

Über eine empirische Formel für die enzymatische Eiweiß-Spaltung.

Von

K. G. Dernby.

Mit einer Kurvenzeichnung im Text.

(Aus dem biochemischen Laboratorium der Hochschule Stockholm.)
(Der Redaktion zugegangen am 24. Januar 1914.)

Die chemische Dynamik enzymatischer Reaktionen wird schon seit etwa 3 Jahrzehnten bearbeitet, und von vielen Forschern sind Formeln und Gesetze aufgestellt worden, die für die Spaltung verschiedener Stoffe gelten sollen. Aber es ist nicht gelungen, ein einheitliches Gesetz für monomolekulare, enzymatische Reaktionen zu geben, das allgemein gültig ist. Diese Reaktionen verlaufen ganz verschieden, je nach der Art des gespaltenen Stoffes und des hierbei wirksamen Enzyms. Daher sind diese Gesetze mehr oder weniger speziell; so z. B. folgt die Spaltung des Wasserstoffsuperoxyds durch Katalase¹⁾ in der Regel der einfachen monomolekularen Formel, welche, wie bekannt, lautet:

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

wenn mit a die vorhandene Stoffmenge und mit x die nach der Zeit t umgesetzte Menge bezeichnet wird, k ist eine Konstante.

Die von Schütz²⁾ gefundene Regel, daß die von verschiedenen Mengen Pepsin in einer bestimmten Zeit verdaute Menge Eiweiß der Quadratwurzel aus diesen Pepsinmengen proportional, und daß bei konstant gehaltener Menge Pepsin das verdaute Eiweiß der Quadratwurzel aus der Zeit proportional ist, spielt in der Dynamik der Enzyme eine sehr große Rolle. Die Schützsche Regel wird mathematisch ausgedrückt:

$$K_S = \frac{x}{\sqrt{t}}$$

mit den gewöhnlichen Bezeichnungen.

¹⁾ Senter, l. c., S. 282. — Euler, Hofm. Beitr., Bd. 7, S. 1, 1905. — Waentig, Diese Zeitschrift, Bd. 72, S. 226, 1911.

²⁾ Emil Schütz, Diese Zeitschrift, Bd. 9, S. 577, 1885.

Aus dieser Regel hat Arrhenius¹⁾ seine bekannte Formel abgeleitet, die mit denselben Bezeichnungen lautet:

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

Diese ist, wie man sieht, eine Modifikation der monomolekularen Formel.

Eine andere Modifikation unter Annahme, daß die entstandenen Reaktionsprodukte die Reaktionsgeschwindigkeit verzögern, ist von Henri²⁾ gegeben. Sie lautet in ihrer einfachsten Form:

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

Es gibt ja noch eine große Zahl Reaktionsformeln, mehr oder weniger empirisch, aber die oben erwähnten sind die wichtigsten und die am meisten gebrauchten.

Während einer Arbeit mit Hefe-Eiweiß³⁾ untersuchte ich die autolytischen Vorgänge in den Hefezellen oder was dasselbe ist, die Verdauung der Hefe durch die Endotryptase. Die Versuchsanordnungen waren in wenigen Worten folgende: In 5—10 Erlenmeyer-Kölbchen wurden je 10 g gewöhnlicher Brauereihefe eingewogen, mit 10 ccm Glycerin plasmolysiert, 60 ccm chloroformhaltiges Wasser zugesetzt, und die Kolben in einen Thermostaten bei 37° gestellt. Nach gewissen Zeitintervallen wurde ein Kolben herausgenommen, der Inhalt auf 100 ccm verdünnt, das Eiweiß koaguliert und mit den Heferesten abfiltriert. Im Filtrat wurde dann der in Lösung gegangene Stickstoff nach Kjeldahl, und der frei gewordene Aminostickstoff durch Formoltitration nach Sørensen bestimmt.

Wenn die Zeit ($t =$ Stunden) als Abszisse, der durch die Autolyse frei gewordene Aminostickstoff ($x = \% N_2$) als Ordinate in einem Diagramme aufgetragen wurden, ergaben

¹⁾ Arrhenius, Medd. fr. k. Vetenskaps Akad. Nobelinst., I. 9.

²⁾ Zeitschr. f. physik. Chem., 1902, Bd. 39, S. 194.

³⁾ Siehe weiteres in der vorhergehenden Mitteilung von Euler und Dernby.

sich in allen untersuchten Fällen immer ähnliche Kurven, die nur ein wenig von der Kurve A auf der Figur abwichen.

Die Kurve A enthält die Werte eines Versuches, welcher in Tabelle 1 angegeben ist.

Sie fällt fast vollständig mit derjenigen

Kurve zusammen, welcheman erhält, wenn man von den anderen Versuchen den Mittelwert nimmt. Wie man sieht, verläuft die Kurve nicht logarithmisch — daher gilt die monomolekulare Reaktions-

formel nicht — und auch nicht linear, sondern sie liegt zwischen diesen beiden Grenzfällen.

Ich versuchte, ob sie irgend einer der oben erwähnten Regeln folgte, und berechnete die Werte von K_S , K_A und K_H , die in der Tabelle 1 stehen.

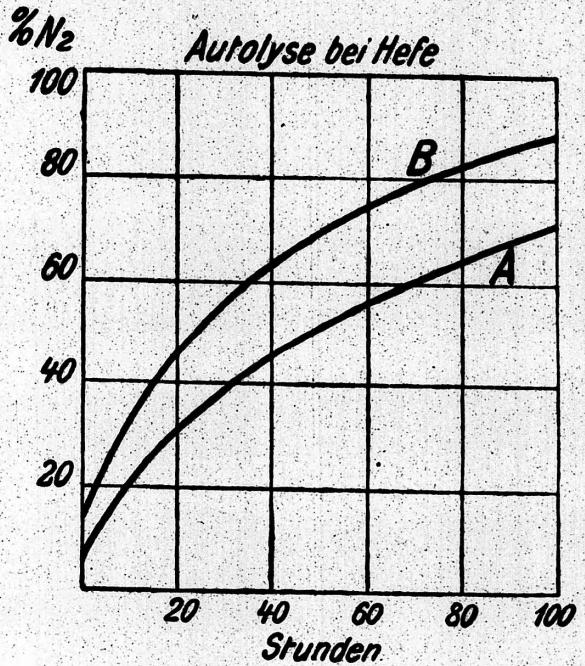


Tabelle 1.

Autolyse gewöhnlicher Hefe bei 37°.

t (Stunden)	x	K_S	K_A	K_H	k
0	8)	—	—	—	—
4	15	7,5	3,13	0,033	0,066
10	24	7,6	3,45	0,021	0,067
16	30	7,5	3,54	0,017	0,067
25	37	7,4	3,68	0,014	0,070
40	45	7,13	3,70	0,011	0,067
64	58	7,25	4,50	0,009	0,072
88	67	7,13	4,90	0,008	0,075
100	70	7,0	5,04	0,0075	0,075
112	72	6,8	5,00	0,007	0,073

Die fetten Ziffern sind direkt beobachtet, die anderen sind graphisch interpoliert.

Die Konstanten K_H und k sind wie in den folgenden Tabellen mit dekadischen Logarithmen berechnet.

Wie aus der Tabelle hervorgeht, stimmt die Schützsche Regel in diesem Falle sehr gut, die Arrheniussche weniger und Henris Formel gar nicht. K_H der letzteren Formel sinkt mit zunehmenden t -Werten.

Tabelle 2.

Autolyse vorbehandelter Hefe bei 37°.

t	x	K_S	K_A	K_H	k
0	10	—	—	—	—
4	23	11,5	7,84	0,051	0,102
9	35	11,7	8,98	0,035	0,108
16	45	11,3	9,12	0,021	0,105
25	55	11,0	9,94	0,022	0,109
40	63	10,1	9,54	0,016	0,110
64	75	9,4	9,94	0,013	0,106
88	84	9,0	11,36	0,012	0,113
100 (e)	86	8,6	11,06	0,011	0,112

In Tabelle 2 sind die Daten für die Kurve B in der obigen Figur angegeben. Diese Kurve stellt ebenfalls einen Autolysevorgang und zwar unter denselben Bedingungen dar, bei welchen jedoch die Hefe vor der Autolyse in Lindnerscher Lösung vorbehandelt worden war. Dieselben Konstanten wie in Tabelle 1 sind auch hier berechnet.

Wie im ersten Falle stimmt K_A ziemlich gut, K_S dagegen weniger, und K_H nimmt auch hier stark ab.

Wenn aber die Reihe K_H in Tab. 1 näher untersucht wird, sieht man, daß das K_H annähernd kontinuierlich abnimmt. Z. B.

$$\text{für } t = 10 \text{ ist } K_H = 0,021$$

$$\text{• } t = 100 \text{ • } K_H = 0,0075 \text{ und}$$

$$\text{für } t = 16 \text{ • } K_H = 0,017$$

$$\text{• } t = 64 \text{ • } K_H = 0,009,$$

d. h. die Konstanten verhalten sich annähernd umgekehrt wie die Quadratwurzel aus den Zeiten. Auch für die übrigen Beobachtungen ergibt sich diese Beziehung.

Die obigen Zahlen können also durch die Formel dargestellt werden:

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

In den Tabellen habe ich unter k (ohne Index) die Werte für die Konstanten nach dieser letzten Formel aufgestellt.

Wie man sehen kann, sind diese Werte teils konstanter als die von K_A und K_S , teils ebenso konstant. So z. B. sind in Tab. 1 die Grenzen für die Abweichung

- für K_A 3,1 — 5,0
- « K_S 6,8 — 7,6
- « 100 k 6,6 — 7,5

und in Tab. 2 dieselben Daten.

- für K_A 7,8 — 11,4
- « K_S 11,7 — 8,6
- « 100 k 10,2 — 11,3

Um zu sehen, ob die Formel $k = \frac{1}{\sqrt{t}} \ln \frac{a+x}{a-x}$ nur die unter diesen speziellen Versuchsbedingungen erhaltenen Werte darstellt, oder eine allgemeinere Gültigkeit besitzt, habe ich als Beispiele einige frühere Versuche berechnet, die unten zu sehen sind.

Tabelle 3.
Verseifung von Äthylacetat durch NH_3 bei 14,8°.

t	% NH_3	K_H	k
1	17,5	(17,4)	0,154
2	25,5	22,0	0,160
3	30,7	21,2	0,159
5	38,5	20,9	0,158
10	51,2	20,9	0,155
15	59,6	20,9	0,154
22	67,5	20,6	0,150
30	74,5	21,2	0,153
50	84,8	20,8	0,152
70	91,1	21,6	0,159
100	95,3	21,1	0,161

Tabelle 3 ist der oben erwähnten Abhandlung von Arrhenius entnommen, aber in der etwas verkürzten Form, die in der «Enzymchemie» von Euler¹⁾ angegeben ist. Sie stellt das Beispiel dar, aus welchem Arrhenius seine Formel herleitete, nämlich die Verseifung von Äthylacetat durch Ammoniak in einer sehr verdünnten Lösung, eine Reaktion, die der peptischen Verdauung ähnlich ist.

Die Arrheniussche Konstante, K_A , schwankt zwischen 20,6 und 22, und meine nun auf drei Dezimalen berechnete zwischen 0,150 und 0,161. Dies zeigt, daß auch in diesem Falle meine empirische Formel sich genau so gut wie Arrhenius' eigene den Beobachtungen anschließt.

Einem Versuche von Sjöqvist²⁾ über die Spaltung von Proteinen durch Pepsin sind die Zahlen der Tabelle 4 entnommen.

Tabelle 4.

Spaltung von Proteinen durch Pepsin.

100 ccm Lösung entspr. 3,23 g Albumin (0,05 n-HCl) + 20 ccm Pepsinlösung.

Stunden	x	K_A	K_S	k
1	19,55	22,2	19,55	0,173
2	28,75	25,9	20,33	0,182
4	41,66	30,6	20,83	0,192
6	48,58	29,7	19,83	0,185
8	52,57	25,1	18,54	0,180
9	55,52	28,0	18,44	0,181
12	59,40	25,6	17,15	0,170
16	63,34	25,1	15,81	0,172
20	68,03	22,5	15,21	0,162
32	74,58	19,5	13,18	0,150
48	81,70	18,3	11,79	0,144
64	86,34	—	10,49	0,142
96	92,24	18,0	9,41	0,142

¹⁾ Bergmann, Wiesbaden 1910.

²⁾ Sjöqvist, Skand. Arch. f. Physiol., Bd. 5, S. 317, 1895.

Hier liegt K_A zwischen 14,4 und 30,6

K_S » 9,4 » 20,8

und $100k$ » 14,2 » 19,2.

Wie man sieht, sind also die Werte von k viel konstanter als die nach den anderen Formeln berechneten.

Ich bin damit beschäftigt, die Gültigkeit der vorgeschlagenen Formel für andere enzymatische Vorgänge zu prüfen.