum an Glucosid	Umgesetzte Menge Glucose in %
Methylalkohol	22	60,1
Äthylalkohol	20	32,6
Propylalkohol	16	19,4
Allylalkohol	13–14	19,4

Beim Butylalkohol und Isobutylalkohol macht sich die zerstörende Wirkung auf da Enzym schon in geringen Konzentrationen bemerkbar.

Unter den β -Glucosiden mehrwertiger Alkohole, welche Bour-

quelot synthetisiert hat, sei ein Glykol- β -Glucosid erwähnt¹⁾, sowie ein primäres und ein sekundäres β -Glucosid des Glycerins²⁾.

Bourquelot und Bridel³⁾ haben auch auf wässrig-alkoholische Lösungen von Glucose α - und β -Glucosidase gleichzeitig einwirken lassen und erzielten gleichzeitige Bildung von α - und β -Methylglucosid. Sie haben diesen bemerkenswerten Versuch einer Berechnung unterzogen, welche im II. Teil, 6. Kap., B. eingehender mitgeteilt ist. Es ist von besonderem Interesse, durch weitere Experimente festzustellen, unter welchen Bedingungen die in Bourquelots Berechnung eingehenden Voraussetzungen zutreffen, um so mehr, als durch neue Versuche von J. Hatano⁴⁾ nachgewiesen ist, dass in gewissen Mikroorganismen und natürlichen Präparaten z. B. Takadiastase⁵⁾, beide Glucosidasen zugleich vorkommen. Offenbar handelt es sich hier nicht nur um die Reaktionsgeschwindigkeiten der beiden Synthesen, welche übrigens ein verschiedenes Aciditätsoptimum besitzen, sondern auch um die Umwandlungsgeschwindigkeit α -Glucose \rightleftharpoons β -Glucose, d. h. um die Geschwindigkeit, mit welcher die durch die beiden Glucosidsynthesen verbrauchten Glucose-Formen aus der Gleichgewichtsglucose nachgeliefert werden können.

Zahlreiche Galaktoside (des Methyl-, Äthyl-, Propyl-, Isobutyl-, Allyl-, Benzyl-, Salicyl-Alkohols u. a.) hat Bourquelot in Gemeinschaft mit Hérissé, Aubry und Bridel enzymatisch dargestellt⁶⁾, und zwar solche der α -Serie mittels α -Galaktosidase aus Unterhefe, diejenigen der β -Serie mittels β -Galaktosidase aus Emulsin.

Hérissé⁷⁾ ist neuerdings auch die biochemische Synthese von Alkyl- α -Mannosiden gelungen, und zwar konnte mit Mannose ausser Methylalkohol noch n-Propylalkohol, Isopropylalkohol und n-Butylalkohol kombiniert werden.

3. Synthese von Hexose-Phosphorsäure-Estern.

Die ausserordentlich interessante Synthese des von Harden und Young als Zwischenprodukt der alkoholischen Gärung nachgewiesenen Hexose-diphosphorsäure-esters (Zymophosphats) $C_6H_{10}O_4(PO_4H_2)_2$ ist eng mit anderen Teilreaktionen der alkoholischen Gärung verknüpft (vgl. S. 335) und wird im speziellen Teil, II, 3, ausführlich besprochen. Hier sei nur auf folgende Tatsachen hingewiesen:

¹⁾ Bourquelot und Bridel, C. r. 158.

²⁾ Bourquelot, Ann. de Chim. (9) 4, 310; 1915.

³⁾ Bourquelot und Bridel, Jl de Pharm. et de Chim. (7) 9, 104, 155, 230; 1914. — 10, 361, 393; 1914.

⁴⁾ J. Hatano, Biochem. Zs 151, 501; 1924.

⁵⁾ Siehe auch Y. Hattori, Biochem. Zs 150, 150; 1924.

⁶⁾ Bourquelot, Hérissé und Aubry, Jl de Pharm. et de Chim. (7) 9, 225; 1914. — Bourquelot und Bridel, C. r. 156, 1104; 1913. — Siehe Zusammenfassung bei Bourquelot, Ann. de Chim. (9) 7, 153; 1917. — Ferner Mougne, Jl Pharm. Chim. [7], 15, 345; 1917.

⁷⁾ Hérissé, Bull. Soc. Chim. Biol. 5, 133 u. 501; 1924. — Jl de Pharm. et de Chim. 29, 441; 1924.

Als Ausgangsmaterial (Substrat) sind sämtliche gärfähige Hexosen geeignet, einschliesslich Galaktose¹⁾ (nach Anpassung der Hefe).

Die Kinetik der Zymophosphatsynthese und besonders die Aciditätsbedingungen sind im Laboratorium des Verf. eingehend untersucht worden²⁾; und es hat sich gezeigt, dass bei Verwendung von Trockenhefe das Aciditätsoptimum dieser Synthese mit dem Aciditätsoptimum der Gärung nahe übereinstimmt³⁾. Besonders bemerkenswert ist, dass diese enzymatische Synthese durch Co-Zymase beschleunigt wird⁴⁾.

Den Nachweis, dass die enzymatische Bildung des vermutlich identischen jedenfalls nahe verwandten Esters, auch beim Kohlehydratabbau im Muskel eine zentrale Rolle spielt, verdankt man Embden⁵⁾, der neuerdings auch über die Beeinflussung dieser Synthese durch Salze, besonders NaF, wichtige Beobachtungen mitgeteilt hat⁶⁾. Wie dann die Messungen von Euler und Myrbäck gezeigt haben, stimmt die Synthese im Muskel und in der Hefe auch insofern miteinander überein, als NaF die Synthese nicht nur im Muskel, sondern auch (unter Verbrauch des Glykogens) in der Hefe fördert⁷⁾.

Eine Veresterung tritt ferner ein mit Dioxyaceton; die Identität des Produktes mit dem normalen Zymophosphat ist noch nicht endgültig sichergestellt.

Welches Umwandlungsprodukt der Zymohexosen primär der Phosphatveresterung unterliegt, ob eine Enolform der Hexosen oder ein Spaltprodukt mit drei Kohleatomen, lässt sich noch nicht sagen.

Von wesentlicher Bedeutung ist die Auffindung zweier Hexosemonophosphate, die unter der Einwirkung von Hefeenzymen entstehen, sei es durch direkte Synthese⁸⁾, sei es als Abbauprodukt des Diphosphates⁹⁾. Diese beiden Stoffe sind von Harden und Robison und von Neuberg nachgewiesen worden. Mitteilungen von Robison über das Auftreten dieses Monoesters in der Muskel lassen vermuten, dass dieser Stoff eine wichtige Rolle als Zwischenprodukt im tierischen Phosphatstoffwechsel spielt¹⁰⁾.

¹⁾ Harden und Norris, Proc. Roy. Soc. B. 82, 645; 1910.

²⁾ Euler und Nordlund, H. 116, 229; 1921. — Euler und Ohlsén, H. 76, 468; 1912. Der Umstand, dass bei diesen Versuchen eine die Veresterung begleitende CO₂-Entwicklung nicht beobachtet wurde, ist wohl auf die sehr geringen Beträge des gebildeten Zymophosphats zurückzuführen; die entsprechenden kleinen CO₂-Mengen sind vermutlich in Lösung geblieben.

³⁾ Euler und Myrbäck, H. 131, 179; 1923. — 133, 260; 1924.

⁴⁾ Euler und Myrbäck, H. 139, 15; 1924.

⁵⁾ Embden und Mitarbeiter, H. 93, 94 u. 124; 1914. — 98, 181; 1917.

⁶⁾ Embden und Lange, 130, 350; 1923. — Embden und Haymann, H. 137, 154; 1924. — Embden und Lehnartz, 134, 273; 1923.

⁷⁾ Euler und Myrbäck, Sv. Kem. Tidskr. 36, 295; 1924.

⁸⁾ Harden und Robison, Proc. Chem. Soc. 30, 16; 1914. — Robison, Biochem. JI 16, 809; 1922. — H. D. Kay und Robison, Biochem. JI 18, 1139; 1924.

⁹⁾ Neuberg, Biochem. Zs 88, 432; 1918. — Neuberg und Dalmer, Biochem. Zs 131, 188; 1922. — Neuberg und Reinfurth, Biochem. Zs. 146, 589; 1924.

¹⁰⁾ H. W. Goodwin und Robison, Biochem. JI 18, 1161; 1924.

4. Synthese von Biosen.

Die bereits zahlreichen Versuche, den Rohrzucker aus dem Invertzucker enzymatisch aufzubauen, haben bis jetzt noch zu keinem endgültigen Ergebnis geführt. Zur Beurteilung der Grösse der zu erwartenden Synthese ist eine Untersuchung von Y. Osaka¹⁾ zu erwähnen, nach welcher in Lösungen von 50% Rohrzucker die Spaltung bis zum Verbrauch von 99,8% der Gesamtmenge geht, während in einer 80%igen Rohrzuckerlösung 98,9% invertiert werden. Bedenkt man die mögliche Umwandlung der Glucose in Isomaltose, so geben diese Zahlen wenig Aussicht, dass der Nachweis einer enzymatischen Synthese gelingt. Demgemäss spricht sich auch Pantanelli²⁾ in einer sachgemässen Kritik seiner gründlichen Versuche dahin aus, dass eine enzymatische Rohrzuckersynthese nicht bewiesen ist, und zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Blagowestschenski³⁾ und W. Löb⁴⁾, welche die Beobachtungen von Visser⁵⁾ nicht bestätigen konnten. Auch in Glycerinlösung gelang die enzymatische Rohrzuckersynthese nicht; allerdings wird Saccharase durch konzentriertes Glycerin sehr geschwächt⁶⁾.

Will man die Ergebnisse von Osaka über das „natürliche“ Gleichgewicht zwischen Rohrzucker, Fructose und Glucose als endgültige betrachten, so lässt sich damit auch das enzymatische Gleichgewicht berechnen, wenn man die S. 305—312 mitgeteilten Erwägungen zugrunde legt. Nimmt man das Produkt der Affinitätskonstanten K^1_M und $K^2_M = K_M$ an, was nach Josephsons Messungen annähernd zutrifft, so kann $K^1_M \cdot K^2_M : K_M = 1$ gesetzt werden, und somit wird

$$\frac{[\text{Rohrzucker}]}{[\text{Fructose}][\text{Glucose}]} = \frac{K_M [\text{Rohrzucker}]}{K^1_M [\text{Fructose}] K^2_M [\text{Glucose}]} = \frac{[\text{Enzym-Rohrzucker}]}{[\text{Enzym-Fructose}] [\text{Enzym-Glucose}]}$$

Eine Rohrzuckersynthese durch Saccharase ist — unter den jetzt bekannten Bedingungen — also nur möglich, wenn der gebildete Rohrzucker irgendwie kontinuierlich aus dem System ausscheidet, sei es, dass er fort-diffundiert, sei es dass er in Form einer schwerlöslichen Verbindung ausfällt. Unter diesen Bedingungen kann immerhin damit gerechnet werden, dass pflanzliche Saccharase als synthetisierendes Enzym eine Rolle spielt.

In der Einleitung zu diesem Abschnitt D. ist bereits der Arbeit Croft Hills gedacht worden, in welcher über die erste gelungene Synthese von

¹⁾ Osaka, JI Coll. of Soc. 1908.

²⁾ Pantanelli, Atti R. Accad. Lincei 16, 419; 1907 und 19, I, 389; 1910. — Bot. Ber. 26, 494; 1908.

³⁾ Blagowestschenski, Biochem. Zs 61, 446; 1914.

⁴⁾ Löb, Biochem. Zs 72, 392; 1916.

⁵⁾ Visser, H. 52, 257; 1905. — Siehe auch die wenig kritische Mitteilung von Kohl (Beitr. Bot. Zbl., 23, 64; 1908), in welcher dieser Autor angibt, eine Reversion nachgewiesen zu haben.

⁶⁾ Bourquelot, C. r. 165, 567; 1917.

Maltose neben Revertose aus Glucose berichtet wird¹⁾. Dieses lange umstrittene Resultat hat ganz neuerdings eine sehr bemerkenswerte Bestätigung durch Pringsheim und Leibowitz²⁾ erfahren, welche Maltose als synthetisches Produkt der Hefe-Maltase in krystallinischem Zustand erhielten.

Im Gegensatz zu den älteren Versuchen (Croft Hills) trat bei Pringsheim die Menge der Revertose weit hinter der der Maltose zurück, weshalb noch kein Krystallisationsversuch mit Revertose ausgeführt werden konnte.

„Die reichlichere Maltosebildung fällt bei der optimalen Acidität mit der grösseren Reaktionsgeschwindigkeit zusammen, was sehr verständlich ist, da die Hefe-Maltase von Willstätter nach seinen eigenen Angaben die Maltose viel energischer spaltet als die nach Croft Hill präparierte Hefe.“

Die Isolierung und Identifizierung reiner enzymatisch in vitro synthetisierter Biosen ist zuerst Bourquelot und seinen Mitarbeitern Bridel, Aubry und Hérissé gelungen, und zwar konnten die genannten Forscher darstellen:

2 Glucobiosen, nämlich Gentiobiose³⁾ und Cellobiose = Cellose⁴⁾, und 2 Galaktobiosen⁵⁾.

1 Mannobiose (Jl Pharm. Chim. [7] 21, 81; 1920).

Wir werden im 9. Kapitel hierauf näher zurückkommen.

5. Synthese höherer Kohlehydrate.

Glykogen bildet sich nach Cremer in Hefepresssaft aus Zucker⁶⁾.

Ferner gehört hierher die von Maquenne⁷⁾ und von J. Wolff und Fernbach⁸⁾ studierte enzymatische Rückbildung von Amylose aus ihren Spaltprodukten.

Die Synthese des Glykogens, welche biologisch als Bildung von Reservestoff aufzufassen ist, spielt sowohl im tierischen Muskel und in der Leber als auch in der Hefe eine ebenso wichtige Rolle wie die Anhäufung der Stärke in den höheren Pflanzen.

Der Zusammenhang zwischen Glykogenumsatz in der Hefe und ihren Gärungsreaktionen geht aus biologischen Daten in allgemeinen Umrissen hervor⁹⁾, die exakte Erforschung der chemischen und energetischen Bildungsbedingungen steht noch aus.

Was die Vorgänge in der Muskel betrifft, so verdankt man Embden und Meyerhof wichtige Anhaltspunkte über die Beziehung zwischen Glykogen- und Milchsäurebildung.

¹⁾ Aus den Versuchen Croft Hills hat Pomeranz (Wien. Sitz. Ber. II B. 111, 554; 1902) ein Gleichgewicht zu berechnen versucht. Da indessen die Deutung der Zahlen von Hill keineswegs klar ist, so sehe ich von einer Mitteilung dieser Berechnung ab.

²⁾ Pringsheim und J. Leibowitz, Chem. Ber. 57, 1576; 1924.

³⁾ Bourquelot und Bridel, C. r. 165, 728; 1917 und 168, 253; 1919.

⁴⁾ Bourquelot und Bridel, C. r. 168, 1016; 1919.

⁵⁾ Bourquelot und Aubry, C. r. 164, 443 und 521; 1917.

⁶⁾ Cremer, Chem. Ber. 32, 2062; 1899. — Rubner, Arch. Physiol. 1913.

⁷⁾ Maquenne, Bull. Soc. Chim. 35; 1906.

⁸⁾ Wolff und Fernbach, C. r. 137, 718; 1903.

⁹⁾ Vgl. Kullberg, H. 92, 340; 1914.

6. Synthese der Carbamidgruppe $\text{RNH}\cdot\text{CO}\cdot\text{R}'$ und die Bildung eiweissartiger Stoffe.

Die Bildung von Hippursäure aus Benzoesäure (Benzylalkohol) und Glykokoll durch Nierenextrakt haben Abelous und Ribaut¹⁾ beobachtet. Es dürfte dies die synthetische Wirkung des von Neuberg²⁾ kürzlich beschriebenen Enzyms sein.

Was die Synthese von eiweissartigen Stoffen betrifft, so sind zunächst die Versuche über Plasteinbildung zu erwähnen.

Durch Danilewski ist festgestellt worden, dass Labferment in konzentrierten Lösungen von Wittepepton eigentümliche Eiweissniederschläge hervorruft. Dieses Phänomen, die „Plasteinbildung“, welches auch unter der Einwirkung von Pepsinpräparaten eintritt, wurde im Laboratorium Danilewskis weiter untersucht und hat dann die Aufmerksamkeit mehrerer russischer Forscher wie Sawjalow³⁾ und Okuneff⁴⁾ in Anspruch genommen; Kurajeff⁵⁾ fand die analoge koagulierende Eigenschaft des Papayotins. Lawrow und Salaskin⁶⁾ konnten feststellen, dass die in konzentrierten Wittepeptonlösungen unter Einwirkung von Magensaft eintretende Bildung von Niederschlägen bei allen Arten von Albumosen stattfindet.

Die Plasteine⁷⁾ oder Koagulosen⁸⁾ zeigen qualitative Eiweissreaktionen, unterscheiden sich aber von diesen durch einen Mindergehalt an Stickstoff. Für ein Plastein aus Wittepepton wurde gefunden:

57—60 % C

13—14,6% N.

Ausgangsmaterial für die Plasteinbildung ist meistens Wittepepton; besonders wesentlich ist, ob der Abbau durch peptische oder tryptische Verdauung stattgefunden hat. Welche Stoffe für die Plasteinbildung notwendig sind, ist noch nicht ganz festgestellt.

Levene und D. D. van Slyke⁹⁾ fanden mit der Methode von E. Fischer im Plastein aus Witte-Pepton die für Proteine typischen Aminosäuren, ausser Alanin. Vermutlich ist das Plastein kein einfacher Stoff, sondern eine Mischung von Albumosen. Denn das aus sehr stark gespaltenen Proteinen gebildete Plastein weicht dadurch von denen ab, die aus weniger stark gespaltenen entstanden sind, dass es in schwacher Natronlauge und schwacher Salzsäure unvollständig löslich ist. Diesen Nachweis, wie überhaupt eine

¹⁾ Abelous und Ribaut, Soc. Biol. 52, 543; 1900.

²⁾ Neuberg, Biochem. Zs 150, 145, 249; 1923.

³⁾ Sawjalow, Zbl. f. Physiol. 16, 625; 1902.

⁴⁾ Okuneff, Dissertation St. Petersburg.

⁵⁾ Kurajeff, Hofm. Beitr. 1, 121; 1901 und 4, 476; 1903.

⁶⁾ Lawrow und Salaskin, H. 36, 277; 1902.

⁷⁾ Die Bezeichnung stammt von Sawjalow, H. 54, 119; 1907.

⁸⁾ Lawrow, H. 51, 1; 1907. — 53, 1; 1907. — 56, 343; 1908. — 60, 520; 1909.

⁹⁾ Levene und D. D. van Slyke, Bioch. Zs 13, 440; 1908.

wesentliche Erweiterung unserer Kenntnisse über Plasteinbildung verdankt man Henriques und Gjaldbæk¹⁾, welche diesen Vorgang mit der Formoltitrationsmethode von Sörensen verfolgt haben. Nicht nur die Zusammensetzung, sondern auch die Menge des synthetisierten Stoffes hängt vom Ausgangsmaterial ab; „je stärker gespalten dieses gewesen ist, desto weniger kompliziert ist der Bau des synthetisierten Stoffes, aber in desto grösserer Menge wird er gebildet“. Der Prozentgehalt des formoltitrierbaren Stickstoffes (8,8% bis 12,9%) war im allgemeinen bei Plasteinen höher als bei genuinen Eiweisskörpern (Hühner-Eiweiss 5,6%; Kasein 9,5%), aber niedriger als in Witte-Pepton, woraus Henriques und Gjaldbæk den Schluss ziehen, dass Plasteine im allgemeinen nicht so kompliziert gebaut sind, wie genuine Proteinstoffe. Jedenfalls beweist die Abnahme des formoltitrierbaren Stickstoffs, dass es sich bei der Plasteinbildung wirklich um eine Synthese handelt²⁾. In ihrer zweiten Untersuchung haben dann Henriques und Gjaldbæk an Witte-Pepton, verdaulichem Edestin u. a. den Nachweis geführt, dass bei Einwirkung von Pepsinsalzsäure auf Proteine und peptische Spaltungsprodukte je nach der Konzentration eine Synthese oder Hydrolyse eintritt³⁾.

Auch bei Einwirkung von Trypsin auf Witte-Pepton sowie auf peptische Spaltungsprodukte von Hühnereiweiss, Kasein und Rindfleisch trat Plasteinbildung ein.

Bemerkenswert ist, dass an pepsinverdauter Gelatine keine Plasteinbildung vorkam, weder durch Pepsin-HCl noch durch Trypsin.

An Produkten der Trypsinspaltung konnte keine Plasteinbildung nachgewiesen werden, und zwar weder bei Anwendung von Pepsin-HCl noch von Trypsin.

Einen besonders interessanten Ausgangspunkt für weitere enzymatische Gleichgewichtsstudien an Proteinen liefert die dritte Mitteilung von Henriques und Gjaldbæk, deren ausführliches Referat hier zu weit führen würde. Es sei nur auf folgende Ergebnisse hingewiesen:

Liess man Pepsin-HCl auf teilweise trypsinverdautes Hühnereiweiss und teilweise trypsinverdautes Kasein einwirken, so ergaben sich Verschiedenheiten, und zwar so, dass teilweise trypsinverdautes Hühnereiweiss sich mehr durch Pepsin-HCl beeinflussen lässt. „Pepsin-HCl kann sowohl Hühnereiweiss als Kasein bis zu einem Spaltungsgrad von 38% spalten, aber während man Hühnereiweiss mit Trypsin bis zu einem Spaltungsgrad von ca. 63% formoltitrierbarem N spalten muss, bevor es sich nicht von Pepsin beeinflussen

¹⁾ Henriques und Gjaldbæk, H. 71, 485; 1911. — 81, 439; 1912. — 83, 83; 1913.

²⁾ Einen Beweis für die Eiweissnatur der Plasteine könnte man auch in dem Umstand erblicken, dass sie ein spezifisches Präzipitin bilden (Hermann und Chain, H. 77, 289; 1912).

³⁾ Bald darauf hat sich auch Glagolew im Laboratorium von Slowtzoff der Sörensenschen Formoltitration zum Studium der Plasteine bedient und ebenfalls die Reversibilität der Plasteinbildung nachgewiesen (Bioch. Zs 50, 162; 1913).

lässt, so braucht Kasein nur bis zu einem Spaltungsgrad von ca. 40% formtitrierbarem N gespalten zu werden, um sich nicht von Pepsin beeinflussen zu lassen.“

Offenbar sind die Gleichgewichte bei Eiweisskörpern viel komplizierter als frühere Forscher auf diesem Gebiete angenommen haben; dies liegt nicht nur an der grossen Zahl der Spaltprodukte der Proteine, sondern auch an den spezifischen Wirkungen, welche die Komponenten der Pepsin- und Trypsinpräparate ausüben. Vermutlich treten unter der Einwirkung eines Enzymkomplexes, wie Pepsin aus Magensaft, mannigfache Gleichgewichte zwischen Proteinen, Aminosäuren und den Zwischenprodukten ein.

Von diesem Gesichtspunkt aus muss es auch von vornherein als wenig wahrscheinlich bezeichnet werden, dass es gelingt, ein spezielles, definiertes Protein, selbst wenn es zu den einfacheren Repräsentanten dieser Stoffe, wie z. B. zu den Protaminen gehört, aus den Spaltprodukten nach Konzentrieren der Lösung und Einwirkung eines Enzymsaftes zurückzugewinnen; wie sich ein diesbezüglicher, von A. E. Taylor¹⁾ beschriebener Versuch, bei welchem zu den Spaltprodukten eines Protamins ein Trypsin zugesetzt worden war, erklärt, lässt sich bis auf weiteres kaum entscheiden²⁾.

Dagegen könnte es sich bei den synthetischen Ergebnissen, welche T. B. Robertson mit Pepsin erhalten hat, um eine mit der Plasteinbildung verwandte Reaktion handeln³⁾. Die neueren Untersuchungen⁴⁾ dieses Forschers enthalten mehrere bemerkenswerte Beobachtungen.

„30 ccm 15%igen Pepsins (Grueblers puriss. sicc.) wurden zu 150 ccm der unkonzentrierten Produkte der vollständigen peptischen Hydrolyse von N/50 Natriumcaseinat zugesetzt und die Mischung 48 Stunden lang bei 65° in der Gegenwart von Toluolüberschuss stehen gelassen. Das resultierende Präzipitat wurde auf gehärtetem Filtrierpapier gesammelt und in destilliertem Wasser gewaschen, bis die Waschungen farblos waren; es wurde dann aufgelöst, indem man verdünntes Natriumhydrat durch das Filter hindurchlaufen liess, und gefällt, indem man dieses Filtrat in ein einen Überschuss verdünnter Essigsäure enthaltendes Becherglas laufen liess. Das so erhaltene Präzipitat wurde auf einem gehärteten Filter gesammelt, mit grossen Mengen Wasser, Alkohol und Äther gewaschen und über CaCl₂ und später über H₂SO₄ getrocknet.“

Das Produkt enthielt 1,65% P₂O₅ und zeigte Paranuclein-ähnliche Zusammensetzung und Eigenschaften, bezüglich deren auf die Originalarbeit verwiesen sei.

Nach Bayliss⁵⁾ liegt bei den Versuchen von Robertson keine enzymatische Synthese vor, sondern eine gegenseitige Ausfällung entgegengesetzt geladener Kolloide. Zweifellos können solche Fällungserscheinungen bei Versuchen, enzymatische Synthesen hervorzurufen, leicht eintreten, wie Bayliss dartut; dagegen scheint dem Verf. bis jetzt ein Beweis gegen die enzymatische Natur des von Robertson beobachteten Vorgangs nicht vorzuliegen.

¹⁾ A. E. Taylor, JI Biol. Chem. 3, 87; 1907.

²⁾ Siehe hierzu auch Bayliss (Arch. Sci. Biol. St. Petersburg, 11, 1904, Suppl.) und The Nature of Enzyme Action, 4. Aufl., 1919.

³⁾ T. B. Robertson, JI Biol. Chem. 3, 95; 1907, besonders 8, 237; 1910.

⁴⁾ Robertson und Biddle, ebenda, 9, 295; 1911. — Siehe auch Robertson, Physik. Chemie der Proteine, deutsch von Wyncken, Dresden 1912.

⁵⁾ Bayliss, JI of Physiol. 46, 236; 1913.

Eine enzymatische Synthese von Harnstoff ist nunmehr nachgewiesen; die Lage des Gleichgewichtes Ammoniumcarbonat — Harnstoff geht aus den Arbeiten von Mack und Villars¹⁾ und von H. D. Kay²⁾ hervor.

Ein Ergebnis von prinzipieller Bedeutung ist 1914 von Abderhalden³⁾ angekündigt worden, welcher die Mitteilung gemacht hat, dass ihm eine Synthese von Aminosäuren in denjenigen Fällen gelungen ist, in welchen das Aminosäuregemisch und der enzymatisch wirksame Organmacerationssaft vom gleichen Organ (Leber, Niere, Schilddrüse, Lunge) stammt. Der Effekt war allerdings noch ziemlich klein (bei den Proben, bei denen das Aminosäuregemisch und der Mazerationssaft aus dem gleichen Organ stammten, waren etwa 5—15% weniger Aminstickstoff als in den anderen Proben nachweisbar) scheint aber durch entsprechende Ergebnisse an Organpeptonen aus Niere, Muskel, Leber und Placenta bestätigt zu werden⁴⁾.

Abderhalden sieht hierin einen Beweis für die von ihm vielfach betonte, weitgehende Organspezifität der Enzymwirkung, auf welche wir noch im 9. Kapitel zurückkommen.

Gerade bei der Plasteinbildung und der Synthese von Proteinkörpern tritt uns die schon früher berührte Frage nach den Komponenten von Enzymgruppen wie Trypsin, Pepsin wieder entgegen. Was speziell Pepsin betrifft, so kann nach den neueren Untersuchungen von Hammarsten⁵⁾ wohl nicht mehr bezweifelt werden, dass am peptischen Eiweissabbau durch den Magensaft wenigstens zwei Enzyme — Hammarsten nennt sie Pepsin und Chymosin — beteiligt sind. Auf Grundlage dieser Beobachtungen von Hammarsten erscheint es wohl möglich, experimentell zu entscheiden, ob eine dieser beiden „Pepsin“-Komponenten vorzugsweise an den synthetischen Wirkungen der Pepsinpräparate beteiligt ist.

Fassen wir schliesslich den in diesem Kapitel dargestellten gegenwärtigen Stand der Forschung zusammen, so können wir sagen, dass die enzymatische Synthese der Fette, Biosen und Glucoside in zahlreichen Fällen einwandfrei durchgeführt werden konnte, und dass synthetische Wirkungen auf Eiweisspaltprodukte ebenfalls als festgestellt angesehen werden können. Die Lage der in enzymatischen Systemen eintretenden Gleichgewichte dürfte sich von den durch nicht-enzymatische Katalysatoren eingestellten, sog. „natürlichen“ Gleichgewichten allgemein wenig unterscheiden.

¹⁾ Mack und Villars, *Am. Chem. Soc.* 45, 501 und 505; 1923.

²⁾ H. D. Kay, *Biochem. J.* 17, 277; 1923.

³⁾ Abderhalden, *Fermentforsch.* 1, 47; 1914.

⁴⁾ Abderhalden, *Lehrbuch der physiol. Chemie*, 5. Aufl., II. Teil, S. 312; 1923.

⁵⁾ Hammarsten, *H.* 94, 104 und 291; 1905 und 102, 105; 1918. — Ferner *Medd. Nobel Inst.* Bd. 5, Nr. 7; 1919.

8. Kapitel.

Wärmetönung und Energiewandlung bei enzymatischen Vorgängen.

Im Kapitel 6 ist der Einfluss, welchen die Temperatur auf den zeitlichen Verlauf von Enzymreaktionen ausübt, eingehend behandelt worden. Es hat sich dabei im wesentlichen um Reaktionen gehandelt, welche — praktisch vollständig — in einer Richtung verlaufen. Es können aber auch in einem enzymatischen System messbare Gleichgewichtszustände zwischen Substrat und Reaktionsprodukten eintreten, wie wir sie im Kapitel 7 kennen gelernt haben, und es soll zunächst kurz daran erinnert werden, in welcher Weise die Lage des Gleichgewichts von der Temperatur beeinflusst werden kann.

Wir betrachten das Gleichgewicht zwischen Ester, Wasser, Säure und Alkohol und gehen von Gleichung (35) aus (Massenwirkungsgesetz):

$$K' = \frac{[\text{Ester}][\text{Wasser}]}{[\text{Säure}][\text{Alkohol}]}, \text{ also } \frac{1}{K'} = K = \frac{[\text{Säure}][\text{Alkohol}]}{[\text{Ester}][\text{Wasser}]}.$$

Aus dem zweiten Hauptsatz der mechanischen Wärmetheorie hat van't Hoff in seiner grundlegenden Arbeit „Études de Dynamique chimique“ 1884 die folgende Gleichung abgeleitet:

$$\frac{d \ln K}{dT} = - \frac{Q}{RT^2} \dots \dots \dots (36a)$$

wo K die Gleichgewichtskonstante bedeutet und Q die bei der absoluten Temperatur T gemessene Reaktionswärme¹⁾; R ist die Gaskonstante.

Durch Integration ergibt sich hieraus, für den Fall, dass den Temperaturen T₁ und T₂ die Gleichgewichtskonstanten K₁ und K₂ entsprechen:

$$\ln \frac{K_2}{K_1} = \frac{Q}{R} \left(\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_1} \right) = \frac{Q}{R} \frac{(T_1 - T_2)}{T_1 T_2} \dots \dots \dots (36b)$$

Aus der Gleichung (36 a) können wir unmittelbar entnehmen, wie sich ein chemisches Gleichgewicht mit der Temperatur verändert.

Bei Reaktionen, welche unter Wärmeabsorption (Wärmeaufnahme) verlaufen (endothermen Reaktionen), muss also K, das Konzentrationsverhältnis Reaktionsprodukte : Ausgangsprodukte, mit steigender Temperatur wachsen.

¹⁾ Nernst bezeichnet diese Gleichung als Reaktionsisochore (vgl. Lehrbuch, 8. Aufl. S. 723). Wird K durch (35) definiert, so bedeutet Q die Wärme, welche entwickelt wird, wenn Ester und Wasser in Säure und Alkohol übergehen. Vgl. auch die Anwendung der Gleichung (36) auf S. 280.

Bekanntlich verläuft die elektrolytische Dissoziation des Wassers, die Spaltung von H_2O in H^+ und HO^+ , unter Wärmeaufnahme. Demgemäss steigt die elektrolytische Dissoziation des Wassers mit steigender Temperatur (vgl. S. 24).

Andererseits nimmt K bei Reaktionen, welche unter Wärmeentwicklung verlaufen (exothermen Reaktionen) mit steigender Temperatur ab.

Schliesslich wird für den Fall

$$Q = 0 \quad \text{auch} \quad \frac{d \ln K}{dT} = 0,$$

d. h. die Gleichgewichtskonstante K ändert sich nicht mit der Temperatur, wenn die Reaktion ohne „Wärmetönung“ verläuft, wie dies bei obigem Beispiel, der Spaltung eines Esters, sehr angenähert zutrifft.

Überhaupt sind Hydrolysen in wässriger Lösung, also die Vorgänge, welche von den Lipasen, Glucosidasen und Proteinase beschleunigt werden, in der Regel von sehr geringer Wärmetönung begleitet.

Dies geht aus einer lehrreichen Zusammenstellung von R. O. Herzog hervor, welche wir im Auszug tabellarisch wiedergeben¹⁾.

Substrat	Reaktionsprodukte	Reaktionswärme in Cal.
Äthylbutyrat	Äthylalkohol + Buttersäure	1,2 ber. (Herzog)
Rohrzucker	Invertzucker	4,5
Maltose	2 Glucose	3,8
Lactose	Glucose + Galaktose	9,2
Salicin	Salicylalkohol + Glucose	5,3
Helicin	Salicylaldehyd + Glucose	4,9
α -Methylglucosid	Methylalkohol + Glucose	3,8
β -Methylglucosid	Methylalkohol + Glucose	2,3
α -Methylgalaktosid	Methylalkohol + Galaktose	0,6
Harnstoff	Ammoniak + Kohlensäure	4,3
Hippursäure	Benzoëssäure + Glykokoll	6,5
Glycyl-Glycin ²⁾	2 Glykokoll	5,4
Leucyl-Glycyl-Glycin ²⁾	Leucin + 2 Glykokoll	12,2
An diese Hydrolysen schliessen wir an:		
Wasserstoffsperoxyd	Sauerstoff + Wasser	21,7

¹⁾ Die Berechnung der in dieser Tabelle verzeichneten Reaktionswärmen beruht auf dem Hessschen Gesetz der konstanten Wärmesummen, nach welchem die Energiedifferenz zwischen den Ausgangs- und Endprodukten einer Reaktion von dem Weg, auf welchem die Reaktion verläuft, unabhängig ist. Demgemäss ergibt sich beispielsweise die Energiedifferenz zwischen einem Ester und seinen Hydrolyseprodukten, Säure und Alkohol einfach aus den Verbrennungswärmen der beteiligten Stoffe, wie folgendes Beispiel zeigt. (Die thermochemischen Daten hat Herzog dem bekannten Werke von Berthelot entnommen. Sie geben im allgemeinen sicher ein genügend genaues Bild der Verhältnisse.)

Verbrennungswärme von Äthylbutyrat	851,3 Calorien
„ „ Äthylalkohol 325,7 Calorien	} 850,1 „
„ „ Buttersäure 524,4 „	
Differenz 1,2 Calorien.	

Die so berechnete Differenz ist kaum grösser als die Versuchsfehler.

²⁾ Nach den Messungen von E. Fischer und Wrede, Sitz-Ber. Preuss. Akad. 1904.

Wenn auch die in obiger Tabelle für Hydrolysen berechneten Wärmetönungen z. T. kaum grösser sind, als die Versuchsfehler, so kann man doch wenigstens den Schluss ziehen, dass die angegebenen Hydrolysen mit einer meist sehr kleinen Wärmeentwicklung verlaufen.

Besonderes Interesse bietet die Wärmetönung des Überganges von Glykogen in Glucose, welche von Meyerhof einer erneuten Berechnung unterzogen wurde¹⁾. Verbrennungswärme pro g Glykogen · H₂O = 3815.

Indirekt können die mit Hydrolysen verbundenen Wärmetönungen ermittelt werden aus den Differenzen der Verbrennungswärmen der Reaktionskomponenten unter Zuziehung der (ziemlich geringfügigen) Lösungswärmen und der Schmelzwärme des Wassers.

Die meisten der älteren Daten über Verbrennungswärmen verdankt man Berthelot und Stohmann. Exakte Messungen an biochemisch wichtigen Kohlehydraten sind von Karrer und Fioroni (Helv. 6) mitgeteilt worden.

1 g	Cal.	1 g	Cal.
Glucose	3743	Rhamnose	4379
Galaktose	ca. 3721	Arabinose	3731
Rohrzucker	3945	Xylose	3735
Maltose	3949	Diamylose	4285
Lactose	3948	Triamylose	4165,3
Cellobiose	3944	α-Tetramylose	4196
Stachyose	4065	α-Octamylose	4620
Inulin	4190	β-Hexamylose	4166

Direkte kalorimetrische Messungen der mit enzymatischen Hydrolysen verbundenen Wärmetönung sind früher an Proteinen ausgeführt worden von Hari²⁾, v. Lengyel, Kornfeld und Lax³⁾ und von Grafe.

Die Untersuchungen der beiden erstgenannten Forscher zeigten schon, dass die auftretende Wärmetönung jedenfalls sehr gering ist; definitive Resultate brachten diese Arbeiten noch nicht.

Mit einer geeigneten Methodik hat in Rubners Institut Grafe⁴⁾ ähnliche Versuche wieder aufgenommen; er hat mit einem Silberkalorimeter seine Versuche mit verschiedenen Eiweisskörpern unter Anwendung von Trypsin wiederholt und zum Teil über Wochen hin bis zum Verschwinden der Biuretreaktion ausgedehnt. Auch mit Pepsin konnten bei Spaltung von Fibrin und Pferdeserum keinerlei Anhaltspunkte für eine Wärmetönung gefunden werden. Aus diesen Versuchen geht wohl mit Sicherheit hervor, dass die Wärmetönung bei der fermentativen Spaltung der Eiweisskörper fast = 0 ist.

¹⁾ Meyerhof, Naturwissensch. 12, 181; 1924. — Die Verbrennungswärme des Glykogens ist neu bestimmt von W. K. Slater, Jl Physiol. 58, 163; 1923 und Biochem. Jl 18, 629; 1924 sowie von R. Meier und Meyerhof, Biochem. Zs 150, 233; 1924.

²⁾ Hari, Pflüg. Arch. 115, 11; 1906.

³⁾ Kornfeld und Lax, Biochem. Zs 95, 272, 1919.

⁴⁾ Grafe, Arch. f. Hyg. 62, 216; 1907. — Pflüg. Arch. 121, 459; 1908.

Bei der enzymatischen Eiweisspaltung machen die erforderlichen langen Versuchszeiten Schwierigkeiten. Erheblich einfacher gestalten sich die Messungen bei solchen Enzymreaktionen, welche man im Verlauf von 30—60 Minuten beenden kann, wie dies z. B. bei der Inversion des Rohrzuckers durch Saccharase möglich ist. Auch hier haben mehrere Reihen von noch nicht veröffentlichten Versuchen ein Ergebnis geliefert, welches mit den Forderungen der Theorie befriedigend übereinstimmt.

Es erhebt sich nun die Frage, welche Schlüsse wir aus diesen Ergebnissen und aus den Zahlen der obigen Tabelle den thermodynamischen Grundsätzen zufolge ziehen können hinsichtlich der Lage des Gleichgewichtes und der Möglichkeit, die erwähnten Vorgänge im Sinne der Synthese zu leiten.

Von vornherein können wir an die Erfahrung erinnern, dass alle diese Reaktionen in mässig verdünnter wässriger Lösung sehr weitgehend im Sinne einer Hydrolyse verlaufen. Über die Zahlenwerte der Gleichgewichtskonstanten sind aber bis jetzt — etwa Äthylbutyrat ausgenommen — keine experimentellen Ergebnisse gewonnen worden.

Der erste und zweite Hauptsatz der Thermodynamik.

Ein freiwillig verlaufender Vorgang kann stets so geleitet werden, dass ein gewisses Mass von Arbeit daraus gewonnen werden kann. Diese Arbeitsleistung A (Abnahme der freien Energie) ist in der Regel von einem Wärmeeffekt begleitet, welchen wir als U bezeichnen wollen¹⁾ (Änderung der Gesamtenergie des chemischen Systems).

Die Totalbilanz der Energieformen ist durch den sog. ersten Hauptsatz der mechanischen Wärmetheorie gegeben, welcher lautet:

$$A - U = Q \quad \dots \dots \dots (37)$$

wenn man mit Q die vom System aufgenommene Wärmemenge bezeichnet, während A die vom System geleistete äussere Arbeit und U die Abnahme der Gesamtenergie (also die an die Umgebung abgegebene Energie) ist.

Dem zweiten Hauptsatz der mechanischen Wärmetheorie zufolge verläuft ein chemischer Vorgang nur in der Richtung freiwillig, in welcher durch den Vorgang äussere Arbeit geleistet werden kann.

Handelt es sich um einen Vorgang, bei welchem die Wärmemenge Q unter Arbeitsleistung von $T + dT$ auf T sinkt, so gilt die Gleichung

$$dA = -Q \frac{dT}{T} \quad \dots \dots \dots (38)$$

Aus der Kombination der Sätze (37) und (38) folgt die zuerst von Helmholtz angewandte Fundamentalgleichung:

¹⁾ Wir schliessen uns damit der von Nernst in seinem klassischen Lehrbuch eingeführten Bezeichnungsweise an und müssen zur Vertiefung des Studiums der Thermodynamik auf dieses Lehrbuch und auf die Darstellung von Planck verweisen (Vorlesungen über Thermodynamik, 6. Aufl., Leipzig 1921).

$$A - U = T \frac{dA}{dT} \dots \dots \dots (39)$$

Aus dieser Gleichung geht nun zunächst hervor, dass im allgemeinen U kein Mass für die Arbeitsfähigkeit eines chemischen Systems ist, denn es ergibt sich $A = U$ nur für den Fall, dass das rechtsstehende Glied der Gleichung Null wird. Dies tritt ein, wenn $T = 0$, also beim absoluten Nullpunkt, und ausserdem nur dann, wenn dA/dT den Wert Null annimmt, wenn also die Arbeitsfähigkeit des Systems sich mit der Temperatur nicht ändert.

Dass eine positive Wärmetönung (Wärmeentwicklung) kein Kriterium für das freiwillige Eintreten einer chemischen Reaktion gibt, erhellt daraus, dass wir eine Reihe von endothermen, freiwillig verlaufenden Vorgängen kennen, wie überhaupt aus dem Umstand, dass ein chemisches Gleichgewicht durch freiwillig verlaufende Vorgänge von beiden Seiten her erreicht werden kann.

Es ergibt sich nun die weitere Frage, wie die maximale Arbeitsfähigkeit eines chemischen Systems, welche also für das Eintreten einer Reaktion massgebend ist, gemessen werden kann.

Bestimmung der maximalen Arbeit einer Reaktion aus der Gleichgewichtskonstante K .

Wir kehren zu unserem S. 325 u. ff. besprochenen Spezialfall der Spaltung und Bildung des Äthylacetats zurück, und wir bezeichnen die Konzentrationen durch folgende Gleichung

$$K = \frac{[\text{Säure}] [\text{Alkohol}]}{[\text{Ester}] [\text{Wasser}]} = \frac{c_2 \cdot c_3}{c_1 \cdot \text{konst.}}$$

wobei wir, da es sich um verdünnte Lösungen handeln soll, die Konzentration des Wassers konstant setzen.

Nach van't Hoff berechnen wir die Umwandlungsarbeit in folgender Weise:

Wir gehen von einem System aus, in welchem die drei Komponenten Ester, Säure und Alkohol die Konzentration 1 besitzen.

Zunächst wird der Ausgangsstoff osmotisch von der Konzentration 1 auf seine Gleichgewichtskonzentration (also auf c_1) gebracht. Dazu ist die Arbeit

$$A_1 = RT \ln \frac{1}{c_1} \dots \dots \dots (40)$$

erforderlich.

Bei den Gleichgewichtskonzentrationen wird die Umwandlung des Esters in seine Spaltprodukte vorgenommen, und zwar ohne dass die Gleichgewichtskonzentrationen eine Änderung erfahren, was dadurch geschehen kann, dass in jeder Zeit ebenso viele Estermoleküle osmotisch eingeführt als Moleküle Alkohol und Säure entzogen werden. Im Gleichgewicht kann diese Umwandlung arbeitslos vorgenommen werden. Schliesslich werden die Reaktions-

produkte Säure und Alkohol von den Gleichgewichtskonzentrationen c_2 und c_3 auf die Konzentrationen 1 gebracht, wobei die Arbeiten gewonnen werden

$$A_2 = RT \ln \frac{1}{c_2} \text{ und } A_3 = RT \ln \frac{1}{c_3}.$$

Die Gesamtarbeit der Reaktion A ist die Summe der drei osmotischen Arbeitsleistungen $A_1 + A_2 + A_3$, also

$$A = RT \ln \frac{1}{c_1} - RT \ln \frac{1}{c_2} - RT \ln \frac{1}{c_3}$$

oder, da $\frac{c_2 \cdot c_3}{c_1 \cdot \text{konst.}} = K$

$$A = RT \ln K \dots \dots \dots (41)$$

Es ist dies die gebräuchlichste Form für die ausserordentlich wichtige Gleichung zwischen der maximalen Arbeit einer chemischen Reaktion und ihrer Gleichgewichts- oder Affinitätskonstante. Man bezeichnet diese Gleichung als Reaktionsisotherme.

Aus der Gleichung (41) ersehen wir, dass aus einer Reaktion um so mehr Arbeit gewonnen werden kann, je weiter die Ausgangskonzentrationen von den Gleichgewichtskonzentrationen c_1 , c_2 und c_3 entfernt sind.

Wie schon oben betont, sind leider die Gleichgewichtskonstanten nur für wenige durch Enzyme katalysierbare Reaktionen bekannt. In denjenigen Fällen, in welchen die Reaktionen nahezu vollkommen in einer Richtung verlaufen, sind sie auch schwer zu bestimmen.

Für Reaktionen zwischen Elektrolyten lässt sich ein zweiter Weg zur Bestimmung von A einschlagen, indem man die Reaktion in einem reversibeln Element elektromotorisch wirksam macht. Ein solcher Weg ist bei biochemischen Reaktionen bis auf weiteres nicht gangbar.

Einen dritten Weg zur Berechnung von A bietet das Nernstsche Wärmetheorem.

Wie aus der Gleichung (39) hervorgeht, wird beim absoluten Nullpunkt $A = U$. Demgemäss müssen sich im absoluten Nullpunkt die A-Kurve und die U-Kurve schneiden. Bei gewöhnlicher Temperatur sind nun zwar A und U keineswegs, wie Berthelot angenommen hatte, einander streng gleich, wohl aber lehrt die Erfahrung, dass die bei gewöhnlichen und noch niedrigeren Temperaturen freiwillig eintretenden Reaktionen sehr häufig unter Wärmeentwicklung verlaufen, und dass demgemäss A und U in einiger Nähe vom absoluten Nullpunkt im allgemeinen nicht stark verschieden sind. Von dieser Erfahrung ausgehend, hat Nernst den Satz aufgestellt, dass die A- und U-Kurven sich im absoluten Nullpunkt nicht schneiden, sondern tangieren, dass also für $T = 0$

$$\lim \frac{dA}{dT} = 0, \quad \lim \frac{dU}{dT} = 0.$$

Wie Nernst betont und wie in den Darstellungen des neuen Wärmesatzes¹⁾ näher einzusehen ist, kann A aus lauter thermischen Daten berechnet werden.

Einen interessanten Versuch, den Nernstschen Wärmesatz für biochemische Probleme zu verwerten, haben schon vor längerer Zeit Báron und Pólányi²⁾ gemacht. Ausgehend von der Nernstschen Annäherungsformel³⁾ kommen sie zu dem biologisch interessanten Ergebnis, dass bei der Verbrennung von Fett, Eiweiss und Zucker die Veränderung der freien Energie nahe gleich der Wärmetönung ist, also angenähert gilt $A = U$.

Weitere Anwendungen des Nernstschen Wärmetheorems auf organische Gleichgewichte findet man z. B. bei G. N. Lewis⁴⁾ (Harnstoff) und bei Kurt H. Meyer⁵⁾.

Wärmetönung von Gärungsreaktionen.

Wir haben auf S. 326 gesehen, dass die Hydrolysen von Estern, Kohlehydraten und Proteinen von einer sehr geringen Wärmetönung begleitet sind. Im Gegensatz hierzu verlaufen biologische Oxydationen und einige der wichtigsten Gärungsvorgänge, welche ebenfalls den enzymatischen Reaktionen zuzuzählen sind, unter bedeutender Wärmeentwicklung.

Es seien zunächst einige Zahlen angeführt, welche die alkoholische Gärung des Traubenzuckers betreffen, und zwar die Verbrennungswärmen in kg-Cal. pro Mol bei konstantem Druck.

Glucose (Stohmann)	674,0 kg-Cal.
Äthylalkohol (Matignon; Atwater-Snell)	326,2 „ „
Kohlensäure (entweicht als Gas)	—

Hierzu kommt noch die Lösungswärme

der Glucose	2,1 kg-Cal.
des Äthylalkohols	2,3 „ „

Demnach berechnet sich für die Wärmetönung der alkoholischen Gärung

$$(674,0 + 2,1) - 2(326,2 - 2,25) = 28,2 \text{ kg-Cal. pro Mol.}$$

Nun zerfällt bei der alkoholischen Gärung der Traubenzucker nicht quantitativ in Alkohol und Kohlensäure, vielmehr treten einige Nebenreaktionen ein. Setzen wir diese in Rechnung, so erhalten wir als wahrscheinlichsten Wert für den Gärungserfall eines Mols Glucose in der Hefe 27 kg-Cal.

¹⁾ Nernst, Die theoretischen und experimentellen Grundlagen des neuen Wärmesatzes, Halle 1918.

²⁾ Báron und Pólányi, Biochem. Zs 53, 1; 1913.

³⁾ Nernst, Lehrbuch, 8. Aufl., S. 800.

⁴⁾ G. N. Lewis und G. E. Gibson, Am. Chem. Soc. 39, 2554; 1917. — Siehe auch R. Wurmser, Bull. Soc. chim. biol. 5, 506; 1923.

⁵⁾ Kurt H. Meyer und Mitarbeiter, Chem. Ber. 54, 1705 und 1709; 1921.

Unter den direkt kalorimetrisch gemessenen Werten der Gärungswärme ist derjenige von Rubner¹⁾ wohl der zuverlässigste²⁾; er beträgt 24 kg-Cal.

Bekanntlich werden bei der alkoholischen Gärung mehrere noch nicht genau festgestellte Zwischenstadien durchlaufen. Gegen die Annahme der Milchsäure als Zwischenprodukt der alkoholischen Hefegärung sind bemerkenswerte Einwände gemacht worden. Beim Glucose-Abbau im Tierkörper spielt dieser Stoff, besonders nach Untersuchungen von Fletcher, Hopkins, Emden und Meyerhof eine wichtige Rolle. Aus älteren Messungen hatte sich bereits ergeben, dass die Spaltung eines Moleküls Glucose in zwei Moleküle Milchsäure höchstens mit sehr geringer Wärmeentwicklung verläuft und das gleiche gilt von einer (eventuell intermediär in Betracht kommenden) weiteren Zerlegung der Milchsäure in Acetaldehyd und Ameisensäure. Im Tierkörper erfolgt also die mit der Zuckerverbrennung verbundene starke Wärmeentwicklung erst in den letzten Reaktionsphasen.

Einer der für die Enzymchemie interessantesten Vorgänge, der Glykogenabbau im Muskel hat in letzter Zeit eine eingehende energetische Bearbeitung durch Hill und Meyerhof erfahren. Dieser Vorgang zerfällt in zwei Teile, die anaerobe Phase und die aerobe Phase, in welcher die vorher gebildete Milchsäure verschwindet (aufoxydiert wird).

Besonders sind Meyerhofs kalorimetrische Neubestimmungen und Berechnungen zu erwähnen, nach welchen die Differenz der Verbrennungswärme des Glykogens und der Milchsäure (verd.) 188 Cal. per g beträgt^{3) 4)}.

Dabei ist mit der Verbrennungswärme 3790 Cal. für gelöstes Glykogen gerechnet (Pflüg. Arch. 204, 295; 1924). Ferner sei auf Meyerhofs direkte Messung der Hydrolysewärme Glykogen-Zucker verwiesen.

Bei der nach Neuberg für die alkoholische Gärung als Zwischenprodukt in Betracht kommenden Brenztraubensäure war früher eine positive Gärungswärme beobachtet worden⁵⁾; neue Messungen mit Hefen-Macerationssaft, an welchem keine Selbstgärung auftritt⁶⁾, haben nun ergeben, dass die Vergärung von Brenztraubensäure nicht von Wärmeentwicklung begleitet ist⁷⁾.

Von anderen Gärungsreaktionen sei noch die von Buchner u. Gaunt untersuchte Essigsäuregärung erwähnt, also die oxydative Bildung von Essigsäure aus Äthylalkohol; die per Mole angegebenen Verbrennungswärmen betragen:

Äthylalkohol	326,2
Essigsäure	210,0.

¹⁾ Rubner, Rubners Archiv f. Physiologie, 1912, Suppl.

²⁾ Vgl. Euler u. Lindner, Chemie der Hefe u. d. alkoholischen Gärung. Leipzig 1915, S. 247.

³⁾ Meyerhof, Pflüg. Arch. 195, 22; 1922.

⁴⁾ Hill und Hartree, JI of Physiol. 56, 294, 367; 1922.

⁵⁾ Neuberg und P. Rosenthal, Biochem. Zs 61, 175; 1914.

⁶⁾ A. v. Lebedew, Am. Inst. Pasteur, 26, 31; 1912.

⁷⁾ Neuberg, Biochem. Zs 152, 203; 1924.

Da die beiden Lösungswärmen angenähert gleich sind, erhalten wir als Reaktionswärme einfach die obige Differenz, nämlich

116,2 kg-Cal.

Andere Gärungen, wie die Buttersäuregärung, die Zellulosegärung, lassen sich nicht durch eine ähnlich einfache Formel darstellen, wie die alkoholische Hefegärung, weshalb auch die entsprechenden Gärungswärmen weniger scharf definiert sind.

Energiewandlung bei Enzymreaktionen in der lebenden Zelle.

In diesem Zusammenhang muss in Kürze das Problem der Energiewandlung in der lebenden Zelle berührt werden.

Wie schon S. 230 besprochen worden ist, wird die alkoholische Gärung der Hefe nur zu einem verhältnismässig kleinen Teil durch den von Buchner als Zymase bezeichneten Enzymkomplex vermittelt; vielmehr müssen wir diese Gärung der Hauptsache nach als eine Protoplasmawirkung ansehen. Immerhin — und das muss hier betont werden — ist eine besondere Gruppe des Protoplasmas für jede spezielle stoffliche Umwandlung verantwortlich zu machen, und in diesem Sinne werden wir die meisten, von einem unbekanntem Katalysator abhängigen organischen Reaktionen im Tier- und Pflanzenkörper als Enzymreaktionen betrachten können.

Wenn wir also die wärmeliefernden, exothermen Spaltungs- und Gärungsvorgänge in der Zelle den Enzymreaktionen zuzählen, unabhängig davon, ob die betreffenden Enzyme schon isoliert worden sind, so erhebt sich besonders für diese Vorgänge sowie für die Oxydationen die Frage, in welcher Weise die bei einer Reaktion frei werdende Energie von der Zelle ausgenutzt werden kann.

Äusserungen in der neueren enzymatischen Literatur zeigen, dass es nicht vollkommen überflüssig ist, darauf hinzuweisen, dass die Temperaturerhöhung, welche als Folge einer Reaktionswärme in einer Zelle eintreten kann, an sich noch keineswegs die Ausnutzung dieser Wärmeenergie durch die Zelle verständlich macht.

Es handelt sich hier um folgende, auch für die allgemeine Chemie prinzipiell wichtige Frage: Auf welche Weise kann die bei einer Reaktion frei werdende chemische Energie den Eintritt und den Verlauf anderer chemischer (und auch physikalischer) Vorgänge im gleichen System ermöglichen.

In allgemeiner Form kann hierauf wohl die Antwort gegeben werden, dass die typischen energieliefernden Reaktionen der lebenden Zelle in irgend einer Weise den Energiehub gewisser Stoffe veranlassen, welcher erforderlich ist, damit Vorgänge, welche isoliert der Zufuhr von Energie bedürfen, in der Zelle ablaufen können.

Erst in neuerer Zeit hat sich die Erkenntnis Bahn gebrochen, dass bei der Ausnutzung der chemischen Energie einer Reaktion in der lebenden Zelle nicht intermediär Wärme entsteht, sondern freie Energie in anderer Form erzeugt wird.

Nicht ausgeschlossen ist, dass ein Teil der Reaktionswärme in der Zelle weiter energetisch ausgenützt wird. Wenn wir nämlich an der Voraussetzung festhalten, dass vitale Enzymreaktionen, wie Zuckerabbau und gewisse Oxydationen an katalysierende Gruppen des Plasmas lokalisiert sind, so wäre es denkbar, dass der Wärmestrom bzw. der Temperaturunterschied zwischen den verschiedenen Teilen des Protoplasmas in freie Energie umgesetzt werden könnte, dass also das Plasma gewissermassen als Wärmemaschine funktioniert¹⁾. Allerdings hat sich in einer bemerkenswerten Untersuchung von O. Warburg und Meyerhof²⁾ ein so typischer Energie liefernder Vorgang, wie die Atmung unbefruchteter Seeigelleier, unabhängig von der Struktur gezeigt, d. h. er blieb nach der scheinbar gründlichen Zerreibung des Materiales ziemlich unverändert erhalten.

Verschiedene Wege sind denkbar, auf welchen eine mit Energie-Entwicklung verbundene Reaktion einen für sich allein nicht freiwillig verlaufenden Vorgang „erzwingen“ kann.

Der einfachste Fall liegt wohl bei stufenweisen Reaktionen vor (vgl. S. 167). Wir nehmen an, dass eine reversible Reaktion I, etwa eine Hydrolyse, ihr natürliches Gleichgewicht erreicht, wenn 95% des Ausgangsmateriales A in einen Stoff B umgesetzt sind. Die entgegengesetzt gerichtete synthetische Reaktion, welche freiwillig nur bis zum Umsatz von 5% der Substanz B in A erfolgen würde, kann erzwungen werden durch eine Reaktion II, welche den Stoff A praktisch vollständig in C verwandelt. Es ist dies ja eine unmittelbare Folge des Massenwirkungsgesetzes, und die energetische Beziehung zwischen den beiden Vorgängen wird ohne weiteres erkannt, wenn man in Betracht zieht, welche Arbeitsleistungen gemäss der Reaktionsisotherme (39) $A = RT \ln K$ gewonnen werden können, wenn einerseits jede der beiden Reaktionen $B \rightarrow A$ und $A \rightarrow C$ für sich verläuft, andererseits beide in einem gemeinsamen System vor sich gehen.

In diesem Zusammenhang muss nochmals die von Neuberg³⁾ in die Enzymchemie eingeführte und mit viel Erfolg verwendete „Abfangemethode“ erwähnt werden. Durch dieselbe sind Neuberg und seinen Mitarbeitern wichtige Feststellungen über das Auftreten gewisser Produkte bei der alkoholischen Gärung gelungen. Insbesondere spielen, wie im II. Teil eingehender dargelegt wird, Sulfit und Dimedon [= Dimethylhydroresorcin⁴⁾] als

¹⁾ Euler und af Ugglas, Zs f. allgem. Physiol. 12, 364; 1911. Über die Anwendbarkeit des 2. Hauptsatzes auf Vorgänge im tierischen Organismus siehe auch Wachtel, Pflüg. Arch. 171, 66; 1918.

²⁾ Warburg und Meyerhof, Pflüg. Arch. 148, 295; 1912.

³⁾ Neuberg und E. Färber, Biochem. Zs 78, 238; 1916. — Neuberg und Reinfurth, ebenda 89, 365; 1918. — Neuberg und F. F. Nord, ebenda 96, 133; 1919. — Neuberg und Arinstein, ebenda 117, 269; 1921. — Siehe auch Neuberg und J. Hirsch, Erg. d. Physiol. 21, 400; 1923.

⁴⁾ Neuberg und Reinfurth, Biochem. Zs 106, 281; 1920.

Abfangestoffe für Carbonylderivate eine wesentliche Rolle in den Neubergschen Gärungsstudien.

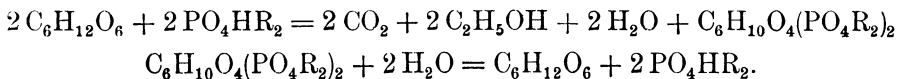
Die Energie liefernden Reaktionen bzw. die durch ihre Umwandlung Energie liefernden Stoffe können Anlass zur Bildung von Zwischenprodukten geben, welche dann in der Weise zerfallen, dass ein Teil geringeren, ein Teil höheren Energiegehalt besitzt als das Ausgangsmaterial. Letztere Stoffe können sich an synthetischen Reaktionen beteiligen, welche sich aus dem Ausgangsstoff scheinbar unter Energieverbrauch bilden. Zwei Reaktionen sind also durch eines oder mehrere ihrer Zwischenprodukte verknüpft.

Solche Reaktionspaare werden im allgemeinen als „gekoppelte Reaktionen“ bezeichnet (vgl. S. 169 u. ff.), und besonders bei dem von Haber studierten Fall der Autooxydation (S. 170) wird es deutlich, dass die „erzwungene Reaktion“ eine Folge des Energie-Überschusses der induzierenden Reaktion ist.

Hat ein Vorgang B aber mit der Energie liefernden Reaktion A keine Reaktionskomponente (im eigentlichen Sinne des Wortes) gemeinsam, so lässt sich — nach dem gegenwärtigen Stand unserer Kenntnisse, besonders wenn wir an dem sogen. Prinzip der Koexistenz zweier Reaktionen festhalten — nur dann eine Energieübertragung verständlich machen, wenn beide Reaktionen unter dem Einfluss eines und desselben Katalysators verlaufen¹⁾, welcher dabei eine Umwandlung erfährt. In lebenden Zellen wird der Forderung eines gemeinsamen Katalysators in der Regel dadurch genügt sein, dass die wichtigsten vitalen Reaktionen am Protoplasma vor sich gehen dürften.

Die im vorstehenden angegebenen Gesichtspunkte lassen sich auf die biochemischen Zuckerspaltungen, und zwar zunächst auf die Vergärung, dann aber auch auf den Kohlehydratabbau im Muskel anwenden und dürften eine gewisse Erweiterung unserer Einsicht in den Mechanismus dieser Vorgänge ermöglichen. Der Gedankengang der Arbeiten, welche der Verf. in dieser Richtung zusammen mit K. Myrbäck²⁾ begonnen hat, ist folgender:

Die Hardensche Gärungsgleichung, von Harden und Young selbst gut experimentell begründet, hat in letzter Zeit auch im Laboratorium des Verf. neue Bestätigungen erfahren. Sie drückt bekanntlich den Zusammenhang des Phosphatumsatzes mit der Entwicklung von Alkohol und CO₂ aus und ist von Harden folgendermassen formuliert worden:

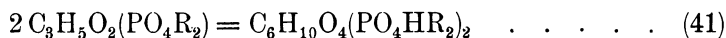


Die beiden Formeln drücken die Tatsache der gleichzeitigen Bildung von 2 Molekülen CO₂, 2 Molekülen Alkohol und einem Molekül Kohlehydratphosphorsäureester (Zymophosphat) aus. Dagegen geht aus der Hardenschen Gleichung nicht hervor, wodurch der Umsatz des einen Glucosemoleküls

¹⁾ Vgl. hierzu Euler und Ugglass, Zs f. allg. Physiol. 12, 364; 1911.

²⁾ Euler und Myrbäck, Sv. Kem. Tidsk. 36, 160; 1924.

zu Alkohol und Kohlensäure mit dem Umsatz eines zweiten Moleküls Glucose und zweier Moleküle Phosphat zu einem Molekül Zymophosphat verknüpft ist. Der Inhalt der obigen Gärungsgleichung kann nun dahin näher präzisiert werden, dass ein Molekül Glucose die Umsetzung im Hardenschen Sinne erfährt:



Die neue Formulierung der Gärungsgleichung besagt, dass ein Molekül Glucose zunächst in zwei Teilmoleküle mit je 3 C-Atomen gespalten wird, von welchen nur das eine mit Phosphat verestert wird, während das andere die Spaltung in Alkohol und CO_2 erfährt. Die chemische Begründung gehört, soweit sie gegenwärtig durchgeführt ist, in den speziellen Teil dieses Buches¹⁾. Zunächst wird verständlich, dass zwischen Alkohol, CO_2 und Zymophosphat eine strenge stöchiometrische Beziehung bestehen muss. Energetisch ergibt sich ferner aus dem Postulat, dass von den beiden Teilmolekülen das eine energiereicher, das andere energieärmer ist als das halbe Glucosemolekül, dass die Synthese des Zymophosphates auf Kosten der energieärmeren, vergärenden Glucosehälfte erfolgt. Es liegt nun nahe, weiter anzunehmen, dass das nach der Gleichung (40) reagierende Glucosemolekül nicht, wie viele andere Substrate, durch ein Enzym an zwei Stellen, sondern durch zwei Enzyme an zwei Stellen gebunden wird, und man wird zunächst die Phosphatase und ein der Carboxylase nahestehendes Enzym in Betracht ziehen. Es soll also versucht werden, die Reaktionskoppelung zwischen Zymophosphatbildung und Alkohol- CO_2 -Entwicklung weiter aufzuklären. Auch hier sei auf die wichtigen Beiträge von Meyerhof zur Energetik des Kohlehydratabbaues hingewiesen.

Beim Kohlehydratabbau im Muskel können wir das zweite Teilmolekül näher definieren; es ist die Milchsäure [Fletcher und Hopkins²⁾], welche stets neben Lactacidogen (Zymophosphat) auftritt (Embden und Mitarbeiter).

Der hier erwähnte Spezialfall gibt uns ein Beispiel, wie eine unter Energiebindung verlaufende Synthese möglich wird auf Kosten einer zweiten Teilreaktion, indem das eigentliche Substrat der Synthese auf Kosten des zweiten Teilsubstrates und unter Mitwirkung eines gemeinsamen Katalysators einen Energieüberschuss erhält, so dass die Synthese ein freiwillig verlaufender Vorgang wird.

In analoger Weise lassen sich noch weitere im pflanzlichen Organismus eintretende Synthesen, welche energetisch durch Atmung und Gärung ermöglicht werden, auf die Bildung energiereicher Zwischenprodukte zurückführen.

¹⁾ Zur Diskussion der Gärungsgleichungen siehe auch A. v. Lebedew, Chem. Ber. 45, 3240; 1912. — H. 132, 275; 1924.

²⁾ Fletcher und Hopkins, JI of Physiol. 35, 247; 1907.

Im vorhergehenden war noch nicht von denjenigen Fällen die Rede, in welchen einem System von Stoffen, zwischen welchen an sich keine freiwillige Reaktion abläuft, eine fremde Energie zugeführt wird. In solchen Fällen erfährt die Komponente des Systems, welche die fremde Energie absorbiert, einen Energiehub (eine Potentialerhöhung), so dass dadurch ihre Teilnahme an einer Reaktion erzwungen werden kann.

Die bekannteste und in jeder Hinsicht wichtigste derartige Reaktion ist die Assimilation der Kohlensäure, ein Vorgang, welcher in höheren Pflanzen unter der Einwirkung sichtbarer Strahlen stattfindet und, wie Willstätter gezeigt hat, unter Teilnahme eines (wenigstens eines) Enzymes verläuft.

Es ist bereits erwähnt worden, dass man Otto Warburg eine ausgezeichnete energetische Bearbeitung des Assimilationsproblems unter Anwendung der Quantentheorie verdankt, welche durch seinen Vater Emil Warburg zuerst (1907) auf photochemische Prozesse überhaupt angewandt worden war¹⁾.

Die allgemeine Beziehung zwischen strahlender Energie und chemischer Energie und, im Anschluss daran, die Einführung der Quantentheorie auf chemische Probleme ist in den letzten Jahren Gegenstand zahlreicher, teilweise sehr bemerkenswerter Arbeiten gewesen.

Unter den Pionieren auf diesem Gebiete muss M. Trautz²⁾ genannt werden, welcher bereits 1905 sehr interessante Zusammenhänge zwischen der Intensität der Chemilumineszenz von Reaktionen und ihrer Geschwindigkeit fand. Wie Trautz (1905) betont hat, kommt „Chemilumineszenz nicht nur vereinzelt vor, sondern umfasst ein weit ausgedehntes Gebiet neuer und eigenartiger Erscheinungen“.

Den Entwurf einer Theorie der chemischen Reaktionen auf Grund der Strahlungshypothese hat 1919 Perrin³⁾ gegeben.

Perrin geht davon aus, dass in chemischen Systemen zahlreiche diffuse Strahlungen der verschiedensten Wellenlängen wirksam sind und stellt den Satz auf: „Jede chemische Reaktion ist durch eine Lichtstrahlung hervorgerufen; seine Geschwindigkeit ist bestimmt durch die Intensität dieser Strahlung und hängt nur von der Temperatur insofern ab, als diese auf der Strahlung beruht.“

Bezeichnet man die Frequenz dieser Strahlung mit ν , die absolute Temperatur mit T , und ist C eine Konstante, so ergibt sich aus den bekannten Strahlungsgesetzen, dass sich die Reaktionsgeschwindigkeit mit der Temperatur proportional dem Ausdruck ändert:

$$\frac{1}{e^{\frac{C\nu}{T}} - 1},$$

wo C eine universelle Konstante bedeutet, welche angenähert $0,5 \cdot 10^{-10}$ beträgt.

¹⁾ Siehe auch Trautz, Zs f. wiss. Phot. 6, 169; 1908.

²⁾ Trautz, Zs f. physik. Chem. 53, 1; 1905. — Zs f. wiss. Phot. 4, 351; 1906. Jahrb. d. Radioaktivität, 4, 136; 1907.

³⁾ Perrin, Ann. de Physique, 11, 1; 1919. — Siehe hierzu auch W. C. M. Lewis, Brit. Assoc. Rep. 1915, 394 und Phil. Mag. (6) 39, 26; 1920.

Die Gleichung (24a) S. 130 für monomolekulare Reaktionen geht in die Gleichung über:

$$\frac{dx}{dt} = v = \frac{s}{e^{Q/T} - 1},$$

wo s eine für jede chemische Reaktion charakteristische Konstante bedeutet.

Unter vereinfachenden Annahmen wird für den Ausdruck $\frac{d \ln v}{dT}$ (die „thermische Beschleunigung“), die Formel abgeleitet:

$$\frac{d \ln v}{dT} = \frac{Qv}{T^2}.$$

„Jede chemische Reaktion umfasst zwei entgegengesetzte Bewegungen der strahlenden Energie, nämlich eine Absorption des Lichtes, welche die chemische Reaktion hervorruft, und eine Emission des Lichtes, welche die Reaktion wieder umkehren würde.“

Eine eingehendere Ausarbeitung oder experimentelle Prüfung hat dieses theoretische Essai seit dessen Erscheinen nicht erfahren.

In den letzten 5 Jahren ist eine Reihe sehr bemerkenswerter Arbeiten erschienen, in welchen die Reaktionsgeschwindigkeit unter Einführung der Planckschen Quantentheorie behandelt wird¹⁾.

Trautz und Herzfeld haben unabhängig voneinander für die Geschwindigkeit einer Reaktion $AB \rightarrow A + B$, bei welcher jeder Stoss zur Reaktion führen soll, die Formel abgeleitet:

$$k = \frac{R}{h} T \cdot e^{-\frac{Q}{RT}}$$

S. Dushman²⁾ setzt die Anzahl derjenigen Moleküle, deren innere Energie durch Strahlung einen solchen Wert erhält, dass sie in einen angeregten, reaktionsfähigen Zustand übergehen, proportional mit

$$A \cdot e^{-\frac{Q}{RT}},$$

und er findet für den Reaktionskoeffizienten k den Ausdruck

$$k = s \cdot e^{-\frac{h\nu}{RT}},$$

wo h die Plancksche Konstante, ν die Schwingungszahl und s eine Konstante bezeichnen.

Es kann kaum bezweifelt werden, dass die weitere Entwicklung dieser Ansätze, wie überhaupt die Einführung der Quantentheorie für die Entwicklung der chemischen Reaktionskinetik von wesentlicher Bedeutung sein wird.

Eine Strahlungshypothese für Enzymreaktionen hat 1904 Barendrecht³⁾ aufgestellt und ist neuerdings wieder darauf zurückgekommen. Sie sei der Vollständigkeit halber hier erwähnt. Der Autor nimmt an, dass die Enzymwirkung auf Strahlung beruht, welche von

¹⁾ K. F. Herzfeld, Ann. d. Physik, 59, 635; 1919. — Polanyi, Zs f. Elektrochem. 26, 54; 1920. — Trautz, Zs f. Physik 2, 117; 1920. — Siehe auch die sehr interessante Arbeit von E. K. Rideal und Norrish (Proc. Roy. Soc. A. 103, 366; 1923).

²⁾ Dushman, Am. Chem. Soc. 43, 397; 1921. — Siehe auch J. A. Christiansen und H. A. Kramers, Zs physik. Chem. 104, 451; 1923. — O. Klein und Rosseland, Zs f. Physik 4, 46; 1921. — Christiansen, Zs f. physik. Chem. 113, 35; 1924.

³⁾ Barendrecht, Zs f. physik. Chem. 49, 456 und 54, 367; 1906.

der katalysierenden Substanz ausgehen. Barendrecht hat seine Ansichten zunächst an der Urease¹⁾ entwickelt: „Das Enzym Urease wirkt durch seine Strahlung, welche nur von seinem Substrat Harnstoff und von Wasserstoffionen absorbiert wird.“

In einer Mitteilung über Saccharase findet Barendrecht eine Bestätigung seiner Formel:

$$-\frac{dx}{dt} = m \frac{x}{x + nc}$$

wo

- x = Konzentration des Substrates zur Zeit t
- c = Konzentration der Wasserstoffionen
- n = Absorptionskoeffizient der Wasserstoffionen
- m = Konstante, proportional der Enzymkonzentration.

„Diese Formel²⁾ sagt (für x = a), selbst frei von jeder Hypothese, dass Substrat und Wasserstoffionen den Effekt, welcher von einem Enzym ausgeht, unter sich in konstantem Verhältnis teilen.“ „Die spezifisch sehr starke Absorbierung dieses Effektes durch Wasserstoffionen, das ist durch die Einheiten positiver Elektrizität, stützt die früher schon ausgesprochene Vermutung, dass die Enzymstrahlung sich als eine Elektronenerscheinung herausstellen würde.“

„Eine direkte Bekräftigung (nach Barendrechts Auffassung) dieser Ansicht wurde vor kurzem von Petri³⁾ gegeben, der oberhalb aktiver Enzymlösungen eine messbare Ionisierung der Luft nachwies, welche verschwand, sobald man das Enzym inaktivierte.“

¹⁾ Barendrecht, Rec. Trav. chim. Pays Bas., 39, 1; 1920 und Proc. Akad. Wetensch. Amsterdam 21–22.

²⁾ Barendrecht, Biochem. Zs 151, 363; 1924.

³⁾ Petri, Atti Reale Accad. die Lincei, Rend. 31, 50; 1922. Zitiert nach Barendrecht.

9. Kapitel.

Spezifische Wirkungen von Enzymen in vitro.

In der 2. Auflage dieses Buches wurde dieses Kapitel mit folgenden Worten eingeleitet:

„Dem Studium der spezifischen Enzymwirkungen fällt nach Ansicht des Verfassers eine besonders wichtige Rolle in der künftigen Enzymforschung zu. Mehrere Tatsachen deuten darauf hin, dass uns die Strukturchemie — wenigstens auf ihrem gegenwärtigen Standpunkt — keine Analoga zur chemischen Bindung zwischen Enzym und Substrat liefern kann. Dagegen können wir hoffen, dass uns die erweiterte Kenntnis der strengst spezifischen enzymatischen Vorgänge einen Einblick in die vermutlich eigenartigen Verhältnisse gestattet, welche ein Enzym mit seinem besonderen Substrat verknüpft.“

Die in den letzten 4 Jahren gewonnenen Ergebnisse haben die hier ausgesprochene Erwartung über die Fruchtbarkeit des Studiums stereochemischer Einflüsse für die Enzymforschung in hohem Masse bestätigt, und man hat allen Grund zu hoffen, dass die weiteren Arbeiten auf diesem Gebiet zu entscheidenden Fortschritten führen werden.

Unsere Kenntnisse über die Wirkungsgebiete der Enzyme weisen noch so viele Lücken auf, dass eine Einteilung keineswegs Anspruch darauf machen darf, längere Zeit massgebend oder zweckmässig zu bleiben. Gegenwärtig erscheint es dem Verf. immerhin geeignet, zwei Erscheinungsgruppen auseinanderzuhalten, für welche die Bezeichnungen *Biologische Enzym-Spezifität* und *Chemische Enzym-Spezifität* gewählt werden können.

Biologische Enzym-Spezifität sei diejenige genannt, welche mit der Herkunft, Rolle und Eigenart eines Enzyms, wie es im Organ (Saft oder Gewebe) vorkommt, zusammenhängt. Sie betrifft also das Enzym oder richtiger das Enzymsystem mit Einschluss der Aktivatoren usw., das in einem Organ eines gewissen Tieres oder einer bestimmten Pflanze wirkt. Die Kenntnis dieser spezifischen Enzymwirkungen wird besonders der Biologe benötigen, wenn er sich über das Geschehen in einem Organ eine quantitative Vorstellung bilden will. Eingehenderes über die biologische Spezifität, die übrigens vielleicht die interessanteste von allen ist, da sie zu den Lebensvorgängen in unmittelbarster Beziehung steht, wird im III. Teil dieses Buches erörtert werden. Hier seien nur einzelne typische Tatsachen und einige Gesichtspunkte angeführt.

Bei der Behandlung der chemischen Enzym-Spezifität ist es unser Ziel, Vorgänge an reinen Enzymen von konstitutionschemischen und kinetischen Gesichtspunkten aus zu beschreiben. Die Vorarbeit dazu muss darin bestehen, die biologischen Bedingungen chemisch zu definieren.

Es liegen also hier drei verschiedene Probleme zur Bearbeitung bzw. zur Besprechung vor:

Erstens sind diejenigen Besonderheiten in der chemischen Struktur der Substrate aufzusuchen, welche für die Angreifbarkeit durch Enzyme ausschlaggebend sind.

Zweitens haben wir diejenigen Daten zu sammeln, welche uns die Beziehungen eines Enzyms zu stereoisomeren Substraten und besonders zu optischen Antipoden kennen lehren.

Drittens müssen wir versuchen, die Befunde über artspezifische, körperspezifische und organspezifische Enzyme den beiden vorhergehenden Beobachtungsgebieten anzuschliessen.

Es ist zweifellos eine besonders wichtige Aufgabe der Forschung, zu entscheiden, inwieweit die noch rätselvollen Tatsachen, welche hinsichtlich artspezifischer, körperspezifischer und organspezifischer Enzyme gefunden worden sind, nicht nur durch die Verschiedenheit der Wirkungsbedingungen und äusseren Umstände veranlasst sind, sondern sich auf chemische Spezifität zurückführen lassen, inwieweit es also notwendig wird, charakteristische chemische Unterschiede etwa zwischen der Pankreasamylase und der Darmamylase oder zwischen den Serumlipasen zweier verwandter Tiere anzunehmen.

Auch die Frage, welche Faktoren die Enzymbildung im lebenden Organismus beeinflussen, werden am besten durch Versuche mit solchen Stoffen beantwortet, denen eine gewisse Spezifität zukommt (siehe 10. Kapitel).

Chemische Spezifität.

A. Verhalten einzelner Enzyme zu Substraten verschiedener Zusammensetzung und Struktur.

Die Forschungen des letzten Jahrzehntes haben es wahrscheinlich gemacht, dass in vielen Enzympräparaten, in welchen man früher ein einziges Enzym angenommen hat, eine Anzahl verschiedener Enzyme existiert, welchen ein kleineres Wirkungsgebiet zukommt. So wurde bereits erwähnt, dass im Emulsin mehrere Enzyme enthalten sind; die „Zymase“ kann nicht mehr als einheitlich angesehen werden; auch Teilenzyme der „Diastasen“, welche den Abbau der Stärke stufenweise bewerkstelligen, sind in Betracht gezogen worden, und es wird der weiteren Forschung gelingen, noch manches jetzt als einheitlich angesehene Enzym in Komponenten aufzuteilen, von welchen jede einzelne eine besondere Reaktion beschleunigt.

Was die Frage betrifft, welche verschiedenen Enzympräparate eine und dieselbe Reaktion beschleunigen, so scheidet eine kritische Bearbeitung jetzt noch häufig an der Schwierigkeit, die Reinheit der Präparate zu beurteilen. Wenn also z. B. angegeben wird, dass eine Protease Fette spaltet, so heisst dies ja nichts anders, als dass die betreffenden Präparate Lipasen enthalten, falls nicht nachgewiesen wird, dass die glucosidspaltende und die fettspaltende Wirkung stets parallel gehen. Physiologisch kann es natürlich von Interesse sein, festzustellen, welche Enzyme gleichzeitig vorzukommen pflegen und auch hinsichtlich ihrer Menge und Wirksamkeit miteinander parallel gehen.

Besonders nahe liegt gegenwärtig dem Enzymchemiker die Frage, welche engsten Grenzen für jedes spezielle, möglichst exakt definierte Enzympräparat bzw. Enzym angenommen werden müssen, bzw. welchen Bereich verschiedener Substrate die einzelnen Enzyme umfassen.

1. Ältere Arbeiten und wichtigere empirische Ergebnisse über den Wirkungsbereich einzelner Enzyme.

Es hat sich zunächst darum gehandelt, festzustellen, welchen Einfluss chemische Veränderungen an einem Substrat (Substitutionen, Additionen usw.) auf seine Angreifbarkeit durch eine gegebene Enzymmenge besitzen.

Dieser Frage hat E. Fischer zeitig seine Aufmerksamkeit gewidmet; er hat z. B. schon in einer frühen Periode der Enzymforschung untersucht, ob Derivate der Glucose, wie Gluconsäure, Sorbit usw., gärfähig sind; dies ist bekanntlich nicht der Fall. Nun liegen gerade bei der Zymase die Verhältnisse deswegen verhältnismässig kompliziert, weil bei der Gärung zweifellos mehrere Enzyme zusammenwirken, über deren Tätigkeitsgrenzen wir erst vereinzelte Anhaltspunkte haben.

Mehr Aussicht, gesetzmässige Beziehungen zwischen Konstitution und Reaktionsfähigkeit zu finden, haben wir bei den enzymatischen Hydrolysen, und besonders bei solchen, wo wir die Reihenfolge der Reaktionsfähigkeiten auch mit nicht enzymatischen Katalysatoren feststellen können.

Besonders ist hier eine der letzten Arbeiten von E. Fischer¹⁾ zu erwähnen, welche den Einfluss der Struktur der β -Glucoside auf die Wirkung des Emulsins behandelt. Wir geben zunächst zwei Auszüge aus der Tabelle (l. c. S. 183—186), unter annähernder Umrechnung auf gemeinsame Versuchsbedingungen.

Die Angaben beziehen sich auf eine mittlere Temperatur von 35° und optimale Acidität.

Substrat	Derivat	Prozent der Hydrolyse	Dauer in Stunden
Glucosidoglykolsäure	Natriumsalz	20	50
	Methylester	77	80
	Amid	55	24
	Nitril	35	24

Dass β -Glucoside des Traubenzuckers durch einen Bestandteil des Emulsins gespalten werden, gleichgültig ob das mit dem Zucker verbundene Radikal

¹⁾ E. Fischer, H. 107, 176; 1919.

ein Alhyl oder Arryl ist, hat Fischer bereits früher betont¹⁾. In folgender Tabelle wird nun das ältere Material ergänzt.

Substrat	Versuchsdauer	Prozent der Hydrolyse
Na-Salz der Glucosidoglucolsäure	48	18
„ „ „ Glucosido- α -oxyisobuttersäure	48	Spuren
„ „ „ Glucosido-mandelsäure (d + l)	24	30
„ „ „ Amygdalinsäure (d + l)	48	43
„ „ „ Cellosidoglucolsäure	24	30
freie Glucosidosyringasäure ($p_H = ca. 3,7$) ($1/2$ Emulsin)	24	45
freie Glucosidogallussäure ($1/10$ Emulsin)	24	46
	24	34

Gewiss sind die Fehlergrenzen der angeführten Zahlen ziemlich gross; indessen geben schon bei derartigen orientierenden Versuchen angenäherte quantitative Beobachtungen ein deutlicheres Bild der Verhältnisse, als die sonst üblichen Angaben „spaltet“ bzw. „spaltet nicht“²⁾.

Das spezielle Ergebnis, das wir aus der obigen Tabelle gewinnen, ist der ziemlich weite Wirkungsbereich der β -Glucosidase des Emulsins, was mit den S. 315 wiedergegebenen Resultaten von Bourquelot gut übereinstimmt.

Wie Fischer bemerkt, werden bei ähnlicher Struktur die Glucoside der Phenole und Phenolcarbonsäuren durch Emulsin leichter gespalten, als die Derivate der aliphatischen Alkohole und Alkoholsäuren³⁾.

Dies gilt aber nicht allein für die Wirkung des Emulsins, sondern auch für die Hydrolyse durch Säuren. In der folgenden Tabelle stellt Fischer seine Versuchsergebnisse zusammen, welche mit den mittels Emulsin gewonnenen zu vergleichen sind.

Mit der 25fachen Menge 0,1 n-Salzsäure, 30 Minuten auf 100° erhitzt, werden hydrolysiert:

von β -Glucosidogallussäure	96%
„ Glucosido-dl-mandelsäure	7%
„ α -Methylglucosid (Chem. Ber. 49, 2818)	4,5%
„ β -Methylglucosid	9%
„ α -Phenolglucosid	68%
„ γ -Phenolglucosid	32%

Mit der 25fachen Menge 0,01 n-Salzsäure, auf 100° erhitzt, werden gespalten:

β -Glucosidogallussäure in 30 Minuten	13%
„ „ „ in 2 Stunden	44%
γ -Methylglucosid in 30 Minuten	quantitativ.

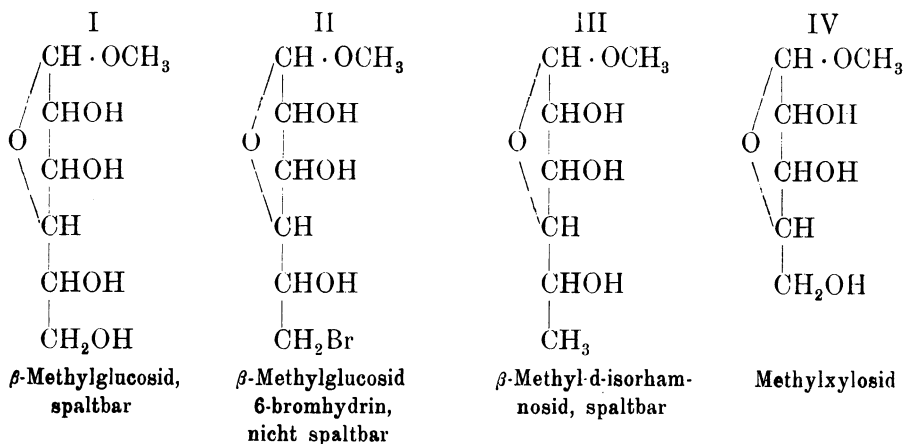
¹⁾ E. Fischer und Zach, Chem. Ber. 45, 3761; 1912. — Siehe auch Fischer und Helferich, Lieb. Ann. 383, 85; 1911.

²⁾ Wie Fischer hervorhebt, ist der unsicherste Faktor bei diesen Versuchen die Beschaffenheit des Emulsins. Indessen ist immer dasselbe Emulsinpräparat benutzt worden.

³⁾ Es scheint dem Verf. nicht zweifelhaft, dass damit der Umstand zusammenhängt, dass die überwiegende Mehrzahl der natürlichen Glucoside die Phenylgruppe enthält.

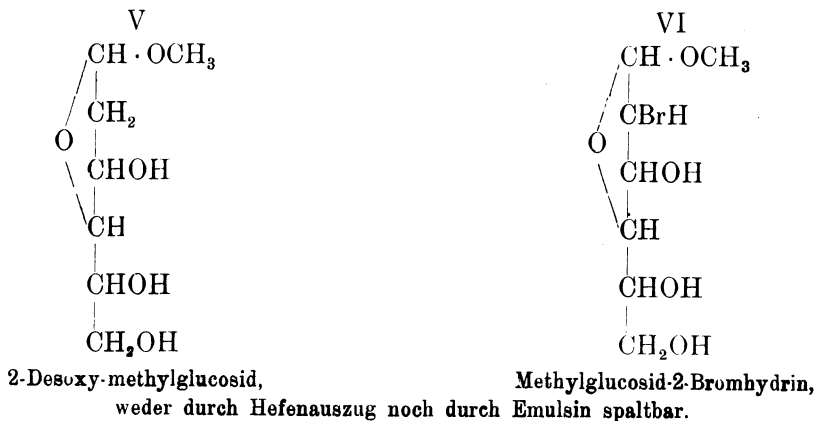
Besonders bemerkenswert ist das Verhalten einiger β -Methylglucosid-abkömmlinge: Während β -Bromallylglucosid (unter den gleichen Bedingungen wie oben angegeben) in 24 Stunden zu 96% gespalten war und β -Methyl-d-isorhamnosid schon durch $\frac{1}{10}$ der dazu verwendeten Emulsinmenge in 24 Stunden zu etwa $\frac{1}{4}$ gespalten werden konnte, wurde β -Methylglucosid-6-bromhydrin in dieser Zeit überhaupt nicht angegriffen.

Wie ein Blick auf die drei folgenden Strukturformeln I, II und III zeigt,



steht das β -Methylglucosid-6-bromhydrin in der Mitte zwischen dem β -Methylglucosid und dem β -Methyl-d-isorhamnosid. Auch die Konfiguration des Zuckerrestes ist in allen drei Fällen gleich. Da nun das Brom allein die Wirkung des Emulsins nicht verhindert, wie das Verhalten des Bromallylglucosides zeigt, so liegt hier ein neuer Beweis für die ausserordentlich feine Spezifität des Enzyms vor.“

In der Folge hat es sich dann gezeigt¹⁾, dass auch das mit dem 6-Bromhydrin isomere Methylglucosid-2-Bromhydrin (VI) und das mit dem Methyl-d-isorhamnosid isomere 2-Desoxymethylglucosid (V) durch Emulsin unspaltbar sind.



¹⁾ E. Fischer †, Bergmann und Schotte, Chem. Ber. 53, 509; 1920.

Noch merkwürdiger ist das negative Verhalten der beiden Methylxyloside gegen Emulsin und Hefenzym. Ein Vergleich der Formeln I, II und IV zeigt, dass Isorhamnosid in der Mitte zwischen I und IV steht. „Es ist das nächste Homologe des Xylosids und unterscheidet sich von dem Traubenzucker nur durch das Fehlen des endständigen Hydroxyls. Es erscheint nun sehr merkwürdig, dass die Wirkung des Enzyms auf die am anderen Ende der Kohlenstoffkette befindliche Methoxylgruppe abhängig ist von der Anwesenheit des sechsten Kohlenstoffatoms, dass sie also im Gegensatz zu allen bekannten chemischen Reaktionen bei der Grundform fehlt und erst beim Homologen eintritt“¹⁾.

„Die Indifferenz der Xyloside gegen Emulsin und Hefenenzyme zeigt mithin, welche feine Unterschiede für den Angriff dieser Stoffe massgebend sind, oder mit anderen Worten, wie grob die Vorstellungen noch sind, welche wir trotz aller Fortschritte der Struktur- und Stereochemie von dem Aufbau des chemischen Moleküls haben. Das weitere Studium der enzymatischen Prozesse scheint mir deshalb berufen zu sein, auch die Anschauungen über den molekularen Bau komplizierter Kohlenstoffverbindungen zu vertiefen.“

Diese letzten Arbeiten Fischers auf dem Gebiet der Glucoside sind auch für die allgemeine Enzymchemie von grossem Interesse.

Am leichtesten dürfte sich die vielfach hervorgehobene Spezifität der Oxydasen auf bekannte chemische Tatsachen zurückführen lassen. Die Oxydationsfähigkeit der einfachen und substituierten Mono-, Di- und Triphenole tritt gleichermassen hervor, ob „Oxydasen“ oder anorganische Mangauverbindungen die oxydierenden Katalysatoren sind²⁾.

Die früheren Vorstellungen über die Spezifität der Lipasen müssen nach den Ergebnissen der letzten Jahre wesentlich modifiziert werden.

Nach Kastles und Loevenharts einleitenden und in mancher Hinsicht bahnbrechenden Arbeiten schienen wenigstens zwei Gruppen von esterspaltenden Enzymen zu bestehen, von welchen die eine ganz vorwiegend auf Ester einwertiger Alkohole mit niedrigen Fettsäuren, die andere auf eigentliche Fette und Öle oder sonstige Glycerinester eingestellt ist. H. E. Armstrong und Ormerod³⁾ sowie auch Falk und Sugiura⁴⁾ neigen auf Grund ihrer eigenen Versuche ebenfalls zur Annahme einer Grenze zwischen den Enzymen niedriger Ester, „Esterasen“, und den eigentlichen „Lipasen“.

Armstrong und Ormerod vergleichen die Einwirkung von Leberlipase und Ricinuslipase auf verschiedene Ester; die Arbeit verdient Erwähnung als eine der ersten, in welcher systematische Vergleiche über die

¹⁾ Dabei ist allerdings die Voraussetzung gemacht, dass die beiden Xyloside eine ähnliche Struktur wie die β -Glucoside in bezug auf den Oxyring haben. „Früher hat man dies für selbstverständlich gehalten. Seitdem aber das γ -Methylglucosid existiert (E. Fischer, Chem. Ber. 47, 1980; 1914), muss man mit dieser Voraussetzung vorsichtig sein.“

²⁾ Siehe hierzu Bertrand, Bull. Soc. Chim. de Paris [3] 15, 791; 1896.

³⁾ H. E. Armstrong und Ormerod, Proc. Roy. Soc. B. 78, 376; 1906.

⁴⁾ K. G. Falk und Sugiura, Amer. Chem. Soc. 37, 217; 1915.

Spaltbarkeit verschiedener Substrate durch je ein Enzympräparat gemacht wurden. Sie kommen auch zu dem unzweifelhaft richtigen Schluss, dass es sich hier um Gradunterschiede der Wirksamkeit handelt (l. c. S. 383).

„Aus nachstehenden Resultaten scheint hervorzugehen, dass, wenn nur genügend Enzym angewandt wird, alle Ester mehr oder weniger angegriffen werden.“

ccm 0,2 n. Alkali, entsprechend der enzymatisch frei gemachten Säure. 25°.

	1 ccm Ester + 0,2 ccm Toluol + 20 ccm 2%iger Lebersaft		1 ccm Ester + 20 ccm Wasser + 2 ccm 0,2 n. Essigsäure + 0,2 ccm Toluol + 1,0 g (Ricinus)- Samen-Rückstand.	
	21 Stunden	68 Stunden	21 Stunden	68 Stunden
Mandelsaures Äthyl . . .	1,4	1,4	1,9	2,0
Benzoensaures Äthyl . . .	2,8	3,9	0,68	0,8
Salicylsaures Methyl . . .	0,3	0,3	0,2	0,4
Essigsäures Äthyl . . .	3,6	10,35	3,3	9,9
Weinsaures Äthyl . . .	0,2	—	1,0	—

Weitere Angaben über die spezifische Angreifbarkeit verschiedener Glycerinester, sowohl Acetate als Stearate, verdankt man Abderhalden und Weil¹⁾.

Was die Unterschiede betrifft, welche zwischen den tierischen Lipasen verschiedener Herkunft von zahlreichen Forschern gefunden worden sind, so führen die Untersuchungen von Willstätter und seiner Mitarbeiter, besonders Waldschmidt-Leitz²⁾ und Memmen³⁾ zu wesentlichen Modifikationen des früheren Bildes dieser Verhältnisse. Es zeigt sich, dass die Unterschiede, aus welchen man früher auf verschiedene Lipasen geschlossen hat, in die Gruppe der „Biologischen Spezifitäten“ gehören, d. h. im Verlauf der Reinigungsarbeit mehr und mehr verschwinden und als Folgen von äusseren Umständen erkannt werden. Wir kommen S. 379 auf diese Unterschiede zurück.

Wie Glucoside und Biosen in ihrem Verhalten zu Glucosidasen beeinflusst werden, wenn sie mit Schwefel- oder Phosphorsäure verestert worden sind, hat B. Helferich⁴⁾ kürzlich untersucht.

Beim α -Methylglucosid wird die Wirkung der α -Glucosidase aus Hefe durch Einführung eines Schwefelsäurerestes völlig aufgehoben. Dasselbe gilt für β -Methylglucosid bezüglich Emulsin. Auch die Phosphorsäureester des α -Methylglucosides, des β -Methylglucosides und des β -Phenylglucosides erwiesen sich durch Glucosidasen unspaltbar, ebenso die Schwefelsäure- und Phosphorsäureester der Trehalose und Cellobiose. Spaltbarkeit durch Emulsin zeigte nur der Schwefelsäureester eines Methylmaltosides. Sämtliche Ester wurden in Form ihrer Natriumsalze untersucht.

¹⁾ Abderhalden und Weil, Fermentf. 4, 76; 1920.

²⁾ Willstätter und Waldschmidt-Leitz, H. 134, 161; 1924.

³⁾ Willstätter, Haurowitz und Memmen, H. 140, 203; 1924. — Willstätter und Memmen, H. 138, 223; 1924.

⁴⁾ Helferich, Löwe, Nippe und H. Riedel, H. 128, 141; 1923.

Was weitere Kohlehydratderivate betrifft, so hat Ne u b e r g¹⁾ die interessante Beobachtung gemacht, dass Maltosazon durch Hefenmaltase hydrolysiert wird. Lactosazon wird durch Emulsin nicht gespalten.

Bierry und Giaja²⁾ haben einige Beobachtungen über die Spaltbarkeit des Lactons der Lactobionsäure und der Maltobionsäure angestellt, deren quantitative Wiederholung nicht ohne Interesse wäre. Sie haben nämlich, unter Anwendung je zweier Enzymsäfte, die Spaltbarkeit dieser Lactone mit derjenigen der entsprechenden Biosen, Lactose und Maltose, verglichen. Dabei hat sich ergeben, dass der Verdauungssaft der Weinbergsschnecke (*Helix pomatia*) eine ausgeprägte Fähigkeit besitzt, das Lacton der Lactobionsäure in Galactose und Gluconsäure zu zerlegen, während der Macerationssaft aus den Eingeweiden eines Säugetierfötus, welcher gegen Lactose sehr wirksam war, das Lacton nur in sehr geringem Grade angriff. Ähnlich waren die Ergebnisse bei der Einwirkung der beiden Säfte auf das Lacton der Maltobionsäure und auf Maltose. Bierry und Gjaia erwähnen auch die Spaltungsfähigkeit des Saftes von *Helix pomatia* gegenüber Maltosazon, was die Beobachtung von E. Fischer und E. F. Armstrong³⁾ ergänzt, welche das Spaltungsvermögen der Bierhefe gegenüber Maltoson bereits festgestellt hatten.

Neuberg⁴⁾ hat bereits 1910 studiert, wie die Phosphorylierung auf die Vergärbarkeit von Kohlehydraten einwirkt. Rohrzuckerphosphorsäure⁵⁾ und die von Neuberg dargestellte Glucosephosphorsäure werden nicht vergoren, dagegen die durch Säurespaltung aus der Rohrzuckerphosphorsäure entstandene und die direkt phosphorylierte Fructosephosphorsäure; ebenso erwies sich Galaktosephosphorsäure gärfähig.

Die Aceton-Verbindungen der einfachen Kohlehydrate Glucose, Fructose, Arabinose und Rhamnose sind, wie schon E. Fischer (Chem. Ber. 28) angegeben hat, nicht vergärbar.

Über die Fähigkeit des Pankreassaftes, Dipeptide zu spalten, haben Fischer und Abderhalden⁶⁾ ein reichhaltiges Material geliefert. Durch Pawlowschen Pankreassaft erwiesen sich nämlich als

hydrolysierbar:	nicht hydrolysierbar:
*Alanyl-glycin	Glycyl-alanin
*Alanyl-alanin	Glycyl-glycin
*Alanyl-leucin A	Alanyl-leucin B
*Leucyl-isoserin	Leucyl-alanin
Glycyl-l-tyrosin	Leucyl-glycin

Die mit * bezeichneten Peptide sind Racemkörper.

¹⁾ Neuberg und Saneyoshi, Biochem. Zs 36, 44; 1911.

²⁾ Bierry und Giaja, C. r. 147, 268; 1908.

³⁾ Fischer und E. F. Armstrong, Chem. Ber. 35, 3142; 1902.

⁴⁾ Neuberg und Kretschmer, Biochem. Zs 36, 5; 1911.

⁵⁾ Neuberg und Pollack, Biochem. Zs 23, 515; 1910.

⁶⁾ E. Fischer und Abderhalden, H. 46, 52; 1905 und 50, 264; 1907. — Vgl. auc E. Fischer und Bergell, Chem. Ber. 36, 3592; 1903 und 37, 3103; 1904.

hydrolysierbar:	nicht hydrolysierbar:
Leucyl-l-tyrosin	Leucyl-leucin
*Alanyl-glycyl-glycin	Aminobutyryl-glycin
*Leucyl-glycyl-glycin	Aminobutyryl-aminobuttersäure A
*Glycyl-leucyl-alanin	Aminobutyryl-aminobuttersäure B
*Alanyl-leucyl-glycin	Aminoisovaleryl-glycin
Dialanyl-cystin	Glycyl-phenyl-alanin
Dileucyl-cystin	Leucyl-prolin
Tetraglycyl glycin	Diglycyl-glycin
Triglycyl-glycinester (Curtius'	Triglycyl-glycin
Biuretbase)	Dileucyl-glycyl-glycin

Die mit * bezeichneten Peptide sind Racemkörper.

An diese Ergebnisse haben die genannten Forscher eine Reihe sehr interessanter Überlegungen geknüpft.

Den wesentlichen Einfluss der Struktur ersehen wir z. B. aus dem Befund, dass Alanyl-glycin gespalten wird, Glycyl-alanin nicht. Die Länge der Peptidkette beeinflusst die Spaltbarkeit wesentlich: Während bei Glycyl-glycin, Diglycyl-glycin und Triglycyl-glycin mit Pankreassaft die Spaltung nicht gelingt, ist Tetraglycyl-glycin angreifbar.

Es ist das Verdienst von Abderhalden, wiederholt betont zu haben, dass man Enzymgruppen wie Trypsin, Erepsin und Substratgruppen wie Albumine nicht behandeln darf, wie wenn ein einzelnes Enzym und ein einzelnes Substrat vorläge, sondern dass am enzymatischen Eiweissabbau eine grössere Anzahl von Enzymen beteiligt ist, welche auf je ein spezielles Substrat und unter speziellen Reaktionsbedingungen zur Wirkung kommen¹⁾. Die ausserordentlich grosse Variationsmöglichkeit der Substrate, d. h. die sehr grosse Anzahl der möglichen Isomeren erschwert hier die Forschung natürlich in hohem Grade.

Bis jetzt sind 20 Aminosäuren als Spaltprodukte der Proteine mit Sicherheit beobachtet worden. Würde es sich nur um Monoaminocarbonsäuren handeln und würden alle Verbindungen nach dem Schema —CO—NH— konstituiert sein, so wäre die Zahl der Formen wiedergegeben durch den Ausdruck $1 \times 2 \times 3 \times 4 \dots n$ oder

$$n!$$

wenn n die Zahl der im Molekül enthaltenen Aminosäuren ist, und diese alle untereinander verschieden sind. Für $n = 20$ ergibt sich

$$20! = 2,4 \cdot 10^{18} \text{ (abgerundet).}$$

Wenn das Molekül des Polypeptids n Aminosäuren enthält, die nicht alle verschieden sind, so wird die Zahl der Isomeren kleiner. Für ein 19-Peptid von Abderhalden und

¹⁾ Abderhalden und Teruuchi, H. 49, 1; 1906. — Abderhalden und Brahm, H. 57, 342; 1908.

Fodor¹⁾, welches 15 Glykokoll- und 4 Leucin-Moleküle enthält, ergibt sich die Anzahl der Isomeren zu

$$\frac{19!}{15! 4!} = 3876.$$

Hierzu kommen noch die Tautomerien.

Für ein Protein, bestehend aus 30 Molekülen Aminosäuren, von denen 18 untereinander verschieden sind, berechnete Fischer²⁾ die Isomeriefälle zu rund

$$1,28 \cdot 10^{27},$$

also mehr als tausend Quadrillionen.

Eine interessante Spezifität einer Pankreas-Nucleosidase wurde neuerdings von Levene und Ione Weber³⁾ beschrieben. Das von den genannten Forschern angewandte Enzym, welches gegen Purin-Riboside sehr aktiv war, vermochte Adenin-Hexosid nicht zu spalten. Auch erwies sich das gegen Purin-Nucleoside aktive Enzym unwirksam gegen die von Kossel und Neumann Thyminsäure benannte Substanz.

Wir kommen damit zurück zu den Biosen und Glucosiden, welche gegenwärtig das reichhaltigste Material zur Frage nach der chemischen Spezifität der Enzyme bieten, besonders durch die Beiträge, welche Willstätter und seine Mitarbeiter, in erster Linie Kuhn, geliefert haben. Diese Beiträge gestatten auch ein tieferes Eindringen in die chemischen Ursachen der experimentellen Befunde.

2. Zur Theorie der chemischen Enzym-Spezifität (R. Kuhn).

Es ist eine Konsequenz unserer gegenwärtigen, seit Michaelis quantitativ gefestigten Auffassung über die reaktionsvermittelnde Rolle der Verbindung Enzym-Substrat, dass die durch ein Enzym an verschiedenen Substraten hervorgerufene Reaktionsgeschwindigkeit (unter sonst konstant gehaltenen Bedingungen) eine Funktion zweier Grössen ist, nämlich

1. der Konzentration der Molekulart Enzym-Substrat, welche ihrerseits abhängt von der Affinität des Enzyms zu dem betreffenden speziellen Substrat,
2. der Zerfallgeschwindigkeit des an das Enzym gebundenen Substrates.

Man kann also aus enzymatischen Reaktionsgeschwindigkeiten nur dann Schlüsse auf Enzymmengen ziehen, wenn die Affinität zwischen Enzym und Substrat in den verglichenen Fällen bekannt ist.

Beim Vergleich von Enzympräparaten verschiedener Herkunft hatte man aus dem Umstand, dass die Quotienten der Reaktionsgeschwindigkeiten an verschiedenen Substraten verschieden ausfielen, den Schluss gezogen, dass jedem Substrat ein besonderes, ihm spezifisches Enzym entspricht, durch

¹⁾ Abderhalden und Fodor, Chem. Ber. 49, 561; 1916.

²⁾ E. Fischer, Sitz-Ber. Preuss. Akad. d. Wiss. 40, 990; 1916.

³⁾ Levene und I. Weber, JI Biol. Chem. 60, 717; 1924.

welches die Spaltung erfolgt¹⁾. Man verdankt R. Kuhn²⁾ den prinzipiell wichtigen Beweis, dass ein solcher Schluss nicht allgemein bindend ist, sondern nur für den speziellen Fall, dass mit allen verglichenen Substraten die Molekülart Enzym-Substrat in der gleichen Konzentration entsteht. Dies tritt ein, wenn die verglichenen Substrate zum Enzym die gleiche Affinität besitzen, oder aber wenn durch grossen Substratüberschuss stets alles Enzym an das Substrat gebunden ist.

Kuhn hat die Affinität als mitbestimmenden Faktor bei der Beurteilung von Spezifitätsfragen zuerst am Beispiel der enzymatischen Rohrzucker- und Raffinosespaltung eingeführt. Seiner theoretischen Bearbeitung dieses Spezialfalles ist folgendes entnommen:

Willstätter und Kuhn (H. 115) hatten für verschiedene Hefen den Quotienten Q der zum halben Umsatz äquinormalen Lösungen von Rohrzucker bzw. Raffinose erforderlichen Zeiten gemessen³⁾ und waren zu folgenden Zahlen gekommen:

Invertinpräparate (l. c. S. 192) (Löwenbräuhefe)	Q	Hefen (l. c. S. 196)	Q
Durch $Al(OH)_3$ ger. (Zeitw. 4,8)	11,2	Brennereihefe XII	12,3
Durch $Al(OH)_3$ und Kaolin ger. (Zeitw. 0,36)	11,2	Sinner-Hefe	7,4
Dasselbe Präparat mit Uranylacet. ger. (Zeitw. 1,96)	11,4	Brennereihefe M	7,0
		Brennereihefe Kopenhagen	5,1

Die Q -Werte der verschiedenen Hefen schwanken also weit über 100%, während Q bei den Präparaten einer Heferasse nahezu konstant bleibt.

Diese Schwankungen des Quotienten $\frac{\text{Zeitwert für Raffinase}}{\text{Zeitwert für Saccharose}}$, die sich beim Vergleich verschiedener Hefen ergaben, sind nun nach Kuhn nicht durch ein wechselndes Mengenverhältnis absolut spezifischer Hefenenzyme zu erklären. „Sie sind bedingt (Kuhn, l. c. S. 34) durch die wechselnde Affinität, die dem Invertin verschiedener Hefen gegenüber dem Di- und Tri-Saccharid eigen ist. Das Verhältnis der Dissoziationskonstante der Saccharase-Saccharoseverbindung K_S zur Dissoziationskonstante der Raffinase-Raffinoseverbindung K_R ist für alle untersuchten Invertine übereinstimmend

$$K_S : K_R = 1 : 16.$$

Ebenso erweist sich das Verhältnis des molaren Umsatzes von Rohrzucker und Raffinose, den eine bestimmte Enzymmenge unter optimalen Bedingungen in gleichen Zeiten bewirken könnte, der für unendlich hohe Substratkonzentration extrapolierte Zeitwertquotient Q_∞ als konstant. $Q_\infty = 2,0$.“

¹⁾ Willstätter und Steibelt, H. 115, 199; 1921. — Willstätter und Kuhn, H. 115, 180; 1921. — Willstätter und Csányi, H. 117, 172; 1921. — Willstätter und G. Oppenheimer, H. 121, 183; 1922.

²⁾ Willstätter und Kuhn, H. 125, 1; 1923.

³⁾ Über die Willstätterschen Maasseinheiten siehe Chem. Ber. 56, 509; 1923.

„Diese Zahlen liefern zum ersten Male ein Bild von der relativen Spezifität eines Enzyms zu zwei Substraten: Wenn wir die Rohrzucker-Invertin- und Raffinose-Invertinverbindung in reinem Zustand isolieren könnten und sie in solcher Konzentration in Wasser von 30° lösten, dass die Konzentration der undissoziierten Enzymsubstratverbindungen je 1 Mol pro Liter betrüge, so wäre neben dem Trisaccharid viermal mehr freies Invertin in Lösung als neben dem Disaccharid. Für jedes in Melibiose + Fructose zerfallende Raffinosemolekül würden dann in der gleichen Zeit zwei Rohrzuckermoleküle in Glucose + Fructose gespalten.“

Vergleicht man die Affinitäten (die Dissoziationskonstanten K_{mS}) der Saccharase-Saccharose-Verbindung mit derjenigen der Raffinase-Raffinose-Verbindung K_{mR} und mit den Quotienten der Umsatzgeschwindigkeiten in 0,138 n.-Lösungen, so ergibt sich ein gesetzmässiger Zusammenhang zwischen Affinität und Reaktionsgeschwindigkeit.

„Für drei aus verschiedenen Brennereihefen gewonnene Autolysate und ein aus Unterhefe dargestelltes Invertinpräparat vom Zeitwert 0,37 und nur noch geringfügigem Gehalt an Melibiase erweist sich das Verhältnis der Dissoziationskonstanten, der Affinitätsquotient $K_{mR}:K_{mS}$ weit innerhalb der Fehlergrenzen als annähernd konstant.

Vergleich von Geschwindigkeitsquotient und Affinität verschiedener Invertine.

Invertin	$Q_{0,138}$	K_{mS}	K_{mR}	K_{mR}/K_{mS}	Q_{50}	Q_{∞}
Berliner Rasse II	4,8	0,016	0,24	15	16	2,0
Berliner Rasse XII	5,0	0,016	0,24	15	16	2,0
Dänische Brennereihefe	5,0	0,017	0,27	16	16	1,9
Münchener Brauereihefe	8,3	0,040	0,66	17	17	1,9

Aus den in der 5. Spalte mitgeteilten Zahlen ergibt sich, dass die Affinität der Saccharase zum Rohrzucker und die der Raffinase zur Raffinose durch die natürlichen Begleiter des Invertins in fast gleicher Weise beeinflusst wird. Das wäre auch für den Fall zu erwarten, dass die Schwankungen der Zeitwertquotienten durch ein wechselndes Mengenverhältnis zweier einander äusserst ähnlicher Carbohydrasen der Hefe zustande kommen.

In Fig. 45 S. 352 ist die Dissoziationsrestkurve S_D , durch welche die Abhängigkeit der Saccharasewirkung des dänischen Invertins vom log der reziproken Substratkonzentration dargestellt werden kann, neben der für das Invertinpräparat e aus Löwenbräuhefe ermittelten S_L gezeichnet. Der mehr als doppelt so grossen Affinität der Oberhefensaccharase entspricht ein Abstand der S_D - und S_L -Kurve von 0,37 Abszisseneinheiten. Fast den gleichen, nämlich 0,39, finden wir zwischen den zugehörigen Raffinasekurven R_D und R_L , von denen

nur der experimentell verifizierte Teil ausgezogen ist, während der weitere Verlauf der Dissoziationsrestkurven durch Striche angedeutet wird. Indem wir nun die Ordinaten der R-Kurven durch die in der 2. Spalte der Tabelle angeführten Quotienten zu den Ordinaten der S-Kurven ins richtige Verhältnis setzen, finden wir:

Wenn zwei Invertine in bezug auf die Affinität zum Rohrzucker übereinstimmen, so ist nicht nur ihre Affinität zur Raffinose gleichfalls übereinstimmend, sondern es ist auch das Verhältnis der Umsatzgeschwindigkeiten bei beliebiger Zuckerkonzentration identisch.

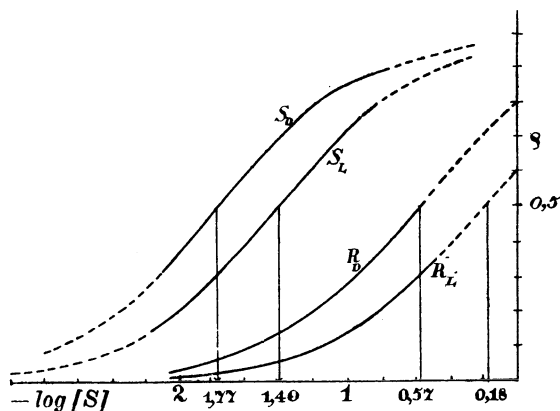


Fig. 45.

Nur bei verschiedener Affinität des Enzyms ist auch das Geschwindigkeitsverhältnis verschieden. Messen wir jedoch in diesem Falle das Geschwindigkeitsverhältnis nicht in 0,138 n-Lösungen des Di- und Tri-Saccharides, sondern z. B. bei solcher Konzentration, dass jeweils 50% der maximalen Saccharasewirkung erreicht sind, so erweist sich der auf diese Art ermittelte Quotient Q_{50} (6. Spalte

der Tabelle) unabhängig vom numerischen Betrag der einzelnen Affinitäten als konstant. Die mittlere Spezifität des Hefeninvertins für die Hydrolyse von Rohrzucker und Raffinose ist 16, seine Leistungsfähigkeit beträgt etwa 2,0. Der in der letzten Spalte der Tabelle für unendlich hohe Substratkonzentration extrapolierte Quotient der Hydrolysegeschwindigkeit Q_{∞} besagt nämlich, dass in diesem für das Tri-Saccharid denkbar günstigsten Fall mit der gleichen Invertinmenge für jedes gespaltene Raffinosemolekül in derselben Zeit der Umsatz von nur 2 Rohrzuckermolekülen erzielt werden könnte.

Wir können also den Inhalt der Tabelle dahin zusammenfassen, dass das molare Verhältnis von Saccharase und Raffinase unabhängig vom wechselnden Betrag des Zeitwertquotienten für jedes Invertin dasselbe ist. Es besteht daher kein Grund gegen die Annahme, dass das in den üblichen Hefen enthaltene Invertin sowohl den Rohrzucker als die Raffinose zu spalten vermag.

Den für die Substratkonzentration S geltenden Quotienten Q_S hat Kuhn l. c. S. 16 u. ff.) als Funktion von K_{mS} , K_{mR} und Q_{∞} ausgedrückt. Er erhielt:

$$Q_S = Q_{\infty} \frac{S + K_{mR}}{S + K_{mS}}$$

Der Wendepunkt der Quotientenkurve ist also in jedem Fall dadurch ausgezeichnet, dass seine Abszisse mit dem Parameter derjenigen Enzym-

wirkung zusammenfällt, der die kleinste Dissoziationskonstante der Enzym-Substratverbindung zukommt. Greift dieses Enzym noch andere Substrate an, so soll die Hydrolyse desjenigen, zu dem es die grösste Affinität besitzt, als Hauptwirkung des Enzyms von seinen Nebenwirkungen unterschieden werden, unabhängig von der Geschwindigkeit, mit der die Komplexe des Enzyms mit den verschiedenen Substraten zerfallen. Die Ordinate des Wendepunktes stellt immer das arithmetische Mittel der für unendlich kleine und unendlich grosse Substratkonzentrationen extrapolierten Geschwindigkeitsquotienten dar und ist daher im Gegensatz zur Abszisse durch den numerischen Wert der Nebenaffinitäten bedingt.

Fig. 46 zeigt die Lage der Quotientenkurve Q , die sich aus den Dissoziationsrestkurven S und R ergibt. Der Parameter der Hauptwirkung S beträgt $0,017$, derjenige der Nebenwirkung R $0,272$. Q_{∞} hat den Wert $2,0$.

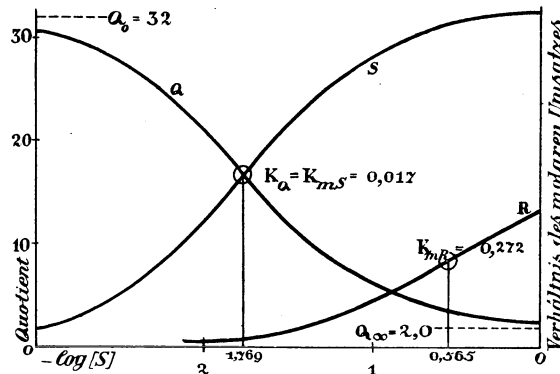


Fig. 46.

Wir sehen also, um das Ergebnis dieses Beispiels zu wiederholen, dass wir keine spezielle „Raffinase“ anzunehmen brauchen; die Annahme, dass die Saccharase auch Raffinose spaltet, kann mit den Tatsachen nunmehr in Übereinstimmung gebracht werden, und so dürfte überhaupt ein einziges Enzym, die Saccharase, genügen, um ähnliche Fructoside, soweit sie sich von der gleichen Form der Fructose herleiten, wie Rohrzucker, enzymatisch zu spalten.

Kuhns Theorie hat auch weiterhin in den Willstätterschen Arbeiten vielfach Anwendung gefunden; besonders ist es nicht mehr notwendig, mit einer Menge spezieller Glucosidasen zu rechnen, vielmehr erweisen sich die z. B. auf α - bzw. β -Methylglucosid wirksamen Enzyme als Gruppen-Katalysatoren, welche mit den verschiedenen Glucosiden durch individuelle Affinitätskonstanten verknüpft sind.

Im Sinne der S. 312 mitgeteilten Entwicklung sind die seit Michaelis durch eine Konstante gemessenen Affinitäten Funktionen je zweier Affinitätskonstanten K_M^1 und K_M^2 , welche die Affinitäten der entsprechenden Spaltprodukte zum Enzym ausdrücken.

Je ausgeprägter sich die einzelnen Enzyme, wie z. B. Glucosidasen als Gruppenkatalysatoren erweisen, um so mehr tritt natürlich der Einfluss spezifischer Affinitäten zum Enzym zurück, ohne indessen ganz zu verschwinden, denn eine endliche Affinität zu beiden Bestandteilen des Hydrolyten dürfte eine Voraussetzung für die Angreifbarkeit durch das betreffende

Enzym sein. Dabei mag nochmals betont sein, dass etwa bei der Bindung von Athylbutyrat nur Gruppenspezifität vorzuliegen braucht, und dass die Affinität zum Äthylrest kleine Beträge annehmen kann¹⁾.

Aus den in diesem Abschnitt dargelegten Grundsätzen ergibt sich dann der Weg zum Eindringen in das Gebiet der spezifischen Enzymreaktionen: Wir haben zu suchen, welche Gruppen der durch spezifische Affinitäten an ein Enzym gebundenen Stoffe für die Affinität massgebend sind. Bleiben wir beim Beispiel der Saccharase, so liegt also für die nächste Zukunft die Aufgabe vor, bei konstant gehaltener Affinität 2 (zur Glucose) zu ermitteln, welche Veränderungen am Fructosemolekül unter Beibehaltung einer messbaren Affinität 1 vorgenommen werden können und umgekehrt.

Wir schliessen nun diesen Abschnitt, indem wir eine Anwendung der Kuhnschen theoretischen Arbeit auf experimentelle Ergebnisse des Willstätterschen Laboratoriums mitteilen.

3. Neuere experimentelle Resultate über Struktur-Spezifität bei Enzymwirkungen.

Systematische Untersuchungen über die Hemmungen von Enzymwirkungen durch Zusätze von Spaltprodukten und verwandten Stoffen hat zuerst wohl Tammann (s. S. 302) angestellt, dann in grösserem Umfange E. F. Armstrong²⁾ und die beiden genannten Forscher müssen auch auf Grund der an ihre Arbeiten geknüpften theoretischen Erwägungen als Vorgänger der neueren Enzymforschung betrachtet werden.

E. F. Armstrong²⁾ sowie V. Henri³⁾ haben den Einfluss von Hexosen und anderen Stoffen auf die Rohrzucker- und die Glucosidspaltung untersucht. Kurze Zeit darauf folgen die Untersuchungen von Barendrecht⁴⁾, über den Einfluss von Hexosen auf die Inversion des Rohrzuckers, die aber mit denjenigen von Armstrong und Henri in mancher Hinsicht nicht in Übereinstimmung stehen. Auf eine Diskussion der Divergenzen kann aber um so eher verzichtet werden, als neuere, auch mit modernerer Methodik angestellte Versuche, besonders aus der Schule von Willstätter vorliegen.

Was die Rohrzuckerinversion betrifft, so werden die Einflüsse stereoisomerer Stoffe im nächsten Abschnitt verglichen.

Bemerkenswert ist das bereits von Michaelis und Pechstein⁵⁾ gewonnene, von Kuhn und von Josephson bestätigte Resultat, dass die Glucose-Glucoside, Maltose und Lactose zur Saccharase keine oder nur geringe Affinität zu besitzen scheinen.

¹⁾ Es wird dabei von der Annahme ausgegangen, dass die einen Umsatz bewirkenden „Reaktionsstösse“ stets in dem Mass „erfolgreich“ sind, als Affinität zwischen den beiden reagierenden Gruppen besteht.

²⁾ E. F. Armstrong, Proc. Roy. Soc. B 73, 516; 1904.

³⁾ V. Henri, Lois générales de l'action des diastases. Thèse Paris 1903.

⁴⁾ Barendrecht, Zs physik. Chem. 49, 456; 1904 und 54, 367; 1905.

⁵⁾ Michaelis und Pechstein, Biochem. Zs 60, 79; 1914.

Dass die Affinitäten des Rohrzuckers und der Raffinose zur Saccharase sich wie 16:1 verhalten, ist bereits erwähnt worden. Eine interessante Versuchsserie über den Einfluss methylierter Hexosen hat neuerdings Kuhn¹⁾ angestellt, wobei sich u. a. ergeben hat, dass α - und α - β 2, 3, 5, 6-Tetramethylglucose merkbar hemmen, während vollständig methylierte Glucose unwirksam war (siehe auch S. 343 u. ff.).

α -Glucoside.

Willstätter, Kuhn und Sobotka²⁾ massen an verschiedenen Hefen die Zeitwerte für Maltose, α -Methylglucosid, α -Äthylglucosid, α -Phenylglucosid und Amygdalin. Für die Hefen selbst wurden folgende Enzymwertquotienten gefunden (l. c. S. 234).

Enzymwertquotienten der Hefen:

Hefe	$\frac{\alpha\text{-Methyl}}{\text{Maltose}}$	$\frac{\alpha\text{-Äthyl}}{\text{Maltose}}$	$\frac{\alpha\text{-Phenyl}}{\text{Maltose}}$	$\frac{\text{Amygdalin}}{\text{Maltose}}$
Kopenhagener	1,17	1,44	6,53	0,00
Ottakringer	0,36	0,54	3,05	0,012
Spatenbräu	0,28	0,74	5,12	0,0066
Löwenbräu	0,20	0,57	4,22	0,0075
Stadlauer	(1,4)	—	(12,5)	(2,78)

„Das scheinbare Mengenverhältnis der α -Methylglucosidase zur Maltase schwankt bei den angeführten Hefen zwischen 0,2 für Löwenbräuhefe und 1,4 für Presshefe von Stadlau. Geringer sind die Schwankungen, die bei den Auszügen gefunden wurden“ (vgl. die Tab. IX im Original).

„In der von Kuhn (vgl. S. 349 u. ff.) angegebenen Weise wurde dann unter Berücksichtigung der von Hefe zu Hefe und von Substrat zu Substrat wechselnden Affinitätsbeträge aus dem Verhältnis der Enzymwerte auf das Verhältnis der Enzymmengen geschlossen.“ Es ergab sich dabei, „dass bei gleicher Konzentration der Enzym-Maltose-, Enzym- α -Methylglucosid- und Enzym- α -Phenylglucosid-Verbindungen auch das Verhältnis der Zerfallsgeschwindigkeiten innerhalb der Fehlergrenzen unserer Methode unabhängig ist von der Herkunft der angewandten Fermentlösung. Es scheinen somit zwischen den Maltasen der untersuchten Hefen keine wesentlichen Unterschiede zu bestehen, wenn auch die Ursache der Affinitätsverschiedenheiten noch ungeklärt ist.“ Willstätter, Kuhn und Sobotka²⁾ haben ihre Versuche in ihrer Tabelle XVIII zusammengefasst; die dort angegebenen Dissoziationskonstanten sind hier in die spezifischen Affinitätskonstanten K_M umgerechnet

¹⁾ Kuhn, H. 135, 1, und zwar 9; 1924.

²⁾ Willstätter, Kuhn und Sobotka, H. 134, 224; 1924.

Auszug aus	K · 10 ⁴ für 1 g Trockenhefe in 50 ccm			Affinitätskonstanten K _M		
	Maltose	Methyl- glucosid	Phenyl- glucosid	Maltose	Methyl- glucosid	Phenyl- glucosid
Löwenbräuhefe	91	23	632	8,3	13,3	20,0
Hofbräuhefe	50	15,5	536	6,9	35,7	47,6
Kopenhagener Hefe	25	14	—	3,3	27,0	—

In der folgenden Tabelle sind die Quotienten Q der Enzymwerte sowohl für die Substratkonzentration [S] = 0,14 n. als für die extrapolierte Substratkonzentration [S] = ∞ berechnet. Während die Quotienten Q_{0,14} des Substrates Methylglucosid:Maltose sich wie 1:2,5 verhalten, sind die Quotienten Q_∞ innerhalb der möglichen Versuchsfehler von ± 20% konstant.

Vergleich der beobachteten und der reduzierten
Enzymwertquotienten.

Enzym aus	Methylglucosid : Maltose		Phenylglucosid : Maltose	
	Q _{0,14}	Q _∞	Q _{0,14}	Q _∞
Löwenbräuhefe	0,25	0,21	7,0	5,1
Hofbräuhefe	0,31	0,18	10,7	6,1
Kopenhagener Hefe	0,56	0,23	—	—

Aus diesem Ergebnis hat man mit den Schluss zu ziehen, dass eine bestimmte Hefenmaltase auch zur Hydrolyse des α-Methyl- und α-Phenylglucosids befähigt ist, und zwar entsprechend K_M¹ und K_M².

Wie bereits früher erwähnt wurde, haben Kuhn und Sobotka¹⁾ das eben besprochene Verhältnis der enzymatischen Hydrolysegeschwindigkeiten mit demjenigen verglichen, welches sich bei der Katalyse durch Mineralsäuren ergibt; letzteres ist von Sigmund, eingehender von E. F. Armstrong²⁾ und von E. Fischer³⁾ gemessen worden.

Substrat	Reakt.-Konst. der Säurehydrolyse		Q _{Säure}	Q _{Enzym}
	74,1° — 0,5 n. HCl	100° — 0,1 n. HCl		
α-Phenylglucosid	—	0,0165	} 25	28
α-Methylglucosid	0,000167	0,00066		
Maltose	0,00123	—	} 0,14	0,20

Aus den beiden letzten Spalten wird die Übereinstimmung der Quotienten Q_{Säure} und Q_{Enzym} ersichtlich.

¹⁾ Kuhn und Sobotka, Zs physik. Chem. 109, 65, und zwar 68; 1924.

²⁾ E. F. Armstrong, Proc. Roy. Soc. B. 74, 188; 1905.

³⁾ E. Fischer, H. 107, 176, 192; 1919.

β -Glucoside.

In gleicher Weise wie für α -Glucoside haben Willstätter, Kuhn und Sobotka¹⁾ die Glucosidasewert-Quotienten einiger Emulsinpräparate an verschiedenen Substraten ermittelt.

Scheinbares und wahres Mengenverhältnis der Enzyme.

Enzym	Salicin : β -Phenylglucosid		Salicin : β -Methylglucosid	
	Q _{0,02}	Q _{∞}	Q _{0,02}	Q _{∞}
a) Bittere Mandeln	12,3	8,0	96	8,5
b) „Emulsin“ Merck	9,6	8,7	56	7,3
c) Aprikosenkerne	—	—	103	9,3
d) Präparat aus süßen Mandeln	—	—	129	6,8

„Innerhalb der Versuchsfehler von $\pm 20\%$ erweist sich somit nicht nur das Mengenverhältnis der salicin- und phenylglucosidspaltenden, sondern auch das der salicin- und methylglucosidspaltenden Enzyme konstant. Die zufällige Übereinstimmung der Mittelwerte für Q _{∞} , nämlich $8,3 \pm 0,4$ und $8,0 \pm 1,3$ mag dahin interpretiert werden, dass die Zerfallsgeschwindigkeiten der Reaktionszwischenprodukte bei der enzymatischen Hydrolyse von Phenyl- und Methylglucosid die gleichen sind.“

Die von Willstätter, Kuhn und Sobotka angegebenen Dissoziationskonstanten K_m sind, in Affinitätskonstanten K_M umgerechnet, folgende:

Enzym aus	K _M Salicin	K _M Phenylglucosid	K _M Methylglucosid
bitteren Mandeln (Glucosidasewert 0,14) .	28,5	15,4	1,67
bitteren Mandeln (Glucosidasewert 0,53) .	28,5	25	2,50
Aprikosenkernen	24,4	—	1,54
süßen Mandeln	58,8	—	0,89

Kuhn und Sobotka (Zs phys. Chem. 109) bemerken hierzu, dass sich die relative Spezifität des Emulsins durch das auswählende Bindungsvermögen allein nicht beschreiben lässt.

„Es steht aber noch nicht fest, wie weit in diesem Falle die messbaren Reaktionsgeschwindigkeiten als Mass für die Konzentration der Enzym-Glucosid-Verbindungen gelten können, wie weit die Voraussetzungen für die Anwendbarkeit des Massenwirkungsgesetzes erfüllt sind.“

Eine Beziehung zwischen den Reaktionskonstanten der Säurehydrolyse und denjenigen der Emulsinspaltung ist — wie die folgende Tabelle zeigt — hier nicht ersichtlich.

¹⁾ Willstätter, Kuhn und Sobotka, H. 129, 33; 1923.

Substrat	Q _{Säure}	Q _{Enzym}
Helicin) 1,1) 0,46) 5,3 (4,1)	5 ± 2
Salicin		8,3 ± 0,5
β-Phenylglucosid		1,0 ± 0,2
β-Methylglucosid		

B. Verhalten der Enzyme zu stereoisomeren Substanzen, besonders optischen Antipoden.

Stereoisomere Stoffe treten uns bekanntlich in der Biochemie und speziell in der Enzymchemie häufig entgegen. Wir brauchen nur an die drei Hexosen, Glucose und Mannose und die indirekt gärfähige Galaktose zu erinnern, welche trotz ihrer identischen Struktur auf Grund ihrer ungleichen Konfiguration wesentliche Verschiedenheiten gegenüber Enzymen aufweisen.

Für Stoffe wie diese drei Hexosen, welche nicht im Verhältnis von Bild und Spiegelbild zueinander stehen, hat P. Jacobson die zweckmässige besondere Bezeichnung „Diastereoisomere“ oder „Diastereomere“ eingeführt, und unterscheidet sie damit von den „enantiomeren“ Substanzen, den sog. optischen Antipoden, welche sich wie Bild und Spiegelbild verhalten.

Gesetzmässigkeiten allgemeiner Art über das Verhalten von Enzymen zu diastereomeren Stoffen sind bis jetzt noch nicht zutage getreten; das experimentelle Material ist dazu auch wohl noch zu gering.

Hingegen haben die zahlreichen Arbeiten über die Bildung und Umwandlung optischer Antipoden bereits viele wertvolle Ergebnisse geliefert.

Von besonderem Interesse sind ferner die bereits mehrmals (S. 354) erwähnten Unterschiede zwischen solchen Formen, welche — wie α- und β-Glucose — durch Mutarotations-Isomerie verknüpft sind; wir können dieselben abgekürzt als mutamere Formen bezeichnen.

Im folgenden soll zunächst kurz besprochen werden, was über die asymmetrischen Reaktionen im allgemeinen bekannt ist, bevor wir auf die asymmetrischen Enzymreaktionen eingehen.

1. Allgemeines über asymmetrische Reaktionen.

Unter Benützung des von Pasteur eingeführten Begriffes der molekularen Symmetrie kann man aus der van't Hoff'schen Hypothese über die tetraedrische Anordnung der vier Valenzrichtungen in einem Kohlenstoffatom folgenden Grundsatz entwickeln.

Ein Molekül zeigt optische Aktivität, wenn es keine Symmetrieebene besitzt¹⁾.

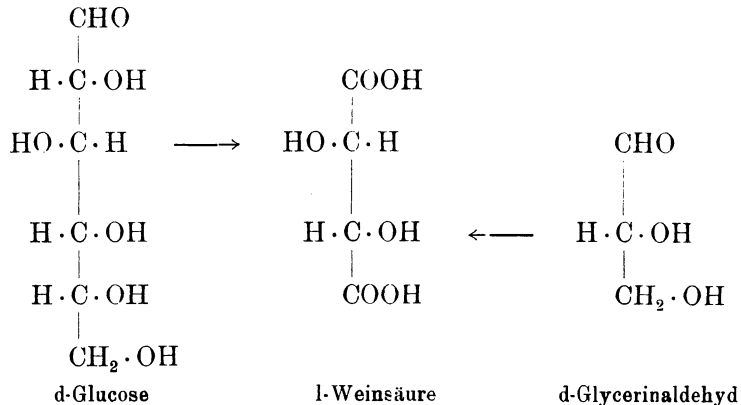
¹⁾ Siehe hierzu Aschans eingehende Besprechung des Begriffes Symmetrieebene. Chem. Ber. 35, 3389; 1902.

Die Asymmetrie eines Moleküls ist in der weitaus überwiegenden Mehrzahl der Fälle veranlasst durch Gegenwart eines an vier verschiedene Radikale gebundenen, sog. asymmetrischen, Kohlenstoffatoms (van't Hoff); eine Betrachtung optisch aktiver Substanzen, welche sich auf das asymmetrische Kohlenstoffatom, bzw. auf ein anderes „asymmetrisches“ Atom, gründet, hat sich in hohem Grad praktisch erwiesen.

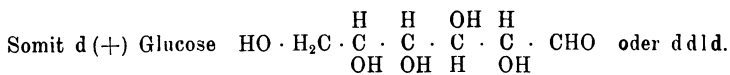
Ein Molekül, welches nur ein asymmetrisches Kohlenstoffatom oder Asymmetriezentrum enthält, kann in einer Rechts- und einer Linksform auftreten. Ein Stoff, welcher n asymmetrische Kohlenstoffatome enthält, kommt bekanntlich in 2ⁿ verschiedenen Formen vor.

Wir bezeichnen die optischen Antipoden eines Stoffes mit d, bzw. l nach ihrem Zusammenhang mit einem als Ausgangspunkt gewählten rechts- bzw. linksdrehenden Stoff. Die Mischung solcher Teile von d- und l-Form, die sog. racemische Mischung, wird mit dl bezeichnet.

Als Ausgangspunkt ist nunmehr nach den Vorschlägen von A. Wohl und von Freudenberg¹⁾ der Glycerinaldehyd zu wählen. Seine rechtsdrehende Form ist mit d zu bezeichnen; sie ist durch Überführung in l-Weinsäure konfigurativ aufgeklärt.



Hier sei auch auf die von Wohl und Freudenberg²⁾ eingeführte Konfigurationsbezeichnung für Hexosen hingewiesen. Das rechts (oder bei senkrecht geschriebener Formel oben) geschriebene Carbonyl-C-Atom und das am anderen Ende befindliche alkoholische C-Atom werden weggelassen, und nur die vier asymmetrischen C-Atome werden angedeutet. Ein in der Ebene unten befindliches Hydroxyl wird mit d, ein oben befindliches mit l bezeichnet.



Trennung der optischen Antipoden aus einer racemischen Mischung.

Für die Gewinnung zweier optischer Antipoden aus einer racemischen Mischung liegen vier Methoden vor, von welchen sich drei prinzipiell voneinander unterscheiden.

¹⁾ Freudenberg und Fritz Brauns, Chem. Ber. 55, 1339; 1922.

²⁾ Wohl und Freudenberg, Chem. Ber. 56, 309; 1923.

Drei dieser Methoden hat Pasteur angegeben.

1. Die mechanische Trennung von Spiegelbildkrystallen. Da die d- und l-Form verhältnismässig selten mit gut erkennbaren Spiegelbildflächen krystallisieren, ist die Anwendbarkeit dieser Methode beschränkt.

2. Die Kombination des Racemkörpers mit einer optisch aktiven Substanz und die Trennung der entstehenden, nun nicht mehr Spiegelbild-isomeren Produkte auf Grund ihrer ungleichen physikalischen oder chemischen Eigenschaften. Das klassische Beispiel ist die Behandlung der dl-Weinsäure mit einer optisch aktiven Alkaloidbase, und die Trennung der Salze durch ihre verschiedene Löslichkeit.

3. Die Anwendung des racemischen Gemisches als Nährsubstrat für gewisse Mikroorganismen, welche nur die eine der beiden Antipoden angreifen, und zwar die in der Natur vorkommende, an welche die betr. Mikroorganismen angepasst sind¹⁾.

An diese letztgenannte Pasteursche Methode schliesst sich nun

4. ein allgemeines chemisches Verfahren an, welches zuerst von Marckwald und Mc Kenzie²⁾ angewandt worden ist. Dasselbe wurde von den genannten Forschern zuerst in der Weise benutzt, dass zwei optisch entgegengesetzte Säuren, wie z. B. d- und l-Mandelsäure durch einen aktiven Alkohol, z. B. l-Menthol mit verschiedener Geschwindigkeit verestert wurden.

Wenn zwei Stoffe in einem Gemisch irgend eine Umsetzung mit ungleichen Geschwindigkeiten erfahren, so ergibt sich, falls Temperatur und Druck konstant angenommen werden, aus dem Massenwirkungsgesetz, wie Hecht, Conrad und Brückner gezeigt haben, die Beziehung

$$c = \frac{\log \frac{a-x}{a}}{\log \frac{b-y}{b}}$$

In dieser Formel bezeichnen a und b die anfänglich von beiden Stoffen vorhandenen Mengen in g Molekülen, x und y die nach einer gewissen Zeit umgewandelten Mengen, c das Verhältnis der Reaktionsgeschwindigkeiten. Diese Formel gestattet es, wenn die Werte von a, b, x und y durch einen Versuch festgestellt sind, den Wert von c zu berechnen und dann zu übersehen, in welcher Weise sich das Verhältnis der beiden Stoffe zueinander im Verlaufe der Reaktion ändert.

Aus den (Chem. Ber. 32) mitgeteilten Beobachtungen über die teilweise Veresterung der dl-Mandelsäure mit l-Menthol lässt sich das den dortigen Versuchsbedingungen entsprechende Verhältnis der Esterbildungsgeschwindigkeiten der l- und d-Säure berechnen. 50 g dl-Mandelsäure hinterliessen nach einstündigem Erhitzen auf 155° mit l-Menthol 33,8 g Mandelsäure von der spezifischen Drehung $[\alpha]_D = -3,3^\circ$.

In obiger Formel ist zu setzen: $a = b = 2,5$ denn bei isomeren Verbindungen sind die Molekularkonzentrationen gleich den Gleichgewichtskonzentrationen und in der racemischen Verbindung sind gleiche Teile von d- und l-Verbindung vorhanden. Ferner berechnet sich aus dem Drehungsvermögen der unveresterten Mandelsäure, dass diese aus 17,26 g l-Säure und 16,54 g d-Säure bestand. Dies sind die Werte von (a-x) und (b-y). Durch Einsetzung dieser Werte in die obige Gleichung ergibt sich das Verhältnis der Esterbildungsgeschwindigkeiten:

$$c = 0,897.$$

¹⁾ Siehe hierzu eine sehr interessante Untersuchung von Mc Kenzie und A. Harden, JI Chem. Soc. 83, 424; 1903.

²⁾ Marckwald mit Mc Kenzie, Chem. Ber. 32, 2130; 1899 und 34, 469; 1901.

Das Verhältnis der Esterverseifungsgeschwindigkeiten des l-Mandelsäure- und d-Mandelsäurementhylesters ergab sich zu $c = 0,910$.

Eine ähnliche Untersuchung hat Mc Kenzie¹⁾ mit dl-Mandelsäure- und l-Borneol ausgeführt. Wenn dl-Mandelsäure-l-Bornylester der fraktionierten Hydrolyse unterworfen wurde, so erhielt man zunächst eine linksdrehende Säure.

Marckwald und R. Meth²⁾ konnten mit ihrer Methode auch eine asymmetrische Amidbildung hervorrufen, und zwar mit dl-Mandelsäure und l-Menthylamin. Das Verhältnis der Reaktionsgeschwindigkeiten war in diesem Fall 0,862. Eine weitere Anwendung haben die genannten Autoren mit der Trennung des dl-Phenyläthylamins mit l-Chinasäure gemacht, wobei sich c zu 0,878 ergab.

Diese Methode von Marckwald und Mc Kenzie, welche sich auf die verschiedene Reaktionsgeschwindigkeit bei diastereomeren Substanzen gründet, ist in ihren verschiedenen Ausführungsformen der weitestgehenden Anwendungen fähig.

Gemeinsam für die hierher gehörenden Verfahren ist die Benutzung eines asymmetrischen Stoffes — wir können ihn Hilfsstoff nennen — welcher intermediär und mit sehr verschiedener Geschwindigkeit auf die beiden Antipoden einwirkt. Diese Verfahren lassen sich nach Fajans³⁾, dessen ausgezeichnete Darstellung wir hier folgen, in nachstehender Weise einteilen.

1. „Man kann das Gemisch allmählich sich mit dem benutzten optisch aktiven Hilfsstoff verbinden lassen. Dann wird im allgemeinen die Geschwindigkeit, mit der die beiden Antipoden mit dem Hilfsstoff reagieren, eine verschiedene sein. Unterbricht man deshalb die Reaktion bevor das ganze Gemisch verbraucht ist und trennt man das Reaktionsprodukt von dem Ausgangsstoff, so wird sich im letzteren die eine Antipode im Überschuss befinden, während im ersteren das Derivat der anderen überwiegt. Dieses Prinzip wurde zum ersten Male von W. Marckwald und Al. Mc Kenzie benutzt, indem sie dl-Mandelsäure mit l-Menthol sich verestern liessen und fanden dass dabei die l-Säure langsamer als die d-Säure reagiert.“

2. „Andererseits kann man von fertigen Verbindungen des zu spaltenden inaktiven Stoffes mit dem Hilfsstoff ausgehen und den im allgemeinen bestehenden Unterschied der Geschwindigkeit, mit dem die beiden Verbindungen, die nicht mehr Spiegelbilder sind, irgend einer allmählichen Umwandlung unterliegen, ausnutzen.“

Fajans unterscheidet hier, je nach der Art der betreffenden Umwandlung 3 Fälle:

„Erstens kann es sich um die Zersetzung der Verbindung in die sie bildenden Komponenten, die ursprünglichen Körper und den Hilfsstoff, handeln. Dieser Fall ist einfach eine Umkehrung des ersten (1.) und wurde an demselben Beispiele, dem Ester der Mandelsäure, realisiert.“ (Siehe

¹⁾ Mc Kenzie, JI Chem. Soc. 85, 378; 1904. — Siehe auch Al. Mc Kenzie und Herbert Bryan Tompson, JI Chem. Soc. 91, 789; 1907.

²⁾ Marckwald und Meth, Chem. Ber. 38, 801; 1905.

³⁾ Fajans, Zs physik. Chem. 73, 25; 1910.

Mc Kenzie und H. B. Tompson l. c., ferner Mc Kenzie und H. A. Müller¹⁾.

Zweitens kann es sich um eine Reaktion handeln in der nur der optisch zu aktivierende Stoff eine Veränderung erleidet, während der Hilfsstoff an das Reaktionsprodukt ebenso gebunden bleibt, wie früher an das Ausgangsmaterial. Ein derartiger Fall wurde von W. Marckwald und G. M. Paul²⁾ realisiert.

Diese Forscher haben gezeigt, dass es bis zu einem gewissen Grade möglich ist, den Vorgang der Racemisierung umzukehren. Gerade unter solchen Umständen, unter denen Pasteur die überhaupt erste Racemisierung durchgeführt hat, gelingt es auch eine racemische Säure zu aktivieren.

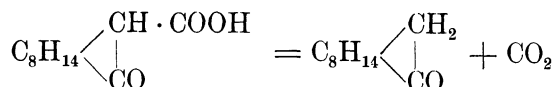
Marckwald und Paul haben dl-Mandelsäure mit der zur Salzbildung erforderlichen Menge wasserfreien Brucins im Ölbad 10 Stunden lang auf 150–160° erhitzt. Nach Absehung der gesamten Säure aus dem Salzgemisch resultierte eine optisch aktive Verbindung, und zwar mit einem Überschuss an d-Mandelsäure.

Wie leicht ersichtlich, beruht diese asymmetrische Erscheinung darauf, dass das Brucin keine Veränderung erleidet, während die Mandelsäure selbst racemisiert wird. Die Verbindungen der Antipoden mit dem Brucin sind dann keine Spiegelbilder mehr und die Geschwindigkeiten ihrer gegenseitigen Umwandlungen sind nicht mehr gleich. Erst wenn die Mengen der Antipoden umgekehrt proportional den Geschwindigkeitskonstanten geworden sind, stellt sich das Gleichgewicht ein.

Der aktivierende Hilfsstoff bleibt also auch nach der Reaktion gebunden.

Drittens endlich kann die betreffende Reaktion derart sein, dass gleichzeitig mit der Umwandlung des optisch zu aktivierenden Stoffes der Hilfsstoff wieder frei wird, dass also das Reaktionsprodukt den Hilfsstoff nicht mehr zu binden vermag. Fajans hebt hervor, dass nur dieser von den drei erwähnten Fällen als Katalyse angesehen werden kann, bemerkt aber, dass es zwischen den Fällen zwei und drei eine ganze Reihe von Übergangsstufen geben kann.

Einen interessanten Übergangsfall hat Fajans³⁾ selbst mit Bredig eingehend studiert und dadurch einen wertvollen Beitrag zur Klärung der vorliegenden Verhältnisse geliefert. Er untersuchte die Zersetzung der d- und l-Camphocarbonsäure in Campher und Kohlendioxyd, welche durch die Formeln dargestellt wird



Die Geschwindigkeit dieser Reaktion wurde in verschiedenen inaktiven

¹⁾ Mc Kenzie und H. A. Müller, JI Chem. Soc. 91, 1814; 1907. Dasselbst ist auch die Racemisierung des Mentholmandelsäureesters durch Alkali behandelt.

²⁾ Marckwald und G. M. Paul, Chem. Ber. 38, 810; 1905 und 39, 3654; 1906.

³⁾ Fajans, Zs f. physik. Chem. 73, 25; 1910. — Bredig und Fajans, Chem. Ber. 41, 752; 1909.

Lösungsmitteln und in einem optisch aktiven Lösungsmittel, Nicotin, gemessen, ausserdem unter Zusätzen von Alkaloiden zu inaktiven Lösungsmitteln.

Das Fortschreiten der Reaktion wurde durch Wägung der ausgeschiedenen Mengen Kohlendioxyd verfolgt. Temperaturen zwischen 40° und 90°.

In Anilin und Acetophenon erwies sich die Zersetzungsgeschwindigkeit der d- und l-Säure vollkommen gleich. In Nicotin als Lösungsmittel wurden folgende mittleren Konstanten k erhalten (70°):

d-Säure: $k_d = 0,00488$

l-Säure: $k_l = 0,00434$

Mittlerer Fehler 1%

Mittlerer Fehler 2%

Der Unterschied der Zersetzungsgeschwindigkeiten betrug also 12%.

Hieraus war zunächst der Schluss zu ziehen, dass die gemessenen Reaktionsgeschwindigkeiten nicht den freien Säuren oder Ionen, sondern hauptsächlich der Zersetzung der Salze zukommen, die ja als Nicht-Spiegelbilder (d-Säure-l-Base und l-Säure-l-Base) verschiedene Eigenschaften besitzen können. Es war hiernach zu erwarten, dass auch in indifferenten Lösungsmitteln ähnliche Unterschiede auftreten, wenn nur eine intermediäre Salzbildung der Camphocarbonsäuren mit einer optisch aktiven Base ermöglicht wird. Diese Erwartung hat sich denn auch bei Anwendung von Nicotin, Chinin und Chinidin bestätigt, wo Geschwindigkeitsunterschiede zwischen der d- und l-Säure bis zu 46% nachgewiesen wurden.

Man wird Fajans auch darin beipflichten, dass ein prinzipieller Unterschied zwischen dem von ihm untersuchten Fall und demjenigen von Markwald und Paul (l. c.) nicht besteht. Bei der von Fajans untersuchten Reaktion, welche übrigens besonders sorgfältig durchgearbeitet ist, tritt dann aber das katalytische Moment deutlicher hervor. Jedenfalls sind beide Arbeiten für das Studium der asymmetrischen Reaktionen sehr wertvoll.

Als dritten Hauptfall erwähnt Fajans noch die (bisher nicht realisierte) Möglichkeit, gleichzeitig sowohl den Unterschied der Vereinigungsgeschwindigkeiten der beiden Antipoden mit dem Hilfsstoff, als auch den der weiteren Umwandlung der sich dadurch bildenden Verbindungen auszunutzen, um eine optische Aktivierung vorzunehmen.

Negative Ergebnisse.

Bekanntlich hat E. Fischer¹⁾ ausgehend von seiner Auffassung über die sterische Konfiguration der Enzyme versucht, ob nicht die d- und l-Camphersäure den Rohrzucker verschieden schnell spalten²⁾. Der Versuch fiel bekanntlich negativ aus. Die Tatsache, dass hier, wie in einer Reihe

¹⁾ E. Fischer, H. 26, 83; 1898.

²⁾ Entsprechende negative Resultate haben auch Verf. sowie Caldwell (Proc. Roy. Soc. 74, 184; 1904) mit der gleichen Reaktion erhalten.

ähnlicher Fälle¹⁾, keine spezifische Wirkung beobachtet werden konnte, verdient nun eine weitere Verfolgung.

Es ist kaum mehr zweifelhaft, dass auch die Mineralsäuren, indem sie katalytisch wirken, an das Substrat gebunden werden. Dabei handelt es sich aber um eine Salzbildung des Rohrzuckers mit der katalysierenden Säure, so dass das Rohrzuckermolekül selbst unter Umlagerung zum Kation $C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H^+$ wird, entsprechend einem Oxoniumion. Unter der Annahme, dass die so entstehenden Rohrzuckerionen, nicht aber (oder nur untergeordnet) das undissoziierte Substratsalz die reaktionsvermittelnde Molekülarart bildet, wird es verständlich, dass die Konfiguration des Anions der katalysierenden Säure in diesem Fall keine Rolle spielt, während sich bei der enzymatischen Inversion das Saccharasemolekül selbst an den Rohrzucker anlagert.

Übrigens muss in diesem Zusammenhang betont werden, dass die Beziehungen, welche zwischen optischen Antipoden bestehen, vom chemischen Standpunkt aus nun keineswegs restlos aufgeklärt sind; insbesondere bleiben noch die spezifischen Molekularkräfte zu erforschen, welche zwischen asymmetrischen Molekülen enantiomerer Konfiguration zu wirken scheinen.

2. Asymmetrische Spaltung durch Enzyme.

Im Jahre 1898 hat E. Fischer aus dem damals vorliegenden verhältnismässig geringen Material den Schluss gezogen, dass die Spezifität der Enzyme optischen Antipoden gegenüber durch den stereochemischen Bau der Enzyme bedingt sei, dass also, mit anderen Worten, die Enzyme als optisch aktive Katalysatoren zu betrachten seien.

Er selbst fand, teilweise in Gemeinschaft mit seinen Mitarbeitern, die auffallendsten Beispiele für den Einfluss der Konfiguration auf die Angreifbarkeit eines Substrates, nämlich die Spaltung der Methylglucoside.

In der gleichen Mitteilung hat er die Enzyme wegen ihrer spezifischen Wirksamkeit auf stereoisomere Substanzen mit Schlüsseln verglichen, welche nur dann funktionieren, wenn sie genau zu einem bestimmten Schloss passen. Wie er damals betont hat, „stellt dieses Bild der experimentellen Forschung das ganz bestimmte und angreifbare Problem, dieselben Unterschiede, welche wir in der enzymatischen Wirkung beobachten, bei einfacheren, asymmetrisch gebauten Substanzen von bekannter Konstitution aufzusuchen“.

Die Verbindung der im vorigen Abschnitt erwähnten chemischen Ergebnisse mit den bei enzymatischen Spaltungen auftretenden Beziehungen hat zuerst in einer Reihe sehr verdienstvoller Arbeiten D a k i n hergestellt.

¹⁾ Siehe auch Walden, Chem. Ber. 32, 1846; 1899. — Ferner die Verseifung der d- und l-Weinsäureester durch Nicotin (Markwald, Chem. Ber. 21, 723; 1898). In konzentrierten Lösungen, wo die entsprechenden undissoziierten Salzmoleküle auftreten, ist das Eintreten einer asymmetrischen Wirkung zu erwarten.

Dakin¹⁾ hat gefunden, dass inaktiver Mandelsäurementhylester bei der partiellen Hydrolyse durch Lipase eine stark rechtsdrehende Mandelsäure liefert, während der zurückbleibende Ester entsprechend linksdrehend war, dass also die Rechts-Komponente des Esters rascher hydrolysiert wurde als die Links-Komponente²⁾. Daran hat dieser Forscher eine Reihe interessanter Schlüsse und weitere Versuche geknüpft³⁾. Zunächst wird daran erinnert, dass zwei optische Antipoden, welche sich mit derselben asymmetrischen Substanz verbinden, dies mit ungleicher Geschwindigkeit tun, und dass andererseits die Produkte einer derartigen Reaktion sich mit verschiedener Geschwindigkeit zersetzen. Dieser Fall liegt nach Dakin bei der asymmetrischen Esterhydrolyse durch Lipase vor: Lipase muss also selbst eine optisch aktive Substanz sein, welche mit dem Ester, welchen sie spaltet, eine Verbindung eingeht. Versuche ergaben ferner, dass bei der fraktionierten Hydrolyse einer Serie von strukturell verwandten racemischen Estern, die am schnellsten angegriffenen Komponenten stets ähnliche Konfiguration, aber nicht notwendig gleiche Drehungsrichtung besitzen.

Partiell gespaltene Ester der	Art der Drehung	
	Freie Säure	Ungespaltener Ester
Methylmandelsäure	+	—
Äthylmandelsäure	+	—
Isoamylmandelsäure	+	—
Benzylmandelsäure	+	—
Methylphenylchloroessigsäure	—	+
Methylphenylbromoessigsäure	—(?)	+
Äthylphenylchloroessigsäure	—	+
Äthylphenylbromoessigsäure	—(?)	+
Methylphenylmethoxyessigsäure	+	—
Äthylphenyläthoxyessigsäure	+	—

Eine asymmetrische Spaltung durch Lipase wurde ebenfalls erzielt, wenn nicht der Säure-, sondern der Alkoholrest des Esters ein asymmetrisches Kohlenstoffatom besass. Dakin zieht hieraus den Schluss, dass die Verbindung zwischen dem Enzym und dem Ester nicht ausschliesslich an der Säuregruppe erfolgt, sondern wahrscheinlich das Estermolekül als Ganzes gebunden wird.

Im Anschluss hieran ist auch eine Arbeit von Neuberg und Rosenberg⁴⁾ zu erwähnen, welche dl-Dibromstearinsäuretriglycerid, ebenfalls durch Lipase, asymmetrisch spalteten, wobei eine rechtsdrehende Säure und ein rechtsdrehendes, nicht zerlegtes Triglycerid entstand.

¹⁾ Dakin, JI of Physiol. 30, 253; 1903.

²⁾ Praktische Anwendung hat die racemische Ester-Hydrolyse auch zur Darstellung optisch aktiver Aminosäuren gefunden (O. Warburg, H. 48, 205; 1906).

³⁾ Dakin, JI of Physiol. 32, 199; 1905.

⁴⁾ Neuberg und E. Rosenberg, Biochem. Zs 7, 191; 1907.

Zuerst wurden asymmetrische Esterspaltungen an Glyceriden von P. Mayer¹⁾ an Lecithin, und zwar mit Steapsin Grüberl erzielt.

An einem racemischen Aminosäureester hat bald darauf O. Warburg²⁾ in E. Fischers Laboratorium asymmetrische Spaltung nachgewiesen; es entsteht unter der Einwirkung des Pankreassaftes l-Leucin, während d-Leucin-ester zurückbleibt.

Vor einiger Zeit haben Abderhalden und Weil³⁾ Monoacetin (Glycerinmonoacetat) und Monocaproin mit Pankreaspräparaten asymmetrisch gespalten.

Willstätter spricht sich auf Grund dieser früheren und seiner eigenen Versuche folgendermassen aus: „Als ein besonderer Fall der strukturechemischen Sondereignung, die das Verhalten gegen niedere Ester und gegen hohe Glyceride bestimmt, ist die stereochemische Spezifität der beiden hydrolysierenden Enzyme anzusehen. Die Konfigurationsspezifität der lipatischen Enzyme ist in den meisten Fällen keine so strenge wie die an den glucosidspaltenden von E. Fischer entdeckte.“

„Unser Vergleich der hydrolysierenden Enzyme aus dem Pankreas und der Leber einer Tierart wird nun vervollständigt, indem wir die Wirkung beider, was noch in keinem Falle geschehen ist, auf dieselben racemischen Ester prüfen, hauptsächlich auf eine Anzahl von Estern der Mandelsäuregruppe. Es würde nicht genügen, zum Vergleich einen oder wenige Ester auszuwählen. Denn es zeigt sich, dass die Pankreaslipase in einer Anzahl von Fällen dieselben aktiven Komponenten vorzieht, wie die Leberesterase. In anderen Fällen sind es aber die Komponenten von entgegengesetztem Drehungssinne, die von den beiden Enzymen mit grösserer Geschwindigkeit verseift werden.“

„H. D. Dakin vertrat die Auffassung, das Leberenzym bevorzuge die Ester von d-Mandelsäure und stets die Ester derjenigen Derivate, die ähnliche Konfiguration, aber nicht notwendig gleichen Drehungssinn besitzen. Die mit d-Mandelsäure übereinstimmende Konfiguration schrieb Dakin der durch Waldensche Umkehrung entstehenden l-Phenylchloressigsäure zu. Nun sind es aber bei der hepatischen Verseifung d-Mandelsäure und l-Phenylchloressigsäure, bei der pankreatischen Verseifung l-Mandelsäure und l-Phenylchloressigsäure, die mit grösserer Geschwindigkeit hydrolysiert werden. Die beiden Antipoden sind für die asymmetrisch konstituierten und reagierenden Enzyme zwei verschiedene Substrate, wie strukturechemisch ungleiche, die mit gewissen Geschwindigkeitsunterschieden hydrolysiert werden. Den Geschwindigkeitsunterschied finden wir bei den Estern der halogenierten Phenylelessigsäuren gering, viel grösser bei der hydroxylierten und methoxylierten Verbindung, noch grösser bei der entsprechenden Aminoverbindung (Phenyl-

¹⁾ P. Mayer, Biochem. Zs 1, 39; 1906.

²⁾ O. Warburg, Chem. Ber. 48, 187; 1905. — Später hat Warburg (H. 48, 205; 1906) angenommen, dass diese Wirkung einer Protease des Pankreas zuzuschreiben ist. Es wurde indessen schon betont, dass diese Auffassung nicht mehr haltbar ist; vgl. hierzu auch Abderhalden, Sickel und Ueda, Fermentf. 7, 91; 1923, sowie Rona und P. E. Speidel, Biochem. Zs. 149, 385; 1924.

³⁾ Abderhalden und A. Weil, Fermentf. 4, 76; 1920.

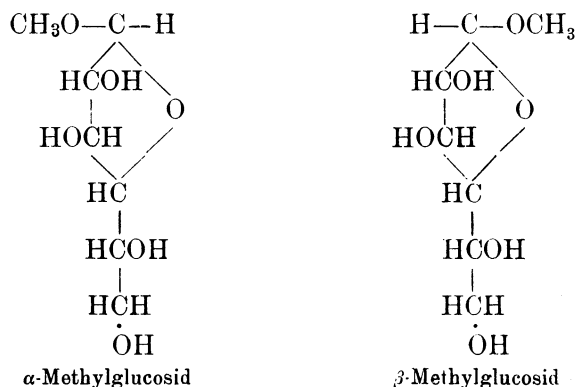
aminoessigsäurepropylester). In allen Fällen ist die Spezifität grösser bei der pankreatischen als bei der hepatischen Lipase, auch wenn beide denselben Antipoden auswählen“. Siehe ferner unter „Biologischer Spezifität“¹⁾ S. 379.

Glucoside und Biosen.

Die ersten und grundlegenden Arbeiten über Stereo-Spezifität der Enzyme verdankt man E. Fischer²⁾, sie beziehen sich auf Glucoside, einschliesslich Biosen.

Sowohl α - als β -Methyl-d-glucosid werden durch Enzyme angegriffen, dagegen bleiben α - und β -Methyl-l-glucosid unverändert. Während aber α -Methyl-d-glucosid nur der Spaltung durch α -Glucosidase (Maltase) unterliegt, enthält das Emulsin ein typisches Enzym, welches nur das β -Methyl-d-glucosid angreift³⁾.

Allgemein dürften α -Glucoside durch „Maltase“ bzw. α -Glucosidase der Hefe, β -Glucoside durch eine β -Glucosidase der Mandeln zerlegt werden. Die Arbeiten aus Willstätters Laboratorium über den Grad dieser Spezifität sind bereits S. 355 u. ff. erwähnt worden.



Diese Verhältnisse sind in zahlreichen Lehrbüchern schon so oft und eingehend behandelt worden, dass sich hier eine weitere Besprechung erübrigt.

Durch eine Amidase aus *Aspergillus Oryzae*, welche zu dem sog. Histozytm von Schmiedeberg in naher Beziehung steht, werden, wie Neuberg und Linhardt⁴⁾ gefunden haben, auch Homologe der Hippursäure gespalten, und zwar asymmetrisch. So hat neuerdings Hoppert⁵⁾ auf diesem Wege Benzoyl-dl-alanin gespalten, wobei Benzoyl-l-alanin vom Enzym nicht angegriffen wurde und in optisch nahezu reiner Gestalt zurückblieb; die d-Benzoylkomponente liefert freie Benzoesäure und freies d-Alanin.

¹⁾ Die Untersuchung von K. G. Falk bezieht sich überwiegend auf Strukturspezifität.

²⁾ E. Fischer, Chem. Ber. 27, 3230; 1894. — H. 26, 60; 1898.

³⁾ Erst neuerdings hat sich gezeigt, dass einige Mikroorganismen und daraus hergestellte Präparate, besonders Takadiastase, sowohl α - als β -Glucosidase enthalten.

⁴⁾ Neuberg und Linhardt, Biochem. Zs 147, 372; 1924.

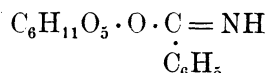
⁵⁾ Hoppert, Biochem. Zs 149, 510; 1924.

Auch ein Methyl-Maltosid ist untersucht; der Erwartung entsprechend fand E. Fischer¹⁾ dass β -Methylmaltosid durch Emulsin in Maltose und Methylalkohol, durch α -Glucosidase der Hefe in Glucose und β -Methylglucosid zerlegt wird, was Helferich bestätigen konnte. Helferich²⁾ fand bei einem kürzlich von ihm dargestellten Disaccharid-methyl-glucosid, welches er als α -Methylderivat der Biose anspricht, eine überraschende Widerstandsfähigkeit gegen α -Glucosidase der Hefe; durch Emulsin trat Spaltung ein, nach Helferich an der Disaccharidbindung; das neue Glucosid wäre als ein Derivat der Gentiobiose anzusprechen.

Weitere, von E. Fischer gefundene Tatsachen über Struktur-Spezifität bei Glucosidwirkungen sind bereits S. 342 u. ff. mitgeteilt worden. Hier ist folgendes nachzutragen³⁾:

Bei der Glucosidomandelsäure besteht ein Unterschied zwischen den Derivaten der d- und l-Mandelsäure. Denn die Salze und das Amid der d-Mandelsäure werden nicht angegriffen, dagegen die Salze der l-Verbindung.

„Die natürlich vorkommenden Nitrile der Glucosidomandelsäure (Mandel-nitrilglucosid und Sambunigrin) werden, wie bekannt, beide leicht von dem Emulsin angegriffen. Die Asymmetrie des einen Kohlenstoffatoms in dem Mandelnitrilrest ist also für die Wirkung des Enzyms ohne Bedeutung. Bekanntlich werden aber diese beiden Nitrile auch schon durch sehr geringe Mengen Basen bei gewöhnlicher Temperatur ineinander umgewandelt.“ Fischer⁴⁾ hat auf die Möglichkeit hingewiesen, dass dabei vorübergehend eine tautomere Form



entsteht. Dasselbe könnte bei der Wirkung des Emulsins eintreten.

„Man kann sich aber auch vorstellen, dass bei der enzymatischen Hydrolyse zuerst Blausäure abgelöst und dadurch die Asymmetrie im Mandelrest aufgehoben wird.

Noch merkwürdiger ist das Verhalten der Methylester. Auch hier werden die Derivate beider Mandelsäuren durch Emulsin gespalten. Für die d-Verbindung, die im reinen, krystallisierten Zustand gewonnen werden konnte, ist das direkt nachgewiesen, für die l-Verbindung folgt es aus dem Verhalten des Gemisches von d- und l-Derivat. Für Glucosido-d-mandelester wird später der Beweis erbracht, dass durch die enzymatische Hydrolyse neben Zucker der Methylester der d-Mandelsäure gebildet wird. Hier fällt also die Möglichkeit fort, dass vorübergehend eine tautomere Form ohne asymmetrisches Kohlenstoffatom entsteht.

Der Fall des Glucosido-d-mandelsäuremethylesters verdient also bei allgemeinen stereochemischen Betrachtungen über Zusammenhang von Enzymwirkung und Konfiguration eine besondere Berücksichtigung.“

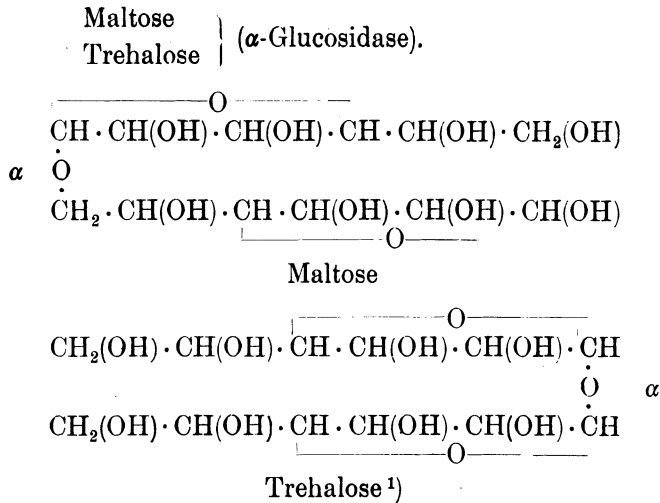
¹⁾ E. Fischer, Chem. Ber. 34, 2895 und 4343; 1901.

²⁾ Helferich und Johanna Becker, Lieb. Ann. 440, 1; 1924.

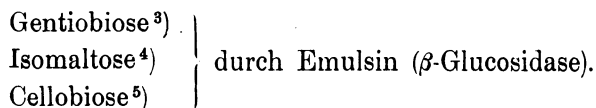
³⁾ E. Fischer, H. 107, 187; 1919.

⁴⁾ E. Fischer, Chem. Ber. 50, 1050; 1917.

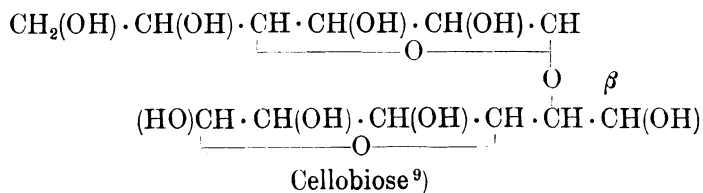
Was die Glucosido-Glucosen betrifft, so sind folgende Spaltungen beobachtet worden:



Ob Trehalose von einer besonderen Trehalase gespalten wird, wie Bourquelot²⁾ meinte, hielt E. Fischer noch unsicher.



Der β -Reihe der Glucosidoglucosen muss nach neuen Ergebnissen von Kuhn⁶⁾, welche durch Haworth und Wylam⁷⁾ und durch Hudson⁸⁾ bestätigt werden, die Amygdalose zugeordnet werden, welche mit Gentiobiose identisch zu sein scheint.



¹⁾ C. S. Hudson, Am. Chem. Soc. 38, 1566; 1916.

²⁾ Bourquelot, Soc. Biol. 47, 515; 1895.

³⁾ Bourquelot und Hérissé, C. r. 135, 399; 1902. — Zemplén, H. 85, 399; 1913. — Ferner Karrer und M. Staub, Biochem. Zs 152, 207; 1924.

⁴⁾ E. Fischer, Chem. Ber. 28, 3024; 1895.

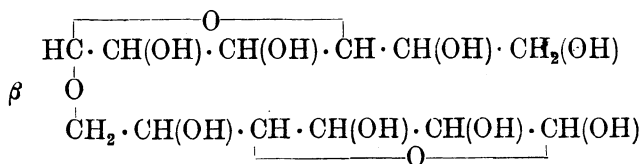
⁵⁾ E. Fischer und Zemplén, Lieb. Ann. 365. 1; 1908. — Bertrand und Holderer (C. r. 150, 230; 1910) hatten die Existenz einer besonderen Cellase angenommen.

⁶⁾ Kuhn, Chem. Ber. 56, 857; 1923.

⁷⁾ Haworth und Wylam, JI Chem. Soc. 123, 3120; 1923. — Siehe auch Zemplén, Chem. Ber. 57, 698; 1924.

⁸⁾ C. S. Hudson, Am. Chem. Soc. 46, 483; 1924.

⁹⁾ Haworth und Hirst, JI Chem. Soc. 119/20, 193; 1921. — Karrer und Widmer, Helv. 4, 295; 1921.



Amygdalose = Gentiobiose¹⁾.

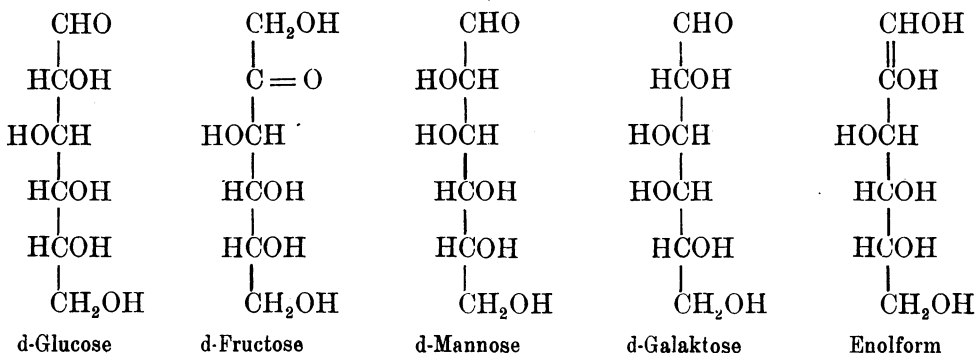
Im allgemeinen wird man nunmehr die β -Glucosidase des Emulsins als ein spezifisches Reagens auf die β -Konfiguration betrachten können. Fischer, von dem diese Betrachtungsweise stammt, warnte jedoch²⁾, dieselbe als ganz sicher anzusehen.

Gärungs-Enzyme.

Dass die Gärfähigkeit der Hexosen mit ihrer Konfiguration in engstem Zusammenhang steht, hat Fischer in einer Arbeit mit Thierfelder³⁾, sowie in seiner bekannten Mitteilung über die „Bedeutung der Stereochemie für die Physiologie“ (H. 26) zum erstenmal dargetan.

Vergoren werden von der Hefe nur die in der Natur vorkommenden Formen der Hexosen; dieselben gehören durchweg der d-Serie an.

Drei Aldohexosen unterliegen der alkoholischen Gärung, nämlich d-Glucose, d-Mannose und d-Galaktose, letztere allerdings nicht ohne weiteres; dazu kommt eine Ketohehexose, nämlich d-Fructose. Durch die Arbeiten von E. Fischer können wir den Bau dieser Zuckerarten vergleichen:



Die d-Glucose, die d-Mannose und die d-Fructose zeigen hinsichtlich $\frac{2}{3}$ der Kohlenstoffkette völlige Übereinstimmung; an drei asymmetrischen Kohlenstoffatomen sind die H- und HO-Gruppen gleich angeordnet. Die nahe chemische Verwandtschaft dieser Zucker geht auch daraus hervor, dass sie nach Lobry de Bruyns und Alberda van Ekensteins Befund in schwach alkalischer Lösung (also als Anionen) miteinander in ein Gleichgewicht treten,

¹⁾ Kuhn, Chem. Ber. 56, 857; 1923. — Haworth und Wylam, JI Chem. Soc. 123, 3120; 1923. — Siehe auch Zemplén, Chem. Ber. 57, 698; 1924.

²⁾ E. Fischer und Zemplén, Lieb. Ann. 365, 1; 1908.

³⁾ Fischer und Thierfelder, Chem. Ber. 27, 2031; 1894.

wobei nach Wohl eine Enolform als Zwischenglied auftritt. Welches der am Zymasekomplex beteiligten Enzyme in seinem sterischen Bau der Konfiguration der eigentlichen Zymohexose entspricht, ist einstweilen noch unbekannt.

Bei der Betrachtung der Stereochemie der Zymohexosen ist nunmehr auch die Ringbildung zu berücksichtigen. Die Gärungsreaktionen sind, wie bereits im vorhergehenden Abschnitt betont, sehr verwickelt und im einzelnen noch sehr wenig bekannt; es ist nicht wahrscheinlich, dass die Hexosen in der oben angegebenen oder in der entsprechenden Ringform zur Spaltung gelangen.

Immerhin müssen als interessante Tatsachen hier die Befunde von Willstätter und Sobotka über die relative Vergärungsgeschwindigkeit von einerseits Glucose und Fructose, andererseits von α - und β -Glucose erwähnt werden. Im Gemisch von Glucose und Fructose vergärt Hefe auswählend, ebenso im Gemisch von α - und β -Glucose.

Willstätter und Sobotka geben die Quotienten k der beiden Gärungsgeschwindigkeiten an. Diese k -Werte (welche nicht konstant sind) lassen erkennen¹⁾, dass auch zu Beginn der Gärung die β -Form zwar dreimal langsamer, aber immerhin merklich gärt. Liess Willstätter jede der drei Formen (α , β - und Gleichgewicht) für sich vergären, so erhielt er übereinstimmende Gärungsgeschwindigkeit.

Über die Vergärung der Galaktose siehe S. 406 u. ff.

Auch über die Stereospezifität der proteolytischen Enzyme hat Fischer mit seinen Mitarbeitern die ersten Angaben machen können.

Fischer und Bergell²⁾ haben schon 1903 über die asymmetrische Hydrolyse des inaktiven Carbäthoxyglycyl-dl-leucins durch Pankreasenzyme berichtet, welche zur Abspaltung von l-Leucin führt. Später sind besonders von Fischer und Abderhalden³⁾ und von letzterem Forscher mit seinen Schülern zahlreiche ähnliche Fälle beschrieben worden.

Unter den vielen bemerkenswerten Ergebnissen Abderhaldens⁴⁾ sei z. B. erwähnt, dass Hefemacerationssaft das Tetrapeptid Glycyl-l-leucyl-glycyl-l-leucin glatt spaltet, während die Verbindung Glycyl-d-leucyl-glycyl-l-leucin unangegriffen bleibt.

Durch abgetötete Bakterien (*B. coli* und *Staphylococcus albus* hat Mito⁵⁾ Glycyl-dl-tyrosin asymmetrisch spalten können.

Eine interessante asymmetrische Spaltung des dl-Arginins hat Riesser⁶⁾ mit der von Kossel und Dakin⁷⁾ entdeckten Arginase durchgeführt.

1) Willstätter und Sobotka, H. 123, 164 und 170; 1922.

2) Fischer und Bergell, Chem. Ber. 36, 2592; 1903.

3) Fischer und Abderhalden, H. 46, 52; 1905.

4) Abderhalden und H. Handovsky, Fermentf. 4, 316; 1921.

5) Mito, Acta sc. med. univ. Kioto, 5; 1921. — Ber. ges. Phys. 16, 17; 1923.

6) Riesser, H. 49, 210; 1906.

7) Kossel und Dakin, H. 41, 321; 1904.

Ebenso wie bei den nicht enzymatischen, asymmetrischen Spaltungen handelt es sich bei den enzymatischen Spaltungen um Differenzen in der Reaktionsgeschwindigkeit. Allerdings wird bei Anwendung von Enzymen als Katalysatoren die Reaktionsgeschwindigkeit der einen Antipode nicht selten verschwindend klein, nahezu 0.

So zeigten schon zahlreiche ältere¹⁾ oder gelegentliche Beobachtungen, sodann mehr systematische Versuche von A. Mc Kenzie und A. Harden²⁾, dass die Spezifität von Mikroorganismen optischen Antipoden gegenüber doch nicht vollständig ist. Auch die als Nahrung minder bevorzugte Antipode wird von Mikroorganismen, wenn auch erheblich langsamer, verbraucht, und selbst in zellfreien (kräftig wirkenden) Enzymlösungen scheint, in gewissen Fällen wenigstens, keine der beiden Formen ganz unangegriffen zu bleiben.

Wie Pringsheim³⁾ gezeigt hat, besitzt auch die Hefe, trotz ihrer speziellen Bevorzugung der natürlichen Komponenten verschiedener Aminosäuren, die Fähigkeit, bei mangelnder Stickstoffnahrung die andere Komponente anzugreifen⁴⁾ und sie eventuell ganz zu verzehren.

In Übereinstimmung hiermit stehen Ergebnisse von Abderhalden und Pringsheim⁵⁾, welche nachwiesen, dass Presssäfte verschiedener Mikroorganismen (*Allescheria Gayonii*, *Aspergillus Wentii*, *Rhizopus Tonkinensis*) die beiden Antipoden von dl-Leucyl-glycin, allerdings mit verschiedener Geschwindigkeit, spalteten (entsprechend verschiedenen Affinitätswerten). Hier ist auch die Deutung möglich, dass die genannten Pilze im Besitz der zwei entsprechenden enantiomeren Enzyme sind.

Aus Glucose, Fructose u. a. Zuckerarten werden, unabhängig von der Konfiguration des Substrates, durch verschiedene Stämme von Milchsäurebakterien verschiedene Mengen d- und l-Milchsäure gebildet⁶⁾. Bei einer analogen Reaktion hat sich neuerdings gezeigt, dass das gleiche auch in anderen Fällen eintritt; wir haben dieses Resultat so gedeutet, dass die d-Form und die l-Form des Substrates vom gleichen Enzym mit verschiedener Affinität gebunden werden. Es ist die ausschliessliche Bindung einer der Spiegelbildformen, wie sie bei typischen Fällen in der Zuckergruppe eintritt, also nicht allgemein gültig.

Pringsheim⁷⁾ hat in der Folge noch weiteres reichhaltiges Material

¹⁾ Schulze und Bosshard, H. 10, 134; 1886.

²⁾ Mc Kenzie und A. Harden, JI Chem. Soc. 83, 424; 1903. Siehe auch Pfeffers Jahrb. wiss. Bot. 28, 205; 1895.

³⁾ Pringsheim, Biochem. Zs 3, 244; 1907.

⁴⁾ F. Ehrlich, Biochem. Zs 1, 7; 1906.

⁵⁾ Abderhalden und Pringsheim, H. 59, 249; 1909.

⁶⁾ Vgl. R. O. Herzog und Hörth, H. 60, 131; 1909. Dasselbst ältere Literatur. Im Tierkörper fanden Neuberg und Saneyoshi gleich schnelle Umsetzung von d- und l-Weinsäure (Biochem. Zs 36, 32; 1911).

⁷⁾ Pringsheim, H. 65, 96; 1910. Siehe daselbst ältere Literatur.

hinsichtlich des Verhaltens von Pilzen zu racemischen Aminosäuren beigebracht, das besonders wegen der quantitativen Angaben interessant ist; untersucht wurden Leucin und Glutaminsäure¹⁾; mit *Aspergillus Wentii*, *Mucor mucedo* und *Oidium lactis* wurden über 50% d-Leucin vom angewandten dl-Leucin gewonnen.

Eine interessante asymmetrische, enzymatische Reduktion von Diacetyl zu linksdrehendem 2,3-Butylenglykol fanden Neuberg und Nord²⁾.

Die asymmetrische Spaltung racemischer Cyanhydrine wird im Zusammenhang mit den asymmetrischen Synthesen besprochen.

3. Asymmetrische Synthesen.

Im vorigen Abschnitt (S. 364 u. ff.) haben wir die asymmetrische Spaltung eines racemischen Substrates besprochen; das Material enthielt in diesen Fällen „asymmetrische Kohlenstoffatome“, aber von vornherein gleich viele solche Atome in der d- wie in der l-Form.

Wir wollen jetzt zu denjenigen Fällen übergehen, in welchen symmetrische Moleküle in eine asymmetrische bzw. in eine optisch aktive Mischung von d- und l-Form verwandelt werden, oder, mit anderen Worten, in denen Asymmetrie erzeugt wird.

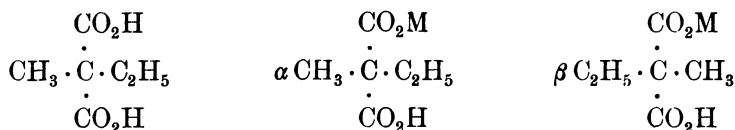
Die Diskussion der physikalischen Bedingungen (polarisierte Strahlung), welche asymmetrisches Material zu erzeugen vermögen, würde uns hier zu weit ins physikalische Gebiet führen; wir behandeln hier lediglich die Einwirkung von asymmetrischen Hilfsstoffen.

Marckwald³⁾ hat, ausgehend von einem symmetrischen Molekül



eine nach obiger Definition asymmetrische Reaktion durchgeführt.

Methyläthylmalonsäure wurde in ein saures Salz HRM übergeführt:



Die beiden Formen α und β besitzen als optische Antipoden übereinstimmende Eigenschaften, abgesehen vom Sinne der Drehung. Dies gilt jedoch nur unter der Voraussetzung, dass M selbst optisch inaktiv ist. Wenn dagegen M selbst ein optisch aktives Radikal darstellt, wie z. B. bei der Bildung des sauren Brucinsalzes der Säure, so sind die beiden Formen α und β

¹⁾ Auch Fäulnisbakterien greifen dl-Glutaminsäure asymmetrisch an (Neuberg, Biochem. Zs 18, 443; 1909).

²⁾ Neuberg und F. F. Nord, Chem. Ber. 52, 2248; 1919.

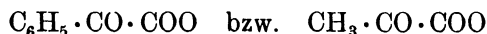
³⁾ Marckwald, Chem. Ber. 37, 349, 1368; 1904.

nicht mehr Spiegelbilder, sondern Diastereomere und müssen sich in physikalisch-chemischer Hinsicht ungleich verhalten. Erhitzt man das Gemisch der α - und β -Formen, um das noch freie Carboxyl abzuspalten, so müssen bei dieser Reaktion die Rechts- und Linksform des Salzes in verschiedenen Mengen entstehen. Die freien Valeriansäuren, welche man erhält, wenn man jetzt den Brucinrest entfernt, bilden ein optisch aktives Gemisch. Nach Fischers Ausdruck hat hier ein aktives Molekül (Brucin) „ein zweites geboren“.

Eine Reihe von interessanten Synthesen verdankt man ferner Mc Kenzie¹⁾, welcher durch Reduktion von Benzoylameisensäure-l-menthylester mit Aluminiumamalgam ein Gemisch von d-Mandelsäure-l-menthylester mit einem geringen Überschuss von l-Mandelsäure-l-menthylester erhielt.

Bald darauf konnte er durch Reduktion des Brenztraubensäure-l-menthylesters linksdrehende Milchsäure darstellen²⁾. Mit Hilfe der Grignardschen Reaktion gelangen weitere asymmetrische Synthesen, wie die der linksdrehenden Atrolactinsäure aus Menthylbenzoylformiat und Magnesiummenthyljodid³⁾. Mc Kenzie und Wren⁴⁾ führten die Synthese der l-Milchsäure durch Reduktion von Brenztraubensäure-l-bornylester aus und stellten die optisch aktiven Weinsäuren durch Oxydation der d- und l-Bornyl- und Menthylfumarsäureester dar.

Mc Kenzie und seine Mitarbeiter gehen also bei diesen Synthesen von symmetrischen Molekülen, Benzoylameisensäure bzw. Brenztraubensäure, aus, machen dieselben durch Einführung eines optisch aktiven Radikals asymmetrisch, und erreichen dadurch, dass aus dem symmetrischen Teil der Moleküle, nämlich



durch Reduktion statt der racemischen Mischung der Mandelsäure bzw. Milchsäureester überwiegend die l-Form entsteht.

In diesem Zusammenhang mag übrigens darauf hingewiesen werden, dass Moleküle mit doppelter Bindung, welche man nach der üblichen Anschauungsweise als symmetrisch betrachtet, wie z. B. Zimtsäure, sich bei Vorgängen, bei welchen die doppelte Bindung aufgehoben wird, asymmetrisch verhalten können, wie schon Le Bel angenommen hat, und wie neuerdings wieder von Erlenmeyer jun.⁵⁾ auf Grund seiner Studien an Zimtsäuren betont wird.

Anders gestalten sich die Verhältnisse, wenn man ein bereits asymmetrisches Molekül als Ausgangsmaterial für weitere Synthesen benützt. Ersetzen wir z. B. in einem der folgenden Antipoden, etwa in I

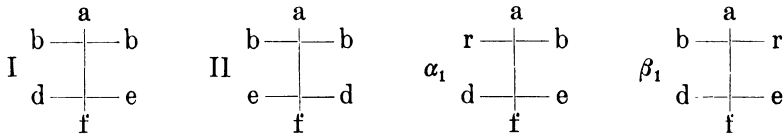
¹⁾ Mc Kenzie, JI Chem. Soc. 85, 1249; 1904.

²⁾ Mc Kenzie, JI Chem. Soc. 87, 1373; 1905.

³⁾ Mc Kenzie, JI Chem. Soc. 89, 365; 1906.

⁴⁾ Mc Kenzie und Wren, JI Chem. Soc. 89, 688; 1906. — 91, 1215; 1907.

⁵⁾ Erlenmeyer und Hilgendorff, Biochem. Zs 35, 134; 1911. — Den theoretischen Auseinandersetzungen von Erlenmeyer (ebenda 43; 1912 und 97, 198; 1919) vermag der Verf. nicht zu folgen.



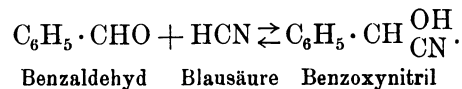
den Substituenten b mit einem anderen Radikal r, so können sich dabei zwei neue Formen bilden, nämlich α_1 und β_1 . Da in diesen beiden Formen die neu eintretende Gruppe r von den übrigen Bestandteilen des Moleküls verschiedenen Abstand hat, wird es einleuchtend, dass die Bildung der Moleküle α_1 und β_1 mit verschiedener Geschwindigkeit erfolgt.

Ebenso wie aus der Konfiguration I zwei diastereomere, asymmetrische Produkte α_1 und β_1 entstehen, so bilden sich aus II, dem Spiegelbild von I, zwei entsprechende Diastereomere α_2 und β_2 , welche ihrerseits Spiegelbilder von α_1 und β_1 sind. Man erhält also aus der Raumform I + II die beiden optischen Paare $\alpha_1 + \alpha_2$ und $\beta_1 + \beta_2$ in verschiedenen Mengen. Das Produkt muss aber inaktiv werden, da sich einerseits α_1 und α_2 , andererseits β_1 und β_2 in gleichen Mengen bilden.

Indem wir, wie in diesem Fall, scharf zwischen den diastereomeren und den enantiomeren Formen unterscheiden, welche bei einer Reaktion gleichzeitig auftreten, verstehen wir, wie sich in Organismen Moleküle mit asymmetrischen Kohlenstoffatomen in hauptsächlich oder ausschliesslich der einen optisch-aktiven Form ausbilden können.

4. Asymmetrische Vorgänge und Gleichgewichte bei umkehrbaren Reaktionen.

Wir kommen nun zu dem sehr interessanten, aber auch komplizierten Fall, dass sich durch Vereinigung zweier symmetrischer Moleküle A und B ein asymmetrisches Produkt A B bildet, welches in zwei Spiegelbildformen auftreten kann, von welchen jede mit A und B im Gleichgewicht steht. Ein solcher Fall ist 1908 von Rosenthaler¹⁾ gefunden worden, und zwar handelt es sich um die Reaktion:



Mischt man Benzaldehyd und reine wässrige Blausäure-Lösung (ohne Zusatz irgend eines Katalysators), so wird bei Zimmertemperatur etwa innerhalb eines Tages ein Gleichgewicht erreicht, bei welchem (bei einer Blausäurekonzentration von etwa 0,5 Normalität) etwa 70% der beiden Ausgangsstoffe in Benzaldehydcyanhydrin (Benzoxynitril) umgewandelt sind. Dabei bleibt, wie zu erwarten, die Lösung optisch inaktiv, es werden also gleiche Mengen d- und l-Oxynitril gebildet.

¹⁾ Rosenthaler, Biochem. Zs 14, 238; 1908. — Siehe ferner ebenda 17, 257; 1909. — 19, 186; 1909. — 26, 1; 1910.

Rosenthaler hat bei seinen grundlegenden Versuchen Mandelemulsin als Katalysator angewandt und hat dabei (überwiegend) rechtsdrehendes Mandelsäurenitril und hieraus linksdrehende Mandelsäure erhalten.

Von seinen Versuchen sei z. B. folgender erwähnt:

5 g Emulsin wurden mit 20 ccm Wasser angerieben, dann 0,675 g Blausäure hinzugesetzt und nach einer Stunde 20 g Benzaldehyd unter ständigem Schütteln dazu getropft, worauf die Flüssigkeit im Schüttelapparat noch 1 Stunde bewegt wurde. Das in üblicher Weise isolierte Nitril wurde verseift, die wässrige Lösung der Mandelsäure wurde ausgeäthert. Der aus Benzol umkrystallisierte Rückstand zeigte eine spezifische Drehung $[\alpha]_D = -153,78^\circ$, in naher Übereinstimmung mit den Angaben der Literatur. Das gebildete Cyanhydrin hielt Rosenthaler frei von l-Form; nach Nordefeldt dürfte dies nicht der Fall gewesen sein.

Wichtig war ferner die Beobachtung von Krieble¹⁾, dass Enzympräparate aus Blättern von *Prunus serotina* (wilde Kirsche) linksdrehendes Oxynitril entstehen lassen. Der Prozentsatz an aktivem Nitril, welches mit verschiedenen Emulsinpräparaten erhalten wird, ist ausserordentlich verschieden.

Eine ausführlichere Darstellung der Arbeiten über das Oxynitrilgleichgewicht gehört in den II. Teil dieses Buches. Hier seien nur diejenigen Tatsachen betont, welche auf die asymmetrische Synthese Bezug haben.

Neben der asymmetrischen, durch einen enzymatischen Katalysator bewirkten Synthese macht sich — unter verschiedenen Versuchsbedingungen verschieden stark — die symmetrische, nicht-enzymatische Oxynitrilbildung geltend und tritt in alkalischer Lösung, und zwar schon bei $p_H = 8$ ganz in den Vordergrund. In welcher Weise die Geschwindigkeit der symmetrischen Oxynitrilbildung von der Acidität abhängt, ist durch die Untersuchung von Nordefeldt, sowie von Krieble und Wieland²⁾ festgestellt worden, und geht aus folgenden Zahlen hervor (Nordefeldt):

p_H	2,9	3,0	3,1	3,3	3,4	3,5	4,1	4,4	5,3	6,1
$k \cdot 10^3$	0,06	0,11	0,3	1,4	2,2	3,6	12	18	50	290

Eine anäloge Beziehung wurde zwischen Acidität und Spaltung des Oxynitrils gefunden.

Das gesamte Oxynitril-Gleichgewicht wird — wie schon Bayliss (1913) und Krieble (1915) im Gegensatz zu Rosenthaler fanden — durch den Zusatz von Emulsin nicht verändert.

¹⁾ V. K. Krieble, *Jl Chem. Soc.* 35, 1643; 1913. — Siehe auch Rosenthaler, *Arch. d. Pharm.* 251, 56, 85; 1913. — Krieble nimmt auf Grund seiner Entdeckung die Existenz einer d-Oxynitrilase und einer l-Oxynitrilase an; über die sterischen Beziehungen zwischen dem l-Enzym und dem d-Enzym ist damit natürlich nichts ausgesagt.

²⁾ Nordefeldt, *Biochem. Zs* 118, 15; 1921 und 131, 390; 1922. — 137, 489, 1923. Krieble und Wieland, *Am. Chem. Soc.* 43, 164; 1921. Unter den früheren Arbeiten sind, ausser denjenigen Rosenthalers, noch zu nennen: Lapworth (*Jl Chem. Soc.* 83, 995; 1903. — 85, 1206; 1904). — Ultee, *Rec. Trav. Chim. Pays Bas* 28, 1 u. 248; 1909. — Wirth, *Arch. d. Pharm.* 249, 382; 1911. — Feist, *Arch. d. Pharm.* 247, 226; 1909 u. 248, 101; 1910. — H. E. Armstrong u. Herton, *Proc. Roy. Soc. B.* 82, 349; 1910.

„Sämtliche symmetrisch-kinetischen Wirkungen lassen sich einfach, ohne Einführung besonderer Hypothesen, als Aciditätswirkungen erklären (Nordefeldt)“.

Schon in einer Acidität von $p_H = 3$ verläuft also die nicht-enzymatische symmetrische Bildung und Spaltung des Oxynitrils sehr langsam; hier treten also die asymmetrischen Enzymwirkungen hervor.

Nordefeldt kommt in seiner zweiten Mitteilung (Biochem. Zs 131) zum Resultat, dass die Schnelligkeit, womit sich die optische Aktivität ausbildet, von der totalen Synthesegeschwindigkeit bestimmt wird, welche ihrerseits durch die Acidität reguliert wird.

Die Aufklärung der asymmetrischen Synthese wird dadurch erschwert, dass das optisch aktive Oxynitril mit der Zeit eine Veränderung erfährt, welche zu einer Abnahme der Drehung führt. Die optische Aktivität nimmt bei niedriger Temperatur

zwar langsamer zu als die Gesamtsynthese, aber die erreichten Maxima bleiben nicht konstant, sondern sinken asymptotisch gegen Null; je höher die Reaktionstemperatur ist, um so niedriger ist das erreichte Maximum.

Die Drehungsabnahme der Lösung geschieht, wie Nordefeldt konstatiert, ohne Mitwirkung eines Enzyms. Die Geschwindigkeit, mit welcher die Drehung abnimmt, wächst bei 10° Temperaturerhöhung um das 3,2fache. Sie sinkt mit steigender Acidität, ist schon bei $p_H = 3$ recht klein und erreicht die Höhe der totalen Synthesegeschwindigkeit erst im Neutralpunkt, wo die optische Aktivität ebenso rasch wieder verschwindet wie sie entsteht.

Bredig und Fiske¹⁾ haben in einer sehr interessanten Arbeit unter Benutzung von Chinin als Katalysator neben inaktivem Cyanhydrin durch asymmetrische Synthese rechtsdrehendes Cyanhydrin erhalten, aus welchem durch Verseifung eine linksdrehende Mandelsäure gewonnen werden konnte. Unter Benutzung des (mit Chinin isomeren, aber im Drehungsvermögen entgegengesetzten) Chinidins als Katalysator wurde dagegen neben inaktivem Cyanhydrin linksdrehendes Cyanhydrin gebildet.

Zusammenfassung.

Es ist auch in diesem vierten Abschnitt wiederum besonderes Gewicht darauf gelegt worden, die tatsächlichen Ergebnisse in den Vordergrund zu stellen.

Die besonders im Anschluss an Rosenthalers Befund früher von

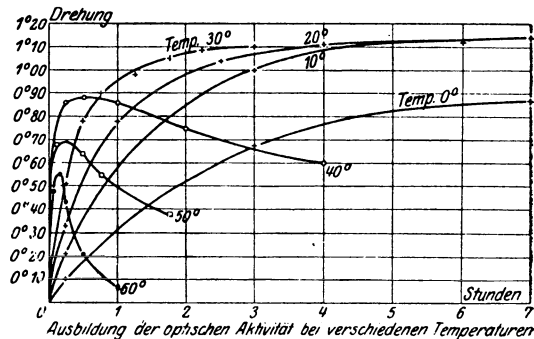


Fig. 47.

¹⁾ Bredig und Fiske, Biochem. Zs 46, 7; 1912.

mehreren Seiten aufgeworfene Frage, ob es neben spaltenden auch besondere synthetisierende Enzyme gibt, kann dahin beantwortet werden, dass die Enzyme sich in dieser Hinsicht von anderen Katalysatoren nicht prinzipiell unterscheiden und also das Gleichgewicht einer Reaktion nicht oder nur wenig verändern¹⁾.

In diesem Abschnitt kommen wir zur weiteren Frage: „Treten Enzyme in enantiomeren Formen resp. als optische Antipoden auf.“

Von allgemeinen theoretischen Gesichtspunkten aus wäre kein Grund vorhanden, eine solche Annahme abzulehnen.

Geht man von der Hypothese aus, dass die enzymatische Reaktionsgeschwindigkeit immer (*ceteris paribus*) proportional ist der Konzentration der Molekülverbindung Enzym-Substrat, so wäre eine asymmetrische Spaltung eines racemischen Materials, bei welchem sowohl eine d- wie eine l-Form gespalten wird, zurückzuführen auf die ungleiche Konzentration der in Betracht kommenden Molekülarten Enzym-Substrat. Nun kann diese Konzentrationsverschiedenheit in zweierlei Weise zustande kommen:

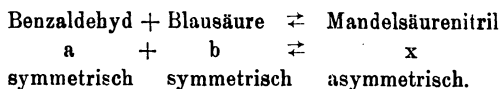
a) Entweder existiert das Enzym nur in einer Konfiguration. Diese wird sich (vorzugsweise) mit einer der beiden Antipoden des Substrates verbinden; die Affinität der Molekülart Enzym-d Substrat kann eine ganz andere sein als diejenige der Molekülart Enzym-l-Substrat.

b) Oder aber es existiert das Enzym in zwei Antipoden. Dann kommen besonders die Verbindungen in Betracht, welche die beiden Enzymantipoden mit den beiden entsprechenden Substratantipoden bilden und ihre Affinitätskonstanten; die relative Spaltungsgeschwindigkeit des d- und l-Substrats durch ein Enzympräparat wird dann hauptsächlich auf der ungleichen Konzentration des d-Enzyms und des l-Enzyms im Enzympräparat beruhen.

Haben wir es mit umkehrbaren Reaktionen zu tun, so kommen für die besprochenen Molekülarten Enzym-Substrat und Enzym-Reaktionsprodukte Gleichgewichte in Betracht, wie sie Verf.²⁾ vor längerer Zeit entwickelt hat, d. h. man behandelt hier zweckmässig die Gleichgewichtskonstante als den Quotienten der beiden entgegengesetzten Reaktionskonstanten, und setzt diese mit den Molekülen Enzym-Substrat bzw. Enzym-Reaktionsprodukte entweder nach Annahme a) oder b) proportional.

Eine der in solcher Weise möglichen Theorien hat Fajans (l. c.) entwickelt und sie mag hier zum Schluss kurz mitgeteilt werden:

Wir verallgemeinern die von Rosenthaler studierte Oxynitrilsynthese und führen folgende Bezeichnungen ein:



¹⁾ Zur Amygdalinspaltung siehe Dakin, *Jl Chem. Soc.* 85, 1512; 1904. — J. W. Walker und Kriehle, *Jl Chem. Soc.* 95, 1369; 1909.

²⁾ Euler, *H.* 52, 149; 1907.

Aus $2a + 2b$ bilden sich die beiden Antipoden x_d und x_l in gleicher Menge, und es ist die Gleichgewichtskonstante für jede Antipode

$$K = \frac{C_{x_d}}{C_a \cdot C_b} = \frac{C_{x_l}}{C_a \cdot C_b} = \frac{k_{\rightarrow}}{k_{\leftarrow}},$$

wo k_{\rightarrow} und k_{\leftarrow} die Geschwindigkeitskonstanten ohne Enzym und C die Gleichgewichtskonzentrationen bedeuten.

Dieser ganze Vorgang lässt sich in vier Reaktionen zerlegen, nämlich



„Setzt man aber zum erreichten Gleichgewicht einen optisch aktiven Katalysator (er sei mit As bezeichnet) hinzu, der auf die Geschwindigkeit aller vier Reaktionen dadurch einen Einfluss ausüben vermag, dass er sich mit den reagierenden Stoffen (bei 1. und 2. mit a) verbindet, und dass die dadurch resultierenden Verbindungen eine andere Reaktionsgeschwindigkeit, z. B. der Bildung von x_d und x_l , als die ursprünglichen (ohne Katalysator) besitzen, so wird im allgemeinen die Beeinflussung der Reaktionsgeschwindigkeit von 1. eine andere sein als von 2., und auch die von 3. eine andere¹⁾ als die von 4. wegen der Asymmetrie des Katalysators.“ „Es mögen nun für die sehr schnell (willkürliche Annahme als Beispiel) verlaufenden Reaktionen $a + As \rightleftharpoons aAs$, $x_d + As \rightleftharpoons x_dAs$ und $x_l + As \rightleftharpoons x_lAs$ die Gleichgewichtskonstanten:

$$k_1 = \frac{C_{aAs}}{C_a \cdot C_{As}}, \quad k_2 = \frac{C_{x_dAs}}{C_{x_d} \cdot C_{As}} \quad \text{und} \quad k_3 = \frac{C_{x_lAs}}{C_{x_l} \cdot C_{As}}$$

gelten. Bedeuten noch k_d , k_l , k_d und k_l die Geschwindigkeitskonstanten der obigen vier numerierten Reaktionen mit Katalysator, so lassen sich die Gleichgewichte für die einzelnen Antipoden nach dem kinetischen Koexistenzprinzip folgendermassen darstellen:

$$\overset{\rightarrow}{k_d} C_b \cdot C_{aAs} + k_{\rightarrow} C_a C_b = \overset{\leftarrow}{k_d} C_{x_dAs} + k_{\leftarrow} C_{x_d},$$

oder mit obigen Gleichungen kombiniert:

$$(\overset{\rightarrow}{k_d} k_1 C_{As} + k_{\rightarrow}) C_a \cdot C_b = (\overset{\leftarrow}{k_d} k_2 C_{As} + k_{\leftarrow}) C_{x_d},$$

und dem analog:

$$\overset{\rightarrow}{k_l} k_1 C_{As} + k_{\rightarrow}) C_a \cdot C_b = (\overset{\leftarrow}{k_l} k_3 C_{As} + k_{\leftarrow}) C_{x_l}$$

$$\text{oder: } 1. \quad C_{x_d} = \frac{(\overset{\rightarrow}{k_d} k_1 C_{As} + k_{\rightarrow}) C_a \cdot C_b}{\overset{\leftarrow}{k_d} k_2 C_{As} + k_{\leftarrow}} \quad \text{und: } 2. \quad C_{x_l} = \frac{(\overset{\rightarrow}{k_l} k_1 C_{As} + k_{\rightarrow}) C_a \cdot C_b}{\overset{\leftarrow}{k_l} k_3 C_{As} + k_{\leftarrow}}.$$

Daraus findet man:

$$\frac{C_{x_d}}{C_{x_l}} = \frac{\overset{\rightarrow}{k_d} k_1 C_{As} + k_{\rightarrow}}{\overset{\rightarrow}{k_l} k_1 C_{As} + k_{\rightarrow}} \cdot \frac{\overset{\leftarrow}{k_l} k_3 C_{As} + k_{\leftarrow}}{\overset{\leftarrow}{k_d} k_2 C_{As} + k_{\leftarrow}}.$$

A. B.

Da die sich entsprechenden Glieder für d und für l im Zähler und Nenner im allgemeinen untereinander verschieden sein werden, und kein Grund vorliegt, dass $A = 1/B$ sein sollte (in einzelnen Fällen kann das ja vorkommen), so wird man also in der Regel im Gleichgewicht verschiedene Mengen von x_d und x_l erwarten müssen. Das bedeutet aber nichts anderes als eine asymmetrische Synthese.“

Biologische Spezifität.

Wie bereits früher betont, gilt die Einteilung in chemische und biologische Spezifität für den gegenwärtigen Stand der Forschung. Auf diesem macht es den Eindruck, als sei die Mannigfaltigkeit der Enzyme, wenn wir sie in

¹⁾ Denn es wird $aAs + b \rightarrow x_dAs$ nicht gleich schnell wie $aAs + b \rightarrow x_lAs$ verlaufen, und das trifft auch für die entgegengesetzten Reaktionen von x_dAs und x_lAs zu.

ihrem natürlichen Medium und mit den sie darin begleitenden Aktivatoren und Paralytoren untersuchen, sehr viel grösser als diejenige, welche Präparate höheren Reinheitsgrades aufweisen. In dem Mass als wir in den Chemismus der Enzymwirkung eindringen, werden die Eigenschaften der natürlichen „Enzysysteme“ verständlich. Bis dahin stehen wir vor noch unerklärten, aber nicht minder bemerkenswerten Tatsachen. Eine Anzahl solcher Tatsachen sind in diesem Abschnitt gesammelt.

Willstätter¹⁾ hat in seinen eingehenden Untersuchungen über Lipasen die erheblichen Unterschiede gezeigt, welche nicht nur zwischen pflanzlichen und tierischen Enzymen, sondern auch zwischen den Lipasen verschiedener Organe bestehen. S. 346 ist bereits der Vergleich zwischen Leber- und Pankreaslipase erwähnt worden.

„Die stereochemische Eigenart der Leber- und Pankreasenzyme bietet eine weitere Stütze für die Annahme ihrer Verschiedenheit. Aber auch dieses neue Argument wird nicht als vollkommen beweisend anzusehen sein. Wären diese Lipasen identisch, so würde die eine (Leber) mit einem asymmetrischen Aktivator assoziiert vorkommen, der die Geschwindigkeit der Spaltung von zwei Antipoden verschieden zu beeinflussen imstande wäre. Alle besonderen Merkmale der Leberesterase . . . müssten dann statt dem Enzym einem mit ihm zum Komplex vereinigten Co-Enzym zugeschrieben werden. Wenn es also einfacher und wahrscheinlicher ist, dass die Leberesterase und die Pankreaslipase verschieden sind, so sollte man doch anstreben, das Leberenzym so weitgehend zu reinigen, dass sich sein Verhalten in bezug auf Hemmung und Aktivierung und Haltbarkeit wesentlich ändert, um mit reineren Präparaten die Versuche asymmetrischer Spaltungen vergleichend zu wiederholen.“

Racemische Substrate	Drehung der rascher verseiften Komponenten	
	mit Pankreaslipase	mit Leberesterase
Mandelsäureäthylester	—	+
Mandelsäure-Monoglycerid	—	+
Phenyl-methoxy-essigsäure-methylester	—	+
Phenyl-chloressigsäure-methylester . . .	—	—
Phenyl-bromessigsäure-methylester . . .	—	—
Phenyl-aminoessigsäure-propylester . . .	+	+
Tropasäure-methylester	+	—
Leucin-propylester	+ ²⁾	+ ²⁾

Noch deutlicher zeigt sich die „biologische Spezifität“ als Folge von Lösungs- und Zustandsbedingungen des Enzyms bei folgendem Vergleich zwischen Pankreaslipase und Phytolipase³⁾.

¹⁾ Willstätter und Memmen, H. 138, 216; 1924.

²⁾ l-Leucin, gemessen in 2,0% Salzsäure.

³⁾ Willstätter und Waldschmidt-Leitz, H. 125, 132 u. zw. 145; 1922.

„Die Pankreaslipase, deren Löslichkeitsverhältnisse in der Literatur ungenau, unsicher und widersprechend beschrieben sind, ist leicht und vollständig löslich in Wasser und Glycerin und besitzt in Glycerin grosse Haltbarkeit Die Samenlipase, z. B. von Ricinus, wahres intracelluläres Enzym ist in Wasser, auch in Glycerin unlöslich, gegen Glycerin, Wasser und Elektrolytlösungen unbeständig. Ihre Wirkung wird durch Aktivatoren nicht gesteigert Die Löslichkeitsunterschiede zwischen dem fettsplaltenden Enzym im Cytoplasma des Samens und dem im tierischen Verdauungstrakt, die den örtlichen Bedingungen für die Fettspaltung entsprechen, haben grosse Unterschiede in den Bedingungen für die enzymatische Wirkung zur Folge. Die lösliche Pankreaslipase ist, um in Funktion zu treten, auf Einstellung eines gewissen Adsorptionszustandes angewiesen. Das Sekret findet am Reaktionsorte die zur Aktivierung dienenden Stoffe, Protein und Galle, und wird von ihnen durch Bildung „komplexer Adsorbate“ zur Wirkung gebracht. Die Phytolipase ist im ruhenden Pflanzensamen unwirksam und unterliegt bei der Keimung einer Veränderung, durch welche sie fähig wird, unter den angegebenen Bedingungen, bei neutraler Reaktion ihre Wirkung auszuüben.“

Schon aus diesen Beispielen geht hervor, welchen Einblick eine quantitative enzymchemische Betrachtungsweise in die bisher vom rein physiologisch-biologischen Standpunkt beschriebenen Organfunktionen gewährt. Im III. Teil dieses Werkes, der „die enzymchemischen Vorgänge im Organismus“ behandeln soll, werden u. a. zahlreiche Fälle örtlich begründeter Eigenarten von Enzymen zu besprechen sein.

Es brauchen keineswegs ganz spezifische Teile eines Enzyms zu sein, welche gewisse Eigentümlichkeiten natürlicher Enzymsysteme und das Bild von Art- oder Organspezifität hervorrufen. So ist es noch fraglich, ob die physiologisch interessanten sehr verschiedenen Empfindlichkeiten von Lipasen gegenüber gewissen Giften, welche Rona¹⁾ neuerdings beschrieben hat, von einem mit den Lipasen notwendig verknüpften Stoff veranlasst sind.

Auch für die Beurteilung biologischer Spezifitäten wird man natürlich so weit möglich zu entscheiden suchen, ob die Unterschiede der Wirksamkeit von Präparaten verschiedener Herkunft auf Unterschiede der Affinität zum Substrat oder auf ungleiche Reaktionsgeschwindigkeit der Enzym-Substratmoleküle (beeinflusst durch Aktivatoren usw.) zurückzuführen sind. Als lehrreiches Beispiel einer sachgemässen Durcharbeitung sei hier nochmals die Untersuchung von Willstätter, Kuhn und Sobotka (H. 129) über verschiedene Emulsinpräparate angeführt.

Eine andere Gruppe von biologischer Spezifität betrifft die Fälle, in welchen das Substrat, je nach seiner Herkunft, spezifisch ausgewählt wird. So sind pflanzliche Proteasen aus Weizen, Roggen und Hafer, die auf pflanz-

¹⁾ Rona und Petow, *Biochem. Zs* 146, 28; 1924. — Siehe hierzu Willstätter und Memmen, H. 138, 216 u. zw. 241; 1924.

liche Proteine eingestellt sind, von Aron und Klempin¹⁾ unwirksam gegenüber tierischen Eiweisskörpern befunden worden. Neuerdings kommt Blagoveschenski²⁾ bei der Untersuchung von Proteasen aus Phaseolus, Dolichos, Cannabis und Hibiscus an Globulinen der gleichen Pflanzen zum Ergebnis, dass das Enzym jeder Pflanze deren eigenes Globulin leichter spaltet als dasjenige der übrigen Pflanzen.

Nach Bestätigung und Erweiterung solcher Tatsachen wird man festzustellen haben, wie sich die Globuline der verschiedenen Pflanzen strukturell und stereochemisch voneinander unterscheiden.

An der biologischen Spezifität natürlicher Enzymsysteme sind neben Aktivatoren vermutlich auch Paralysatoren weitgehend beteiligt. Eine vollständige Zusammenstellung des Materiales, besonders soweit es an die Lehre von den Immunitätswirkungen grenzt, kann erst im III. Teil dieses Buches Platz finden; hier sei nur eine typische Gruppe von Spezialfällen mitgeteilt³⁾.

Antitryptische Paralysatoren des normalen Blutserums.

Durch die Untersuchungen von Hahn⁴⁾ und die fast gleichzeitigen von Pugliese und Coggi⁵⁾ ist zuerst festgestellt worden, dass normales Serum die tryptische Verdauung hemmt. (Fermi hatte bereits beobachtet, dass Trypsin bald nach der Injektion verschwindet.) Weitere Arbeiten hierüber liegen vor von Achalme (Ann. Inst. Pasteur. 15), Camus und Gley (Soc. Biol. 47), Charrin und Levaditti, Simnitzki, Glaessner (Hofm. Beitr. 4). Diese antitryptische Wirkung ist an das Serumalbumin gebunden [Landsteiner⁶⁾, Cathcart⁷⁾, Hedin⁸⁾].

Die Hemmung der Einwirkung von Trypsin auf Kasein durch normales Serum ist in eingehenden Versuchen von Hedin studiert worden, welcher die Analogie dieser Hemmung mit derjenigen durch feste Pulver zeigte. Serumalbumin kann, wie Kohle, als Hemmungskörper des Trypsins derart mit Trypsin gesättigt werden, dass von einer neuen zugegebenen Menge nichts mehr aufgenommen wird, oder dass keine weitere Hemmung stattfindet.

Bei der Trypsinhemmung durch normales Serum und durch Kohle ist das Reihenfolgephänomen sowie der Einfluss von Zeit und Temperatur gleich⁹⁾.

Bei einer Reihe von Krankheiten, wie Diabetes, Tuberkulose, Struma, Tumoren, ferner bei Wundfieber [Zunz und Govaerts¹⁰⁾], sowie in späteren Stadien der Schwangerschaft,

¹⁾ Aron und Klempin, Biochem. Zs 9, 163; 1908.

²⁾ Blagoveschenski, Biochem. JI 18, 795; 1924.

³⁾ Siehe auch S. A. Waksman, Abstr. of Bact. 6, 265; 1922.

⁴⁾ Hahn, Berl. klin. Wochenschr. 34, 499; 1897.

⁵⁾ Pugliese und Coggi, Bollet. Scienze med. 8; 1897.

⁶⁾ Landsteiner, Zbl. f. Bakt. I, 27, 357; 1900.

⁷⁾ Cathcart, JI of Physiol. 31, 497; 1904.

⁸⁾ Hedin, JI of Physiol. 32, 390; 1905.

⁹⁾ Hedin, Biochem. JI 1, 474; 1906. — H. 60, 364; 1909.

¹⁰⁾ Zunz und Govaerts, Soc. Biol. 81, 146; 1919.

wurde erhöhte antitryptische Tätigkeit des Serums, des „antitryptischen Titers“ [Brieger und Trebing¹⁾] gefunden. Auf Angaben der reichhaltigen Literatur muss verzichtet werden.

Delezenne²⁾ hat behauptet, dass die hemmende Wirkung des normalen Serums nicht einer direkten Einwirkung auf die proteolytischen Enzyme, sondern einer Neutralisation der entsprechenden Kinasen zuzuschreiben ist. Er beschreibt folgende Versuche:

Nach vorläufiger Bestimmung derjenigen Menge Serum, welche gerade die verdauende Wirkung einer Mischung von Pankreassaft und Darmsaft aufheben kann, werden drei Röhren mit gleichen Mengen der zu verdauenden Substanz, der Pankreas-Darmsaft-Mischung und der zur Neutralisation hinreichenden Menge Serum gefüllt. Nach einigen Stunden überzeugt man sich, dass in keiner der Röhren Verdauung eingetreten ist, und fügt dann zur Röhre A einen Überschuss von Pankreassaft, zu B einen Überschuss von Darmsaft; C dient als Kontrollversuch. Nun ergab sich, dass Verdauung hierauf nur in B eintrat. Delezenne zieht daraus den Schluss, dass bei der Verdauung durch die Pankreas-Darmsaft-Mischung nur der Darmsaft (die Kinase) neutralisiert war, und dass das Serum auf das Pankreasenzym selbst gar nicht einwirkt. Ascoli und Bezzola (Zentralbl. f. Bakt. 33) kamen zu teilweise ähnlichen Ergebnissen.

Gegen diese Auffassung lassen sich Einwände erheben, besonders, dass auch trypsinogenfreie Trypsinlösungen von Serum kräftig gehemmt werden.

Nach Delezenne wäre das Antitrypsin eine Antikinase, und man könnte ausserdem noch die Existenz eines Antitrypsinogens erwarten. Ein solcher Stoff konnte indessen nach subkutaner Injektion im Blutserum nicht nachgewiesen werden. Normales Kaninchenserum besitzt übrigens ausser seinen antitryptischen Eigenschaften zuweilen auch die Fähigkeit, Entero-kinase zu neutralisieren; diese Fähigkeit soll durch Injektion von Entero-kinase gesteigert werden. Dagegen erhöht im Serum erzeugte „Antikinase“ nicht dessen antitryptischen Eigenschaften. Diese Beobachtungen wurden durch bemerkenswerte Arbeiten von E. Zunz bestätigt und erweitert³⁾.

Nachdem nunmehr die Wirkung der Entero-kinase durch Waldschmidt-Leitz wesentlich geklärt worden ist (vgl. S. 219, wird eine Revision mancher älteren Arbeiten wünschenswert.

Normales Blutserum enthält neben Antitrypsin ein proteolytisches Enzym, die Serumprotease, deren Wirkung durch Antitrypsin gehemmt wird. Die Serumprotease lässt sich durch Salzfällung vom Antitrypsin trennen, da die Protease der Globulinfraction, das Antitrypsin überwiegend der Albumin-fraction folgt.

Wie Hedin fand, hemmt normales Serum, besonders Pferdeserum, auch die koagulierende Wirkung von Kalbslab auf Kuhmilch.

Dass die Antitrypsinmenge im Serum durch Injektion von Trypsinlösungen erheblich gesteigert werden kann, haben Achalme⁴⁾ und Wein-

¹⁾ Brieger und Trebing, Berl. klin. Wochenschr. 45, 1041; 1908.

²⁾ Delezenne, Soc. Biol. 55, 112; 1903.

³⁾ Zunz, Bull. Acad. R. de méd. de Belgique [4] 19; 1905.

⁴⁾ Achalme, Ann. Inst. Pasteur 15, 737; 1901.

land¹⁾ gefunden; dagegen wird nach W. J. Young²⁾ durch intravenöse oder intraperitoneale Injektion die antitryptische Wirkung des Blutes nicht gesteigert. Dieser Autor bestätigt noch einen Befund von Hedin, dass Blutserum die Trypsinwirkung nicht vollständig hemmen kann.

Nach Kurt Meyer³⁾ ist das Antitrypsin des normalen Serums ein echter Antikörper, dessen Auftreten im Serum vom Pankreastrypsin und vom Leukozytentrypsin wenig beeinflusst wird.

Quantitative Versuche über die Beziehung zwischen Trypsinmenge und Serumantitrypsin verdankt man ferner T. B. Robertson und Hanson. Nach Robertson lässt sich das Trypsin-Antitrypsin-Gleichgewicht nach dem Massenwirkungsgesetz berechnen.

Wenn A = zugesetzte Antitrypsinmenge

T = Proz.-Anteil des durch das Serum neutr. Trypsins, so soll gelten:

$$\frac{T}{A(1-T)} = \text{Konst.}$$

Die so gefundene Konstante ist ein direkter Massstab des in einem gewissen Serum vorhandenen Antitrypsingehaltes.

Neuerdings haben Hussey und Northrop⁴⁾ auf die Verbindung zwischen Trypsin und Hemmungskörper das Massenwirkungsgesetz angewandt, und es soll hiernach gelten:

[freies Trypsin] [freier Hemmungskörper] = K [Trypsin-Hemmungskörper].

Die klinische Bedeutung der Tryptasen und Antitryptasen, auf welche hier nicht näher eingegangen werden kann, findet man in einem zusammenfassenden Bericht von G. v. Bergmann und Kurt Meyer, Berl. klin. Woch. 45, 1673; 1908, dargestellt.

Antitryptische Wirkungen zeigen nach Fermi⁵⁾ auch verschiedene Organewebe und einige eiweisshaltigen Stoffe wie Eigelb und Milch.

Nach A. Döblin⁶⁾ ist das Serumantitrypsin recht hitzebeständig. Fujimoto gibt für verschiedene Seren Temperaturen von 65—75° an. Nach Vandavelde⁷⁾ wird die „Antiproteolase“ durch Erwärmen auf 55° geschwächt. Auch die antitryptische Wirkung des Urins wird nur wenig durch Erhitzen geschwächt; Fujimoto⁸⁾ fand zur Zerstörung dieser Wirkung halbstündiges Erhitzen auf 100° erforderlich.

Nach letzterem Autor kann das Antitrypsin des Serums nicht durch Dialyse entfernt werden. Es ist, wie auch schon Kurt Meyer gefunden hatte, nicht oder nur sehr wenig in Äther löslich.

¹⁾ Weinland, Zs f. Biol. 44, und 45; 1903.

²⁾ W. J. Young, Biochem. JI 12, 499; 1918.

³⁾ Kurt Meyer, Berl. klin. Woch. 46; 1909 und 47; 1910. — Siehe auch Kawashima, Biochem. Zs 23, 186; 1910, sowie Cobliner, Biochem. Zs 25, 494; 1910.

⁴⁾ R. G. Hussey und Northrop, JI gen. Physiol. 5, 335; 1922.

⁵⁾ Fermi, Zentralbl. f. Bakt. 50, I, 50, 255; 1909.

⁶⁾ Döblin, Zs f. Immunitätsf. u. exp. Therap. 4, 229; 1910.

⁷⁾ Vandavelde, Biochem. Zs 18, 142; 1909.

⁸⁾ Fujimoto, JI of Immun. 3, 51; 1918.

Schliesslich muss hervorgehoben werden, dass der Grad der Spezifität des Hemmungskörpers im Blutserum noch nicht geklärt ist, weder hinsichtlich ähnlicher Körper in anderen Organen (vgl. S. 226), noch hinsichtlich der Wirkungsfähigkeit auf andere Enzymgruppen als Proteasen.

C. Wirkungen an fremden, besonders zellfremden und blutfremden Substraten.

Jede biologische Einheit, die Art, die Rasse, das Individuum, das Organ und die Zelle, reagiert gegen Eingriffe, welche eine dauernde Veränderung hervorzurufen drohen. Diese Reaktion ist eine der auffallendsten und interessantesten der Lebenserscheinungen; sie hat sich auf keine bekannte, physikalische oder chemische Tatsache zurückführen lassen; über die treibende Kraft, welche diese Erscheinung bewirkt, wissen wir einstweilen noch nichts. Bevor die künftige biologische Forschung an die Beantwortung der Frage nach der Erhaltung von Art und Rasse gehen kann, wird es notwendig sein, die chemischen Wege zu erkunden, auf welchen die niedersten Einheiten für die Erhaltung ihrer Eigenschaften sorgen.

Wir können das Problem zunächst so formulieren: durch welchen Vorgang reagiert eine biologische Einheit gegen eine wesentliche Veränderung der ihr eigentümlichen chemischen Zusammensetzung.

Aus äusseren Gründen ist diese Frage nicht bei den niedersten, einzelligen Organismen am einfachsten zu beantworten. Man kann sagen, dass systematische Untersuchungen über chemische Veränderungen an Mikroorganismen — Versuche über Anpassungen an chemische Bedingungen — nach den bedeutungsvollen Arbeiten E. Chr. Hansens und seiner Schüler vom chemischen Standpunkt aus erst in den letzten fünfzehn Jahren wieder in Angriff genommen worden sind. Vgl. Kap. 10.

Bei höheren Pflanzen ist es nach Erfahrungen des Verfassers sehr schwer, chemische Eingriffe vorzunehmen, ohne den Organismus als Ganzes stark zu schädigen.

Die Grundlagen für weitere Fortschritte sind durch Versuche an Menschen und höheren Tieren, und zwar von medizinischer Seite geliefert worden. Eine geschichtliche Einleitung in dieses Gebiet würde uns hier allzuweit führen, und wir müssen uns darauf beschränken, den gegenwärtigen Stand der Forschung kurz zu kennzeichnen.

Die Zelle wehrt sich gegen äussere chemische Eingriffe zum grossen Teil durch Vermittlung von spezifischen Schutzstoffen und, in gewissen Fällen, von spezifischen Enzymen.

„Die Annahme eines spezifisch festgelegten Baus für jede Zellart mit besonderen Funktionen setzt voraus — schreibt Abderhalden —, dass die einzelnen Zellen über

besondere Werkzeuge verfügen, mittels deren sie ihren Bau zurecht zimmern. Das Ausgangsmaterial, die Bestandteile des Blutplasmas, ist für alle Zellen das gleiche. Auch die Bildung spezifisch wirkender Sekrete fordert, dass jede Zellart über Mittel und Einrichtungen verfügt, um unter Umständen das gleiche Produkt eigenartig umformen und bearbeiten zu können. Von diesen Gesichtspunkten aus ist zu erwarten, dass jede Zellart über besondere Fermente verfügt.“

Die Bedeutung dieses Gedankenganges betont und ihn zum Ausgangspunkt für ein grosses Forschungsgebiet gemacht zu haben, ist das Verdienst von Emil Abderhalden.

Dieser Forscher hat selbst eine zusammenfassende Darstellung seiner eigenen, Aufsehen erregenden Ergebnisse und Anschauungen in seinem bekannten Buch: „Abwehrfermente“ gegeben, welches in 5. Auflage unter dem Titel „Die Abderhaldensche Reaktion“ vorliegt. Es kann sich also hier nur darum handeln, dieses Erscheinungsgebiet in das allgemeine Gebiet der Enzymologie einzuordnen. Es wird dies am besten durch die Mitteilung einiger typischen Fälle geschehen.

Weinland¹⁾ hatte 1907 gefunden, dass durch Injektion von Rohrzucker in die Blutbahn Saccharase gebildet wird, die im normalen Serum nicht vorhanden, bzw. nicht wirksam ist.

Abderhalden beschreibt (l. c.) folgende Versuche:

„Bringt man Blutserum oder Plasma von Hunden mit einer Rohrzuckerlösung zusammen, so kann man leicht nachweisen, dass keine Spaltung des Rohrzuckers eintritt. Der Gehalt des Blutplasmas an reduzierenden Substanzen nimmt nicht zu. Verwendet man dagegen Blutplasma oder Serum von einem Hunde, dem man vorher Rohrzucker unter die Haut oder besser direkt in die Blutbahn eingespritzt hat, so beobachtet man beim Zusammenbringen dieses Plasmas mit Rohrzucker sehr oft, dass das Reduktionsvermögen des Gemisches erheblich zunimmt. Gleichzeitig kann man verfolgen, dass die Menge des zugesetzten Rohrzuckers eine Abnahme erfährt.“

Diese Abnahme des Rohrzuckers gibt sich auch dadurch zu erkennen, dass die anfänglich beobachtete starke Rechtsdrehung fortwährend abnimmt, und schliesslich in eine Linksdrehung übergeht, was anzeigt, dass der Rohrzucker zum grössten Teil in Glucose und Fructose gespalten worden ist.

„Es gelingt nicht immer durch die parenterale Zufuhr von Rohrzucker das Erscheinen von Invertin im Blutplasma anzuregen. Besonders bei Hunden zeigen sich grosse individuelle Unterschiede.“

„Bei Kaninchen sind die Resultate viel regelmässiger. Offenbar spielt bei der Bildung der Abwehrfermente das Verweilen des blutfremden Stoffes im Blute eine grosse Rolle.“ Der Rohrzucker wird sehr rasch durch die Nieren ausgeschieden.

Das folgende Beispiel gibt einen Einblick in das Ergebnis derartiger Versuche.

¹⁾ Weinland, Zs f. Biologie 47, 279; 1906.

Einem Hund wurde vor der parenteralen Zufuhr des Rohrzuckers Blut entnommen und das Verhalten des Serums gegenüber diesem Disaccharid festgestellt. Es fand keine Spaltung statt (Kurve 1 in Fig. 48). Nun erhielt das Tier 10 ccm einer 5%igen Rohrzuckerlösung intravenös. Die 15 Minuten nach der Injektion entnommene Blutprobe zeigte bereits Hydrolyse von zugesetztem Rohrzucker (Kurve 2 in Fig. 48). Zur Kontrolle wurde das Drehungsvermögen des Serums ohne Zusatz von Rohrzucker verfolgt (Kurve von A und B).

Versuchsanordnung:

0,5 ccm Serum (Blut 15 Minuten nach der intravenösen Injektion von Rohrzucker entnommen),

0,5 ccm einer 5%igen Rohrzuckerlösung,

7,0 ccm physiologische Kochsalzlösung.

A und B 0,5 ccm Serum,

7,5 ccm physiologische Kochsalzlösung.

Die in diesem Fall neu auftretende Saccharase hat Abderhalden als Abwehrenzym bezeichnet.

Der nach Zufuhr von artfremdem Material (Proteine, Kohlehydrate) im Plasma auftretende Enzymgehalt hält nach Abderhalden recht lange an.

„Das Spaltvermögen des Plasmas konnte in einzelnen Fällen bis zu 3 Wochen nach der Injektion noch deutlich festgestellt werden. Wichtig ist ferner der Befund, dass nach intravenöser Zufuhr von Rohrzucker Invertin im Blutplasma unter Umständen schon nach Stunden nachweisbar war. Wurden Eiweissstoffe subkutan zugeführt, dann dauerte es 2—3 Tage, bis die Fermentbildung voll zur Geltung kam. Nach intravenöser Zufuhr trat sie schon innerhalb 24 Stunden auf.“

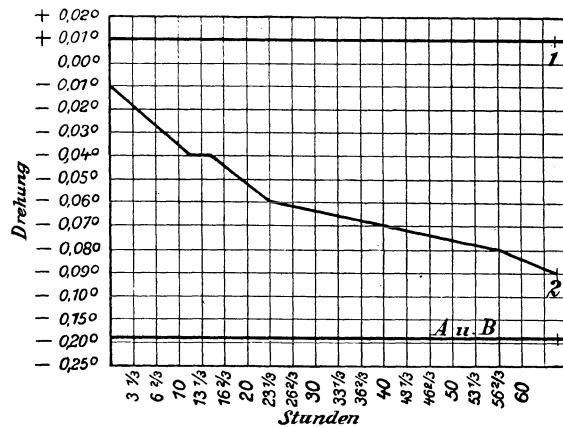


Fig. 48.

Der grösste Teil der Untersuchungen Abderhaldens, seiner Mitarbeiter und anderer Forscher über Abwehrenzyme bezieht sich auf die Spaltung von Eiweisskörpern. Hier ist der Nachweis spezifischer Abwehrenzyme mit besonderen Schwierigkeiten verknüpft.

Abderhalden selbst hat bis jetzt im wesentlichen zwei Methoden zum Nachweis der Abwehrenzyme angewandt.

1. Das Dialysierverfahren, welches darauf beruht, dass Eiweiss als Kolloid nicht durch tierische Membranen hindurchdiffundiert, wohl aber die nächsten Abbaustufen, die Peptone.

2. Das Polarisationsverfahren, bei welchem die mit der Eiweisspaltung verbundene Änderung der optischen Drehung untersucht wird.

Hierzu kommt noch als dritte Methode die von P. Hirsch ausgearbeitete Messung der Änderung des Brechungsindex in den Reaktionslösungen¹⁾.

Die Versuche von Weinland sind, besonders auf Grund der fast durchweg positiven Ergebnisse von Abderhalden und Kapfberger²⁾, häufig wiederholt worden, ohne dass deutliche Anzeichen für das Auftreten von Saccharase im Blutplasma nachgewiesen werden konnten. In Rücksicht auf die Besonderheiten, welche an einer tierischen Saccharase vom Verf. und Svanberg³⁾ gefunden worden waren, wurden auch im Stockholmer Laboratorium Versuche angestellt und zwar von Knaffl-Lenz⁴⁾, um die „Abwehr-Saccharase“ mit der Darm-Saccharase zu vergleichen; auch hier zeigte sich nach intravenöser Rohrzuckereinspritzung an Kaninchen keine Saccharase im Blut. Auch Abderhalden selbst hat keine regelmässigen Ergebnisse erzielt, und steht nunmehr auf folgendem Standpunkt⁵⁾: „Die Tatsache, dass nach parenteraler Zufuhr von Rohrzucker im Blutplasma Saccharase auftreten kann, ist über jeden Zweifel erhaben sicher gestellt, ebenso eindeutig ist auch bewiesen, dass es nur ausnahmsweise gelingt, diesen Zustand zu erzielen.“ Weiterhin spricht sich aber Abderhalden nunmehr dahin aus, „dass wohl niemand mehr an eine Neubildung von Saccharase, angeregt durch den Reiz des parenteral zugeführten Rohrzuckers, denkt“, und ist selbst der Meinung, „dass die im Blut auftretende Saccharase aus der Pankreasdrüse bzw. den Darmdrüsen stammt“.

Diese Versuche der Schule von Abderhalden haben neben Bestätigungen auch manche Widersprüche⁶⁾ erfahren; auch die Entwicklung der Ergebnisse von Abderhalden selbst zeigt jedenfalls, dass es noch ausgedehnter, besonders möglichst quantitativer Untersuchungen bedarf, um die nötige Klarheit in dieses Erscheinungsgebiet zu bringen. — Zum Teil mögen die starken Schwankungen in den Ergebnissen darauf beruhen, dass unsere Kenntnisse der Eiweisskörper und des Eiweissabbaus noch so unzureichend sind; die physiologischen Beobachtungen sind auf diesem Gebiet der chemischen Forschung gewissermassen zu weit vorausgeeilt.

Ausserordentlich interessant ist die Frage, welche Beziehung zwischen den proteolytischen Abwehrenzymen und der Anaphylaxie existiert.

Die Anaphylaxie besteht in einer Überempfindlichkeit des

¹⁾ P. Hirsch, *Fermentf.* 1, 33; 1916.

²⁾ Abderhalden und Kapfberger, *H.* 69, 25; 1910. — Weitere Literatur siehe in Abderhaldens Monographie: *Die Abderhaldensche Reaktion*, Berlin, 1922.

³⁾ Euler und Svanberg, *H.* 115, 43; 1921.

⁴⁾ Knaffl-Lenz, *H.* 120, 110; 1922.

⁵⁾ Abderhalden, *H.* 121, 283; 1922. — Siehe auch *Biochem. Zs.* 117, 161; 1921.

⁶⁾ Vgl. z. B. Michaelis und v. Lagermarck, *Deutsche med. Wochenschr.* 40, Nr. 7 und 9; 1914. — Abderhalden, ebenda Nr. 7.

Organismus gegen körperfremde Eiweissstoffe, welche bei wiederholter Injektion derselben hervortritt. Eine bei der ersten Injektion ungiftige Eiweissmenge ruft bei der folgenden Injektion eine typische, oft tödlich verlaufende Reaktion und ein Krankheitsbild hervor, das dem der Peptonvergiftung ähnelt¹⁾.

Abderhalden betont, „dass seine Beobachtungen (über das Auftreten von Fermenten im Blutspasma nach der Einspritzung von blutfremden Proteinen und Peptonen unzweifelhaft in irgend einem Zusammenhang mit der Anaphylaxie stehen. Fraglich bleibt nur, welche spezielle Bedeutung ihnen zukommt. Es wäre denkbar, dass die Fermente im Laufe der Zeit besondere Eigenschaften annehmen, und dann vielleicht beim Abbau des zum zweitenmal gespritzten Eiweisses ganz besondere Abbaustufen liefern, die eine spezielle Wirkung entfalten“.

„Es sind noch viele andere Möglichkeiten gegeben. Der Abbau braucht sich ja nicht ausschliesslich im Blute zu vollziehen. Wir haben — setzt Abderhalden fort — mit unserer Methode bis jetzt nur das Erscheinen von Fermenten im Plasma resp. Serum nachgewiesen, und zwar konnte das geschehen, weil normalerweise im Blutplasma bestimmter Tiere die von uns nach der parenteralen Zufuhr von Proteinen und Peptonen aufgefundenen Fermente nicht feststellbar sind. Es ist nicht unwahrscheinlich, dass nach der Zufuhr von artfremdem Materiale auch in den Körperzellen neue Eigenschaften auftreten, und in diesen ebenfalls der Abbau dieser körperfremden Stoffe vorgenommen wird.“

Anaphylaktische Erscheinungen sind bezüglich Seruminjektionen besonders eingehend studiert.

Nach Behandlung eines Tieres mit einem bestimmten Serum, beispielsweise mit Pferdeserum, ist das Tier nur gegen Pferdeserum anaphylaktisch; es zeigt sich also hier ein hoher Grad von Spezifität, welche an diejenige erinnert, welche zwischen Enzym und Substrat besteht.

Bei Anwendung isolierter Proteine zeigt sich, dass diese Spezifität eine chemische ist; sie tritt nämlich nur bei der wiederholten Einwirkung der genau gleichen Eiweissart auf. Gegen die wiederholte parenterale Eiweisseinführung ist unter den Tieren das Meerschweinchen besonders empfindlich.

R. Fähræus hat mit dem Verf. eine Untersuchung über anaphylaktische Wirkungen eines hochgereinigten Enzyms, und zwar der Saccharase, begonnen, wobei die nächste Fragestellung war, ob die Inaktivierung eines solchen Präparates durch Erwärmen auf 70° bei $p_H = 4,5$ eine solche Veränderung herbeiführt, dass sich das inaktivierte Enzympräparat anaphylaktisch vom aktiven unterscheidet. Für die Beurteilung der Reinheit von Enzympräparaten wäre es natürlich wertvoll, in der anaphylaktischen Reaktion ein Kriterium für die Gegenwart enzymatisch inaktiver Moleküle zu erhalten. Die bisher an Meerschweinchen angestellten (noch nicht veröffentlichten) Versuche mit einem von K. Josephson dargestellten Saccharasepräparat XIX a KA von

¹⁾ Anaphylaxie tritt nur bei der parenteralen, besonders bei der intravenösen Einspritzung von blutfremdem tierischem oder pflanzlichem Eiweiss auf.

Von der schon früher oft beobachteten Arzneimittel-Idiosynkrasie wird man zweckmässig die anaphylaktischen Erscheinungen bei der Diskussion trennen, wenn auch (z. B. bei der Überempfindlichkeit gegen Chinin und Antipyrin) Ähnlichkeiten bestehen. Siehe hierzu auch Kurt Meyer und M. E. Alexander, *Biochem. Zs* 146, 217; 1924.

If = 118 (1 ccm = 3 mg) deuten bestimmt darauf hin, dass dem Präparat Antigeneigenschaften zukommen. Über den Einfluss der Temperatur-Inaktivierung können dagegen noch keine Angaben gemacht werden.

Auf die Ansichten und Theorien über die der Anaphylaxie zugrundeliegenden Vorgänge kann hier nicht eingegangen werden¹⁾. Dagegen mag hier erwähnt werden, dass in neueren Arbeiten auch wieder die chemische Seite des Anaphylaxieproblems berücksichtigt wird. Schon 1918 konnten Wells und Osborne²⁾ nachweisen, dass chemisch ähnliche Proteine von verschiedenen Pflanzensamen miteinander anaphylaktisch reagieren, während bei chemisch verschiedenen Eiweissstoffen des gleichen Samens in vielen Fällen die Wirkung ausblieb, wodurch die Auffassung gestützt wird, dass die Spezifität der anaphylaktischen Reaktion durch die chemische Struktur des Eiweissmoleküls bedingt ist.

Den Einfluss der stereochemischen Konfiguration der Proteine haben Dakin und Dale³⁾ in einer interessanten Arbeit behandelt.

D. Antienzyme (Enzym-Antikörper).

Mit den Toxinen scheinen gewisse Enzyme die Fähigkeit gemeinsam zu haben, den lebenden Organismus zur Bildung von Antikörpern zu veranlassen, welche die Wirkungen der Enzyme, und zwar, nach den Angaben der Literatur, in streng spezifischer Weise hemmen. Der erste Fall von Antienzymbildung wurde 1893 von Hildebrandt am Enzymgemisch „Emulsin“ beobachtet. Es wäre hiernach zu vermuten, dass Enzym als Antigen einen Antikörper (Antienzym) bildet.

Unter der Bezeichnung Antienzyme werden gegenwärtig noch viele Stoffe zusammengefasst, welche weiter nichts gemeinsam haben, als dass sie eine Enzymwirkung hemmen. Von vornherein kann man nun alle diejenigen Stoffe zu den im Kap. 5 besprochenen Paralysatoren abführen, welche nicht auf ein spezielles Enzym spezifisch wirken, sondern nur die Bedingungen der Enzymwirkungen ungünstiger gestalten und somit die enzymatische Reaktionsgeschwindigkeit verringern.

Unter Antienzymen wären eigentlich nur die durch parenterale Injektion von Enzymen im Organismus erzeugten spezifisch hemmend wirkenden Stoffe zu verstehen⁴⁾.

¹⁾ Siehe z. B. Friedberger u. Joachimoglu, Zs f. Hyg. 84, 336; 1917. — Literatur bei Friedberger, Die Anaphylaxie, spezielle Pathologie und Therapie innerer Krankheiten von Kraus u. Brugsch, 1917, Bd. II, 1. 901.

²⁾ Wells und Osborne, JI Infect. Dis. 1918.

³⁾ Dakin und Dale, Biochem. JI 13, 248; 1919.

⁴⁾ Ob unter diesen „Antienzymen“ auch solche sind, welche, ähnlich wie die Enzyme als Katalysatoren fungieren, lässt sich auf Grund des vorliegenden Tatsachenmaterials

Ob solche Stoffe, wie der im normalen Serum vorkommende spezifische Hemmungskörper des Trypsins (vgl. S. 382), den so definierten Antienzymen anzureihen sind, lässt sich wohl nur auf Grund ihrer chemischen Untersuchungen feststellen. Die Zugehörigkeit zu den Antienzymen braucht hingegen nach meiner Ansicht nicht von einer den Enzymen entsprechenden Temperaturstabilität abhängig gemacht zu werden. Es ist wohl denkbar, dass die spezifische Antigruppe, mit deren Ausbildung der Organismus reagiert, selbst thermostabil und auch mit weniger labilen Gruppen verbunden ist als diejenigen, welche die Labilität der Enzyme bedingen.

Eine eingehende Besprechung der Enzym-Antikörper bleibt für den III. Teil des Buches vorbehalten: Hier möchte nur Verf. darauf hinweisen, wie unsicher die meisten bisherigen Angaben über eingetretene oder ausgebliebene Antienzymbildung sind; meist fehlen die absolut notwendigen quantitativen Daten.

So fehlen in den älteren Arbeiten nicht nur Mitteilungen über die Reinheit des Enzyms, worauf Abderhalden¹⁾ richtig aufmerksam macht, sondern man entbehrt insbesondere die Angaben der durch die Injektion eingeführten Aktivitätseinheiten.

Weiter ist hervorzuheben, dass man in den hierhergehörenden Mitteilungen nur selten eine Besprechung der Stabilität des eingeführten Enzyms im Blutserum findet; eine Überschlagsrechnung ergibt, dass schon in einem kleinen Bruchteil der Beobachtungszeit das eingeführte Enzym bei etwa 37° so gut wie vollständig inaktiviert gewesen sein muss. Oft ist es bei der Alkalinität des Blutes von vornherein von seinem Aktivitäts-p_H-Optimum so weit entfernt gewesen, dass es vor der Zerstörung kaum zur Wirkung gekommen ist. Negative Resultate besagen unter solchen Umständen wenig.

Antisteapsin ist von A. Schütze (Ann. Inst. Pasteur 15) dargestellt worden, welcher nach Injektion von Steapsin in zwei Fällen ein stark lipolytisch wirkendes Kaninchenserum erhalten konnte. Seine Versuche sind neuerdings von Beitzke und Neuberg²⁾ und von Bertarelli bestätigt worden.

Bertarelli³⁾ gelang es hingegen nicht, die den tierischen Lipasen aus Ochsenleber und Ochsenblutserum entsprechenden Antienzyme zu erhalten, wohl aber gewann er durch Injektion verschiedener Pflanzenlipasen (Rizinuslipase, Nusslipase) aus Hundeserum ganz spezifisch wirkende Antilipasen. So beeinflusste die Antiricinuslipase weder die Serumlipase noch die Leberlipase, noch die Nusslipase.

noch nicht entscheiden. Die Mehrzahl dieser Stoffe scheint nach stöchiometrischen Verhältnissen an das Enzym gebunden zu werden und dieses dadurch zu inaktivieren; besonders dürfte letzteres hinsichtlich des Antitrypsins im normalen Serum zutreffen; man würde deshalb richtiger von „Enzym-Antikörpern“ sprechen.

¹⁾ Abderhalden und Wertheimer, *Fermentf.* 6, 286; 1922.

²⁾ Beitzke und Neuberg, *Virch. Arch.* 183, 169; 1906. Siehe auch *Zs. f. Immunitätsf. u. exp. Therap.* 1, 645; 1908.

³⁾ Bertarelli, *Zbl. f. Bakt.* 40, I, 231; 1905.

Antiemulsin war das erste überhaupt bekannte Antienzym¹⁾. Wie Hildebrandt haben Beitzke und Neuberg (l. c.) ebenfalls Kaninchen immunisiert und aus dem Antifermentserum den Antikörper mit der Globulinfraktion ausgefällt.

Eine Antikörperbildung gegen Amylase hat vielleicht schon Kussmaul beobachtet; auch die Arbeiten von Ascoli²⁾ haben zu keinem sicheren Resultat geführt.

Durch subkutane Injektion von Diamalt, einer käuflichen, aus Grünmalz hergestellten Enzymlösung, haben Braun und Schütze³⁾ im Serum von Kaninchen Substanzen erzeugt, welche die verzuckernde Wirkung der Amylase hemmen, während das Serum vorher spaltende Wirkung besass.

Auf eine eingehende Untersuchung über Antiamylase von Lüers und Albrecht⁴⁾ sei hier schon besonders hingewiesen. Ohne auf die Diskussion, welche diese Forscher der Antienzymfrage widmen, näher einzugehen, mag hier nur der Schluss mitgeteilt werden, zu welchem sie auf Grund ihrer Versuche kommen: „Der Organismus der Kaninchen antwortet gegen die Amylaseinjektion mit zwei Antikörpern, nämlich mit einem dem Begleiteiweiss entsprechenden Antieiweiss und weiterhin mit einem gegen das Ferment gerichteten Hemmungskörper.“

Über eine Anti-Inulinase berichtet Saiki (Biol. Chem. 3; 1907). Eine Antilactase entsteht nach Schütze⁵⁾, und zwar durch Injektion von Kefirlactase unter die Haut von Kaninchen oder in den Brustmuskel des Hühnes; der Antikörper entsteht im Serum des betreffenden Tieres, in welchem er sich im normalen Zustand nicht findet.

Versuche zur Darstellung von Antisaccharase, welche A. Schütze und Bergell⁶⁾ angestellt haben, führten nicht zu entscheidenden Ergebnissen. Knaffl-Lenz⁷⁾ hat mit Hefesaccharase, und zwar mit einem hochgereinigten Präparat des Verf. (If = 105), gründliche Versuche angestellt; gegen dieselben könnte nur noch eingewendet werden, dass die Hefesaccharase bei der Alkaleszenz des Blutes nicht ihre volle Wirksamkeit entfaltet und bald zerstört wurde; die Untersuchung wäre deshalb mit Darmsaccharase zu wiederholen, deren Gewinnung in gereinigtem Zustand allerdings Schwierigkeiten macht.

Antipepsin. Sachs⁸⁾ konnte Gänse gegen Pepsin immunisieren und eine antipeptische Wirkung des Serums konstatieren, welche bis gegen die 20fache Menge Pepsin schützte. Auch v. Eisler⁹⁾ hat durch Immunisierung von Gänsen mit Lab, Pepsin und Trypsin spezifische Antikörper erhalten.

¹⁾ Hildebrandt, Virch. Arch. 131, 12; 1893.

²⁾ Ascoli, H. 43, 156; 1904.

³⁾ Braun und Schütze, Med. Klin. 3, 550; 1907.

⁴⁾ Lüers und F. Albrecht, Fermentf. 8, 52; 1924.

⁵⁾ A. Schütze, Zs f. Hyg. 48, 457; 1904.

⁶⁾ A. Schütze und Bergell, Zs klin. Med. 61, 366; 1907.

⁷⁾ Knaffl-Lenz, H. 120, 110; 1922.

⁸⁾ Sachs, Fortschr. d. Med. 20, 425; 1902.

⁹⁾ v. Eisler, Wien. Akad. Ber. 104, III, 119; 1905.

Das von Weinland¹⁾ entdeckte Antipepsin, welches als normales Sekret der Magenschleimhaut angesehen wird, entspricht dem normalen Antitrypsin des Blutserums. Es hemmt die Pepsinverdauung *in vitro* und soll die Selbstverdauung der Schleimhäute verhüten.

Der gleiche Autor hat im Presssaft von *Ascaris* Antienzyme des Pepsins und Trypsins nachgewiesen; nach R. O. Herzog²⁾ werden durch *Ascaris*presssaft auch Labpräparate in ihrer Wirkung gehemmt.

Während Bergell und Schütze vergebens versucht haben, ein Antipankreatin zu gewinnen³⁾, berichten Jochmann und Kantorowicz in einer vorläufigen Mitteilung (Münch. med. Wochenschr. 55, 728; 1908) über ein Antienzym gegen das Pankreastrypsin, welches mit dem Antikörper gegen Leukozytenferment identisch sein soll, und über zwei Antipepsine im Blut.

Versuche zur Immunisierung gegen Papayotin sind bis jetzt missglückt (Bergell und Schütze, l. c. — v. Stenitzer, Biochem. Zs 9, 382; 1908).

Antiarease. Normales Kaninchenserum und normaler, eiweissfreier Harn üben, wie L. Moll fand, eine konstante, hemmende Wirkung auf Urease aus. Dieselbe wird verstärkt durch Injektion kleiner Dosen eines Ureasepräparates von *Bact. ureae* Pasteuri. Moll hält die Antikörper des normalen und des immunisierten Serums nicht für identisch.

Die Antikörper der koagulierenden Enzyme. Die wichtige Entdeckung Morgenroths, dass subkutane Injektion von Lab in Serum und Milch der immunisierten Tiere ein Antilab erzeugt⁴⁾, hat das Studium dieser Antienzyme angebahnt. Was speziell das Antilab betrifft, so haben Morgenroth, besonders aber Madsen und Walbum, sowie Bashford die Wirkung des Antilabs quantitativ untersucht, während wir Fuld und Spiro (H. 31) eine eingehende Studie über die labende und labhemmende Wirkung des Blutes verdanken. Arrhenius hat auf die Analogie hingewiesen, welche zwischen dem Verhalten der koagulierenden Enzyme und gewisser Präzipitine gegenüber den Antikörpern besteht. Die experimentellen Unterlagen sind noch gering, und es muss daher von einer Darstellung der Gleichgewichtserscheinungen zwischen Lab, bzw. Fibrin und ihren Antikörpern abgesehen werden.

Hervorgehoben soll nur werden, dass normales Serum mehrerer Tiere eine labungshemmende Substanz enthält, wie Hammarsten und Rödén bereits 1887 gefunden haben. Dieselbe ist jedoch nicht identisch mit der durch aktive Immunisierung erzeugten (Bashford, *Jl of Pathol.* 8). Dieses im Pferdeblutserum enthaltene „Antilab“ ist nach Fuld und Spiro ein Pseudoglobulin, welches dadurch wirkt, dass es einen Teil der Calciumionen bindet und so die Koagulation verzögert. Die genannten Autoren trennen das Chymosin und Antichymosin des normalen Blutes durch Ammoniumsulfatfällung.

Sehr bemerkenswert ist hier die von Hedin⁵⁾ gefundene Tatsache, dass

1) Weinland, Zs f. Biol. 44, 45; 1903.

2) Herzog, H. 60, 306, 1909.

3) Bergell und Schütze, Zs f. Hyg. 50, 305; 1904.

4) Morgenroth, Zentralbl. f. Bakt. 26, 349; 1899 und 27, 721; 1900.

5) Hedin, H. 74, 242; 1911. — Siehe auch 72, 187; 1911 und 76, 355; 1911.

die in normalem Serum vorhandenen Hemmungskörper der Labenzyme nicht spezifisch wirken; Pferdelab wird z. B. durch normales Pferdeserum kaum gehemmt, während die Wirkung auf Kalbslab sehr deutlich ist. Dagegen ist artspezifische Hemmung in den durch Immunisierung mit Lab erhaltenen Seris vorhanden. — Hedin hat in neutralen Infusionen der Magenschleimhäute von verschiedenen Tieren unter Einhaltung gewisser Volumverhältnisse durch Behandlung mit NH_3 das freie Lab zerlegt und nach Neutralisieren eine artspezifisch hemmende Substanz zum Vorschein gebracht. Dies zeigt folgende Tabelle, welche sich auf Hemmungskörper aus Kalbsmagen bezieht (l. c. S. 248. — Monographie, 2. Aufl., S. 169).

Lab von	Gerinnungszeiten in Minuten	
	ohne Hemmungskörper	mit Hemmungskörper aus Kalb
Kalb	16,5	79
Schaf	15	25
Schwein	16	11
Kaninchen	16	15
Meerschweinchen	15	16
Pferd	13	12
Hecht	14	13

Wie ersichtlich, wird ausser Kalbslab nur noch Schafslab (schwach) gehemmt. Die Immunisierung gegen Kalbslab geschieht nach Hedin¹⁾ anfangs am besten mit dem Zymogen.

Das durch Immunisierung erzeugte Antilab wird durch Erhitzen auf 100° inaktiviert.

Wie Hedin fand, wird sowohl der durch Immunisierung erhaltene Hemmungskörper wie auch der im Zymogen enthaltene durch Salzsäure zerstört.

Schon früher hatte Hedin es wahrscheinlich gemacht, dass das Labzymogen nichts anderes ist, als eine Verbindung zwischen Lab und einem Hemmungskörper. Über Beziehungen zwischen Antipepsin und Antilab hat Jacoby²⁾ einige Versuche mitgeteilt.

Antithrombin. Bordet und Gengou³⁾ gewannen diesen Antikörper folgendermassen: Sie injizierten Meerschweinchen mit normalem Kaninchen-serum; dadurch erlangt das Meerschweinchen-serum die Fähigkeit, die Koagulation des Kaninchenblutes zu verhindern, es ist also ein Antifibrinferment gebildet worden. Dasselbe wirkt, wie die genannten Forscher festgestellt haben, ziemlich ausgeprägt spezifisch auf die Sera der verschiedenen Tierarten. Durch Erwärmen auf 55° wird dieser Antikörper nicht beeinflusst. Nach Doyon⁴⁾ enthalten alle Organe Antithrombin.

¹⁾ Hedin, H. 77, 229; 1912.

²⁾ Jacoby, Biochem. Zs 4, 471; 1907.

³⁾ Bordet und Gengou, Ann. Inst. Pasteur, 15, 129; 1901.

⁴⁾ Doyon, Soc. Biol. 82, 570; 1919.

Die Antikatalase von Batelli und Stern verhält sich wie Ferrisulfat (Soc. Biol. 59) und ist den Hemmungskörpern zuzurechnen. Ein eigentliches Antienzym der Katalase scheint nicht zu existieren¹⁾.

Während es mehrfach gelungen ist, im Tierkörper Antienzyme gegen pflanzliche Enzyme hervorzurufen (Magnus und Friedenthal), hat man Pflanzen bisher zur nachweisbaren Bildung von Antienzymen nicht veranlassen können.

Ein biologisch wichtiges Problem liegt in einer, wenn auch nur orientierenden Ermittlung des im lebenden Organismus sich einstellenden Gleichgewichtes zwischen Substrat, Reaktionsprodukt, Enzym und Antienzym.

¹⁾ De Waele und Vandevelde, Biochem. Zs 9, 264; 1908.

10. Kapitel.

Enzymbildung in der Zelle.

In diesem letzten Kapitel betrachten wir die Enzyme als die Produkte des lebenden Organismus.

Von den Auffassungen, dass ein Enzym „analytisch aus bekannten Bestandteilen bestehe, und dass seine eigentümlichen Wirkungen mehr einer bestimmten Mischung, einem bestimmten Zustande (Kolloidität) und vielleicht einer bestimmten zeitlichen Veränderlichkeit (Selbstabbau) verdanke“ und von den Versuchen, welche darauf ausgingen, „ein Ferment mit den Eigenschaften der Zymase künstlich zu bereiten“, ist hier abgesehen. Verf. hat sich mit Chr. Barthel¹⁾ der Aufgabe unterzogen, einen dieser Versuche zur „Urzeugung“ von Enzymen²⁾ eingehend nachzuprüfen; dabei hatte sich die von Schlatter³⁾ behauptete Milchsäuregärung der Glucose durch Peptone als das Ergebnis einer starken bakteriellen Infektion erwiesen. Es wurde im Anschluss an unsere Kontrollversuche auch der Wunsch ausgesprochen, dass auch andere Autoren⁴⁾, welche sich im gleichen Sinne wie Schlatter geäußert hatten, ihre Arbeiten einer genauen Nachprüfung unterwerfen möchten. Wenn eine solche Prüfung nicht von allen Seiten veröffentlicht wurde, so wird doch die Tendenz, die in Schlatters Arbeit zum Ausdruck kam, nur mehr von ganz vereinzelt Autoren weiter verfolgt.

Über die Art und Weise, wie Organe, Säfte und einzelne Zellen höherer Tiere und Pflanzen auf die Zufuhr von Substraten oder auf andere äussere Einflüsse durch die Bildung von Enzymen reagieren, ist noch kaum etwas Allgemeines bekannt⁵⁾. Die Ausbildung von Enzymen in wachsenden tierischen und pflanzlichen Organen⁶⁾ wird im III. Teil des Buches behandelt werden.

¹⁾ Barthel und Euler, H. 128, 257; 1923.

²⁾ Willstätter, Chem. Ber. 55, 3601; 1922.

³⁾ Schlatter, Biochem. Zs 131, 362; 1922. Siehe auch Acklin, Biochem. Zs 139; 1923.

⁴⁾ Siehe die Literaturangaben in der erwähnten Arbeit von Barthel und Euler.

⁵⁾ Der Verlauf der Sekretion eines Enzyms (Pepsin) im Magen ist bekanntlich von Chigin und Lobassow untersucht worden, welche diesen Vorgang als einen monomolekularen beschreiben. Aus welchen chemischen Reaktionen sich derselbe zusammensetzt und in welchem Grad die Enzymbildung daran beteiligt ist, lässt sich einstweilen noch nicht sagen. Wir werden darauf in den Teilen II, 2 und III dieses Buches zurückkommen.

⁶⁾ Dahin gehören die wichtigen Ergebnisse Willstätters über Lipasen im keimenden Samen (H. 134, 161 und zwar 205). Über die Veränderung des Katalasegehaltes im Samen siehe A. Bach und Mitarbeiter, Biochem. Zs 134, 183; 1922 und 148, 476; 1924.

Sofern die Enzyymbildung eine Teilerscheinung der Anpassung ist, muss hier von ihrer Besprechung ebenso abgesehen werden, wie von der Behandlung anderer biologischer Erscheinungskomplexe, wie Fortpflanzung oder Absterben. Die Enzyymbildung bietet aber gleichzeitig auch einen Angriffspunkt für ein Problem der reinen Enzymchemie.

Wie schon im vorhergehenden Kapitel erwähnt, besitzen wir noch kein chemisches Analogon für die vermutlich eigenartige Bindung zwischen Enzym und Substrat, besonders keines, welches geeignet wäre, die zu vermutenden sterischen Beziehungen zwischen diesen beiden Reaktionskomponenten unserem Verständnis näher zu bringen.

An dieses Problem kann man von der chemischen Seite aus herangehen, indem man spezifische Bindung zwischen sterisch bekannten Atomgruppen aufsucht, man kann aber auch von der Arbeitshypothese ausgehen, dass das Material, welches spezifische Enzyymbildungen hervorruft, dem Enzym in bezug auf Konstitution oder Konfiguration in irgend einer Weise angepasst sein muss, so dass die Aufgabe besteht, besonders die letzten Vorstufen der Enzyymbildung aufzufinden.

Über die chemischen und physikalisch-chemischen Bedingungen der Enzyymbildung in Mikroorganismen ist etwa folgendes bekannt:

A. Die Abhängigkeit des Saccharasegehaltes der Hefe vom Zucker- und vom N-Gehalt der Nährlösung. Steigerung des Enzymgehaltes.

Im Jahre 1882 machte Wortmann¹⁾ die Beobachtung, „dass den Bakterien die höchst merkwürdige Eigenschaft zukommt, nur dann ein stärkeumbildendes Ferment zu erzeugen, wenn ihnen ausser der Stärke keine andere benutzbare Kohlenstoffquelle zu Gebote steht“. In Verfolgung dieser Entdeckung hat dann Wortmann auch die Frage aufgeworfen, ob die Abscheidung von Saccharase aus Hefe in ähnlicher Weise von der Gegenwart von Rohrzucker abhängig ist. „Wir würden also“, schreibt er, „wenn wir Hefe in Traubenzuckerlösung kultivierten, kein invertierendes Ferment auffinden können, sondern nur dann, wenn wir statt des Traubenzuckers Rohrzucker anwenden würden.“

Die Prüfung nahm Wortmann in folgender Weise vor: „Es wurden 50 ccm einer 15%igen Rohrzuckerlösung einerseits und einer ebenso konzentrierten Lösung chemisch reinen Traubenzuckers andererseits in je ein Glaskölbchen gebracht; jeder Lösung so viel Aschenbestandteile zugefügt, dass die Konzentration 5% betrug, und hierauf einer jeden so präparierten Flüssigkeit zwei Tropfen einer vorher in Traubenzuckerlösung rein kultivierten Hefe zugesetzt. Die Kölbchen wurden dann gut verkorkt und in den Wärmekasten gebracht. Nach einigen Tagen, wenn in beiden Gefässen die Gärung in vollstem Gange befindlich war, wurde der Inhalt beider Gefässe filtriert und jedes Filtrat mit grossen Mengen absoluten Alkohols versetzt. Die hierdurch entstandenen Niederschläge wurden (jeder für sich natürlich) auf

¹⁾ Wortmann, H. 6, 287; 1882.

einem Filter gesammelt, mit Wasser aufgenommen und zu jeder Lösung gleiche Mengen einer verdünnten Rohrzuckerlösung gefügt. Diese beiden Rohrzuckerlösungen wurden ein bis zwei Tage konstant auf 40° erwärmt. Bei einer darauf vorgenommenen Prüfung mit Barfoedschem Reagens konnte immer in beiden Rohrzuckerlösungen das Vorhandensein von Traubenzucker nachgewiesen werden.“

Dieser Versuch sagt ja in quantitativer Hinsicht nichts, und hinsichtlich des qualitativen Schlusses kann der Einwand gemacht werden, dass nur ein sehr geringer Bruchteil der Hefensaccharase aus der frischen Hefe in Lösung geht, und dass dieser Bruchteil vermutlich gerade von den alten eingepflichten Zellen herrührt, somit über die Enzyymbildung keine bindende Auskunft gibt. Immerhin hat Wortmann trotz seines unzureichenden Versuchsmaterials das richtige Ergebnis getroffen, „dass die in Traubenzuckerlösung kultivierte Hefe ebensogut (wenn nicht sogar noch etwas mehr) Invertin abscheidet als die in Rohrzuckerlösung befindliche“. Anreicherung wird nicht erwähnt.

Wortmanns Ergebnis ist in den folgenden Jahren nicht weiter aufgenommen worden, und so verdankt man die erste eingehende Untersuchung auf diesem Gebiet A. Fernbach¹⁾, welcher speziell der Saccharase der Hefe viele Versuche gewidmet hat. Seine nahezu 35 Jahre alte Untersuchung gehört zweifellos sowohl der Anlage als der Durchführung nach zu den besten dieser älteren Forschungsperiode. Das Thema der Untersuchung nennt Fernbach „la formation de la sucrase“.

Was zunächst die Versuchsmethodik Fernbachs betrifft, so definiert dieser Autor die von ihm vorgeschlagene Wirkungseinheit folgendermassen: „Einheit der Saccharase ist eine solche Menge Saccharase, welche 0,02 g Zucker in 1 Stunde invertiert, und zwar bei einer Temperatur von 54—56° in Gegenwart eines Zusatzes von Essigsäure, welche die Inversion am meisten begünstigt. Hiernach geschah die quantitative Bestimmung der Saccharase in der Weise, dass dasjenige Volumen der enzymhaltigen Flüssigkeit aufgesucht wurde, welches die Einheit der Saccharase enthielt, also imstande war, unter den erwähnten Umständen 0,02 g Rohrzucker in einer Stunde zu invertieren.“

Wesentlich für die Beurteilung der Fernbachschen Resultate ist sein Verfahren, die in den Zellen enthaltene bzw. gebildete Saccharase zu bestimmen. Er hat dazu nicht die einfachste und zugleich genaueste Methode gewählt, nämlich die Inversion direkt durch die Hefezellen zu bewirken, sondern er hat das Enzym in einem ziemlich umständlichen Verfahren quantitativ aus den Zellen herauszuschaffen versucht. Prinzipiell wäre gegen diese Methode nichts einzuwenden, wenn durch die Autolyse keine Saccharase zerstört würde, und wenn tatsächlich die gesamte Enzymmenge aus dem Hefenrückstand in die Flüssigkeit überginge. Indessen hat Verf. mit Svanberg²⁾ in einer

¹⁾ Fernbach, Ann. Inst. Pasteur 4, 641; 1890.

²⁾ Euler und Svanberg, H. 106, 201; 1919.

eingehenden Prüfung der Fernbachschen Methode gefunden, dass dieselbe eine vollständige Extraktion der Saccharase nicht gewährleistet (l. c. S. 205 und ff.).

Folgender Versuch zeigt, dass bei Zimmertemperatur in der von Fernbach angewandten Versuchszeit durch Autolyse eine Verteilung des Enzyms zwischen Hefe und Saft eintritt, nach welcher etwa 10% der Saccharase aus der Hefe in die Lösung geht. Natürlich wird diese Ausbeute bei höherer Temperatur und bei mehrfachem Wechsel von Wasser wesentlich erhöht, aber auch bei 30° kann Hefe bei Fernbachs Versuchen nicht vollständig autolysiert gewesen sein, um so weniger, als Fernbach bemerkt, dass sich die Hefe gut abgesetzt hat.

Saccharase-Ausscheidung bei der Autolyse der Hefe.

Brauerei-Unterhefe.

Mit 0,60 g unvorbehandelter Hefe H wurden 60 ccm 8%iger Rohrzuckerlösung bei optimalem p_H und bei 17° invertiert:

Minuten	Drehung im 5-cm-Rohr	$k \cdot 10^4$
0	1,33	—
20	0,83	71
30	0,61	74
40	0,40	79
50	0,28	76
		<u>Mittel 75</u>

Hieraus berechnet sich für

$$1 \text{ g Hefe: } k \cdot 10^4 = 125.$$

Je 1 g Hefe wurde in 5 Erlenmeyer-Kolben eingewogen, mit 25 ccm destillierten Wassers aufgeschlemmt und mit 1 ccm Toluol versetzt.

Die Kolben wurden täglich mehrmals geschüttelt; täglich wurde ein Kolbeninhalt bis zur vollständigen Klarheit filtriert. Mit den Filtraten wurden die folgenden Inversionsversuche (60 ccm 8%ige Rohrzuckerlösung, 0,5% PO_4) bei Zimmertemperatur angestellt.

Dauer der Autolyse Tage	$k \cdot 10^4$ Mittel
1	—
2	8,1
3	10,1
4	10,7 korr. 12,4
5	13,0

Wir geben folgende Zusammenstellung obiger Konstanten:

Total	Saccharase	
	in Lösung	nach Tagen
125	8,1	2
	2,0	3
	2,4	4
	0,6	5
	<u>13,0 = 10,4% der Gesamtmenge.</u>	

Ein ganz ähnliches Ergebnis wurde bei den Versuchen von Euler und Svanberg mit einer Brennerei-Oberhefe erhalten.

Eine Berechnung hat uns gezeigt, dass das Zahlenmaterial der Fernbachschen Arbeit unter der erheblichen Unsicherheit der Methodik leidet, und dass deshalb die Verwertungsmöglichkeiten zu quantitativen Schlüssen gering sind.

Trotzdem soll hervorgehoben werden, dass Wortmann und Fernbach sich als die ersten in ein Gebiet gewagt haben, dessen Bearbeitung bei dem damaligen Stand der Enzymologie und der chemischen Dynamik grosse Schwierigkeiten bot und dass es ihnen gelungen ist, mit ihren unzureichenden Mitteln zu Schlüssen zu gelangen, welche später exakt bestätigt werden konnten.

Unter den systematischen Arbeiten über Enzyymbildung ist ferner diejenige von F. A. F. C. Went¹⁾ über den Einfluss der Nahrung auf die Enzyymbildung durch *Monilia Sitophila* zu erwähnen. Went hat in dieser Arbeit 11 verschiedene Enzyme untersucht, am genauesten die Maltase.

Auch in dieser Arbeit vermissen wir (vgl. Euler-Svanberg, l. c. S. 212) vor allem die Festlegung des Enzymgehaltes bei einem definierten Normalzustand, welcher gestatten würde, die Enzyymbildung, also den Zuwachs der Enzymwirkung, zu bestimmen. Wir erfahren nicht, durch welche Zellenmengen (Zellenzahlen oder Gewichte) die in der Tabelle angegebenen Rotationsänderungen hervorgebracht worden sind, so dass die verhältnismässig starke Wirkung der Glucose nicht von einem vermehrten Enzymgehalt der Zellen herzurühren braucht, sondern seinen Grund darin haben kann, dass die Hefe sich in der glucosehaltigen Lösung schneller vermehrt hat.

Zusammenfassend muss also gesagt werden, dass die Arbeit wohl Beobachtungen enthält, welche zu weiteren Versuchen anregen, dagegen keine Messungen, aus welchen endgültige Schlüsse gezogen werden könnten.

Systematische Arbeiten über Saccharasebildung sind dann erst wieder 1910 im Laboratorium des Verf. aufgenommen worden²⁾. Einige bemerkenswerte Beiträge hat später Meisenheimer mit seinen Mitarbeitern geliefert³⁾.

Methodik: Die im Stockholmer Laboratorium quantitativ festgestellten Saccharasewirkungen wurden sämtlich in der Weise ermittelt, dass die zu prüfende Hefe bei Zimmertemperatur direkt mit einer Zuckerlösung aufgeschlemmt wurde, die durch Zusatz von KH_2PO_4 auf die für die Tätigkeit dieses Enzyms optimalen p_{H} -Bedingungen gebracht worden war. Von der Aufschlemmung der Hefe in diesem Reaktionsgemisch wurden von Zeit zu Zeit Proben in ein gleiches Volumen 1%ige Sodalösung hineinpipettiert. In dieser Sodalösung, wo die Sprossverbände der Hefe leicht auseinander-

¹⁾ Went, *Jahrb. wiss. Bot.* 36, 611; 1901.

²⁾ Euler und B. af Ugglas, *Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi*, Bd. 3, Nr. 34 (1910). Euler und Johansson, *H.* 76, 388; 78, 246 (1912) und 84, 97 (1913). — Euler und Herm. Meyer, *H.* 79, 274 (1912). — Euler und Cramér, *H.* 88, 430 und 89, 272 (1914) sowie *Biochem. Zs* 58, 467 und 67, 203 (1914). — Euler, *Biochem. Zs* 85, 406 (1918).

³⁾ Meisenheimer, Gambarjan und Semper, *Biochem. Zs* 54, 108 und 122 (1913) und 67, 364 (1914).

fallen, wurden die Hefezellen in der Thoma-Zeisschen Zählkammer direkt unter dem Mikroskop gezählt, und zwar wurden so viele Parallelplatten gerechnet, bis eine Genauigkeit von etwa 4% erreicht worden war. Die Proben wurden sodann bis zur Klarheit filtriert und im 5-cm-Rohr polarisiert.

Definition des Inversionsvermögens lebender Zellen.

Es war durch Versuche festgestellt worden, dass der relative Saccharasegehalt der Hefen ermittelt werden kann, indem man die frischen Zellen direkt oder — bei längerer Versuchsdauer — unter Zusatz eines Protoplasmagiftes in einer Rohrzuckerlösung aufschlemmt und für die eintretende Inversion den Koeffizienten

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

bestimmt. Bei gegebener Temperatur und Acidität ist derselbe konstant, und die Inversionsgeschwindigkeit ist, wie Euler und Kullberg angegeben haben, proportional der Hefenmenge bzw. der Zellenzahl, so dass für eine gegebene Hefenkultur unter den gleichen Bedingungen

$$\frac{k}{\text{Zellenzahl}}$$

konstant gesetzt werden kann¹⁾. Innerhalb gewisser Grenzen ist dieser Quotient umgekehrt proportional dem Rohrzuckergehalt der Lösung. Vgl. auch S. 17. Es wird dann das Inversionsvermögen, Inv., der Hefe angegeben durch den Ausdruck:

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

Innerhalb der Grenzen:

$$\left. \begin{array}{l} 0,4 - 2 \text{ g Hefe (Trocken-Gew. ca. 30\%)} \\ 8 - 16 \text{ g Rohrzucker} \end{array} \right\} \begin{array}{l} \text{per 100 ccm} \\ \text{Lösung} \end{array}$$

ist diese Grösse wenig abhängig von den Mengen Hefe und Rohrzucker, und ich schlage vor, bei ähnlichen Bestimmungen diese Mengen per 100 ccm als Normalbedingungen zu wählen²⁾. Sollte sich später ergeben, dass die Inversionsfähigkeit lebender Zellen noch genauer reproduziert werden kann, so würde man noch engere Grenzen der Zuckerkonzentration zu wählen haben.

Die Konstanz³⁾ der Inversionsfähigkeit zweier Hefen während 12 bzw. 6 Jahren.

Die durch die Unterhefe H hervorgerufene Inversion haben Verf. und Mitarbeiter seit 1911, diejenige der Oberhefe SB seit 1917 wiederholt quanti-

¹⁾ Euler und Cramér, H. 88, 437; 1913.

²⁾ Bei gegebener Zellenzahl ist $k \cdot g \text{ Zucker}$ zwischen den Konzentrationen 16% und 12% ganz konstant, mit abnehmender Zuckermenge nimmt das Produkt indessen etwas zu.

³⁾ Es muss hier hervorgehoben werden, dass von der Konstanz einer Enzymwirkung in lebenden Zellen von Mikroorganismen nur insofern gesprochen werden kann, als diese Zellen die gleiche oder annähernd gleiche Vorgeschichte besitzen, besonders unter vergleichbaren Kulturbedingungen, Zusammensetzung der Nährlösung, Temperatur, Acidität gewachsen sind.

tativ gemessen, und die Messungen sind in zwei Tabellen von Euler und Svanberg (l. c. S. 217) zusammengestellt.

Die Stockholmer Unterhefe H zeigte im Verlauf von 12 Jahren eine sehr bemerkenswerte Konstanz. Für die Temperatur 17° und die optimale Acidität $p_H = 4,5$ können die Mittelwerte angenommen werden:

$$\text{Inv.} = \frac{k \cdot g \text{ Zucker}}{\text{Zellenzahl}} = (10 \pm 2) \cdot 10^{-12} \quad \text{If} = \frac{k \cdot g \text{ Zucker}}{g \text{ Trockensubst.}} = 15 \cdot 10^{-2}.$$

Keinesfalls würde man früher vorausgesetzt haben, dass sich ein „normaler“ Enzymgehalt eines Stammes von Mikroorganismen mit solcher Genauigkeit angeben lässt.

Auch für die Stockholmer Oberhefen SB I und SB II wurde eine ähnliche Konstanz gefunden. Als Mittelwert für 17° und optimale Acidität wurde gefunden:

$$\text{Inv.} = (3,0 \pm 0,5) \cdot 10^{-12} \quad \text{If} = 9 \cdot 10^{-2}.$$

Ferner ist für einige niedere Pilze der Saccharasegehalt ermittelt worden, und zwar zunächst für *Aspergillus niger*¹⁾, wo schon Messungen von Fernbach²⁾ und Duclaux vorlagen.

Für einen unter normalen Bedingungen gewachsenen Stamm (Nährlösung + 10% Rohrzucker; Anfangsacidität $p_H = 7,0$ und Selbstsäuerung; Alter 5 Tage; Wachstumstemperatur 30°) wurde die Inversionsfähigkeit

$$\text{If} = \frac{k \times g \text{ Zucker}}{g \text{ Trockensubst.}} = 0,32 \cdot 10^{-2}$$

festgestellt. Dieser Wert beträgt (siehe oben)

$$\text{für Unterhefe H } 15 \cdot 10^{-2}, \quad \text{für Oberhefe SB II } 9 \cdot 10^{-2}$$

Demgemäss war die Inversionsfähigkeit des untersuchten *Aspergillus niger*-Stammes $\frac{1}{50}$ derjenigen der Unterhefe H und etwa $\frac{1}{30}$ derjenigen der Oberhefe SB II.

Der Einfluss des Nährsubstrates macht sich hier stark geltend; so zeigte ein auf Stärkelösung mit Peptonzusatz gewachsener Pilz eine etwa 30% höhere Saccharasewirkung als ein Pilz, welcher unter sonst analogen Verhältnissen gleich lang ohne Peptonzusatz gewachsen war. Eine orientierende Untersuchung mit E. Borgenstam³⁾ an *Penicillium glaucum* behandelt den Einfluss des Alters der Kultur, der Acidität usw.⁴⁾

Einfluss der Temperatur auf die Saccharasebildung.

Nachdem Lange 1907 orientierende Versuche über die Veränderungen des Enzymbestandes der Hefe unter dem Einfluss verschiedener Temperaturen

¹⁾ Euler und Asarnoj, *Fermentf.* 3, 318; 1920.

²⁾ Fernbach, *Ann. Inst. Pasteur*, 4, 1; 1890.

³⁾ Euler und Borgenstam, *Fermentf.* 4, 242; 1920. — Siehe auch Euler, Josephson und Söderling, *H.* 139, 1; 1924. — Josephson, *H.* 138, 144; 1924.

⁴⁾ Interessante Beobachtungen über einen + und - Stamm von *Mucor mucedo* verdankt man Kostytschew und Eliasberg (*H.* 118, 233; 1922).

angestellt hat, wurden die ersten zahlenmässigen Ergebnisse über diese Beziehung von Euler und Cramér gewonnen. Bald darauf haben Meisenheimer und Semper Versuche über den gleichen Gegenstand veröffentlicht und schliesslich haben dann Verf. und Svanberg (l. c.) diesen Temperatureinfluss nochmals eingehend studiert. Hierbei bestätigte sich die schon von Euler und Cramér vermutete Beziehung zwischen Enzymbildung und Zellenzuwachs, und es zeigte sich, dass ein Optimum der Saccharasebildung nahe bei $27,5^{\circ}$ existiert, während für die gleiche Hefe das Optimum des Zellenzuwachses nahe bei $23,5^{\circ}$ gefunden worden war. Von etwa 35° an zeigte die untersuchte Hefe keine Saccharasebildung mehr.

Die Abhängigkeit der Saccharasebildung von der Acidität.

Bei den eben mitgeteilten Versuchen über den Temperatureinfluss befand sich die Hefe in Lösungen, deren Acidität $p_H = 5,9-6,0$ betrug.

Bei der starken Abhängigkeit sowohl der Hefegärung und Inversion als auch des Zuwachses von der Acidität war zu erwarten, dass auch die Saccharasebildung durch die Konzentration der freien H^+ - und HO^- -Ionen nicht unwesentlich beeinflusst wird. Auf diesen Umstand hat auch bereits Fernbach auf Grund eigener Versuche aufmerksam gemacht. Die Methodik, welche damals zur Verfügung stand, hat allerdings eine genauere Feststellung der geltenden Beziehung nicht gestattet.

In der zitierten Arbeit des Verf. mit Svanberg wurde diese Beziehung mit der Sörensen-Michaelisschen Methodik eingehender untersucht. Es ergab sich ein recht ausgeprägtes Maximum bei $p_H = 5-6$ (vgl. die Figuren 4 und 5 in der genannten Mitteilung). Besonders bemerkenswert ist noch folgender Umstand. Während im allgemeinen diejenigen Einflüsse, unter welchen eine Neubildung des Protoplasmas bzw. ein Zellenzuwachs eintritt, auch die Saccharasebildung bedingen, zeigte sich hier, dass auch bei Aciditäten, in welchen ein Zellenzuwachs nicht mehr stattfindet, die Inversionsgeschwindigkeit der Hefe noch um etwa 100% gesteigert werden kann. Bei $p_H = 6-7$ tritt noch eine kräftige Enzymbildung von etwa 90% der bei optimaler Acidität beobachteten ein. Bei höherer Acidität als $p_H = 2$ macht sich eine zeitliche Zerstörung der Saccharase geltend.

In diesem Zusammenhang mögen auch einige Untersuchungen¹⁾ erwähnt werden, welche angestellt wurden, um festzustellen, ob thermophile Hefen, welche an höhere Temperaturen angepasst sind, Enzyme von höherer Temperaturstabilität ausbilden, ob sich also durch Anpassung die Eigenschaften eines Enzyms verändern. Erstens muss betont werden, dass sich so grosse Unterschiede, wie sich nach älteren Literaturangaben hätten ver-

¹⁾ Euler und Laurin, H. 108, 64; 1919. — Biochem. Zs 97, 156; 1919 und 102, 258; 1920.

muten lassen, hinsichtlich der Saccharase nicht ergeben haben, wenn auch unzweifelhaft Differenzen vorhanden sind; zweitens ist nicht unwahrscheinlich, dass die veränderte Temperaturstabilität einer dem eigentlichen Enzym fremden Stoffgruppe zukommt und von Hemmungskörpern abhängt.

Zeitlicher Verlauf der Saccharasebildung.

Bringt man eine gewisse, nicht zu grosse Menge Hefe in eine zuckerhaltige Nährlösung der üblichen Zusammensetzung, so nimmt das Inversionsvermögen der Hefe, also der Wert $Inv.$, wie er S. 402 definiert wurde, mit der Zeit erheblich zu. Der Saccharasegehalt gelangt zu einem Maximum, und der Verlauf der Enzyymbildung lässt sich durch die Differentialformel darstellen:

$$\frac{dx}{dt} = k_{EB} (a-x),$$

d. h. in jeder Zeiteinheit ist die Zunahme der Enzymmenge pro Zelle proportional der Differenz zwischen der zur Zeit t vorhandenen Enzymmenge (x) und der im betreffenden System überhaupt erreichbaren (a), woraus sich für die Enzyymbildungskonstante k_{EB} der bekannte Ausdruck ergibt:

$$k_{EB} = \frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-x} = \frac{1}{t} \ln \frac{k_{max}}{k_t},$$

wenn wir mit k_{max} die schliesslich erreichte, maximale Inversionskonstante und mit k_t die Inversionskonstante zur Zeit t bezeichnen. Dazu muss aber erwähnt werden, dass die obige Formel überwiegend formeller Art ist, und dass noch festzustellen bleibt, in welcher Weise Gärungs- oder Assimilationsreaktionen den Enzyymbildungsverlauf beeinflussen.

Bei einer orientierenden Untersuchung von Euler und Johansson¹⁾ wurde für die Enzyymbildungskonstante k_{EB} der Wert 0,02 gefunden. Berechnet man mit diesem Wert die Inversionskonstanten k_t , so wird folgende Übereinstimmung zwischen den gefundenen und berechneten Inversionskonstanten erzielt:

Dauer der Vorbehandlung Stunden	$k \cdot 10^4$	
	gefunden	berechnet
0	24,5	24,5
4	48	38
20	74	76
24	76	81
44	94,5	98,7
71	102	106
∞	110	110

¹⁾ Euler und D. Johansson, H. 76, 388; 1912.

Überführt man die zum erstenmal auf ein solches Maximum gekommene Hefe zum zweitenmal in eine frische, der ersten gleichen Nährlösung, so tritt eine abermalige Vergrößerung des Enzymgehaltes ein, usw., wobei jedoch die absolute Zunahme des Enzymgehaltes immer kleiner wird.

Die Figur 49 b, welche einer anderen Untersuchung entnommen ist als die obige Tabelle, lässt den logarithmischen Verlauf der Enzymbildung weniger deutlich hervortreten als die Kurve, welche der obigen Tabelle ent-

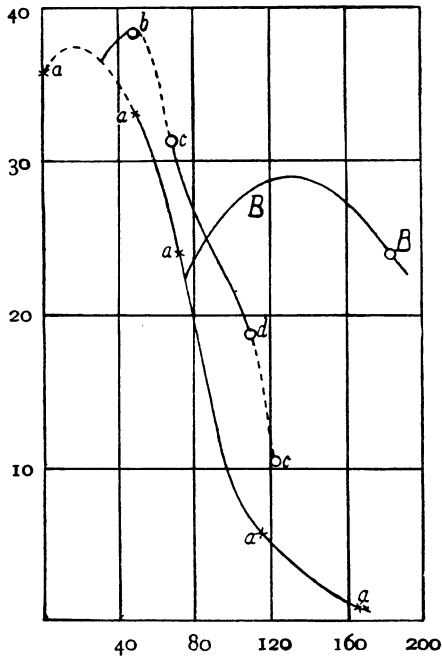


Fig. 49 a.

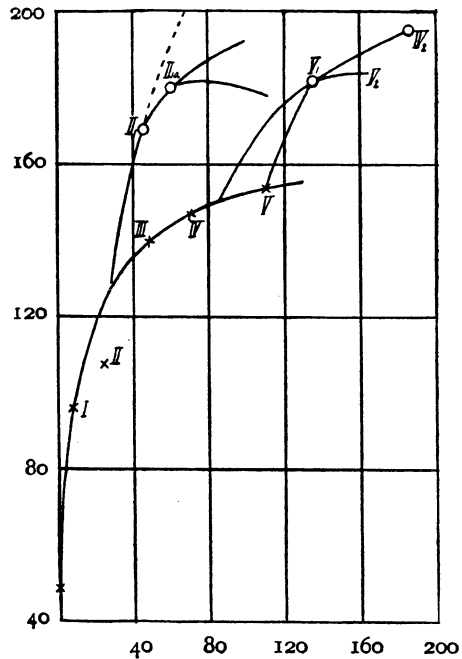


Fig. 49 b.

spricht (l. c. S. 394), aber sie zeigt die immer kleiner werdende Zunahme des absoluten Enzymgehaltes. Fig. 49 a zeigt den gleichzeitigen Verlauf der Gärkraft, welche in der Hefe nicht etwa zu-, sondern im Gegenteil stark abnahm¹⁾.

Die Grösse und Geschwindigkeit dieser Enzymbildung ist abhängig von der C- und N-Nahrung in der Nährlösung, so dass z. B. Mannit den Zucker nicht ersetzen kann²⁾.

Man könnte nun vielleicht einwenden, dass es sich bei diesen Versuchen nicht um die vermehrte Bildung des Enzyms selbst handelt, sondern um Aktivierung durch Hilfssubstanzen. Bei den Gärungsenzymen, wo bekanntlich Co-Enzyme mitwirken müssen, wäre dies wahrscheinlicher. Bei der Saccharase-wirkung sind aber keine solchen Aktivatoren bekannt³⁾.

¹⁾ Euler und D. Johansson, H. 84, 97; 1913. — Siehe auch Hägglund, Dissertation, Stockholm 1914.

²⁾ Euler und Cramér, H. 88, 430; 1913.

³⁾ Vgl. E. W. Miller, Biol. Chem. 48, 329; 1921.

B. Entwicklung der Galaktose-Gärung in der Hefe.

Gewöhnliche Kulturhefe hat in der Regel ein ausserordentlich kleines Vergärungsvermögen für Galaktose, zum Teil vielleicht deshalb, weil in der Hefe die Enzyme, welche die Galaktose in die gärfähige isomere Form umwandeln, nur in sehr geringem Grade ausgebildet sind¹⁾. Erst wenn die Hefe auf dieses Gärsubstrat längere Zeit angewiesen ist, bildet sie die erforderliche Enzymwirkung in erheblicherem Grade aus, so dass die Hefe schliesslich Galaktose etwa ebensgut vergärt wie Traubenzucker.

Dubourg²⁾ machte 1899 die Angabe, dass solche Hefen, welche keine Fähigkeit besitzen, Rohrzucker zu invertieren und sich deswegen weder in Lösungen dieses Zuckers entwickeln, noch denselben vergären können, diese Fähigkeit erlangen, d. h. Saccharase bilden, wenn man sie mit Lösungen, welche gleiche Teile Glucose und Rohrzucker enthalten, vorbehandelt, d. h. sie in einer solchen Lösung gären lässt. Dubourg teilte dann weiter mit, dass er in ähnlichen Versuchen die Vergärung von Galaktose hervorrufen konnte.

Diese Arbeit, welche Duclaux in seinem „Traité de Microbiologie“ (III) 1900 ausführlich referierte, wurde bald darauf durch A. Klöcker³⁾ nachgeprüft, und zwar mit vier Hefenarten. Er fasste seine Resultate folgendermassen zusammen:

„Dubourgs Angabe, dass Hefe, welche ein Enzym nicht enthält, zur Hervorbringung dieses Enzyms durch Gewöhnung an das entsprechende Substrat veranlasst werden kann, ist unrichtig. Folglich ist auch der von Duclaux daraus gezogene Schluss, dass das Verhalten der Hefen zu Zuckerarten nicht zur Charakterisierung der Arten benutzt werden kann, nicht richtig.“

Gleichzeitig mit Dubourg hat Dienert⁴⁾ ähnliche Versuche, besonders mit Galaktose angestellt. Er kam zu dem Ergebnis, dass die Resultate, welche Dubourg in bezug auf die Biosen erhalten hatte, auch in bezug auf Galaktose gelten. Diese Versuche hat Verf. einer Kritik unterzogen⁵⁾, auf welche hier nur verwiesen zu werden braucht.

E. F. Armstrong⁶⁾ hat 1905 zahlreiche Hefen auf ihre Fähigkeit zur Galaktosevergärung untersucht.

Nachdem Slator⁷⁾ in zuverlässiger Weise konstatiert hatte, dass Hefen an die Vergärung von Galaktosen gewöhnt werden können, stellten Harden und Norris⁸⁾ in einer interessanten Mitteilung fest, dass der aus acclimatisierter Hefe gewonnene Presssaft ebenfalls die Fähigkeit besitzt, die Galaktose zu vergären.

Mit D. Johansson hat Verf. untersucht (l. c.), nach welchem Zeitgesetz

¹⁾ Siehe hierzu die Bemerkung von Euler und Johansson (l. c. S. 261): „Wir bezeichnen also hier einstweilen der Kürze wegen als Galaktase denjenigen enzymatischen Bestandteil der Hefe, welcher die Vergärung der Galaktose ermöglicht.“

²⁾ Dubourg, C. r. 128, 440; 1899.

³⁾ Klöcker, Medd. fra Carlsberg Labor. 5, 55; 1900.

⁴⁾ Dienert, Ann. Inst. Pasteur 14, 139; 1900.

⁵⁾ Euler und D. Johansson, H. 78, 246; 1912.

⁶⁾ E. F. Armstrong, Proc. R. Soc. B. 76, 600; 1905.

⁷⁾ Slator, Jl Chem. Soc. 93, 217; 1908.

⁸⁾ Harden und Norris, Proc. Roy. Soc. 82, 645; 1910.

eine Hefe die Fähigkeit erlangt, bei Vorbehandlung mit galaktosehaltigen Nährlösungen diese Hexose zu vergären.

Zur Anpassung wurde die Hefe in folgender Weise behandelt: Etwa 2 g der gewaschenen und abgepressten Hefe wurden in 200 ccm sterilisierter Nährlösung eingetragen, welche, abgesehen von den üblichen Nährsalzen, noch 4 g Asparagin und 20 g Zucker enthielt.

In dieser Lösung wurde die Hefe, deren Vergärungsfähigkeit gegenüber Glucose und Galaktose geprüft war, bei Zimmertemperatur unter zeitweiligem Umschütteln sich selbst überlassen. Nach einer gewissen Zeit wurde die Nährlösung von der Hefe abdekantiert, diese selbst gewaschen und auf Ton getrocknet und nach Bestimmung des Wassergehaltes zur Messung der Gärkraft verwendet.

Die Fig. 50 gibt die Gärkraft der Hefe gegenüber Galaktose nach verschiedenen Zeiten der Vorbehandlung wieder. Als Mass derselben wurde das in einer gewissen Zeit (6 Minuten) entwickelte Volumen CO_2 gewählt. Aus der Figur 50 geht hervor, dass die Geschwindigkeit, mit welcher eine Hefe die Fähigkeit der Galaktosever-

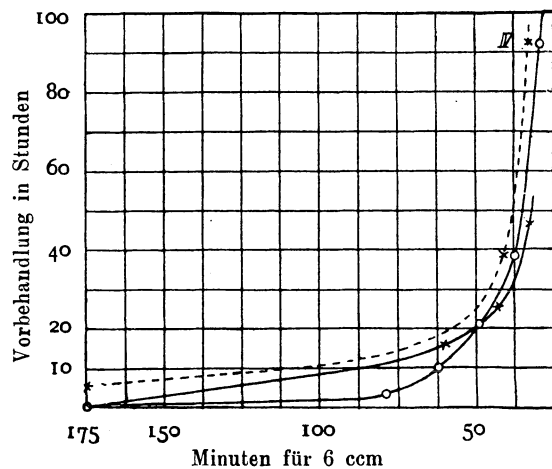


Fig. 50.

gärung ausbildet, eine unter gegebenen Umständen reproduzierbare und messbare Grösse ist. In bezug auf diese Fähigkeit erreicht die Hefe nach einiger Zeit einen Grenzwert, welcher bei weiterer Kultur im gleichen Medium nicht mehr überschritten wird. Dieser Verlauf wird auch durch neue Versuche von Abderhalden¹⁾ bestätigt.

Die Geschwindigkeit der Enzymbildung scheint anfangs verzögert zu sein; Verf. und Johansson nahmen an, dass in dieser Periode eine Hemmung beseitigt oder eine katalysierende Substanz gebildet wird. Ob ein solcher Katalysator, der auch von Abderhalden²⁾ angenommen wird, dem Gärungs-Co-Enzym von Harden und Young nahe steht, konnten Euler und Laurin³⁾ nicht entscheiden; wie R. Nilsson später gezeigt hat, ist dies nicht der Fall.

Was die Deutung dieser Anpassung betrifft, so hat Verf. das Auftreten eines vorläufig als „Galaktase“ bezeichneten Teilenzym der Galaktosegärung angenommen. Dazu wurde bemerkt, dass es sich „möglicherweise nicht um eine Neubildung, sondern um eine Konstitutions- oder Konfigurationsänderung einer Komponente des Zymasekomplexes handelt, etwa in derselben Art wie

¹⁾ Abderhalden, Fermentf. 8, 42: 1924.

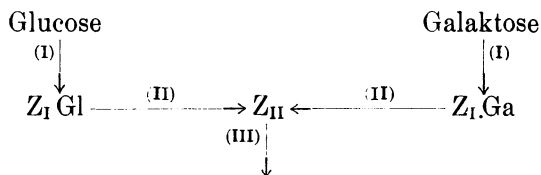
²⁾ Abderhalden und Schaumann, Fermentforsch. 2, 120; 1918.

³⁾ Euler und Laurin, Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi. Bd. 7, Nr. 28; 1920.

Umlagerungen, welche nach Lobry de Bruyn zu einem Gleichgewicht zwischen Glucose und Mannose führen.“ Eingehendere Vermutungen sind über diese Komponente des Zymasekomplexes noch nicht geäußert worden.

Drückt man das Verhältnis der Gärfähigkeit für Galaktose zu jener für Glucose durch den Quotienten aus den Halbgärzeiten oder durch das reziproke Verhältnis der entwickelten CO_2 -Mengen im Zeitpunkte halber Gärung von Glucose aus¹⁾, so kann der im Verlaufe der Anpassung erreichte Wert 100:100 zugunsten der Galaktose überschritten werden. Bei den Versuchen von Slator war das Verhältnis der Halbgärzeiten etwa 65:100, bei Harden und Norris 84:100, während Willstätter und Sobotka²⁾ 75:100 fanden; dabei verdient ihre Bemerkung: „freilich war zugleich die absolute Gärkraft der Hefe zurückgegangen“ Beachtung.

Willstätter und Sobotka haben nun auch Gärungen an Gemischen von Glucose und Galaktose angestellt. Dieselben ergaben, dass sich das Verhältnis der Gärungsgeschwindigkeiten im Gemisch wesentlich zugunsten schnellerer Glucosegärung von dem Geschwindigkeitsverhältnis der Einzelgärungen unterscheidet. Die Erscheinung, dass eine an Galaktose gut gewöhnte Hefe Galaktose allein schneller als Glucose allein vergärt, in einem Gemisch beider Zucker dagegen die Glucose vorzieht, versuchen Willstätter und Sobotka durch folgendes Schema zu erklären:



Ich zitiere die genannten Forscher:

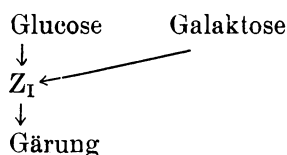
„1. Bei den Einzelgärungen seien die Reaktionen (I) die kontrollierenden, die langsamsten Reaktionen. Durch die Anpassung ist die Hefe in den Stand gesetzt worden, diese Reaktion mit Galaktose schneller als mit Glucose vorzunehmen; infolgedessen raschere Galaktosegärung.

2. Im Gemisch befinden sich beide Substrate in nur halb so grosser Einzelkonzentration. Dadurch ist die in doppelter Konzentration zu bewältigende Reaktion (III) zur limitierenden geworden, und sie hängt von der Konzentration des gemeinsamen Zwischenproduktes Z_{II} ab. Dieses entsteht aus den Zwischenkörpern $\text{Z}_I \text{ Gl}$ und $\text{Z}_I \text{ Ga}$ mit verschiedener, für das Glucosederivat grösserer Geschwindigkeit. Die Glucose wird also schneller gären, wenn auch die mit (I) bezeichneten Vorgänge im Galaktosesystem rascher erfolgen.“

¹⁾ Willstätter und Steibelt, H. 115, 211; 1921.

²⁾ Willstätter und Sobotka, H. 123, 176; 1922.

Das Schema



(welches von den beiden l. c. mitgeteilten der Auffassung des Verf. am nächsten kommt) soll den oben beschriebenen Effekt unerklärt lassen.

Willstätters Auffassung wird sich vielleicht näher präzisieren lassen, wenn über die Zwischenprodukte Z_I und Z_{II} Genaueres bekannt wird.

Nicht ganz im gleichen Sinne wie Verf. sprechen Söhngen und Coolhaas¹⁾ neuerdings von „Galaktosezymase“, die bei der Anpassung der Hefe an Galaktose gebildet wird. Sie soll widerstandsfähiger sein als die „Zymase“ der Glucosegärung.

In Gemeinschaft mit R. Nilsson hat Verf. eine neue Untersuchung über Hefegärung mit Galaktose ausgeführt²⁾. Dabei hat sich eine weitere Analogie zwischen Glucose- und Galaktosegärung ergeben. Auch letztere wird durch den Biokatalysator $Z^3)$ stark beschleunigt, nicht aber durch gereinigte Co-Zymase. Wesentlich scheint für die Auffassung der Galaktosegärung der Umstand, dass die Vorbehandlung, die sog. „Anpassung“ der Hefe an diesen Zucker in der gleichen Weise und in etwa den gleichen Zeiten mit alkoholbehandelter Trockenhefe durchgeführt werden kann, wie mit frischer Hefe. Damit ist gezeigt, dass die „Anpassung“ ein von der Fortpflanzungsfähigkeit der Zellen unabhängiger Vorgang ist.

Auch der Rückgang einer an Galaktose gewöhnten Hefe auf ihre normale Gärwirkung ist untersucht worden⁴⁾. Aus dem zeitlichen Verlauf der Abnahme der Galaktase, auf welchen hier nicht näher eingegangen werden kann, wurde der Schluss gezogen, dass die an Galaktose angepasste Hefe gleichzeitig zwei beschleunigende Stoffe verliert, wenn ihr die Galaktose aus der Nährlösung entzogen wird. Zwischen dem Galaktose-Zymase-System der Hefe und dem typischen Gärungsenzym der Milchsäurebakterien bestehen nahe Beziehungen⁵⁾.

Zahlreiche Beobachtungen über den Zusammenhang der Ureasewirkung von Bakterien und dem Nährsubstrat hat M. Jacoby⁶⁾ mitgeteilt.

Die Hervorrufung der Amylasebildung durch das Nährsubstrat ist schon vor langer Zeit beobachtet worden. Wortmann hatte schon 1882 behauptet, dass Bakterien nur dann stärkelösende Enzyme bilden, wenn sie hinsichtlich ihrer Kohlenstoffnahrung auf die Stärke als einzige Kohlenstoff-

¹⁾ Söhngen und Coolhaas, *Jl of bact.* 9, 131; 1924.

²⁾ Euler und R. Nilsson, H., im Druck.

³⁾ Euler und Swartz, H. 140, 146; 1924.

⁴⁾ Euler, *Zs f. Elektroch.* 24, 178; 1918.

⁵⁾ Siehe auch Virtanen, H. 134, 300 und 138, 136; 1924.

⁶⁾ Jacoby, *Biochem. Zs* 79, 35; 1917. — 80, 357; 1917. — 81, 332; 1917. — 83, 74; 1917.

quelle angewiesen sind. Was *Aspergillus niger* betrifft, so trifft etwas Ähnliches nicht zu, zweifellos aber wird die Amylasebildung durch Stärkezusatz zur Nährlösung befördert. Es wurden z. B. im hiesigen Laboratorium¹⁾ bei Anwendung von 3 g frischem Mycel (Trockengew. 12–20%; $p_H = 6,5-7$; Dauer 2 Stunden; Temperatur 40°) folgende Resultate erhalten:

Kultur, gewachsen in	1 g Trockenpilz liefert mg Glucose
10% Rohrzucker	14,9
10% Rohrzucker + 1% Pepton	41
2% Rohrzucker	17,6
2% Rohrzucker + 1% Pepton	43
2% Stärke	91
2% Stärke + 1% Pepton	146

Sjöberg²⁾ hat die im hiesigen Laboratorium an Mikroorganismen ausgearbeiteten Methodik zum Studium der Enzyymbildung auf Grünalgen und Organe höherer Pflanzen übertragen.

Die Frage, ob und unter welchen Umständen es möglich ist, durch chemische oder physikalische Einflüsse in Zellen solche Enzyme zu erzeugen, welche sonst den betreffenden Mikroorganismen fremd sind, ist noch immer offen; sie ist auch schwer direkt zu entscheiden, da ja immer Anlagen zum betreffenden Enzym vorhanden gewesen sein können, so dass eine Neubildung dann nicht vorläge. Verfasser hat, von der Überlegung ausgehend, dass eine starke und auch reproduzierbare Beeinflussung durch Symbiosen erzielt werden muss, in einigen Fällen die Bildung von Amylase in solchen Mikroorganismen gesucht und gefunden, in welchen — mit der gleichen Methode — sich vorher keine Anzeichen für die Gegenwart dieses Enzyms hatten nachweisen lassen. Der einzige genau untersuchte Fall hat einstweilen vorwiegend spezielles Interesse. Das Studium der enzymatischen Veränderungen bei der Anpassung von Mikroorganismen an Nährsubstrate und andere äussere Bedingungen hat aber noch das allgemeinere Ziel, an Mikroorganismen den Verlauf von Eigenschaftsänderungen quantitativ kennen zu lernen, ferner die den Anpassungen zugrunde liegenden chemischen Reaktionen zu ermitteln und dadurch zur Klärung der Begriffe im Gebiet der Entwicklungs- und Anpassungslehre beizutragen³⁾.

¹⁾ Euler und Borgenstam, *Fermentf.* 4, 242; 1921.

²⁾ Sjöberg, *Fermentf.* 4, 97; 1920. — *Biochem. Zs* 133, 218; 1922.

³⁾ Euler, *Chem. Ber.* 55, 3583; 1922.

Autoren-Verzeichnis.

- Abbot** 23.
Abderhalden 73, 96, 102, 116, 139, 161, 192, 194, 206, 232, 276, 277, 300, 324, 346, 349, 366, 371, 372, 383—389, 391.
Abegg 85.
Abelous 321.
Aberson 277.
Achalme 382, 383.
Acklin 396.
Adler 70.
Agulhon 183, 286.
Airila 207, 212.
Albert 10.
Albrecht, F. 392.
Alexander, M. E. 389.
Anagnostu 286.
Angern 76.
Arnstein 334.
Armstrong, E. F. 139, 152, 154, 175, 299, 313, 314, 347, 354, 356, 406.
Armstrong, H. E. 139, 199, 217, 314, 345, 376.
Arnheim 63, 72, 271.
Aron 382.
Arrhenius 19, 20, 24, 43, 44, 46, 49, 55, 90, 100, 132, 140, 162—165, 182, 245, 249, 250, 278, 393.
Artom, C. 271.
Asarnoj 402.
Aschan 358.
Ascher 193, 199, 206, 216.
Ascoli 383, 392.
Aso 204, 206.
Atwater 331.
Aubry 311, 315, 317, 320.
Auld 275, 277.
Avery 71.
Avogadro 84.
Bach, A. 139, 195, 267, 285, 396.
Bach, E. 217.
Bachmann 13.
Baldwin 70, 71.
Bang 190.
Barendrecht 152, 338, 339, 354.
Barkla 290.
Barnard 288.
Baron 331.
Barthel 260, 396.
Bashford 393.
Batelli 267, 395.
Bau 183.
Baumgarten 186.
Bayliss 82, 114, 139, 154, 219, 256, 277, 299, 314, 323.
Bearn 226, 259.
Bechhold 98, 114—116, 125.
Becker, Johanna 368.
Beckmann 84, 85.
Bednarski 266.
Beisser 226.
Beitzke 391, 392.
Benjamin 199, 217.
Berczeller 216.
Bergell 291, 292, 347, 371, 392, 393.
Berger 187.
v. Bergmann, G. 384.
Bergmann, M. 314, 344.
Bering 290.
Berkeley 83.
Bernton 200.
Bertarelli 391.
Berthelot, D. 287.
Berthelot, M. 326, 327, 330.
Bertrand, G. 194, 281, 345, 369.
Bezzola 383.
Bickel 265, 292, 293.
Biddle 323.
Biedermann 190, 226, 260, 267, 268, 270.
Bien 40, 70.
Bierry 188, 189, 191, 347.
Biltz, W. 123.
Birkenbach 187.
Bjerrum 20, 21, 23, 24, 33, 42, 45, 53, 134.
Blagowestschenski 319, 382.
Blix 232, 268.
Bloch 207.
Blood, A. F. 205.
Blunt 284.
Bodenstein 78, 139, 140, 296, 297, 313.
Böhne 191.
Bokorny 183, 204.
Boldyreff 209.
Bolin, I. 115.
Bordet 192, 394.
Borgenstam 269, 402, 408.
Born 43.
Bosshard 372.
Bouma 265.
Bournot 314.
Bourquelot 5, 238, 305—308, 311, 315—317, 319, 320, 343, 369.
Brahm 348.
Brandting 252, 277.
Braun 392.
Brauns, Fr. 359.
Bredig 24, 26, 37, 171, 362, 377.
Brefeld 186.
Bridel 238, 315, 317, 320.
Brieger 383.
Brockmeyer 208.
Brode 171.
Brossa 124.

- Brown, A. 139, 160.
 Brown, H. 139.
 Brown, R. 79, 80.
 Brown, Th. R. 292.
 Browning 202, 288.
 Brownlee 247.
 v. Brücke 12, 106, 114.
 Brückner 360.
 Bruegel 290.
 Brugsch 390.
 de Bruyn 252.
 Buchner, E. 7, 10, 15, 114,
 192, 199, 206, 213, 216, 228,
 231, 266, 332, 333.
 Buchner, H. 7, 10.
 Buckmaster 222.
 Buglia 96, 210.
 Burge 199, 288.
 Burian 166, 199.
 Bywaters 207.

 Caemmerer 192, 194, 206, 276.
 v. Calcar 14.
 Caldwell 175, 208, 258, 274,
 363.
 Camus 207, 275, 382.
 Cassel 287.
 Cathcart 382.
 Cesana 269.
 Chain 322.
 Charrin 382.
 Chochoard 286.
 Chaudun 139.
 Chick, H. 43, 46—48, 251,
 261, 262.
 Chigin 393.
 Chittenden 185.
 Chodat 275, 300.
 Chodscharjew 115.
 Christen 289.
 Christiansen, J. A. 83, 338.
 Chrsaszcz 268, 269.
 Clark, E. D. 239.
 Clark, W. M. 3, 51, 60, 62.
 Clifford 273.
 Cobliner 384.
 Coehn 41.
 Coggi, E. 382.
 Cohen, E. 83, 91.
 Cohnheim, J. 12.
 Cohnheim, O. 225.
 Cole 188, 189.
 Colin 139.
 Commelin 83.

 Compton 281.
 Connstein 185.
 Conrad 360.
 Coolhaas 408.
 Courtauld 274.
 Cramér, H. 16, 17, 400, 401,
 403, 405.
 Cramer, W. 226, 259.
 Cremer 320.
 Csányi 71, 350.
 Cullen 160, 260, 277.
 Cummins 185.
 Curtius 348.
 Czapek 235.

Dakin H. D. 365, 366, 371,
 378, 390.
 Dale 390.
 Dalmer 318.
 van Dam 22, 26, 72, 265.
 Dambuvceanu 73.
 Danilewski 12, 321.
 Danner 25.
 Danysz 182, 227.
 Dastre 220.
 Dauwe 114.
 Davidsohn 26, 37—40, 61, 64,
 65, 69—72, 75, 135, 158,
 192, 257.
 Debye 20, 21, 43, 45.
 Dekhuyzen 85.
 Delezenne 194, 219, 269, 383.
 Derby 8, 29, 63, 72, 73.
 Dessauer 291.
 Dienert 406.
 Dietz 296, 297, 313.
 Döblin 384.
 Dörle 199, 217.
 Doerr 187.
 Donath 209.
 Donnan 82, 117—119.
 Dorn 290.
 Downes 284.
 Doyon 394.
 Dreyer 287, 292.
 Dubourg 405, 406.
 Duclaux 183, 185, 193, 206,
 402, 406.
 Dunbar 82.
 Duran 103.
 Dushman, S. 338.

Ebsen 162.
 Ebstein 221.

 van Eck 254, 260, 265.
 van Eckenstein, Alberda 370.
 Edelstein 292.
 Edie 267.
 Efront 188, 191, 192, 198,
 239, 251.
 Ege 110.
 Ehrenreich 12, 105—107.
 Ehrlich, F. 372.
 Eichwald 162.
 Einstein 5, 43, 79, 80, 91, 283.
 v. Eisler 392.
 Eliasberg 402.
 Emberg 71.
 Embden 191—194, 225, 228,
 232, 318, 320, 332, 336.
 Emmerling, O. 284, 313.
 Engler 169, 170.
 Ericson, G. 91.
 Erikson, E. 103, 113.
 Eriksson, Anselm 112.
 Erlenmeyer jr. 374.
 Ernström 70, 254—257, 259,
 260, 277.
 Esson 167.
 Eucken 103.
 v. Euler-af Ugglas 9, 10, 113, 114,
 124, 229, 262, 277, 334, 335, 400.
 v. Euler, U. 262.
 Exner 89.

Färber, E. 334.
 Fähraeus, R. 389.
 Faitelowitz 205.
 Fajans 43, 361—363, 378, 379.
 Falck 45.
 Falk, K. G. 70, 71, 185, 190,
 193, 272, 345, 367, 422.
 Falta 293.
 Feenstra 293.
 Feist 376.
 Fels 58.
 Fermi 114, 216, 284, 382, 384.
 Fernau 293.
 Fernbach 63, 115, 320, 398—400,
 402.
 Fick 88.
 Findley, A. 83.
 Finsen 282.
 Fioroni 327.
 Fischer, E. 7, 71, 196, 197,
 199, 228, 313, 315, 321, 326,
 342—345, 347, 349, 356, 363,
 364, 366—371, 374.

- Fischer, W. R. 238.
 Fiske 377.
 Flecker 125.
 Fletcher 336.
 Florell 235.
 Foà 26.
 Fodor 73, 102, 116, 139, 154,
 161, 162, 349.
 Ford 208.
 Frager 82.
 Freudenberg 359.
 Freudenreich 197—199.
 Freund, J. 216.
 Freundlich, H. 94, 100, 102,
 106, 122, 124, 422.
 Fricke 38, 98.
 Friedberger 390.
 Friedemann 124—126.
 Friedenthal 124, 395.
 Friedrich, W. 289, 290.
 Fuchs, W. 226.
 Fujimoto 334.
 Fuld 206, 277, 393.
 Funk, E. 184, 186.
 Funke 71.

Gabbe 73.
 Gambarjan 11, 400.
 Garner 118.
 Gaunt 10, 332.
 Gauss 239.
 Geitel 167.
 Gengou 192, 394.
 Gerber, C. 186, 193, 273, 276
 Geret 206.
 Gerhartz 290.
 Gerlach 291.
 Giaja 189, 230, 347.
 Gibbs 94, 96, 99.
 Gibson, G. E. 331.
 Giezelt, 239, 240.
 Gigon 184, 300.
 Gillespie 60.
 Gjaldback 322.
 Glaessner 382.
 Glagolew 322.
 Glendinning 139.
 Gley 382.
 Glimm 256.
 Goldschmidt, H. 301.
 Goodwin, H. W. 318.
 Gosh 20, 45.
 Gosney 314.
 Govaerts 382.

 Grafe 327.
 Graham 13, 79.
 Gramenitzki 269, 270.
 Graser 39, 61, 107, 108, 125,
 159, 255, 258, 260, 261.
 Grassmann 205.
 Green, R. 286.
 Griffin 112.
 Grignard 374.
 Grigoriew 206, 239.
 Grineff 37.
 v. Gröer, 273.
 Groll 252.
 Gromow 206, 239.
 Grütznern 193, 221.
 Gudzent 290, 292.
 Guggenheim 96.
 Guignard 198, 273.
 Gustaver (Gustafsson) 100, 102.
 Guthrie 208.
 Gyemant 60, 72.
 György 72, 208, 216.

Haber 97, 106, 170, 171, 335.
 Haehn, H. 15, 189, 208, 230,
 270.
 Hägglund 405.
 Händel 186.
 Hahn, A. 189.
 Hahn, M. 7, 10, 70.
 Hahn, O. 292, 382,
 Haley 70.
 Hamburger 219, 220.
 Hamlin 185.
 Hammarsten, E. 82, 119, 198,
 222.
 Hammarsten, O. 12, 106, 114,
 115, 124, 324, 393.
 Hamsik 314.
 Handowsky 43, 45, 371.
 Hanriot 139, 275, 313.
 Hansen, E. Chr. 385.
 Hauson 384.
 Hanssen, Olaf 287, 292.
 Harden, A. 4, 5, 14, 15, 193,
 219, 222, 223, 317, 318, 335,
 336, 360, 372, 406, 407.
 Hardy, W. B. 35, 36, 46, 124,
 262.
 Hári 327.
 Harkins 103.
 Harlow 97.
 Harpuder 189.
 Harries 213.

 Harris 82, 117, 119, 422.
 Hartley 83.
 Hartree 332.
 Hasselbalch 26.
 Hata 183, 185, 186.
 Hatano, J. 317.
 Hatchek 46.
 Hattori 317.
 Haurowitz 346.
 Hausrath 85.
 Hawkins 195.
 Haworth, 369, 370.
 Hayduck, F. 230.
 Haymann, Cl. 192, 232, 318.
 Hébert 185.
 Hecht 360.
 Hedelius 91, 262.
 Hedestrand 45.
 Hedin, S. G. 72, 73, 109, 111,
 112, 139, 156, 226, 382,
 383, 385, 393, 394, 422.
 Hedwall 98.
 Heidenhain 9.
 Heintze 73, 223.
 Hekma 219.
 Helferich 71, 343, 346, 368.
 v. Helmholtz 40, 328.
 Henderson, L. J. 55.
 Hennichs 73, 110, 152, 260.
 Henri, V. 139—141, 152, 158,
 291, 292, 354.
 Henriques 322.
 Hepburn 266.
 Hermann 322.
 Hérissésey 197, 315, 317, 368.
 Hertel 284.
 Herzfeld 115.
 Herzfeld, K. F. 338.
 Herzog, R. O. 10, 90, 92, 154,
 275—277, 326, 372, 393.
 Hess 326.
 Hesse, A. R. F. 70, 189, 191,
 210.
 Heydweiller 24.
 Heyer 13.
 Hildebrand 25,
 Hildebrandt 390, 392.
 Hilgendorff 374.
 Hill, A. V. 119, 332.
 Hill, Croft 5, 115, 313, 319, 320,
 Hinrichs, A. 268.
 Hirsch J. 334.
 Hirsch, P. 388.
 Hirst 369.

- Hitchcock 79, 109, 119, 165, 255.
 Hittorf 91.
 Hjelt 167.
 Höber 26, 41, 81, 121, 288.
 Hönigschmidt 187.
 Hörth 372.
 Höyrup, M. 122, 123, 252.
 van't Hoff 19, 20, 81, 244, 245, 304, 305, 313, 314, 329, 358, 359.
 Hoffmann 213.
 Hofmeister 121.
 Hogewind 288.
 Hollander 165, 255.
 Holderer 115, 369.
 Holmbergh, O. 70, 190, 191.
 Homfray 100.
 Hongardy 219.
 Hopkins, F. G. 288, 336.
 Hoppert 367.
 Horton 199, 217, 376.
 Hosokawa 195.
 Hoyer 185.
 Hubert 115.
 Hudson, C. S. 9, 11, 63, 134, 136, 138, 236, 237, 254, 256, 257, 260, 369.
 Hückel 20, 21.
 Hufner 89.
 Huerre, R. 274.
 Hunter 128.
 Husa 208.
 Hussey, R. G. 293, 384.

 Iljin, W. S. 189.
 Iscovesco 12, 96.
 van Italie 274.
 Iwanoff, L. 5.
 Iwanoff, N. N. 239, 269.
 Iwanow, S. 314.
 Izar 185.

 Jacobsen, J. 197.
 Jacobson, John 204.
 Jacobson, P. 358.
 Jacoby, M. 7, 114, 115, 183, 185, 198, 206, 208, 217, 226, 394, 408.
 Jagič 125.
 Jalandar 70, 297.
 Jamada 213, 284, 285.
 Jander 14.
 Jansen 292.

 Jastrowitz 162.
 Jeppsson 422.
 Joachimoglu 390.
 Jochmann 393.
 Jodlbauer 213, 284, 285, 287.
 Johannessohn 198.
 Johansson, David 400, 404, 406, 407.
 Johnsohn, W. A. 260, 267.
 Jonescu 269.
 Jorrissen 292.
 Josephson, K. 3, 6, 11, 15, 17, 39, 47, 66—69, 71, 91, 108, 109, 151—153, 159—161, 174, 214, 236, 237, 252, 260, 267, 271, 305—307, 312, 354, 389.
 Jürgensen 251, 262.

 Kadletz 186.
 Kailan, A. 290.
 Kaja 38.
 Kanitz 28, 29, 44, 63, 193.
 Kantorowicz 393.
 Kapfberger 388.
 Karamitsas 285.
 Karlsson, K. G. 134, 168.
 Karlsson, Signe 224, 225.
 Karrer 315, 327, 369.
 Kasarnowski 154.
 Kastle 139, 185, 192, 198, 199, 206, 213, 216, 274, 275, 277, 313, 345.
 Kato, N. 225, 286.
 Kaufmann 192, 197, 199.
 Kawashima 384.
 Kay, H. D. 318, 324.
 Kekulé 172.
 Kendall, E. C. 189, 191, 239, 258, 277.
 Kerr 165.
 Kjeldahl 63, 183, 216, 277, 278.
 Klatte 114.
 Klein, O. 338.
 Kleinmann 191.
 Klemensiewicz 106.
 Klempin 267, 382.
 Klöcker, A. 406.
 Knaffl-Lenz 162, 240, 388, 392.
 Knipping 289.
 Knoblauch 167.
 Kober, P. A. 199, 258.
 Kobzarenko 240.
 Kochmann 195.
 Koefoed 257.

 v. Körösy 290.
 Kohl, F. G. 284, 319.
 Kohlrausch 20, 24, 41, 42.
 Kohlschütter 98.
 Kolthoff, J. M. 62.
 Koppel, M. 62, 63.
 Kornfeld 327.
 Kossel 7. 124, 349, 371.
 Kostytschew 186, 402.
 Kramers, H. A. 338.
 Kraus 390.
 Krause, G. A. 8.
 Krause, P. 291.
 Kraut 98, 113.
 Kretschmer 347.
 Kriehle, V. K. 376, 378.
 Kröber 197, 277
 Krömeke 293.
 Krüger, F. 191.
 Krüger, R. 60.
 Kudo 191.
 Kühne, W. 267, 298, 299.
 Kuhn 6, 39, 61, 66, 71, 107, 108, 110, 125, 150, 151—154, 159, 166, 175, 237, 255, 258, 260, 261, 271, 305, 308—310, 312, 349—357, 369, 370, 381, 422.
 Kullberg 10. 90, 187, 229, 231, 256, 261, 320.
 Kulpsohn 270.
 Kurajeff 321.
 Kussmaul 392.

 Laborde 239.
 van Laer, H. 266, 276.
 v. Lagermarck 388.
 Landauer 262.
 Landergren 214.
 Landsteiner 37, 125, 382.
 Lange, H. 403.
 Lange, H. 192, 193, 318.
 Langheld 213.
 Langmuir 95, 102, 103.
 Lapworth 376.
 Laqueur 45, 46, 207, 209, 213, 225.
 Lasnitzki 207, 212.
 v. Laue 289.
 Laurin 132, 150, 151, 232, 250, 254, 257, 258, 260—264, 270, 271, 274, 277—280, 285, 290, 403, 407.
 Lawrow 321.
 Lax 327.

- v. Lebedew, A. 7, 332, 336.
 Le Bel 374.
 Leduc 294.
 Lehnartz 191, 192, 232, 318.
 Leibowitz, J. 320.
 Lemke 289.
 v. Lengyel 327.
 Lepeschkin 262.
 Levaditi 382.
 Levene 36, 260, 277, 321, 348.
 Levites 191.
 Levy, Marg. 290.
 Lewis, G. N. 25, 331.
 Lewis, W. C. M. 337.
 Lillie 14.
 Limbosch 189.
 Linder 96, 123.
 Lindner 232, 332.
 Linhardt 367.
 Lintner 197, 277.
 Lobassow 396.
 Lobry de Bruyn 370, 407.
 Lockemann 191, 285, 290.
 Löb 319.
 Loeb, J. 41, 47, 119, 122, 195.
 Loevenhart 189, 192, 209, 216,
 275, 277, 313, 345.
 Lövgren 72, 152, 160, 225.
 Loew, O. 187, 195, 198, 204,
 216.
 Löwe 346.
 Löwenhamm 232.
 Loewenthal 292.
 London 10.
 Long, J. H. 260, 267.
 Lorentz 92.
 Lorinser 254, 255, 258, 260,
 287, 288.
 Lowartz 269.
 Lubrzynska 46.
 Lubs 60.
 Lüers 254, 255, 258, 260, 262,
 276, 277, 287, 288, 392.
 Luger 186.
 Lundberg, J. 234.
 Lundén 24, 26, 76.
 Luther 85, 169, 170.
 Lyman 70.
- Mc** Bain 99.
 Macfadyen 7.
 Mc Guigan 183, 187.
 Macht 197.
 Mack 324.
- McKenzie 360—362, 372, 374.
 Madinaveitia 110.
 Madsen 182, 249, 251, 254,
 264, 265, 271, 277, 393.
 Mäkelt 106.
 Magnus 209, 395.
 Malfitano 14, 116, 194.
 Mallèvre 194.
 Maquenne 320.
 Marckwald, W. 360—364, 373.
 Marshall 292.
 Martin 14, 46, 48, 222, 251,
 261, 262.
 Masius, Morton 102.
 Mathews 183, 187.
 Matignon 331.
 Maxwell 93.
 May 186.
 Mayer, A. 114, 291, 292.
 Mayer, P. 366.
 Meier, R. 327.
 Meisenheimer 10, 11, 400, 403.
 Mellanby 266.
 Meltzer 97.
 Memmen 70, 162, 193, 197,
 199, 207—209, 212, 217, 241,
 266, 298, 303, 310, 346, 380,
 381.
 Mendel, L. B. 205.
 Mendelsohn 72, 73, 162.
 Menten 66, 141—144, 147, 150,
 152, 256.
 Metcalf 96.
 Meth, R. 361.
 Mett 275.
 Meyer, H. 290.
 Meyer, Herm. 400.
 Meyer, Kurt 72, 384, 389.
 Meyer, Kurt H. 331.
 Meyerhof 109, 224—226, 320,
 327, 332, 334, 336.
 Michaelis 3, 12, 22—24, 26,
 28—33, 35—41, 45, 49—51,
 54, 60—66, 68—73, 75, 78,
 79, 99, 101, 104—107, 109,
 113, 115, 122, 129, 135, 139,
 141—150, 152, 153, 156—159,
 162, 172, 189, 191, 236, 249,
 256, 257, 310, 312, 349, 353,
 354, 388.
 Miller, E. W. 405.
 Millikan 88.
 Millner 20, 94.
 Minami 209, 293.
- Miquel 275.
 Mito 371.
 Moll 393.
 Mond, E. 288.
 Moore 14.
 Morat 207.
 Morávek 103.
 Morawitz 194, 222.
 Morgan 288.
 Morgenroth 267, 393.
 Morse, H. N. 82, 83.
 Mostynski 35, 45.
 Mougne 317.
 Mouton 269.
 Müller, Franz 7.
 Müller, H. A. 362.
 Müller-Thurgau 276.
 Müntz 197.
 Myrbäck 9, 11, 15, 18, 61,
 66—69, 71, 73, 108, 114,
 136, 151, 159, 178—183, 193,
 198, 200—203, 216, 218, 219,
 223—227, 230, 232, 233, 236,
 237, 241, 245, 252, 253, 260,
 272, 318, 335.
- Nägeli 186.
 Nakagawa 260.
 Nakamura, Keizo 267.
 Nasse 188, 206.
 Negelein 283.
 Neilson 189.
 Neisser 126.
 Nell, A. J. 288.
 Nelson, J. M. 109, 112, 165,
 255.
 Nencki 209.
 Nernst 20, 24, 36, 41—43, 58,
 62, 74, 82, 85, 86, 88, 91,
 103, 106, 117, 283, 325, 328,
 330, 331.
 Neubauer 122.
 Neuberg 166, 199, 291, 294,
 303, 318, 321, 332, 334, 335,
 347, 365, 367, 372, 373, 391,
 392.
 Neumann 349.
 Neuschlosz 190.
 Nicloux 265, 277.
 Nilsson, Ragnar 12, 98, 103,
 109, 113, 409.
 Nippe 346.
 Noddack 283.

- Nordefeldt 18, 72, 110, 277,
 303, 376, 377.
 Nord, F. F. 334, 373.
 Nordenson, H. 289.
 Nordlund 73, 318.
 Northrop 69, 72, 79, 109, 110,
 119, 139, 162, 226, 248, 260,
 384.
 Norris 318, 406, 408.
 Norrish R. G. W. 338.
 Noyes 24.

 Öholm 89, 90, 91, 92.
 Offermann 290, 293.
 Ohlsén 268, 318.
 Ohlsson, C. E. 274, 422.
 Ohta, K. 273.
 Okada 72.
 Okuneff 321.
 Olsson, U. 184, 192, 193, 198,
 204, 205, 208, 215, 216, 258.
 Onodera 198, 206, 207, 217,
 225, 260.
 Oppenheimer, C. 422.
 Oppenheimer, G. 71, 350.
 Orient 231.
 Ormerod 345.
 Osaka 319.
 Osborne 8, 188, 390.
 Osterhout 195.
 Ostwald, Wi. 24, 139, 167,
 169, 172.
 Ostwald, Wo. 14, 80, 93, 116,
 242, 285, 303.
 O'Sullivan 63, 135, 137, 256,
 277, 278.

 Paechtner 168.
 Paine 9, 11, 236, 237, 254,
 256, 257, 260.
 Palitzsch 72.
 Paneth 103.
 Pantanelli 319.
 Pascucci 14.
 Pasteur 358, 362.
 Patten 196.
 Paul, D. M. 362, 363.
 Paul, Th. 14.
 Pauli, W. 36, 37, 43, 45, 121,
 122, 125, 126, 292.
 Pavlovič 70, 192, 209.
 Pawlow 9, 10, 209, 219.
 Pechstein 26, 37, 40, 70, 73,
 153, 189, 191, 256, 354.

 Pekarbaring 38, 69, 193, 222.
 Pernossi 114, 216, 284.
 Perrin 40, 80, 81, 92, 337.
 Petersen, W. F. 290.
 Petow 207, 217, 381.
 Petri 339.
 Pfeffer 82, 84.
 Pfeiffer, Paul 76.
 Pfeiffer 186.
 Pfeleiderer 193.
 Philoche 154.
 Picton 96, 123.
 Pierce 192.
 Pighini 162.
 Pinkussen 288.
 Pinkussohn 192, 194, 206, 276,
 286.
 Planck 283, 328, 338.
 Polanyi 103, 331, 338.
 Pollack 347.
 Pollinger, 2, 111, 171, 272.
 Pomeranz 320.
 Porges 122.
 Pottevin 168, 193, 297, 314.
 Pozerski 265, 269.
 Pregl 85, 272.
 Preti 185, 189.
 Price, Sl. 171, 244.
 Price, T. M. 198.
 Prideaux 55.
 Priestley 422.
 Pringsheim, H. 197, 226, 320,
 372.
 Procter 119.
 Pugliese 197, 199, 382.

 Quincke 96.
 Racke 9, 12, 14, 107, 108, 233.
 Rackford 209, 210.
 Rakowski 167.
 Ramsden 96, 97.
 Raoult 85.
 Rapp 10.
 Reichel 240, 241.
 Reicher 167.
 Reinthur 318, 334.
 Reinicke 207.
 Reiss 114.
 di Renzo, Franco 226, 286, 288.
 Reyher 44.
 Ribaut 321.
 Richards, A. 290.
 Richter 290.
 Rideal, E. K. 97, 338, 422.

 Riedel, H. 346.
 Riessenfeld 42.
 Riesser 371.
 Ringer 38, 69, 72.
 Roaf 14.
 Robertson 76, 124, 125, 154,
 162, 323, 384.
 Robison 318.
 Rockwood 192, 208.
 Rödén 393.
 Roger 190, 191.
 Rona 22, 23, 37, 40, 54, 60, 63,
 70—73, 99, 101, 102, 104, 105,
 113, 122, 153, 162, 191, 192,
 199, 206—209, 212, 216—218,
 366, 381.
 Rosenberg, E. 365.
 Rosenberg, T. 184.
 Rosenheim 210.
 Rosenthal, P. 332.
 Rosenthaler 303, 375—378.
 Rosseland 338.
 Rothstein 39, 66, 249.
 Roventree 292.
 Rowland 7.
 Rubner 10, 230, 320, 327, 332.
 Rudberg, E. 54, 103, 120, 133,
 168, 245, 283.
 Rudberg, K. 76.
 Rudolphi 20.
 Russ 288.
 Ryd, S. 76.

 Sachs 392.
 Sackur 45, 46.
 Saelhof, C. C. 290.
 Sagnac 290.
 Sahlén 232.
 Saiki 392.
 Salaskin 321.
 Salessky 58.
 Salomonson 8.
 Samec 126.
 Saneyoshi 347, 372.
 Santesson 186, 205.
 Sawjalow 321.
 Saxl 181, 187.
 Schaeffer 188.
 Schaffnit 266.
 Schaumann 407.
 Schepowalnikow 219.
 Schilow 169, 170.
 Schlatter 396.
 Schlesinger 199.

- Schmalz 226.
 Schmidt, Alex. 222.
 Schmidt, C. L. A. 162.
 Schmidt, E. W. 273.
 Schmidt, G. C. 100, 103.
 Schmidt-Nielsen, Signe 96, 97, 287, 288.
 Schmidt-Nielsen, Sigval 96, 97, 284, 287, 288, 291.
 Schmiedeberg 367.
 Schneider 107, 108, 110.
 Schönbein 205, 206.
 Schotte 344.
 Schreiner 21, 23.
 Schulz, A. 292.
 Schulze 372.
 Schumow-Simanowski 9.
 Schütz, E. 161—165, 288.
 Schütz, J. 191.
 Schütze, A. 391—393.
 Schwarz, Rob. 290, 293.
 Schweigart 189.
 Seal 122.
 Segall 186.
 Semper 11, 400, 403.
 Senter 186, 204, 205, 214, 249, 260, 265, 277.
 Shaklee 97, 250.
 Shaw-Makenzie 210.
 Sherman 70, 71, 189, 191, 208, 239, 258, 277.
 Shimizu 185.
 Sickel 366.
 Siedentopf 79, 87.
 Sigmund 213, 356.
 Simms 36.
 Simnitzki 382.
 Sjöberg 70, 71, 189, 410.
 Sjöqvist 37.
 Skrabal, A. 167.
 Skraup 231.
 Slator 278, 327, 406, 408.
 Slosse 189.
 Slowtsoff 322.
 Sluiter, E. 152.
 van Slyke, D. D. 72, 152, 160, 161, 260, 277, 321.
 v. Smoluchowski 40, 79, 80, 91.
 Smorodinzew 193.
 Snell 331.
 Sobotka 71, 152, 175, 231, 305, 308, 309, 312, 355—357, 371, 381, 408, 409.
 Söderling 71, 153.
 Söhngen 408.
 Sörensen, M. siehe Höyrup.
 Sörensen, S. P. L. 3, 14, 24, 25, 50, 51, 56, 58—60, 63, 64, 71—73, 78, 82—84, 92, 115, 122, 123, 129, 251, 252, 257, 262, 322, 323.
 Sokolowski 293.
 Sommerfeld 291.
 Speidel, P. E. 366.
 Spiro 62, 63, 123, 187, 195, 206, 240, 241, 393.
 Spohr 244.
 Starkenstein 190.
 Starling 219, 256.
 Stassano 220.
 Staub, M. 369.
 Steche 267.
 Steibelt 17, 18, 71, 350, 408.
 v. Stenitzer 393.
 Steppuhn 216, 267.
 Stern 267, 395.
 Stevens 70, 71.
 Stiles 97, 196.
 Stohmann 327, 331.
 Stoklasa 293.
 Stoll 2, 12, 13, 238, 276.
 Strada 115.
 Subkowa 186, 267.
 Sugiura 258, 272, 345.
 Sutherland 20, 92.
 Svanberg 16, 17, 26, 70, 71, 91, 115, 120, 121, 133, 178, 180, 181, 189, 198, 200, 203, 204, 206, 212, 231, 243, 247, 282, 283, 388, 398—401, 403.
 Svedberg 80, 87, 92.
 Swartz 232, 409.
 Szili 26.
 Takahashi 37.
 Takata 70, 192.
 Tammann 83, 197, 247, 248, 265, 271, 277, 282, 297, 298, 302, 354.
 Tanaka, Y. 185, 191.
 v. Tappeiner 285.
 Taylor, A. E. 277, 297, 298, 314, 323.
 Terroine 276, 277.
 Terry 189.
 Teruuchi 348.
 Thiel 23.
 Thierfelder 370.
 Thies 191, 285, 290.
 Thiry 9.
 Tholin 223.
 Thomas 70, 71.
 Thomson, J. J. 96.
 Thorin 120.
 Thunberg 260, 265, 266.
 Thuslow 422.
 Timofejewa 267.
 Titoff 100.
 Tompson, F. W. 63, 135, 137, 256, 277, 278.
 Tompson, H. B. 361, 362.
 Tompson, W. R. 289.
 v. Tóth 102.
 Traube, I. 95, 121, 197.
 Trautz, M. 337, 338.
 Trebing 383.
 Treyer 192, 197.
 Truffi 185.
 Tschuchibashi 185.
 Twitchel 209.
 Ueda 366.
 af Ugglas, siehe v. Euler-af Ugglas.
 Ultee 376.
 Umeda 208.
 Vahlen 225.
 Vandevelde 115, 192, 197, 214, 384, 395.
 Vernon 256—258, 277.
 Villars 324.
 Vines 205.
 Virtanen 224, 409.
 Visser 304, 314, 319.
 Volhard 115.
 Voltz 291, 294.
 Vorwerk 103.
 Vosburgh 165.
 Vulquin 71.
 van der Waals 102.
 Wachtel 334.
 De Waele 394.
 Waentig 267.
 Wagner 44.
 Waksman, 380.
 Walbum 72, 214, 249, 251, 254, 264, 265, 277, 393.
 Walden 92, 364.

- Waldschmidt Leitz 17, 70, 72,
 111, 185, 189, 191, 197, 210,
 219—221, 239—242, 260,
 261, 266, 346, 380, 383.
 Walker, E. W. A. 222.
 Walker, Florence 208, 258.
 Walker, J. 23, 26, 28, 53,
 167, 168.
 Walker, J. W. 378.
 Walles 183, 227, 235, 242.
 Warburg, E. 337.
 Warburg, O. 171, 186, 206,
 283, 334, 337, 365, 366.
 Ward 55.
 Wartenberg 185.
 Wasmund 255, 260, 276, 277.
 Wassermann 107, 108.
 Weber, I. 260, 349.
 Wegelin 115.
 Weil, A. 346, 366.
 v. Weimarn 80.
 Weinland 384, 386, 388, 393.
 Weis, Fr. 277, 284.
 Wels, P. 290.
 Wells 390.
 Welter 314.
 Went, F. A. F. C. 400.
 Wenzel 113.
 Wertheimer 232, 391.
 Westgren, A. 88, 98.
 Westling 191, 192, 231, 232.
 Wichern 191, 285, 290.
 Widmark, E. 175, 422.
 Widmer 369.
 Wiechowksi 8.
 Wiedemann, G. 41.
 Wieland 171, 376.
 Wiener 8.
 Wilcock 292.
 Wild 170.
 Wilhelmy 131.
 Williams 102.
 Willstätter 2, 3, 6, 8, 9, 12—14,
 16—18, 39, 61, 66, 70, 71,
 98, 107, 108, 110, 111, 113,
 114, 125, 129, 152, 154, 159,
 162, 166, 170, 185, 189, 191,
 193—195, 197, 199, 205,
 207—210, 212, 217, 220, 233,
 238—242, 255—258, 260, 261,
 266, 272, 274, 286, 298, 303,
 305, 308, 309, 312, 320, 337,
 346, 349, 350, 353, 354—357,
 366, 367, 371, 380, 381, 396,
 408, 409.
 Wilson, J. A. 119, 290.
 Winkelblech 28.
 Winkler, K. 267.
 Winslow 190.
 Wirth 376.
 Withe 266.
 Wittka 76.
 v. Wogau 91.
 Wohl 256, 359, 371.
 Wohlgemuth 188, 189, 208,
 210, 291, 292.
 Wojczinski 266.
 Wolf, C. G. L. 97.
 Wolff, J. 320.
 Wollberg 206.
 Wooley 266.
 Wortmann 397, 398, 400, 409.
 Woudstra 292.
 Wrede 326.
 Wren 374.
 Wroblewski 198, 204, 266.
 Würgler 76.
 Wurmser, R. 331.
 Wylam 369, 370.
 v. Wynken 76.
 Young, E. G. 288.
 Young, W. J. 4, 5, 14, 15,
 193, 219, 222, 317, 335, 384,
 407.
 Yamagawa 260.
 Yamasaki 168, 277.
 Zach 343.
 Zacharias 72.
 Zeller 285, 287.
 Zemplén 369, 370.
 Zilva 260, 265.
 Zlobicki 96.
 Zsigmondy 13, 14, 79, 80, 87,
 116, 125, 126, 258, 422.
 Zunz, E. 194, 219, 382, 383.
 Zwaardemaker 288, 293.

Sach - Verzeichnis.

- Abderhaldensche Reaktion** 387, 388.
Abwehrfermente 386.
Acidität 3.
 — Einfluss auf Adsorption 109.
 — — auf die Enzymwirkung 63.
 — — auf Temperaturempfindlichkeit 254.
Aciditätsoptima der Enzymwirkungen 70—73.
A Co 225.
Adsorption 98.
 — Aciditätskurve 109.
 — der Enzyme 106, 114.
 — Formel von Freundlich 100.
Äthylalkohol, Einfluss auf Enzyme 235.
Affinitätskonstante 18, 151.
Aktivatoren 176, 205.
 — spezifische 4, 218 u. ff.
Aktivierungen von Enzymen 231, 268.
Alkalisalze, Wirkung auf Enzyme 188.
Alkalische Erden, Wirkung auf Enzyme 193.
Alkaloide als Enzymgifte 206.
Altern, hydrophyler Sole 97.
Amine als Enzymgifte 200.
Ampholyte 26.
 — Theorie von Bjerrum 33.
Amygdalose, Formel 370.
Anaphylaxie 388.
Antienzyme 390.
Artfremde Substrate 385.
Asymmetrische Reaktionen 358, 375.
 — Spaltung durch Enzyme 364.
Aussalzung 75.
Aussalzung von Nickelelektrolyten 120.
Avogadro'sche Zahl 88.
Benzoxynitril-Gleichgewicht 376.
Biosen, enzym. Synthesen 319.
Blausäure als Aktivator und Enzymgift 205.
Blutserum, antitryptische Hemmungskörper 382.
Brown'sche Bewegung 80.
Charakterisierung von Enzympräparaten 16.
Cellobiose, Formel 369.
Coadsorbens 107.
Coeluens 107.
Co-Enzyme 176.
Co-Zymase 222.
Danzsz-Effekt 182.
Diastereomerie 358.
Diffusion, freie 88.
Diffusionskonstante der Saccharase 91.
Dissoziationsrest 29, 30.
Dissoziationsrestkurve 29, 30.
Donnan-Effekt 116.
Druck, osmotischer 81.
Ektoenzym 9.
Elektrodialyse 38.
Elektrolyte, starke 20.
 — schwache 21.
 — amphotere 26.
Elektrolytische Dissoziationskonstante 19.
 — Dissoziationstheorie 2.
Elektroosmose 38.
Enantiomerie 352.
Endoenzyme 9.
Energiewandlung in der Zelle 333.
Enterokinase 219.
Enzymantikörper 390.
Enzymbildung in der Zelle 396.
Enzyme, Aciditätsoptima 70 bis 73.
 — Adsorption 106.
 — Adsorptionsreinigung 11.
 — Affinitätskonstante 18.
 — Aktivierung durch Erhitzung 268.
 — als Antigene 390.
 — Ausfällung 10.
 — Darstellung 6.
 — Dauerpräparate 10.
 — als Elektrolyte 19.
 — Extrahieren 8.
 — gegenseitige Beeinflussung 266.
 — Haltbarkeit 15.
 — Hauptwirkung der 353.
 — als Kolloide 78.
 — Reinigung 6, 10.
 — Spezifität 340, 341, 379.
 — Theorie von Kuhn 349.
 — Stabilität 259.
 — zeitliche Verlauf der Inaktivierung 248.
 — Verhalten zu stereoisomeren Substanzen 353.
Enzymhomologe 3.
Enzymreaktionen, — Endzustände 302.
 — Gleichgewichte 295, 305.
 — Kinetik der 128.
 — Temperaturkoeffizient der 275.
 — Wärmetönung 325.

- Enzymreaktionen, Spezifität 340, 341, 379.
 Enzym-Substrat-Verbindung 139.
 Enzym-Trockenpräparate 261, 271.
 Enzymwirkung, Abhängigkeit von der Acidität 63.
 — Optimaltemperaturen 280.
- Filtersubstanzen als Sorptionsmittel für Enzyme 114.
 Flockung, gegenseitige, von Kolloiden 124.
 Fluoride 192.
 Folgewirkungen 165.
- Gärungsenzyme 370.
 Gärungsreaktionen, Wärmetönung 331.
 Galaktosegärung, Hervorufung von 406.
 Gallensäuren als Aktivatoren 209.
 Gefrierpunktsbestimmungen 85.
 Gifte 4, 176.
 — anorganische 177.
 — organische 196, 216.
 Giftwirkung 177 u. f.
 Gleichgewichte zwischen mehreren Elektrolyten 48.
 — heterogenes 74.
 — enzymatische 305.
 Glucosidgleichgewicht, Theorie 306.
- Habers** Schema 170.
 Halogene als Enzymgifte 214.
 Haltbarkeit von Enzymen 15.
 Hardensche Gärungsgleichung 335.
 Hauptsätze der Thermodynamik 328.
 Hemmungskörper 4, 176, 226.
 — antitryptischer, des Blutserums 226, 382, 392.
 Hydratation der Ionen 41.
 Hydrolyse 52.
- Inaktivierungen, irreversible 212.
 — zeitlicher Verlauf 248.
- Indikatoren 57.
 Indikatorenreihe nach Sörensen 59.
 — nach Clark 60.
 — nach Michaelis 61.
 Inv. 401.
 Ionen, Beweglichkeit 36.
 — Hydratation 41.
 — Reibungskoeffizient 44.
 Ionengleichgewicht an Membranen 116.
 Ionenprodukt des Wassers 24.
 Isoelektrischer Punkt 35, 37.
 Isohydrische Lösungen 55.
- K_x** 151.
 Kapillarscheinungen 92.
 Katalase, Temperatur-Aktivierung 268.
 Katalyse, durch Enzyme 1, 134.
 — durch Säuren u. Basen 131.
 — Theorie, 133, 171.
 Kataphorese 40.
 Kinase des Trypsins 219.
 Kolloide, Ausfällung 120.
 — gegenseitige Fällung 123.
 — hydrophile 80.
 — lyophile 80.
 Konstanz des Enzymgehaltes in Hefen 401.
 Kryolabilität der Enzyme 265.
- Lipoide als Aktivatoren 210.
 Lösungsmittel, organische, Einfluß auf Enzyme 235.
- Maltose, Formel 369.
 Mesothorium, Wirkung von 292.
 Michaelissche Theorie 141.
 Molekulargewichtsbestimmungen 84.
 — durch Diffusion 89.
 Mutamerie 358.
- Natriumfluorid als Enzymgift und Aktivator 192.
 Nernstscher Wärmesatz 330.
 Neutralität 25.
 Niederdruckfiltration 116.
 Nicht-Elektrolyte, Aussalzung 120.
- Oberflächenenergie 92.
 Oligodynamische Wirkungen 186.
 Optimaltemperaturen 280.
 Ordnungsgeschwindigkeit 97.
 Organische Stoffe als Enzymgifte 196, 228.
 Osmotischer Druck 81.
 Orynitilgleichgewicht 376.
- Papain**, Aktivierung durch Blausäure 205.
 Parallelreaktionen 166.
 Paralysatoren 176.
 — antitryptische des Blutserums 382.
- p_H 25.
 Plasteinbildung 321.
 Proenzyme, Aktivierung 121.
 Puffer 49, 50, 56.
 Puffergemische 51.
 Pufferung 62.
- Reaktionen, gekoppelte 169.
 — stufenweise 167.
 Reaktionsgleichung der enzymatischen Rohrzuckerspaltung 156.
 Reaktionswärmen 326.
 Reibung, innere 43.
 Röntgenstrahlen 288.
- Saccharase, Diffusion 91.
 — Bildung in der Zelle 405.
 — elektrolyt. Dissoziation 67.
 — Rohrzucker-Verbindung 67, 142.
 Selbstregeneration der Saccharase 181.
 Sekundärstrahlung 294.
 Schutz-Kolloide 116, 125.
 Schutzwirkungen 256.
 — durch Salze 257.
 — — übrige Stoffe 258.
 Schüttelinaktivierung 96.
 Schützsche Regel 161.
 Schutz-Kolloide 116, 125.
 Schwermetallsalze als Gifte 177.
 Seifen als Aktivatoren 210.
 Sorption 98.
 Spaltprodukte, Einfluss auf Kinetik 147.

- Spaltprodukte, Einfluß der Mutamerie 159,
 — — auf den Endzustand von Enzymreaktionen 298.
 Spezifität der Enzyme in vitro 340.
 — biologische 379.
 — chemische 341.
 — relative 350.
 Strahlung, Einfluss auf Enzyme 5, 282.
 — und chemische Energie 337.
 Strukturspezifität bei Enzymreaktionen 354.
 Synthesen, asymmetrische 5, 373.
 — enzymatische 5, 295, 313.
 — von Estern 313.
 — — Glukosiden 314.
 — — Hexosephosphaten 317.
- Synthesen von Biosen 319.
 — — höheren Kohlehydraten 320.
 — der Carbamidgruppe 321.
- Teilchengröße 86.
 Temperatur, Einfluss auf enzymatische Reaktionen 244.
 Temperaturkoeffizienten enzymatischer Reaktionen 275.
 Temperaturstabilität der Enzyme 246.
 Thermodynamik, Hauptsätze 328.
 Tötungstemperaturen 272.
 Toxin 2, 393.
 Trehalose, Formel 369.
- Ultrafiltration 115.
 Ultramikroskopie 86.
 Ultraviolette Strahlen 286.
- Verbrennungswärmen von Kohlehydraten 327.
 Verdauungssäfte, Gewinnung von 9.
- Wärmetönung von Hydrolysen und Gärungsreaktionen 325, 326, 331.
 Wanderungsrichtung von Enzymen 40.
 Wasser, Ionenprodukt 24.
 Wasserstoffionenexponent 25.
- X f 17.
- Zeitwertquotient 350.
 Zellfremde Substrate 385.

VERLAG VON J. F. BERGMANN IN MÜNCHEN

Chemie der Enzyme

Von

Professor Dr. **Hans Euler**

in Stockholm

II. Teil: **Spezielle Chemie der Enzyme.** 1. Abschnitt. Die hydrolysierenden Enzyme der Ester — Kohlenhydrate und Glukoside.

Mit 44 Textabbildungen

1922. 12.— Goldmark

Aus den Besprechungen:

Das bekannte Buch Eulers liegt hier in der zweiten Auflage vor. Der schnellen Entwicklung der Enzymchemie entsprechend hat das Buch eine wesentliche Um-
arbeitung und erhebliche Erweiterung erfahren. Es ist zu zwei Bänden ange-
wachsen. Der erste jetzt erscheinende Teil bringt mit meisterhafter Klarheit eine
Darstellung des gegenwärtigen Standes der allgemeinen Enzymlehre, welche im
wesentlichen auf physikochemischer Grundlage aufgebaut ist und in sehr glücklicher
Vereinigung die Ergebnisse der Kolloidchemie und der Reaktionskinetik, bezw.
Katalyse zur Geltung bringt. Das Buch wird sicher auch in der jetzt gegebenen
erweiterten Form viele Freunde gewinnen, da es in seiner übersichtlichen und im
besten Sinne kritischen Art zu den schönsten Darstellungen dieses Gebietes gehört.

Münchener Medizinische Wochenschrift.

II. Teil: **Spezielle Chemie der Enzyme.** 2. Abschnitt.

Erscheint 1925.

Grundzüge der physikalischen Chemie

in ihrer Beziehung zur Biologie

Von

S. G. Hedin

Professor der medizinischen und physiologischen Chemie an der Universität Upsala

Zweite Auflage

1924. 7.50 Goldmark / Gebunden 8.70 Goldmark

Inhalt: Osmotischer Druck — Kolloide — Aus der chemischen Reaktionslehre —
Die Enzyme — Antigene und Antikörper — Ionen — Salzwirkung.

Aus den Besprechungen der ersten Auflage:

Die Anwendung physikalisch-chemischer Methoden und Prinzipien in der Bio-
chemie und Biologie nimmt einen immer größeren Umfang an, und ihre Kenntnis
wird für das Verstehen biologischer Vorgänge immer notwendiger. Das vorliegende
Werk bringt in gedrängter Form die wichtigsten Grundzüge der physikalischen
Chemie in ihrer Beziehung zur Biologie. Sehr gründlich sind die Kapitel über den
osmotischen Druck und die Kolloide und Enzyme bearbeitet. Die Darstellung ist
elementar, sodaß auch diejenigen, welche mit der Materie wenig vertraut sind,
ohne Schwierigkeiten folgen können.

Berichte der deutschen pharmazeutischen Gesellschaft.

VERLAG VON J. F. BERGMANN IN MÜNCHEN

Physiologisches Praktikum

für Mediziner

Von

Dr. med. **R. F. Fuchs**

Professor an der Universität Breslau

Zweite verbesserte und erweiterte Auflage

Mit 10 Abbildungen und vier Tafeln

1912. Gebunden 8.— Goldmark

Das bekannte Fuchssche Praktikum der Physiologie hat in der zweiten Auflage seine Vorzüge und bewährten Besonderheiten beibehalten, insbesondere die Zuverlässigkeit der Darstellung und ein solches Eingehen auf alle Einzelheiten und Kleinigkeiten, daß der Studierende auch ohne dauernde mündliche Anleitung sich zurechtfindet. Der Inhalt ist nicht unbeträchtlich erweitert, und die Zusätze betreffen fast alle Kapitel. Hinzugekommen ist die Spektraluntersuchung des Blutes, die Beobachtung der Blutplättchen, der Pulsgeschwindigkeit der Menschen; die graphische Aufnahme der Darmbewegungen, der Muskelermüdungskurve des Menschen. Die physiologische Optik ist um eine ganze Reihe von neuen Versuchen bereichert. Hervorzuheben ist, daß viele Versuche speziell der Physiologie des Menschen angepaßt sind.

Berliner Klinische Wochenschrift.

Die Umwelt des Lebens

Eine physikalisch-chemische Untersuchung über die Eignung des Anorganischen für die Bedürfnisse des Organischen

Von

Professor **Lawrence J. Henderson**

Nach vom Verfasser verbesserten und erweiterten englischen Original übersetzt von **R. Bernstein**

1914. 5.— Goldmark

Seinen engeren Fachgenossen ist Henderson durch eine Reihe ausgezeichneten Arbeiten auf dem Gebiete der Biochemie bekannt. Mit dem vorliegenden Werke, das Henderson Karl Spiro widmet, wendet sich der amerikanische Forscher an alle naturwissenschaftlich Gebildeten. Seine überaus geistvollen Betrachtungen gehen von dem Umstand aus, daß unter dem Einfluß Darwins in übertriebenem Maße eine Anpassung der Lebewesen an die unvariabel gedachte Außenwelt angenommen worden ist. Henderson legt nun dar, daß auch die Außenwelt der Materie und Energie Umwandlungen unterworfen war, bis der uns bekannte Zustand eingetreten. An zahlreichen Beispielen wird dargetan, daß eine andere Umgebung für das Leben als die derzeitige kaum möglich, jedenfalls nicht zweckmäßig ist.

Deutsche Medizinische Wochenschrift.

VERLAG VON J. F. BERGMANN IN MÜNCHEN

Deskriptive Biochemie

mit besonderer Berücksichtigung der chemischen Arbeitsmethoden

Von

Professor Dr. **Sigmund Fränkel**

Wien

Mit einer Spektraltafel

1907. 17.— Goldmark; gebunden 18.60 Goldmark

... — Es ist ein besonderes Verdienst S. Fränkels, aus der fast unübersehbaren Literatur im vorliegenden Werk nach kritischer Sichtung das Wertvolle in übersichtlicher und vollständiger Form zu bringen; da das inhaltreiche Buch unter vielem anderen in besonderen Kapiteln auf die Bedürfnisse des Arztes (Chemie der Organe, Sekrete und Exkrete) Rücksicht nimmt und durch sorgfältige Register die Benutzung erleichtert ist, dürfte das Buch für jeden Biochemiker unentbehrlich sein.

Deutsche Medizinische Wochenschrift.

Das ungeheuer anwachsende Material der biochemischen Literatur erschwert das Arbeiten auf diesem Gebiete ungemein. Deshalb verdient der Verf. besonderen Dank, daß er die einschlägige Literatur mit fast beispielloser Vollständigkeit in diesem Werke vereinigt hat. Eine angemessene Kritik hat die Aufnahme unerprobter oder unzuverlässiger Methoden verhindert. Ein besonderes Kapitel, das 100 Seiten umfaßt, behandelt die Chemie der Organe, Sekrete und Exkrete, so daß auch den Bedürfnissen des praktischen Mediziners das Fränkelsche Buch in weitem Maße gerecht wird. Ein Arbeiten auf biochemischem Gebiete scheint ohne dieses Werk unmöglich.

C. Neuberg-Berlin i. d. Berliner Klin. Wochenschrift.

Dynamische Biochemie

Chemie der Lebensvorgänge

Von

Professor Dr. **Sigmund Fränkel**

Wien

1911. 18.60 Goldmark; gebunden 20.20 Goldmark

... Die deutsche Literatur ist nicht arm an guten Lehrbüchern der physiologischen Chemie — ich erinnere an das geistsprühende Werk Bunges, an die mustergültigen Leistungen Neumeisters und Hammarstens und schließlich an das berlinisch angehauchte Buch Abderhaldens.

Nun Fränkel kann den Vergleich mit diesen Autoren mit Ehren bestehen!

Auch sein Buch hat Eigenfarbe! Je größer die Zahl der Einzeltatsachen, je breiter der Arbeitsstrom wird, desto schwerer der Überblick. Einen solchen über das Gesamtgebiet der physiologischen Chemie bringt das vorliegende Werk. Charakteristisch für dasselbe ist, daß eine moderne physikalisch-chemische Auffassung der chemischen Lebensphänomene das Ganze durchzieht. Die Darstellung ist klar, sicher und gerade bei den schwierigsten Materien durchsichtig. Hervorzuheben ist die kritische Umspannung eines ganz gewaltigen literarischen Materials.

Das Buch ist ganz vorzüglich, sein Studium warm zu empfehlen.

Prager Medizinische Wochenschrift.

Nachträge.

2. Kap. A. 4. Leslie J. Harris, The physico-chemical theory of titration and its application to biochemical problems. Science Progress 19, 251; 1924.
 2. Kap. A. 6. Pearsall and J. H. Priestley, The New Phytologist 22, 185; 1923.
 2. Kap. D. Erik Ohlsson, Skand. Archiv. f. Physiol. 41, 77; 1921. p_H Optimum der Succino-Reduktase.
 3. Kap. B. (S. 82). Zsigmondy, Zs f. physik. Chem. 111, 211; 1924. Anormaler osmotischer Druck mehrwertiger Salze hochmolekularer Säuren und Basen.
 3. Kap. F. M. Dixon und Thuslow, Biochem. JI 18, 971; 1924. Adsorption der Xanthin-oxydase.
 3. Kap. F. K. George Falk, Am. Chem. Soc. 37, 226; 1915.
 4. Kap. C. Oppenheimer und B. Kuhn, Die Fermente und ihre Wirkungen, 5. Aufl., Leipzig 1924. — K. George Falk, The Chemistry of Enzyme Actions, Second Edition, New York. 1924.
 4. Kap. E. Widmark und C. A. Jeppson, Skand. Archiv f. Physiol. 41, 200; 1922 und 42, 43, 1922.
 9. Kap. S. G. Hedin, Grundzüge der physikalischen Chemie in ihrer Beziehung zur Biologie. 2. Aufl. München 1924.
-