

Über Hemmung der Invertinwirkung.

Von
Anselm Eriksson.

(Aus dem medizinisch-chemischen Institut in Upsala.)

(Der Redaktion zugegangen am 23. März 1911.)

Herstellung des Invertins.

Frische Preßhefe wurde in einem Mörser mit gewaschenem Seesand und Wasser zerrieben. 1 kg Hefe setzte ich 1 l destilliertes Wasser zu. Die breiförmige Masse wurde dann im Laufe eines Tages kräftig geschüttelt. Darauf wurde die Masse durch ein Sehtuch gepreßt, um die größten Partikel zu entfernen. Das Abgeseihte wurde dann filtriert, ein Verfahren, das lange Zeit in Anspruch nahm, da ja der Filter von Sand und Hefepartikeln verstopft wurde. Das Filtrat, das völlig klar und von gelber Farbe war, gab Reaktion auf Eiweiß mit Gerbsäure. Das Eiweiß wurde nach Michaelis durch Schütteln mit Kaolin entfernt. Völlig klar wurde das mit Toluol gesättigte Filtrat der mit Kaolin behandelten Lösung im Eisschrank aufbewahrt. Die Reaktion der auf diese Weise erhaltenen Enzymlösung war stets eine saure und die Lösung gab positive Reaktion auf Phosphate. Um die Säure und andere Krystalloide zu entfernen, wurde die Flüssigkeit 2—7 Tage dialysiert. Nach zweitägiger Dialyse war gewöhnlich die saure Reaktion verschwunden, ebenso fiel die Phosphatreaktion negativ aus. Die Enzymlösung wurde vor dem Gebrauch filtriert und mit Wasser verdünnt.

Bei den meisten Versuchen wurden Rohzuckerlösungen von 20%iger Stärke verwendet, in einigen von 10%. Zu 20 ccm Zuckerlösung nahm ich im allgemeinen 10 ccm Enzymlösung.

Die Zeit der Inversion wurde verschieden gewählt. Meistens

war bei den einfachen Versuchen eine Zeit von 3—4 Stunden genügend, um starke Inversionswirkung zu erzeugen. Die Inversion wurde in einem Thermostaten von Ostwald bei 37° ausgeführt. Vor dem Mischen wurden die verschiedenen Lösungen in der Regel etwa $\frac{1}{2}$ Stunde vorgewärmt, so daß sie die Temperatur des Thermostaten besaßen.

Die Inversionsgröße wurde mit dem Polariskop bestimmt. Die von Hudson¹⁾ untersuchte bei der Invertzuckerbildung auftretende Multirotation wurde durch Zusatz von einem Tropfen Natronlauge vermieden, ein von O'Sullivan und Thompson zuerst ausgeführtes Verfahren. Durch das Alkali wird zugleich die Inversion aufgehoben. Die in nachstehenden Versuchen als ein Maß der Inversionsgröße angeführten Ziffern machen die Differenz zwischen der Anfangsdrehung (α_0) und der Drehung beim Aufheben der Inversion (α_1) aus, also $\alpha_0 - \alpha_1$.

A. Hemmung der Invertinwirkung infolge von Adsorption des Enzyms durch Kohle.

Daß feste Substanzen das Vermögen haben, Enzyme leicht aufzunehmen, ist eine seit langem bekannte Tatsache und wurde von verschiedenen Forschern für mehrere Fälle nachgewiesen.

v. Wittich²⁾ hat z. B. nachgewiesen, daß das Fibrin die Fähigkeit hat, Pepsin zu adsorbieren. Eine ähnliche Adsorbierbarkeit ist für Papain von Würtz,³⁾ für Trypsin u. a. von Grützner,⁴⁾ von Benderewsky⁵⁾ für Ptyalin nachgewiesen. Szumowski⁶⁾ hat die Adsorptionsfähigkeit des Fibrins für Lab, Diastase, Invertin, Maltase konstatiert, v. Heltzl,⁷⁾ daß Pepsin sich an fein verteilter Kohle, Schmirgel, Ziegelsteinpulver, Brücke,⁸⁾ daß Pepsin an frisch erzeugten Nieder-

¹⁾ Hudson, Journ. Amer. Chem. Soc., Bd. XXX, S. 1564 (1908).

²⁾ v. Wittich, Pflügers Archiv, Bd. V, S. 443.

³⁾ Würtz, Compt. rend., Bd. XCIII, S. 1104.

⁴⁾ Grützner, Bresl. ärztl. Zeitschrift, 1882, Nr. 17.

⁵⁾ Benderewsky, Virchows Archiv, Bd. CXXI, S. 554.

⁶⁾ Szumowski, Die Adsorption der löslichen Fermente durch das Fibrin. Inaug.-Diss., Freiburg 1898.

⁷⁾ v. Heltzl, zit. nach Dauwe.

⁸⁾ Brücke, Sitzungsber. d. k. k. Akad., Bd. XLIII, S. 601. Wien.

schlägen von BaSO_4 , $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ und Cholesterin heftet. Hammarsten,¹⁾ daß es an Niederschlägen von MgCO_3 und Fettsäuren, A. Meyer,²⁾ daß es an Niederschlägen von Blei und Kupfer, Jacoby,³⁾ daß es an Niederschlägen von Uranylacetat heftet, Glaessner⁴⁾ hat Lab und Pepsin durch Glas, Quarzsand, Stärke, Lycopodium und andere pulverisierte feste Substanzen gehemmt.

Dauwe⁵⁾ hat die Adsorption von Pepsin, Lab und Emulsin gezeigt. Als Adsorptionsmittel dienten Ton, Quarzsand, Marmor, Talcum, Glaspulver, Tierkohle, Kieselgur, Stärke, Cholesterin, Lecithin, Fibrin u. a.

Michaelis und Michaelis und Ehrenreich⁶⁾ haben die Bindung von Enzym durch Adsorption untersucht. Sie haben für Invertin gefunden, daß es von Kaolin nicht adsorbiert wird, eine Tatsache, die bei der Reindarstellung des Invertins mit Vorteil verwendet wird. Dagegen haben sie gefunden, daß das Invertin sich durch Kohle, Tonerde und Talcum (von diesem jedoch nicht in alkalischer Flüssigkeit) adsorbieren läßt.

Prof. Hedin, unter dessen Leitung ich nachstehende Untersuchung ausgeführt habe, hat zuerst nachgewiesen, daß die Adsorption von Enzymen durch feste Substanzen zu einer Hemmung der Enzymwirkung Veranlassung gibt, auch wenn die Enzymwirkung in der Gegenwart des Adsorbens stattfindet. Derselbe hat auch die Gesetze untersucht, nach denen die Hemmung von Trypsin-⁷⁾ und Labwirkung⁸⁾ infolge von Adsorption durch Kohle stattfindet. Er hat gezeigt, daß für die Hemmung von Trypsin und Lab durch Kohle die Reihenfolge des Mischens der Agenzien von großer Bedeutung ist, sowie auch der Einfluß der Zeit und der Temperatur, bei welchen

¹⁾ Hammarsten. Malys Jahresber., Bd. II. S. 118.

²⁾ A. Meyer, Landwirtschaftl. Versuchsstationen. Bd. XXVII. S. 247.

³⁾ Jacoby, Diese Zeitschrift. Bd. XXX. S. 135.

⁴⁾ Glaessner-Hofmeisters Beitr., Bd. I. S. 1. 1902.

⁵⁾ Dauwe, Hofmeisters Beitr., Bd. VI. S. 426.

⁶⁾ Michaelis u. M. und Ehrenreich, Biochem. Zeitschrift, Bd. VII. S. 488 (1907), Bd. X. S. 283 (1908), Bd. XII. S. 26 (1908).

⁷⁾ Hedin, Biochemical Journ., Bd. VI. S. 426 (1905).

⁸⁾ Hedin. Diese Zeitschrift, Bd. LX. S. 364 (1909).

die Agenzien vermischt und aufbewahrt werden. Er hat auch nachgewiesen, daß die Hemmung durch Kohle in bezug auf die Einwirkung oben erwähnter Faktoren mit der Hemmung des Trypsins und Labs durch Serumalbumin übereinstimmt.

Es wurde also folgendes gefunden:

1. Wenn das Enzym und die hemmende Substanz zunächst vermischt und einige Zeit aufbewahrt werden, und das Substrat nachher zugesetzt wird, ist die Hemmung größer, als wenn Substrat und Hemmungskörper vermischt und das Enzym dann zugesetzt wird.

2. Die Hemmung wächst bis zu einer gewissen Grenze mit der Zeit, während welcher Enzym + Hemmungskörper vor dem Zugeben des Substrats aufbewahrt wird.

3. Die so gefundene konstante obere Grenze der Hemmung steigt mit der Temperatur, bei welcher die Mischung Enzym + Hemmungskörper vor dem Zusatz des Substrats aufbewahrt wird.

4. Das einmal adsorbierte Enzym kann durch geeignete Mittel von dem Adsorbens zum Teil wieder losgelöst und in aktive Form überführt werden.

Hedin¹⁾ hat nämlich gezeigt, daß z. B. Casein und Traubenzucker, die einer Mischung von Kohle und Lab zugesetzt werden, die Fähigkeit haben, das von der Kohle aufgenommene Enzym in aktive Form zu überführen und zwar dadurch, daß jene Substanzen das Enzym von der Kohle verdrängen, indem sie selbst von derselben aufgenommen werden.

Im großen und ganzen stimmen auch nachstehende Versuche über die Hemmung der Invertinwirkung durch Kohle mit den eben erwähnten Versuchen überein.

Zuerst wurde geprüft, ob die Fähigkeit der Kohle, Rohrzucker bzw. Invertzucker zu adsorbieren, die gefundenen Resultate beeinflussen könnte. Diese Einwirkung war unter den von mir gewählten Versuchsbedingungen geringer, als daß der Einfluß derselben auf die gemessene Drehung nachgewiesen werden konnte. Ebenso wurde die mögliche Fähigkeit des Filtrierpapiers,

¹⁾ Hedin, Diese Zeitschrift, Bd. LXIII, S. 143 (1909).

das Enzym oder den Zucker aufzunehmen, untersucht. Irgend welche Einwirkung derselben auf die Drehung habe ich auch nicht nachweisen können. Reinste, fein pulverisierte Knochenkohle wurde bei diesen Versuchen gebraucht. Die Kohle wurde in Wassersuspension zugesetzt.

Einfache Hemmung.

Versuch I.

Gleiche Volumina von Invertinlösung und 1%iger Kohlensuspension wurden 2 Stunden bei 37° zusammen aufbewahrt. Vor dem Zusetzen der Rohrzuckerlösung wurde die Kohle abfiltriert. Der Kontrollprobe wurde statt der Kohle Wasser zugesetzt, so daß am Anfang des Versuchs die Konzentrationen von Enzym und Zucker stets dieselben waren. Alle Lösungen wurden bei 37° (oder der Inversionstemperatur) vorgewärmt. Die Inversionszeit war 12 Stunden.

5 ccm Enzym + 5 ccm 1%iger Kohlensuspension oder Wasser + 20 ccm 20%iger Rohrzuckerlösung.

Kontrollprobe: Enzym + Wasser + Zuckerlösung $\alpha_0 - \alpha_t$ 23°

Filtrat von der Kohlenenzymmischung

+ Zuckerlösung 15,63°

Die Kohle hat also einen Teil des Enzyms an sich genommen und dadurch eine Hemmung der Invertinwirkung verursacht.

Einfluß der Reihenfolge des Mischens.

Versuch II.

Die Mengenverhältnisse in diesem Versuch waren dieselben wie im Versuch I. Die Kohle war hier während der Inversion anwesend und wurde erst beim Schluß des Versuchs wegfiltriert. In 2. wurde die Mischung von Kohle + Enzym 1 Stunde vor dem Zugeben vom Substrat aufbewahrt; in 3. wurde die Kohle unmittelbar nach dem Zugeben des Substrats zugesetzt. Die Inversionszeit war 4½ Stunden.

5 ccm Enzym + 5 ccm 1%iger Kohlensuspension + 20 ccm 20%iger Rohrzuckerlösung.

- | | |
|--------------------------------------|--------|
| 1. Kontrollprobe ohne Kohle | 8,63° |
| 2. (Enzym + Kohle) 1 Stunde + Zucker | 3,56° |
| 3. Enzym + Zucker + Kohle | 7,47°. |

Der Einfluß der Reihenfolge des Mischens läßt sich hier deutlich merken. In 2. ist die Umsetzung die geringste; hier hat bereits vor dem Zugeben des Substrats die schwer reversible Verbindung zwischen Kohle und Enzym stattgefunden. Die Hemmung wird in diesem Falle eine kräftigere als in 3., wo das Substrat eine größere Möglichkeit hat, das Enzym an sich zu nehmen. In 3. ist die Umsetzung fast ebenso groß wie in 1., wo keine hemmende Substanz vorhanden ist.

Einfluß der Zeit und Temperatur.

Versuch III.

Die Mischungen von Invertin und Kohle (5 ccm Enzym-lösung + 5 ccm 0,5%iger Kohlensuspension) wurden verschiedene Zeiten und bei verschiedenen Temperaturen vor dem Zusatz vom Substrat (20 ccm 20%iger Rohrzuckerlösung) aufbewahrt. Die Kohle war während der ganzen Inversionszeit zugegen, und erst am Schluß des Versuchs wurde dieselbe wegfiltriert. Die Inversion geschah nach dem Aufbewahren der Enzymkohlenmischung und dem Zugeben des Substrats bei 37°. Die Inversionszeit 4 Stunden (die Ziffern geben wie gewöhnlich die Inversionsgröße an).

Zeit des Aufbewahrens der Enzymkohlenmischung in Stunden	Inversion nach dem Aufbewahren bei	
	20°	37°
1/4	—	5,51°
1/4	6,51°	4,73° (Maximum von Hemmung)
1 3/4	6,53°	5,63°
2 1/4	—	5,89°
4	6,07°	—
5	5,84° (Maximum von Hemmung)	—
7	5,83°	—

Aus diesem Versuch geht hervor, daß nach Erhalten der Kohlenenzymmischung bei einer höheren Temperatur (37°) sich

eine geringere Inversion ergibt, als bei einer niedrigen (20°). Beim Erhalten der Mischung bei der niedrigen Temperatur (20°) wächst die Hemmung bis zu einer gewissen Grenze. Dies war im obenstehenden Versuche bei der höheren Temperatur nicht der Fall; in diesem nahm nämlich die Hemmung, nachdem sie an ihrem Maximum angelangt, wieder ab.

Hier ist allerdings zu bemerken, daß die Ziffern, die die Inversion nach der Aufbewahrung der Enzymkohlenmischung bei 20° angeben, zu klein sind, und daß hierdurch der Hemmungsunterschied zwischen einer 20- und 37gradigen Aufbewahrung zu wenig merkbar wird. Die bei 20° erhaltene Mischung von Kohle und Enzym setzte nämlich bei dem Zusatz von der 37gradigen Zuckerlösung die Temperatur der ganzen Mischung etwas herab, so daß dieselbe zu Anfang der Inversion nicht völlig 37° erreichte.

Versuch IV.

Die Mengenverhältnisse und die Anordnungen waren in diesem Versuche diejenigen wie im vorigen. Nur wurde die Kohle vor dem Zugeben des Substrats von der Mischung Enzym + Kohle wegfiltriert. Die Inversionszeit war 3 Stunden.

Zeit des Aufbewahrens der Enzymkohlenmischung in Stunden	Inversion nach dem Aufbewahren bei	
	20°	37°
$\frac{1}{2}$	—	3,50°
1	—	3,16°
1	—	3,20°
2	—	2,58° (Maximum von Hemmung)
3	3,62°	3,10°
5	2,89° (Maximum von Hemmung)	—
6	2,90°	—

Dies stimmt also in bezug auf das Resultat mit dem Versuche III überein. Die Tatsache, daß die Kohle, wie im vorigen Versuche, in der Lösung während der Inversion zugegen bleibt, beeinflusst also nicht den Verlauf der Hemmung. Daß dagegen die Größe der Hemmung verschieden wird, je nachdem die

Kohlenenzymmischung oder deren Filtrat auf den Rohrzucker einwirkt, geht aus dem folgenden Versuch hervor.

Versuch V.

Gleiche Volumina Invertinlösung und 1%iger Kohlen-suspension wurden 15 Minuten bei 37° zusammen aufbewahrt. Dann wurde invertiert, einerseits mit dem Filtrat von dieser Mischung, andererseits mit dem gleichen Volumen der nicht fil-trierten Mischung. Die Inversionszeit war 3 Stunden.

10 ccm Kohlenenzymmischung oder deren Filtrat + 20 ccm 10%iger Rohrzuckerlösung.

Mit dem Filtrate 2,62°

Mit der nicht filtrierten Flüssigkeit 4,42°.

Dies stimmt auch mit den Verhältnissen bei Hemmung der Trypsin- und Labwirkung durch Kohle. Mehr Enzym wird wirksam, wenn die Kohle, die das Enzym aufgenommen hat, während der Inversion vorhanden ist, als wenn die Kohle vor dem Zugeben des Substrats entfernt wird. Daß dies nicht auf einer Adsorption des Enzyms durch das Filtrierpapier beruht, ist bereits nachgewiesen. Allem Anschein nach besitzt das Substrat die Fähigkeit, einen Teil des von der Kohle aufgenom-men Enzyms zu aktivieren, was dadurch geschehen kann, daß das Substrat das Enzym von der Kohle verdrängt und selbst dasselbe an sich nimmt.

Abfiltrieren der Kohle zu verschiedenen Zeiten, nachdem das Substrat zugesetzt wurde.

Versuch VI.

Gleiche Volumina von Invertinlösung und 1%iger Kohlen-suspension wurden 1 Stunde bei 37° vor dem Zusatz des Substrats aufbewahrt. In 1. wurde die Kohle vor der Zugabe des Substrats durch Filtrieren entfernt; in den übrigen Fällen wurde die Kohle nach dem Zugeben des Substrats zu ver-schiedenen Zeiten nach dem Beginn der Inversion entfernt.

Die Inversionszeit war für alle Proben 3 Stunden.

10 ccm Enzym Kohlenmischung oder Filtrat + 20 ccm 10%iger Rohrzuckerlösung.

1. Filtrieren vor dem Zugeben von Substrat	3,17°
2. Filtrieren 10 Min. nach dem Zugeben von Substrat	3,05°
3. » 25 » » » » » »	3,05°
4. » 40 » » » » » »	3,34°
5. » 60 » » » » » »	3,37°
6. » 180 » (die ganze Inversionszeit)	3,87°
Kontrollprobe ohne Kohle	4,12°

Hier wäre eine gleichmäßige Steigerung der Inversion zu erwarten. In 2. und 3. ist aber die Inversionsgröße etwas gefallen, um erst dann zu steigen. Woran dies liegt, ist vorderhand nicht zu entscheiden. Wie ich weiter unten zeigen werde, enthält die Invertinlösung hemmende Substanzen, welche vielleicht auch zum Teil durch die Kohle aufgenommen werden können. Nimmt man an, daß eine hemmende Substanz zunächst durch den Rohrzucker von der Kohle verdrängt wird, so wird offenbar daraus eine Steigerung der Hemmung resultieren. Die schließliche Abnahme der Hemmung in den Versuchen III und IV wäre vielleicht durch eine Aufnahme von hemmenden Substanzen seitens der Kohle zu erklären.

Versuch VII.

Die anfängliche Zunahme der Hemmung nach dem Zusatz des Rohrzuckers ist auch aus folgendem Versuch zu ersehen, der sich vom vorigen nur darin unterscheidet, daß die Zuckerlösung mehr konzentriert war und die Inversionszeit (12 Std.) länger. 10 ccm Enzymkohlenmischung oder Filtrat + 20 ccm 20%iger Rohrzuckerlösung.

Filtrieren vor dem Zugeben des Substrats	15,63°
Filtrieren 45 Minuten nach dem Zugeben des Substrats	13,35°
» 70 » » » » » »	13,50°
» 100 » » » » » »	14,10°
» 150 » » » » » »	14,85°
» 200 » » » » » »	15,00°
» 250 » » » » » »	15,10°
» 12 Stunden (die ganze Inversionszeit)	19,10°
Kontrollprobe ohne Kohle	23,00°

Fassen wir die Versuche mit Adsorption von Invertin durch Kohle zusammen, finden wir folgendes:

1. Der Einfluß der Reihenfolge des Mischens ist von großer Bedeutung. Die Hemmung ist stärker, wenn die Kohle einige Zeit vor dem Zugeben des Substrats mit dem Enzym aufbewahrt wird, als wenn die Kohle nach dem Zugeben des Substrats zugesetzt wird.

2. Im großen und ganzen wächst die Hemmung mit der Zeit, während welcher die Kohle mit Enzym aufbewahrt wird.

Beim Aufbewahren der Enzymkohlenmischung bei einer niederen Temperatur (20°) wächst die Hemmung bis zu einer gewissen Grenze. Bei einer höheren Temperatur (37°) erreicht die Hemmung ein Maximum, das doch wieder zurückgeht.

3. Der Rohrzucker besitzt die Fähigkeit, einen Teil des von der Kohle aufgenommenen Enzyms zu aktivieren.

B. Hemmung der Invertinwirkung durch Serum.

Bevor ich meine Versuche beschreibe, will ich in kurzen Zügen eine Übersicht über frühere Untersuchungen geben, die eine unmittelbare Bedeutung für die meinen haben können. Daß normales Serum das Vermögen hat, die Invertinwirkung zu hemmen, ist bisher in der Literatur wohl kaum erwähnt worden. Auf künstliche Weise hat man betreffs mehrerer Enzyme hemmende Substanzen (Antikörper) in Serum hergestellt. Was das Invertin betrifft, haben Schütze und Bergell¹⁾ versucht, ein Antiserum herzustellen, mit dem Vermögen, die Invertinwirkung zu hemmen. Diese Forscher injizierten während einer längeren Zeit — mehrerer Monate — Kaninchen kleine Invertindosen (Invertin v. Merck) und glaubten ein Antiserum hergestellt zu haben. Die Wirkung des Invertins auf Rohrzucker wurde in reduziertem Cu angegeben. Ihre Ziffern zeigen deutlich, daß der Effekt des hergestellten Antiserums sehr gering war; es gibt in ihrer Abhandlung keine Angabe betreffs der Reaktion der erhaltenen Sera und doch ist diese von

¹⁾ Schütze und Bergell. Zeitschrift für klin. Mediz.. Bd. LXI, S. 366 (1907).

großer Bedeutung, da man weiß, wie stark auch sehr geringe Mengen von Alkali bzw. Säure die Inversion des Rohrzuckers mit Enzym beeinflussen können. Bei solchen Versuchen muß auch die Eigenschaft des normalen Serums, selbst in die Invertinwirkung hemmend einzugreifen, in Rechnung genommen werden. Wie folgende Versuche zeigen, existiert nämlich eine solche Hemmung und somit ergibt sich auch die Möglichkeit, daß bereits normales Serum verschiedener Individuen verschieden kräftig hemmt. Damit Versuche, auf künstlichen Weg Antisera herzustellen, als beweisend angesehen werden sollen, muß man verlangen, daß der Unterschied der Wirkung zwischen normalem Serum und Antiserum mehr auffallend, als in den Versuchen von Schütze und Bergell der Fall ist. Im allgemeinen dürften wohl die Versuche, Antisera herzustellen, durch die Schwierigkeit, in anderen Hinsichten völlig vergleichbare Verhältnisse zwischen Kontrollsera und Antisera zu erhalten, sehr unsicher werden.

Daß normales Serum die Fähigkeit besitzt, Trypsin und Labwirkung zu hemmen, ist seit lange erkannt. Hedin,¹⁾ der auch den Verlauf der Hemmung mit Serum und Eierklar einem eingehenden Studium unterworfen hat, findet, daß hier ungefähr dieselben Faktoren, wie bei der Kohlenadsorption, von Bedeutung sind. So spielt bei der Hemmung die Reihenfolge des Mischens, die Zeit und die Temperatur eine große Rolle. Die hemmende Kraft des Serums auf Trypsin und Labwirkung wird im hohen Grade durch Einwirken von Säuren, z. B. Essigsäure (Trypsin) und Salzsäure (Lab) herabgesetzt. Die Hemmung erklärt Hedin so, daß, wie bei der Kohle, das Enzym irreversibel oder nur schwer reversibel am Hemmungskörper in Serum verfestigt wird, eine Verfestigung, die eine gewisse Zeit in Anspruch nimmt und in ausgiebigerer Weise erfolgt, je höher die Temperatur ist. Da das Substrat vor seiner Zersetzung mit dem Enzym sich verbindet, wird die am Hemmungskörper

¹⁾ Hedin, Journ. of Physiol., Bd. XXXII, S. 390 (1905).

Hedin, Biochemical Journ., Bd. I, S. 474 (1906).

Hedin, Diese Zeitschrift, Bd. LII, S. 412 (1907).

Hedin, Diese Zeitschrift, Bd. LX, S. 85 (1909).

verfestigte Enzymmenge geringer in Gegenwart von Substrat, als ohne dasselbe. Durch Behandlung mit Säure verliert das Serum seine Fähigkeit, das Enzym an sich zu verfestigen.

Ich lasse nun einen Bericht über meine Versuche betreffs der Fähigkeit nativen Serums, die Invertinwirkung zu hemmen, folgen.

Im allgemeinen ist Ochsen Serum verwendet worden. Daß auch z. B. Pferdeserum und Kaninchenserum hemmt, glaube ich gefunden zu haben.

Die Ablesung von Serumlösungen im Polariskop ist sehr schwierig infolge der Opalescenz des Eiweißes.

Einfache Hemmung.

a) Undialysiertes Serum.

Versuch VIII.

Ein Volumen Ochsen Serum wurde mit 3 Volumen Wasser verdünnt. Die alkalische Reaktion des Serums hemmt selbst die Invertinwirkung. Auch sehr geringe Mengen Alkali üben eine deletäre Wirkung auf Invertin aus. Das Serum wurde darum mit Salzsäure neutralisiert. Eine Fehlerquelle, auf die man auch achten muß, ist die optisch aktive Eigenschaft des Serums. Zu dem Zwecke wurde die Linksdrehung der angewandten Serumlösung bestimmt vor dem Beginn des Versuches. Die Enzymlösung, von welcher das Eiweiß entfernt war, zeigte keine optische Aktivität. Alle Lösungen wurden vorgewärmt. Serum und Enzym wurden vor dem Zugeben des Substrats 15 Minuten bei 37° aufbewahrt. Eine Kontrollprobe mit Wasser anstatt Serum und mit derselben Inversionszeit wie der Serumprobe wurde ausgeführt. Die Inversionszeit war 3 Stunden.

5 ccm Enzym + 5 ccm verdünntes Serum oder Wasser + 20 ccm 10%iger Rohrzuckerlösung.

Kontrollprobe ohne Serum 3,87°

Mit Serum 2,91°

Diese Ziffern zeigen eine Hemmung, die zwar nicht so ausgesprochen ist wie bei der Hemmung von Trypsin und Lab mit Serum, aber doch auffallend.

b) Dialysiertes Serum.

Versuch IX a.

Es ist klar, daß die Sicherheit, vollkommen neutrale Lösungen zu erhalten, größer ist, wenn diese stark dialysiert werden. Folgender Versuch will die Einwirkung dialysierten Serums zeigen. Das Serum wurde mit HCl neutralisiert und dann einer 3tägigen Dialyse unterworfen. Die Mengenverhältnisse und die Stärke der Rohrzuckerlösung waren dieselben wie im vorigen Versuch. Irgend eine quantitative Vergleichung mit vorigem kann man natürlicherweise nicht ausführen, da ja die Enzymlösung sich von Tag zu Tag leicht ändert.

Kontrollprobe ohne Serum 5,32°

Mit Serum 2,90°

Dieser Versuch, der mit derselben Anordnung wie im vorigen ausgeführt ist, stimmt auch in bezug auf das Resultat mit diesem.

Einfluß der Reihenfolge des Mischens.

Versuch IX b.

Auch folgende Ziffern wurden bei eben angeführtem Versuch erhalten. Die Agenzien werden in derselben Reihenfolge angeführt, in welcher sie zugesetzt wurden. In 3. wurde Hemmungskörper und Enzym 1 Stunde bei 37° vor dem Zugeben des Substrats aufbewahrt. In 2. wurde der Hemmungskörper unmittelbar nach dem Zugeben des Substrats zugesetzt. Die Inversionszeit war 3 Stunden.

5 ccm Enzym + 5 ccm verdünntes Serum oder Wasser + 20 ccm 20%iger Rohrzuckerlösung.

1. Kontrollprobe ohne Serum 5,32°

2. Enzym + Rohrzucker + Serum 3,40°

3. (Serum + Enzym) 1 Stunde + Rohrzucker 2,90°

Aus diesem Versuch ist also zu ersehen, daß die Reihenfolge des Mischens eine gewisse Rolle spielt. Die geringste Wirkung wird erhalten, wenn die Reihenfolge ist: Hemmungskörper — Enzym — Substrat. Doch erhält man auch eine beträchtliche Hemmung beim Mischen: Substrat — Enzym — Hem-

mungskörper. Dies stimmt auch mit dem bei den Versuchen Hedins über Hemmung von Trypsin und Lab und den oben beschriebenen über Kohlenadsorption gefundenen überein. Der Einfluß der Reihenfolge des Mischens geht auch aus folgendem Versuche hervor.

Einfluß der Zeit und Temperatur.

Versuch X.

Ein Volumen mit Salzsäure neutralisierten Serums wurde mit 3 Volumina Wasser verdünnt. Gleiche Volumina von Serum und Enzymlösung wurden zu verschiedenen Zeiten vor dem Zusetzen des Substrats bei 37° zusammen aufbewahrt. In 2. wurde der Hemmungskörper unmittelbar nach dem Zusatz vom Substrat zugesetzt. In der Kontrollprobe ohne Serum wurde ein entsprechendes Volumen Wasser hinzugefügt. Die Inversionszeit war 3 Stunden.

5 ccm verdünntes Serum oder Wasser + 5 ccm Enzym + 20 ccm 10%iger Rohrzuckerlösung:

1. Kontrollprobe ohne Serum	5,52°
2. Enzym + Rohrzucker + Serum	3,27°
3. (Enzym + Serum) 10 Min. aufbewahrt + Rohrzucker	2,97°
4. (Enzym + Serum) 20 » » + Rohrzucker	2,97°
5. (Enzym + Serum) 30 » » + Rohrzucker	3,07°

Versuch XI.

Dieser Versuch wurde wie der vorige ausgeführt, jedoch mit dem Unterschied, daß stark dialysiertes Serum von derselben Verdünnung wie im vorigen benutzt wurde.

1. Kontrollprobe ohne Serum	5,32°
2. Enzym + Rohrzucker + Serum	3,40°
3. (Enzym + Serum) 15 Min. aufbewahrt + Rohrzucker	3,24°
4. (Enzym + Serum) 30 » » + Rohrzucker	3,13°
5. (Enzym + Serum) 60 » » + Rohrzucker	2,90°

Dieser Versuch wie auch der vorhergehende zeigt, daß die Hemmung mit der Zeit wächst, während welcher die Mischung von Enzym + Hemmungskörper zusammen aufbewahrt worden ist. Der vorhergehende Versuch deutet auch darauf hin, daß

die Hemmung schließlich eine gewisse Grenze erreicht. Dies sieht man jedoch deutlicher aus folgendem Versuche.

Versuch XII.

Dieser Versuch soll den Einfluß der Temperatur, bei welcher die Mischung von Enzym + Hemmungskörper vor dem Zusatz des Substrats erhalten wird, zeigen.

Dialysiertes Ochsen Serum, mit 3 Volumen Wasser verdünnt, wurde gebraucht. Zwei auf völlig dieselbe Weise bereitete Mischungen von Enzym und Hemmungskörper wurden während verschiedener Zeiten vor dem Zusatz des Substrats aufbewahrt, die eine bei 12°, die andere bei 37°.

Die Inversion wurde dann bei 37° ausgeführt und dauerte 3 Stunden.

5 ccm Enzym + 5 ccm verdünntes, dialysiertes Serum + 20 ccm 20%iger Rohrzuckerlösung.

Zeit des Aufbewahrens in Stunden	Inversion nach dem Aufbewahren	
	bei 12°	bei 37°
1/4	—	12.15°
1/2	12.03°	11.95°
1	—	11.73° (Maximum der Hemmung)
2	11.95° (Maximum der Hemmung)	11.70°
3	11.95°	—

Die Hemmung wächst also beim Erhalten der Mischung von Enzym + Hemmungskörper bis zu einer gewissen Grenze und die Hemmung wird relativ höher, je höher die Temperatur ist, bei welcher die Mischung erhalten wird. Es mag hier bemerkt werden, daß in diesem letzten Versuch die Mischung von Enzym und Hemmungskörper, als sie dem Substrat, das eine Temperatur von 37° hatte, zugefügt wurde, in den Fällen, wo der Versuch die Einwirkung einer niederen Temperatur zeigen will, selbst eine Temperatur von 12° besaß und also die Temperatur der ganzen Mischung etwas herabsetzte. Darum sind in diesem Versuch die Ziffern, die die Inversion bei Einwirkung von der bei 12° erhaltenen Mischung angeben, ein

wenig zu niedrig und also in diesem Falle die Hemmung in der Tat geringer, als die Ziffern angeben.

Überhaupt stimmen diese Resultate mit den von Hedin bei Trypsin und Lab erhaltenen. Das hemmende Vermögen des Serums auf Invertin ist jedoch viel geringer, als auf Trypsin und Lab.

Einfluß der Säure auf das hemmende Vermögen des Serums.

Versuch XIII.

Hedin¹⁾ hat Serum mit Säure behandelt und dabei gefunden, daß das hemmende Vermögen des Serums auf die Trypsinverdauung bei Behandeln mit Essigsäure verloren geht. Was die Hemmung von Labwirkung betrifft, ist diese so gut wie vollkommen bei Behandeln mit Salzsäure aufgehoben worden.

Folgender Versuch will den Einfluß der Säure auf Serum hinsichtlich der Rohrzuckerinversion zeigen.

10 ccm dialysiertes mit drei Volumina Wasser verdünntes Serum wurde 1 Stunde bei 37° mit 2 ccm 1%iger Salzsäure behandelt. Nach dem Behandeln wurde mit 2 ccm äquivalenter Natronlauge neutralisiert (A). Eine Kontrollprobe mit 10 ccm Serum und 4 ccm entsprechender Neutralsalzlösung (B) wurde ausgeführt. Die Inversionszeit war 3 Stunden.

5 ccm Invertin + 5 ccm Serummischung + 20 ccm 10%iger Zuckerlösung.

Ohne Serum	6,12°
Mit A (Behandlung mit HCl)	4,68°
Mit B (Neutralsalz)	4,11°

Diese Ziffern zeigen, daß das hemmende Vermögen des Serums durch Behandlung mit HCl etwas herabgesetzt wird. Die Säure vermag jedoch nicht dasselbe ganz aufzuheben, wie das Verhältnis bei Trypsin und Lab ist.

Hier ist also zu ersehen, daß Serum eine beträchtliche Hemmung auf Invertin ausübt. Diese Tatsache ist bei früheren Untersuchungen über Antisera gegen Invertin nicht in Rechnung

¹⁾ Vorher zitiert.

genommen worden, sowie auch nicht die Einwirkung der Reihenfolge des Mischens der Agenzien, die bei Hemmung durch Serum eine gewisse Rolle spielt.

C. In der Invertinlösung selbst befindliche hemmende Substanzen.

Daß es in Enzymlösungen Substanzen geben oder z. B. durch Erhitzen von Enzymlösungen Stoffe hergestellt werden können, welche die Enzymwirkung hemmen, ist hinsichtlich mehrerer Enzyme nachgewiesen. Über deren Natur sind die Angaben widersprechend. Es ist wohl anzunehmen, daß diese hemmenden Substanzen bei den Enzymreaktionen eine gewisse Rolle spielen können.

Pollak¹⁾ fand bei seinen Untersuchungen über die einheitliche Natur des Trypsins, daß eine erhitzte Enzymlösung eine beträchtliche Hemmung auf das Trypsin ausübte. Die Hemmung war nur gegen die Leimverdauung gerichtet, während die Verdauung von Serum nur wenig durch den Hemmungskörper beeinflusst wurde. Die hemmende Substanz, die er Antiglutinase nennt, war kochbeständig und nicht dialysierbar.

Schwartz²⁾ hat infolge der Untersuchungen von Pollak auch andere Enzyme z. B. Pepsin in bezug auf in dem Enzym selbst vorhandene hemmende Substanzen geprüft. Er fand ein thermostabiles Antipepsin von nicht proteinartiger Natur. Das Antipepsin wird nicht beim Kochen gebildet, sondern es findet sich als solches in der Enzymlösung präformiert. Der Hemmungskörper greift das Substrat nicht an.

Cramer und Bearn³⁾ haben Pepsin, Lab und Taka-diastase geprüft. Durch Zusetzen von nicht zu stark erhitztem Enzym zu nicht erhitztem haben sie eine Hemmung der Enzymwirkung gefunden. Auf 56—60° erhitzte Enzymlösungen setzten die Wirkung aktiven Enzyms herab. Die hemmende Substanz wurde im allgemeinen bei 100° zerstört. Der Hemmungskörper

¹⁾ Pollak, Hofmeisters Beitr., Bd. VI, S. 95.

²⁾ Schwartz, Hofmeisters Beitr., Bd. VI, S. 524.

³⁾ Cramer und Bearn, Biochemic Journ., Bd. II, S. 174 (1907). —
 Proc. of the Physiol. soc., June 2, 1906.

dialysiert nicht durch Pergament. Der Prozeß beruht nicht auf einem Antiferment. Möglicherweise war eine Verbindung zwischen Substrat und Hemmungskörper vorhanden.

Schließlich hat Porter¹⁾ enzymhemmende Substanzen in Enzymlösungen nachgewiesen. Er untersuchte die Wirkung von Kollodiummembranen auf Pepsin, Trypsin, Lab, Steapsin, Ptyalin, Emulsin und Takadiastase. Lösungen von allen diesen Enzymen, die Takadiastase ausgenommen, verloren bei Berühren von Kollodiummembranen ihre Enzymwirkung und zeigten dann, Ptyalin ausgenommen, eine hemmende Einwirkung auf die entsprechenden Enzyme.

Folgende Versuche zeigen, daß auch in Invertinlösungen hemmende Substanzen sich finden.

Einwirkung von gekochter Invertinlösung.

Wie in den Versuchen über Hemmung mit Kohle und Serum wurde darauf geachtet, daß in den zu vergleichenden Proben stets dasselbe Volumen und dieselbe Konzentration von Substrat und von Enzym vorhanden waren. Es ist auch von Belang, Fehlerquellen, wie z. B. die saure Reaktion, zu eliminieren. Wird nämlich undialysierte gekochte Enzymlösung zugesetzt, ergibt sich eine befördernde Einwirkung, die man einem spezifischen Koenzym zuschreiben könnte. Diese Förderung der Inversion liegt an der sauren Reaktion, die stets in Invertinlösungen, die nicht dialysiert sind, vorhanden ist oder beim Aufbewahren entsteht. Um die hemmende Substanz nachzuweisen, muß man also die Enzymlösungen der Dialyse unterwerfen oder sie auf andere Weise neutralisieren. Die saure Reaktion nicht nur neutralisiert die Wirkung des Hemmungskörpers, sondern wirkt auch darüber hinaus fördernd.

In nachstehenden Versuchen waren die Enzymlösungen während verschiedener Zeiten (2—6 Tage) dialysiert worden. Im allgemeinen war die hemmende Eigenschaft wahrzunehmen, ehe alle Säure weg-dialysiert war. Nach 2—3tägigem Dialysieren wurde die größte Hemmung erhalten. Den Kontroll-

¹⁾ Porter. Biochem. Zeitschrift, Bd. XXV, S. 301 (1910).

proben ohne Hemmungskörper wurde eine entsprechende Menge Wasser zugesetzt. Die Enzymlösung wurde etwa 2—5 Min. bei 100° gehalten.

5 ccm aktives dialysiertes Invertin
 + 5 » erhitztes
 + 20 » 20%iger Rohrzuckerlösung.

Versuch XVI. Inversionszeit 3 Std.

Kontrollprobe ohne Hemmungskörper 0,61°
 Mit Hemmungskörper 0,09°.

Versuch XIV.

Wie das vorige, aber mit kräftigerem akt. Enzym. Inversionszeit
 4 Std.

Kontrollprobe 2,28°
 Mit Hemmungskörper 0,58°.

Versuch XV. Inversionszeit 4 Std.

Kontrollprobe 0,62°
 Mit Hemmungskörper 0,07°.

Versuch XVI. Inversionszeit 4 Std.

Kontrollprobe 2,61°
 Mit Hemmungskörper 0,28°.

Aus diesem ist zu ersehen, daß gekochte dialysierte Invertinlösungen eine kräftig hemmende Einwirkung auf das aktive Enzym ausüben. Da ja in diesen Versuchen Erhitzung bis 100° gebraucht wurde, muß man wohl annehmen, daß der in dem Enzym gefundene Hemmungskörper thermostabil ist.

Zusetzen von Filtraten von mit Kohle behandeltem Enzyme.

Aus oben beschriebenen Versuchen ist nicht zu entscheiden, ob der Hemmungskörper als solcher in dem aktiven Enzym sich findet oder erst durch Erhitzen gebildet wird. Um diese Frage zu entscheiden, muß man auf irgend eine Weise das Enzym aus der Lösung entfernen, ohne dieselbe zu erhitzen. Das Enzym durch Alkali zu zerstören, ist nicht angängig, da ja möglich wäre, daß der Hemmungskörper selbst davon beeinflußt werden könnte. Um starke chemische Agenzien zu

vermeiden, wurde das Enzym völlig durch Kohle entfernt, dann wurde das Filtrat von der mit Kohle behandelten Enzymlösung auf sein Hemmungsvermögen geprüft. Um die fördernde Einwirkung der sauren Reaktion zu vermeiden, wurde auch hier das Enzym dialysiert. 10 ccm dialysierter Invertinlösung wurden mit 5 ccm 4%iger Kohlensuspension vermischt und $\frac{1}{2}$ —1 Stunde bei 37° aufbewahrt. Die Menge der Kohle wurde so groß gewählt, daß das Enzym aus der Lösung völlig entfernt wurde. Es war für das Resultat gleichgültig, ob die Enzymkohlenmischung bei einer niederen oder höheren Temperatur aufbewahrt wurde. Die auf diese Weise behandelte Enzymlösung wurde durch doppelte Filter filtriert. Das Filtrat wurde zu dem aktiven Enzym hinzugefügt. Die Inversion wurde bei 37° ausgeführt. Kontrollproben wurden ausgeführt, um zu zeigen, daß das Enzym durch die Adsorption von der Kohle völlig entfernt war. Die Inversionszeit war 3 Stunden.

5 ccm Invertin + 5 ccm Filtrat von kohlenbehandeltem Enzym oder H₂O + 20 ccm 20%igen Rohrzuckers.

Versuch XVII.

Kontrollprobe	11,70°
Mit Kohlenfiltrat	10,35°

Das Kohlenfiltrat war in diesem Falle schwach sauer wegen der kurzen Dialyse (2 Tage). Doch ist die Hemmung deutlich, denn wie oben erwähnt wurde, ist es nicht nötig, daß alle Säure entfernt wird. Eine sehr schwache saure Reaktion vermochte nicht den Hemmungskörper völlig zu neutralisieren.

Versuch XVIII.

Stärkere Dialyse wurde bei diesem Falle benutzt. Das Kohlenfiltrat war neutral, mit Lackmuspapier geprüft.

Kontrollprobe	7,10°
Mit Kohlenfiltrat	5,08°

Also zeigt sich eine größere Hemmung, wenn man praktisch neutrale Kohlenfiltrate benutzt. Die Hemmung tritt bei Anwenden von Kohlenfiltrat zwar nicht so deutlich wie bei Anwenden von erhitztem Enzym hervor. Die Ursache ist die, daß die Lösung des Hemmungskörpers durch den Zusatz von

der Kohlensuspension mehr verdünnt wird. Infolge dieser Versuche ist zu behaupten, daß mindestens ein Teil des Hemmungskörpers als solcher in der Invertinlösung vorhanden ist und nicht durch Erhitzen gebildet wird.

Es scheint, als ob Erhitzen keine Einwirkung auf den so erhaltenen Hemmungskörper ausübte.

Einwirkung von Dialyse auf die Hemmungskörper.

Bei den Versuchen über den aus dialysierten Lösungen erhaltenen Hemmungskörper wurde beobachtet, daß verschieden kräftig dialysierte Enzymlösungen verschieden stark hemmten. Eine Reihe Versuche wurden deshalb mit Zusatz von verschieden kräftig dialysiertem Enzym ausgeführt. Eine gewisse Menge frisch bereiteter Invertinlösung wurde in einem Dialyseschlauch eingeschlossen und Toluol wurde zugesetzt. Die Dialyse wurde gegen destilliertes Wasser ausgeführt. Das Wasser wurde alle Tage gewechselt. Alle Tage wurde eine gewisse Menge Enzymlösung aus dem Schlauch herausgenommen und aufbewahrt. Alle Versuche wurden zu gleicher Zeit ausgeführt. Nachstehende Ziffern muß man jedoch nur als approximativ vergleichbar ansehen. Es ist nämlich sehr schwierig zu vermeiden, daß die Lösung in dem Dialyseschlauch ihr Volumen ein wenig verändert.

Die aus dem Dialyseschlauch herausgenommenen Enzymlösungen wurden mit Kohle behandelt, um das Enzym zu entfernen.

Zu 10 ccm Enzymlösung wurden 5 ccm 4%iger Kohlensuspension hinzugefügt. Dann wurde filtriert. Die Filtrate von der Kohlenbehandlung wurden aktivem Enzym zugesetzt. Das Kohlenfiltrat und die Enzymlösung wurden 1 Stunde bei 37° zusammen aufbewahrt. Das aktive Enzym war wie gewöhnlich dialysiert.

Versuch XIX.

5 ccm Enzym + 5 ccm Filtrate + 20 ccm 20%igen Rohrzuckers.

1. Ohne Kohlenfiltrate	9,72°
2. Mit Kohlenfiltrat von undialysiertem Enzym	10,02°
3. „ „ von 1 Tage dialysiertem „	7,76°
4. „ „ „ 2 „ „ „	7,11°
5. „ „ „ 3 „ „ „	8,03°
6. „ „ „ 4 „ „ „	8,33°
7. „ „ „ 6 „ „ „	8,33°
8. „ „ „ 9 „ „ „	7,78°

2. zeigt, daß das Filtrat des undialysierten Invertins die Inversion befördert und zwar durch ihre saure Reaktion. Dann sinken die Werte herab. Dies ist so zu erklären, daß die befördernde Säure geschwind wegdialysiert, worauf die hemmende Natur der Lösung hervortritt. Dann steigt wieder die Enzymwirkung. Dies wird daraus erklärt, daß die hemmende Substanz selbst dialysiert, wenn auch sehr langsam, eine Tatsache, auf die auch folgender Versuch hindeutet.

Die invertierende Kraft der Enzymlösung wurde nach verschieden starker Dialyse geprüft.

Versuch XX.

Das aktive Enzym, undialysiert	3,43°
„ „ „ 1 Tag dialysiert	2,58°
„ „ „ 2 Tage „	2,53°
„ „ „ 3 „ „	2,81°
„ „ „ 4 „ „	2,96°
„ „ „ 5 „ „	2,98°

Die Erklärung dieses Verhältnisses ist dieselbe wie im vorigen Versuch. Die anfängliche starke Enzymwirkung beruht auf der sauren Reaktion. Die Säure dialysiert dann geschwind weg und die Wirkung wird herabgesetzt. Die Wirkung steigt wieder, denn der Hemmungskörper wird durch die Dialyse, obschon viel langsamer als die Säure, entfernt.

Einwirkung von Dialysate.

Oben erwähnte Versuche deuten darauf hin, daß das hemmende Prinzip in der Invertinlösung dialysierbar ist, denn das Kohlenfiltrat von stark dialysiertem Enzym hemmt weniger

als das nach kürzerer Dialyse. Daß die hemmende Substanz, wenn sie dialysierbar ist, durch Dialyse mit größerer Schwierigkeit als z. B. Phosphate entfernt wird, ist leicht zu ersehen. Nach etwa 2tägigem Dialysieren wird die Phosphatreaktion negativ. Die hemmende Substanz dagegen kann man sogar nach 6—9tägigem Dialysieren in der Lösung aufweisen.

Um das aus der Enzymlösung Wegdialysierte hinsichtlich der hemmenden Substanz zu untersuchen, wurde ein Dialyseschlauch mit destilliertem Wasser gefüllt und mit frisch bereiteter undialysierter Enzymlösung umgeben. Die Enzymlösung wurde 2—3 mal erneut. Nach etwa 2tägigem Dialysieren wurde die Flüssigkeit in dem Dialyseschlauch geprüft. Diese Flüssigkeit sollte nun die in der Enzymlösung dialysierbaren Substanzen enthalten. Auch in diesem Falle muß man natürlicherweise genau darauf achten, daß die Flüssigkeit vor dem Untersuchen neutral ist. Das so erhaltene Dialysat reagiert nämlich sauer, eine Tatsache, die die Inversion fördern sollte. In nachstehenden Versuchen wurde das Dialysat mit NH_3 oder NaOH neutralisiert. Das Neutralisieren ist sehr schwierig auszuführen, da ja selbst ein sehr winziger Überschuß von Alkali eine hemmende Wirkung ausübt. Im allgemeinen wurde nur so viel Alkali hinzugefügt, daß eine äußerst schwache saure Reaktion erhalten wurde.

5 ccm Invertin + 5 ccm Dialysat oder Wasser + 20 ccm 20%iger Rohrzuckerlösung.

Versuch XXI.

3 Stunden Inversion. Das Dialysat mit NH_3 neutralisiert.

Kontrollprobe ohne Dialysat 12,85°

Mit Dialysat 8,28°

Versuch XXII.

4 Stunden Inversion. Das Dialysat mit NH_3 neutralisiert.

Kontrollprobe ohne Dialysat 8,08°

Mit Dialysat 5,00°

Versuch XXIII.

4 Stunden Inversion. Das Dialysat mit NH_3 neutralisiert.

Kontrollprobe ohne Dialysat 6,91°

Mit Dialysat 2,28°

Versuch XXIV.

4 Stunden Inversion. Das Dialysat mit NaOH neutralisiert.	
Kontrollprobe ohne Dialysat	7,49°
Mit Dialysat	1,39°

Versuch XXV.

4 Stunden Inversion. Das Dialysat mit NH ₃ neutralisiert.	
Kontrollprobe ohne Dialysat	12,59°
Mit Dialysat	7,76°

Hieraus ist zu ersehen, daß das Dialysat viel kräftiger als das Filtrat von mit Kohle behandeltem Enzym hemmt. Das Neutralisieren des Dialysats braucht nicht vollständig zu sein, um kräftige Hemmung hervorzurufen. Daraus ist die Schlußfolgerung zu ziehen, daß die hemmende Substanz (oder vielleicht mehrere hemmende Substanzen, denn sehr schwierig ist zu entscheiden, ob das hemmende Prinzip einheitlich ist) die Fähigkeit besitzt, durch Pergament zu diffundieren. Es ist jedoch aus oben beschriebenen Versuchen leicht ersichtlich, daß ihre Diffusionsfähigkeit nicht so groß ist, wie z. B. die der in der Enzymlösung vorhandenen Säure oder anderer Krystalloide, wie Phosphate u. a. Auch das Dialysat hemmt nach Erhitzen auf 100°; dessen hemmende Fähigkeit scheint jedoch bei starkem Erhitzen etwas herabgesetzt zu werden.

Einwirkung der Reihenfolge des Mischens.

Man kann nur fragen, auf welche Weise der in der Enzymlösung vorhandene Hemmungskörper seine Wirkung ausübt. Verbindet er sich mit dem Enzym? Die Hemmung mit Serum und Kohle, wie oben nachgewiesen ist, liegt an einer Verfestigung zwischen Hemmungskörper und Enzym.

Versuch XXVI.

Um diese Frage etwas zu beleuchten, wurde folgender Versuch angestellt. Der Hemmungskörper wurde durch Behandeln von dialysiertem Invertin mit Kohle hergestellt. 20 ccm Enzym wurden bei 37° mit 10 ccm 4%iger Kohlensuspension aufbewahrt. Dann wurde filtriert. In 2. wurden 5 ccm dieses Filtrates mit 5 ccm aktivem Enzym bei 37° 1 Stunde auf-

bewahrt. Dann wurde das Substrat (20 ccm 20%iger Rohrzuckerlösung) zugefügt. In 3. wurde der Hemmungskörper, 5 ccm Kohlenfiltrat, unmittelbar nach dem Zusetzen von Substrat hinzugefügt. Die Lösungen hatten alle am Anfang des Versuchs dieselbe Temperatur, 37°. Dann wurde bei 37° invertiert. Die Inversionszeit war 4 Stunden.

- | | |
|---|-------|
| 1. Kontrollprobe ohne Hemmungskörper | 6,93° |
| 2. (Enzym + Hemmungskörper) 1 Std. + Substrat | 4,85° |
| 3. Enzym + Substrat + Hemmungskörper | 4,73° |

Ähnliches Resultat ergibt sich auch bei Benutzung von erhitztem Enzym. Die Reihenfolge des Mischens spielt beim Anwenden dieses Hemmungskörpers offenbar nicht dieselbe Rolle, wie bei Hemmung mit Serum oder Kohle. Man muß also annehmen, daß in diesem Falle die Hemmung nicht wie bei Serum und Kohle stattfindet, wo die Reihenfolge eine wichtige Rolle spielt.

Zusammenfassung.

Das Invertin kann durch Kohle aus seiner Lösung völlig oder zum Teil aufgenommen werden. Bei der hierdurch erzeugten Hemmung der Invertinwirkung ist die Reihenfolge des Mischens der Agenzien von großer Bedeutung. Die Hemmung wird stärker, wenn die Kohle einige Zeit vor dem Zusetzen des Substrats mit dem Enzym aufbewahrt wird, als wenn die Kohle unmittelbar nach dem Zusetzen des Substrats hinzugefügt wird.

Im großen und ganzen wächst die Hemmung mit der Zeit, während welcher die Kohle mit dem Enzym aufbewahrt wird. Beim Aufbewahren der Enzymkohlenmischung bei der niederen Temperatur (20°) wächst die Hemmung bis zu einer gewissen Grenze. Bei der höheren Temperatur (37°) erreicht die Hemmung ein Maximum, das jedoch wieder ein wenig herabgeht.

Das Substrat besitzt die Fähigkeit, einen Teil des von der Kohle aufgenommenen Enzyms zu aktivieren.

Normales Serum besitzt auch die Fähigkeit, die Invertinwirkung zu hemmen. Auch bei Serum spielt die Reihenfolge des Mischens der Agenzien eine Rolle, doch keine so große.

wie bei der Adsorption durch Kohle. Die Hemmung wird größer, je längere Zeit die Serum-Enzymmischung vor dem Zusetzen des Substrats aufbewahrt wird. Bei Anwendung von Serum wächst die Hemmung bis zu einer gewissen Grenze mit der Zeit und Temperatur, während welcher die Serum-Enzymmischung vor dem Zusetzen des Substrats aufbewahrt wird. Hier liegt jedoch ein Unterschied von der Hemmung durch Kohle vor. Bei der Kohle sank die Hemmung, als sie ihr Maximum erreicht hatte, bei der höheren Temperatur wieder etwas herab.

In der Invertinlösung finden sich Hemmungskörper. Die in der Invertinlösung gefundenen Hemmungskörper sind als solche mindestens zum Teil in dem Enzym präformiert und entstehen nicht, wie andere beschriebene Hemmungskörper, beim Erhitzen des Enzyms.

Sie werden gar nicht, oder nur wenig, durch Erhitzen bis auf 100° beeinflusst.

Sie werden mindestens zum Teil nicht durch Kohle aufgenommen.

Die Hemmungskörper diffundieren, aber nur langsam, durch eine Membran.

Sie verfestigen sich nicht, wie z. B. Kohle und Serum, an dem Enzym, um ihre Wirkung ausüben zu können.