

Über den Temperaturkoeffizienten der Saccharasewirkung.

Von

Hans v. Euler und Ingvar Laurin.

(Mit 27 Figuren im Text.)

(Aus dem biochemischen Laboratorium der Hochschule Stockholm.)

(Der Redaktion zugegangen am 6. Januar 1920.)

In einer vorhergehenden Untersuchung¹⁾ haben wir den Temperaturkoeffizienten der enzymatischen Rohrzuckerspaltung erneut, und zwar bei festgelegter optimaler Acidität $p_H = 4,5$ bestimmt. Eine Berechnung der im Gebiet $0^\circ - 52^\circ$ gefundenen Inversionskonstanten nach der Arrheniusschen Temperaturformel

$$k_2 = k_1 e^{\frac{A(T_2 - T_1)}{R \cdot T_1 T_2}}$$

ergab mit steigender Temperatur etwas abnehmende A-Werte. Wir erhielten für das Gebiet

$$\begin{array}{ll} 0-20^\circ & \dots A = 10\,500 \pm 300 \\ 20-52^\circ & \dots A = 8\,800 \pm 500 \end{array}$$

in ziemlich guter Übereinstimmung mit früheren Beobachtungen aus dem hiesigen Laboratorium²⁾.

Die obigen Grenzen für die Berechnung der A-Werte waren in unserer erwähnten Arbeit willkürlich gewählt worden. Offenbar nimmt A mit steigender Temperatur kontinuierlich ab; wir sind durch die genannte Untersuchung im Besitz

¹⁾ Euler und Laurin, Diese Zeitschr. Bd. 108, S. 64 (1919).

²⁾ Euler und af Ugglas, Diese Zeitschr. Bd. 65, S. 124 (1910). — Euler und Kullberg, Diese Zeitschr. Bd. 71, S. 134 (1911).

eines hinreichenden Zahlenmaterials, um den „Gang“ von A genauer festzustellen, und wir haben nunmehr die Werte von A von 10 zu 10 Graden berechnet.

Beobachtungs- temperaturen	Differenz	Mittel- temperatur	Verhältnis der Inv.-Konst.	A
0,8°; 10,4°	9,6°	5,6°	2,025	11 400
10,4°; 18,9°	8,5°	14,2°	1,69	10 200
45,3°; 52,2°	6,9°	48,8°	1,21	5 800
0,8°; 18,9°	18,1°	9,9°	3,42	10 900
20,0°; 45,3°	25,3°	32,7°	3,455	9 200
20,0°; 52,2°	32,2°	36,1°	4,19	8 400

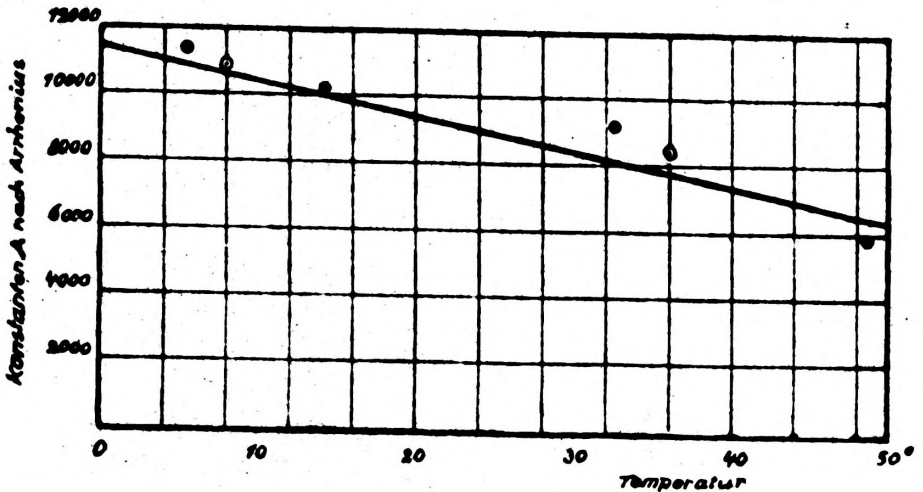


Fig. 1.

Wir haben die erhaltenen Werte, wie die Fig. 1 zeigt, graphisch interpoliert unter Berücksichtigung der relativen Sicherheit der ermittelten Werte und unter Annahme, daß A im untersuchten Gebiet geradlinig abfällt.

Es ergibt sich dann für A die Interpolationsformel:

$$A = 11\,400 (1 - 0,009 t).$$

Hiermit stimmen auch die alten Versuche von Kjeldahl (1881) und O'Sullivan und Tompson (1890) überein. Es ergibt sich nämlich:

nach Kjeldahl bei 30°–40°: A = 7800, ber. 7810.
nach O'Sullivan und Tompson bei 40°–50°: A = 6800, ber. 6840

Es muß bei dieser Gelegenheit bemerkt werden, daß die Unabhängigkeit der Arrheniusschen Konstante A von der Temperatur keineswegs eine theoretische Forderung ist. Nach der von Arrhenius gegebenen Entwicklung¹⁾ ist A die Wärmetönung der betreffenden Reaktion und es liegt keine Veranlassung zur Annahme vor, daß diese Wärmetönung stets von der Temperatur unabhängig sein sollte.

Andererseits ist es eine Erfahrungstatsache, daß die Arrheniussche Temperaturformel sich den Beobachtungen innerhalb recht weiter Temperaturgebiete gut anschließt, und dies gilt besonders für die recht genau untersuchte Inversion des Rohrzuckers durch Säuren.

Schon früher hat der eine von uns darauf aufmerksam gemacht²⁾, daß der Temperaturkoeffizient der nicht enzymatischen Säurekatalyse erheblich größer ist als derjenige der enzymatischen Inversion. Für die Temperatur von 20° ist nämlich bei der Reaktion

$$\begin{array}{l} \text{Rohrzucker—Salzsäure} \\ A = 25\,600. \end{array}$$

$$\begin{array}{l} \text{Rohrzucker—Saccharase} \\ A = 9\,400. \end{array}$$

Dieser Umstand und die starke Abnahme von A bei der enzymatischen Inversion gab zu folgender Überlegung Veranlassung:

Gehen wir von der Annahme aus, daß die Geschwindigkeit der Rohrzuckerinversion proportional ist der Konzentration des Molekülkomplexes Rohrzucker—Saccharase, so wird der Temperaturkoeffizient der Inversion durch folgende Größen bestimmt:

- I. durch den Einfluß der Temperatur auf die Konzentration des aktiven Enzyms;
- II. durch den Einfluß der Temperatur auf die Reaktionsfähigkeit der Verbindung Rohrzucker—Enzym (und die Reaktionsfähigkeit des Wassers);

¹⁾ Arrhenius, Zeitschr. f. physik. Chem. Bd. 4, S. 226 (1889).

²⁾ Euler, Allgem. Chemie der Enzyme, 1. Aufl. Bergmann, 1910, S. 175.

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 von Michaelis¹⁾ gegebenen Theorie stellen. Nach dieser ist die Reaktionsgeschwindigkeit v der Inversion proportional der Konzentration φ der Verbindung Rohrzucker—Enzym, und diese Konzentration ist gegeben durch die Gleichung

$$[S] [E - \varphi] = K_M [\varphi].$$

In derselben ist:

$[S]$ = Konzentration des freien Substrates, bzw., da nur ein kleiner Teil durch das Enzym gebunden wird, Gesamtkonzentration des Substrates,

$[E]$ = die gesamte molare Enzymkonzentration,

$[\varphi]$ = die Konzentration des gebundenen Enzymes bzw. der Verbindung Rohrzucker—Enzym,

K_M = die Gleichgewichtskonstante.

Dieser Theorie zufolge ist also:

$$v = C \cdot [\varphi] = C \cdot [E] \frac{[S]}{[S] + K_M},$$

wo C einen Proportionalitätsfaktor darstellt.

Verändern wir die Temperatur, so bleibt $[S]$ konstant. Nehmen wir ferner in erster Annäherung an, daß $[E]$, 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 $\frac{[S]}{[S] + K_M}$ und es ergibt sich also, daß der Einfluß III und damit der Temperaturkoeffizient von v von der Substratkonzentration $[S]$ abhängig ist.

¹⁾ Michaelis und Menten, Biochem. Zeitschr. Bd. 49, S. 333 (1913).

Wie stark sich dieser letztere Einfluß geltend macht, war von vornherein nicht zu sagen, da über die Größe des Temperaturkoeffizienten von K_M nichts bekannt war.

Der Temperaturkoeffizient des Gleichgewichts Substrat—Enzym ist überhaupt noch in keinem Fall untersucht, und wir haben deswegen die Konstanten K_M des Gleichgewichts Rohrzucker—Saccharase für das Temperaturintervall 0° — 40° gemessen, auch haben wir diese Gelegenheit benutzt, um uns von der Reproduzierbarkeit der Michaelisschen Konstanten selbst eine Vorstellung zu verschaffen und ihre Abhängigkeit von Aciditätsschwankungen und von inaktiven Zusätzen zu untersuchen.

Methodik.

Zur Bestimmung der Dissociationskonstanten der Verbindung Rohrzucker—Saccharase wurde im wesentlichen die gleiche Methode angewandt, welche Michaelis in einer Mitteilung mit Menten (l. c.) beschrieben hat.

Rohrzuckerlösungen von wechselnder Konzentration wurden also mit einer gewissen Enzymmenge invertiert, wobei die Anfangsgeschwindigkeit der Inversion polarimetrisch in gewöhnlicher Weise gemessen wurde. Setzt man mit Michaelis diese Geschwindigkeit proportional der Konzentration der Rohrzucker—Enzymverbindung, so erhält man aus den gemessenen Ausgangsgeschwindigkeiten die Dissociationsrestkurve des oben besprochenen Dissociationsgleichgewichtes

$$[S] [E - \varphi] = K_M [\varphi].$$

Michaelis und Menten haben die Konstante K für die Temperatur 25° ausgewertet und in vier Versuchsreihen erhalten:

$\log K_M =$	-1,78	-1,78	-1,80	-1,78
$K_M =$	0,0167	0,0167	0,0160	0,0167
	Mittel: $K_M = 0,0165$			

Bei der Konstruktion der Dissociationsrestkurven (Fig. 1 b, 2 b usw.) haben wir, wie Michaelis, zunächst einen „zufälligen Maßstab der Ordinate“, d. h. der Inversionsgeschwindigkeit

benützt. Seine Wahl ist durch nichts beschränkt; wesentlich ist nur das Verhältnis zwischen den Anfangsgeschwindigkeiten der verschiedenen Zuckerkonzentrationen. Aus rein praktischen Ursachen wurde folgendermaßen verfahren:

In den Fig. 1a, 2a usw. wird die Ordinate ausgewählt, welche von den Inversionskurven irgendwo zwischen $0,2^\circ$ und $0,3^\circ$ geschnitten werden. Diese Ordinate ist in jede Figur eingezeichnet. Die Schnittpunkte zwischen den Inversionskurven und dieser Ordinate bezeichnen die „relative Anfangsgeschwindigkeit“, welche man in den Fig. 1b, 2b usw. als zufälligen Maßstab der Ordinate wiederfindet.

In den folgenden Tabellen dürften die Spalten I—IV keine besondere Erklärung erfordern. Die Zahlen der Spalte V sind nach der eben angegebenen graphischen Methode aus den Fig. 1a, 2a usw. erhalten worden. Zur Konstruktion der Dissociationsrestkurve ist auch der Logarithmus der Zuckerkonzentrationen erforderlich. Man findet diese Werte in der Spalte VI.

Versucht man die Dissociationskonstanten nach der ersten Michaelisschen Methode (l. c. S. 346) auszuwerten, indem man den Neigungswinkel im mittleren, fast geradlinigen Teil der Kurve mißt und dadurch die „rationelle Einheit der Ordinate“ konstruiert, so stößt man auf erhebliche Schwierigkeiten. Wir haben daher fast immer nach der zweiten von Michaelis angegebenen Methode gearbeitet (S. 347). Die rationelle Einheit der Ordinate suchten wir einfach durch Extrapolation nach Augenmaß aus den höchsten beobachteten Funktionswerten der Dissociationsrestkurve zu erhalten. Vom Punkt 0,5 auf der rationellen Ordinate zogen wir eine Linie parallel mit der Abscisse und konnten schätzen, wo diese Linie die Dissociationsrestkurve schneidet. Die entsprechende Abscisse ist $\log K$. Kennt man die rationelle Einheit der Ordinate und die Dissociationskonstante, so läßt sich die Dissociationsrestkurve konstruieren. In der Regel schließt sich die so erhaltene Kurve den Punkten nicht in bester Weise an, und man muß mit verschiedenen Einheiten der Ordinate arbeiten, bis man den besten Anschluß an den experimentellen

Daten erhält. Wir haben dabei großes Gewicht darauf gelegt, daß die gefundenen Punkte so gleichheitlich als möglich auf beiden Seiten der Kurve liegen, da sich sonst systematische Fehler geltend machen.

Die Anfangsgeschwindigkeiten wurden in der Weise bestimmt, daß von Zeit zu Zeit aus der Rohrzucker—Enzymmischung 20 ccm entnommen und in 5 ccm einer 10%igen Sodalösung einpipettiert wurden. Alle Drehungen wurden zur Erreichung größtmöglicher Genauigkeit im 2 dm-Rohr bestimmt. Die Ausgangsdrehung wurde durch Extrapolation aus den beobachteten Anfangswerten der Drehung berechnet. Jede hier angegebene Zahl ist das Mittel von sechs Ablesungen.

Zu allen Versuchsreihen wurden gereinigte Enzymlösungen angewandt, deren Herstellung in einer Mitteilung von Euler und Svanberg¹⁾ beschrieben ist, und zwar zu den beiden ersten Versuchsreihen die Enzymlösung 3H, zu allen andern die Enzymlösung 3G α 2. Die Enzymlösungen wurden im Verhältnis 1 : 200 bzw. 1 : 250 verdünnt. Von diesen Verdünnungen wurden in der Regel 10 ccm (in einzelnen Fällen 20 oder 30 ccm, was dann besonders angegeben ist) zu einer vorher bereiteten Versuchslösung zugesetzt.

Die letztere bestand aus

$$\begin{array}{l} 15 \text{ ccm } 4\% \text{ iger } \text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Lösung (pH} = 4,1 - 4,4) \\ + \quad x \text{ ccm Rohrzuckerlösung} \\ + \quad (125 - x) \text{ ccm Wasser} \\ \hline \end{array}$$

Summe 140 ccm, mit 10 ccm Enzymlösung 150 ccm.

Die verschiedenen Versuchstemperaturen wurden im Thermostaten auf $\pm 0,2^\circ$, vereinzelt $0,3^\circ$, konstant gehalten.

Die Zuckerkonzentrationen haben wir in der Regel zwischen 0,2 und 0,01 n. gewählt. Wie sich nämlich aus den Kurven von Michaelis zeigt, nimmt bei größeren Konzentrationen als etwa $\frac{1}{3}$ n. ($\log = -0,5$) = ca. 10 % die Anfangsgeschwindigkeit wieder ab, d. h. eine Abweichung vom einfachen Dissociationsgesetz tritt ein. Das Massenwirkungs-

¹⁾ Euler und Svanberg, Diese Zeitschr. Bd. 107.

gesetz für Lösungen bezieht sich nämlich genau genommen nicht auf die Konzentration, sondern auf den osmotischen Druck der Komponenten, und in Lösungen über 10 % Rohrzucker sind die Abweichungen von der Proportionalität zwischen Konzentration und osmotischem Druck schon recht erheblich, wie z. B. aus den Gefrierpunktsbestimmungen von Arrhenius hervorgeht. — Wendet man anderseits kleinere Zuckerkonzentrationen als 0,01 n. an, so werden die Drehungen so gering, daß die Ablesungsfehler stark ins Gewicht fallen.

Unsere Messungen.

Wir gehen jetzt zu unseren Beobachtungen und Berechnungen über und können uns darauf beschränken, die folgenden Tabellen und Figuren mitzuteilen. Da die Reproduzierbarkeit der Michaelisschen Konstanten zum erstenmal mit dem Erscheinen der Arbeit von Michaelis und Menten einer Prüfung unterzogen wird, und diese Konstante im wesentlichen graphisch ermittelt wurde, haben wir geglaubt, die einzelnen Kurven vorlegen zu sollen, um dem Leser eine Vorstellung vom Grade der Sicherheit der gewonnenen Zahlen zu geben.

Tabellen und Figuren

der Versuchsreihen 1—13.

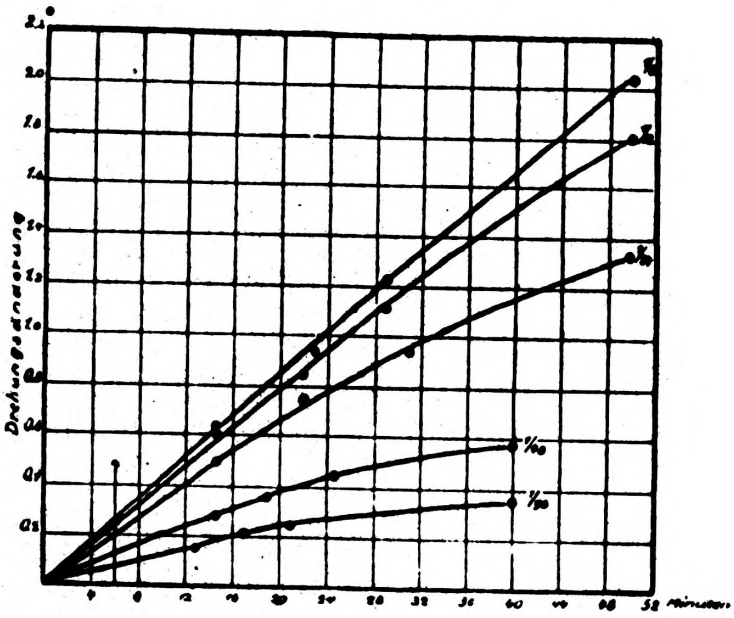


Fig. 1a.

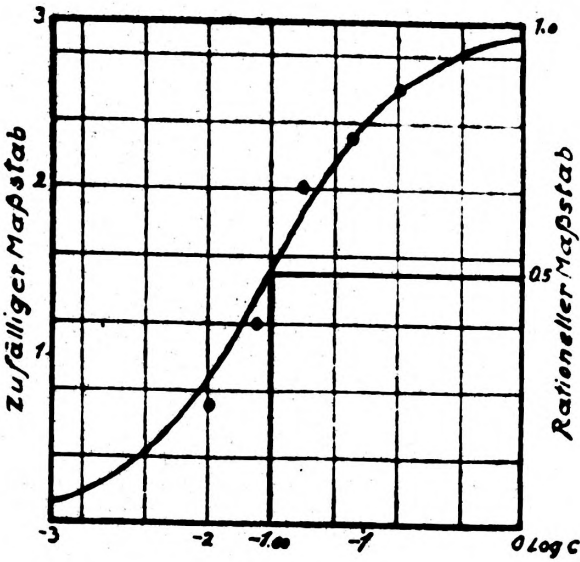


Fig. 1b.

Versuchsreihe I. Inversionstemperatur 25°.

Polarisationstemperatur 18°.

Hierzu Fig. 1a und 1b.

I	II	III	IV	V	VI
Anfangskonz. der Saccharose; Normalität (c)	Minuten	Drehung	Drehungs- änderung	Rel. Anfangs- geschwin- digkeit	Log c.
1. $\frac{1}{6} = 0,167$	0	[5,96]	—	2,6	— 0,78
	0,5	5,94	—		
	14,5	5,33	0,63		
	22,5	5,02	0,94		
	29	4,73	1,23		
	50	3,92	2,04		
2. $\frac{1}{12} = 0,0833$	0	[3,03]	—	2,3	— 1,08
	0,5	3,01	—		
	14,5	2,43	0,60		
	22	2,18	0,85		
	29	1,92	1,11		
	50	1,22	1,81		
3. $\frac{1}{24} = 0,0417$	0	[1,46]	—	2,0	— 1,38
	0,5	1,44	—		
	14,5	1,97	0,49		
	22	0,72	0,74		
	31	0,52	0,94		
	50	0,13	1,33		
4. $\frac{1}{48} = 0,0209$	0	[0,67?]	—	1,2	— 1,68
	0,5	0,66	—		
	14,5	0,39	0,28		
	19	0,315	0,355		
	24,5	0,23	0,44		
	40	0,10	0,57		
5. $\frac{1}{96} = 0,0104$	0	[0,36]	—	0,7	— 1,98
	0,5	0,36	—		
	13	0,21	0,15		
	17	0,15	0,21		
	21	0,12	0,24		
	40	0,01	0,35		

Aus Fig. 1b ersieht man, daß $k = 0,025$.

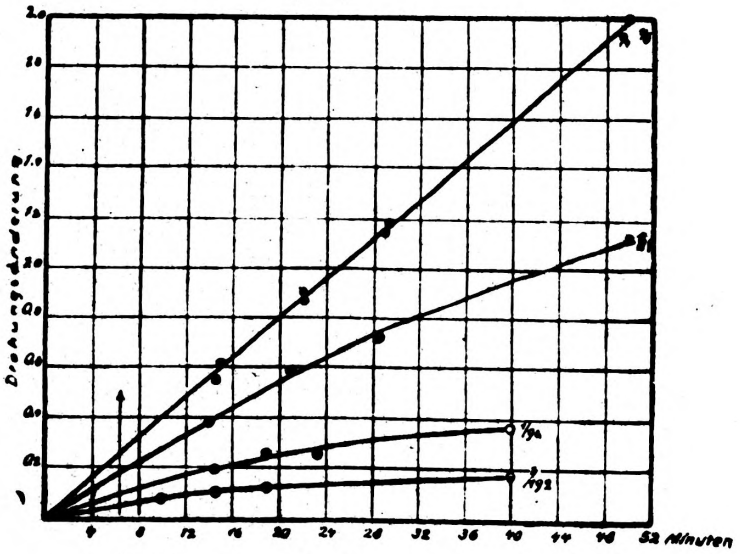


Fig. 2a.

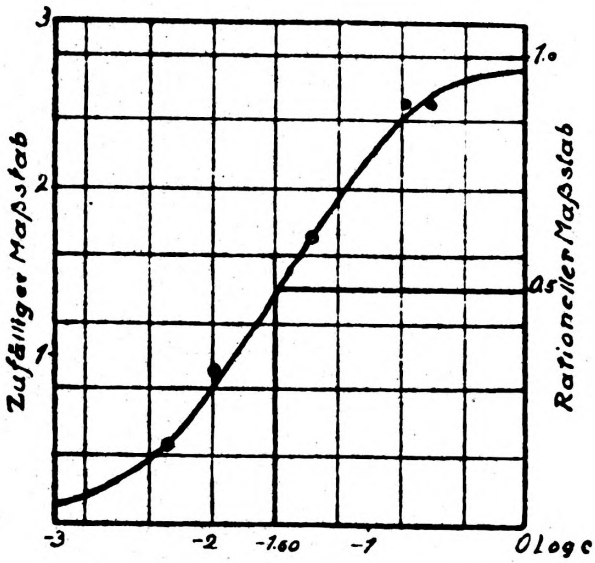


Fig. 2b.

Versuchsreihe 2. Inversionstemperatur 25°.

Polarisationstemperatur 20°.

Hierzu Fig. 2a und 2b.

I Anfangskonz. der Saccharose; Normalität (c)	II Minuten	III Drehung	IV Drehungs- änderung	V Rel. Anfangs- geschwin- digkeit	VI Log c.
6. $\frac{1}{4} = 0,250$	0	[9,44?]	—	2,5	—0,60
	0,5	9,42	—		
	14,5	8,89	0,55		
	22	8,575	0,865		
	29,5	8,255	1,185		
	50	7,44	2,00		
7. $\frac{1}{6} = 0,167$	0	6,07	—	2,5	—0,78
	0,5	6,05	—		
	15	5,46	0,61		
	22	5,17	0,90		
	29	4,92	1,15		
	50	4,06	2,01		
8. $\frac{1}{24} = 0,0417$	0	[1,47]	—	1,7	—1,38
	0,5	1,45	—		
	14	1,09	0,38		
	21	0,89	0,58		
	28,5	0,75	0,72		
	50	0,34	1,13		
9. $\frac{1}{96} = 0,0104$	0	[0,38]	—	0,9	—1,98
	0,5	0,37	—		
	14,5	0,19	0,19		
	19	0,13	0,25		
	23,5	0,13	0,25		
	40	0,02	0,36		
10. $\frac{1}{192} = 0,0052$	0	[0,19]	—	0,45	—2,28
	0,5	0,19	—		
	10	0,11	0,08		
	14,5	0,09	0,10		
	19	0,07	0,12		
	40	0,02	0,17		

Aus Fig. 2b ergibt sich $k = 0,025$.

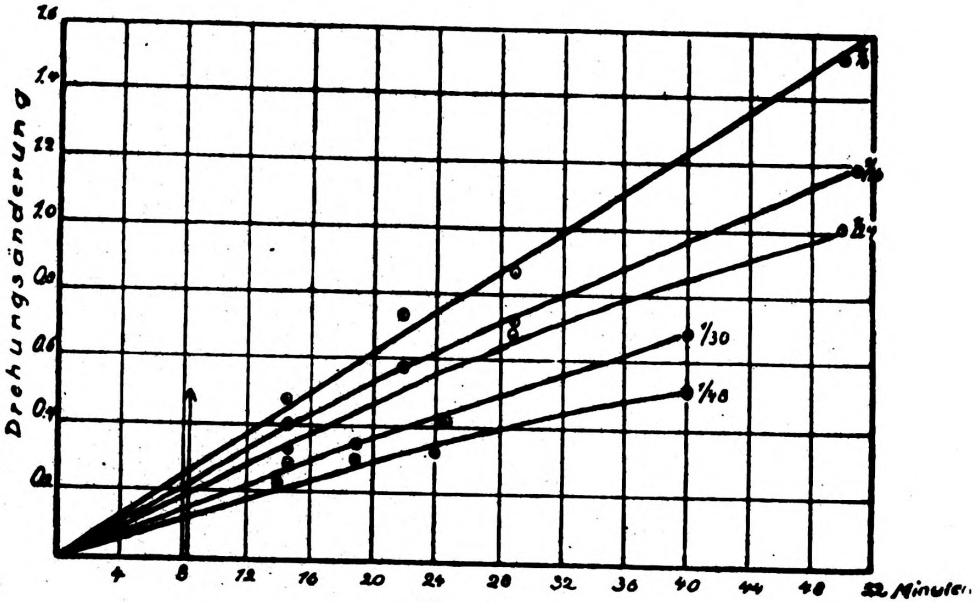


Fig. 3a.

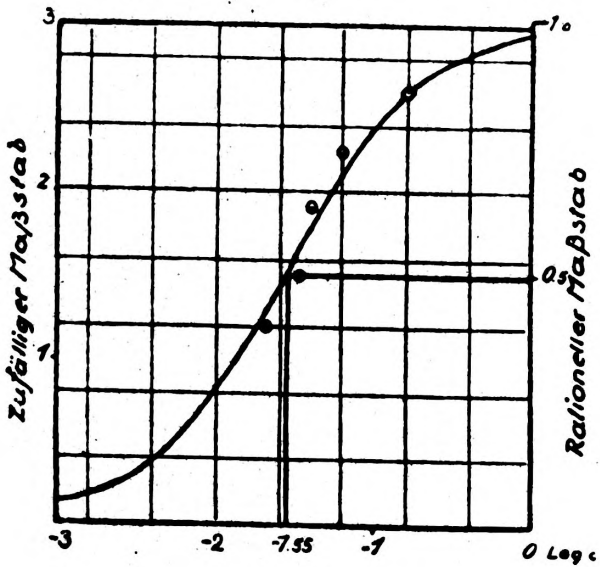


Fig. 3b.

Versuchsreihe 3. Inversionstemperatur 25°.
 Polarisationstemperatur 18°.
 Hierzu Fig. 3a und 3b.

I Anfangskonz. der Saccharose; Normalität (c)	II Minuten	III Drehung	IV Drehungs- änderung	V Rel. Anfangs- geschwin- digkeit	VI Log c.
11. $\frac{1}{6} = 0,167$	0	[6,16]	—	2,6	- 0,78
	0,5	6,14	—		
	14,5	5,68	0,48		
	22	5,43	0,73		
	29	5,29	0,87		
	50	4,63	1,53		
12. $\frac{1}{16} = 0,0625$	0	[2,33]	—	2,25	- 1,20
	0,5	2,32	—		
	14,5	1,93	0,40		
	22	1,755	0,575		
	29	1,605	0,725		
	51	1,13	1,20		
13. $\frac{1}{24} = 0,0417$	0	[1,56]	—	1,9	- 1,38
	0,5	1,55	—		
	14,5	1,235	0,325		
	22	1,055	0,505		
	29	0,88	0,68		
	50	0,54	1,02		
14. $\frac{1}{30} = 0,0333$	0	[1,18]	—	1,5	- 1,48
	0,5	1,17	—		
	14,5	0,90	0,28		
	19	0,835	0,345		
	24,5	0,76	0,42		
	40	0,49	0,69		
15. $\frac{1}{48} = 0,0209$	0	[0,78]	—	1,2	- 1,68
	0,5	0,77	—		
	14	0,555	0,225		
	19	0,485	0,295		
	24	0,45	0,33		
	40	0,26	0,52		

Aus Fig. 3b ergibt sich $k = 0,028$.

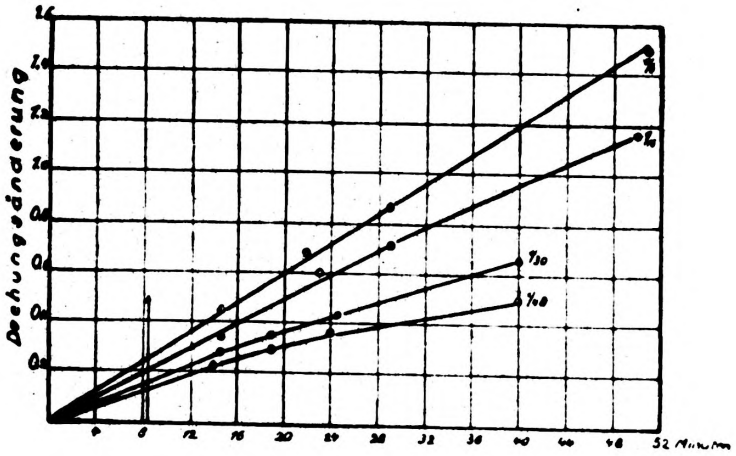


Fig. 4a.

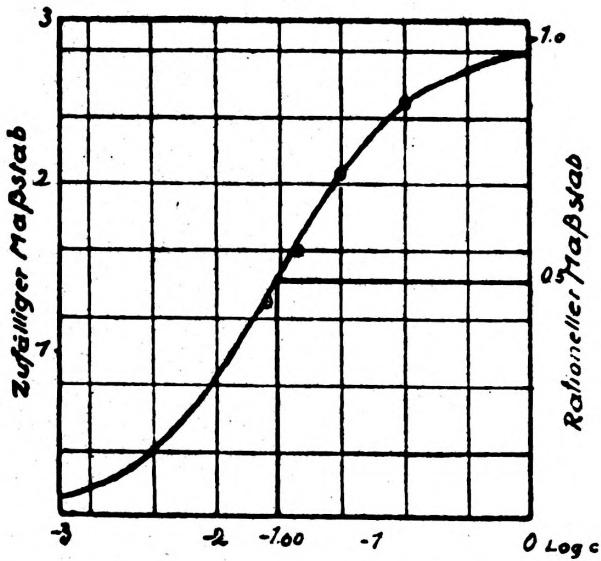


Fig. 4b.

Versuchsreihe 4. Inversionstemperatur 25°. $p_H = 3,35$.

Polarisationsstemperatur 18—19°.

Hierzu Fig. 4a und 4b.

I Anfangskonz. der Saccharose; Normalität (c)	II Minuten	III Drehung	IV Drehungs- änderung	V Rel. Anfangs- geschwin- digkeit	VI Log c.
16. $\frac{1}{6} = 0,167$	0	[6,21]	—	2,5	— 0,78
	0,5	6,19	—		
	14,5	5,76	0,45		
	22	5,53	0,68		
	29	5,35	0,86		
	51	4,70	1,51		
17. $\frac{1}{16} = 0,0625$	0	[2,34]	—	2,05	— 1,20
	0,5	2,33	—		
	14,5	1,995	0,345		
	23	1,74	0,60		
	29	1,62	0,72		
	50	1,17	1,17		
18. $\frac{1}{24} = 0,0417$	ging verloren		—	—	—
19. $\frac{1}{30} = 0,0333$	0	[1,26]	—	1,6	— 1,48
	0,5	1,25	—		
	14,5	0,98	0,28		
	19	0,91	0,35		
	24,5	0,83	0,43		
	40	0,595	0,665		
20. $\frac{1}{48} = 0,0209$	0	[0,83]	—	1,3	— 1,68
	0,5	0,82	—		
	14	0,60	0,23		
	19	0,51	0,29		
	24	0,465	0,365		
	40	0,325	0,505		

 Aus Fig. 4b ergibt sich $k = 0,025$.

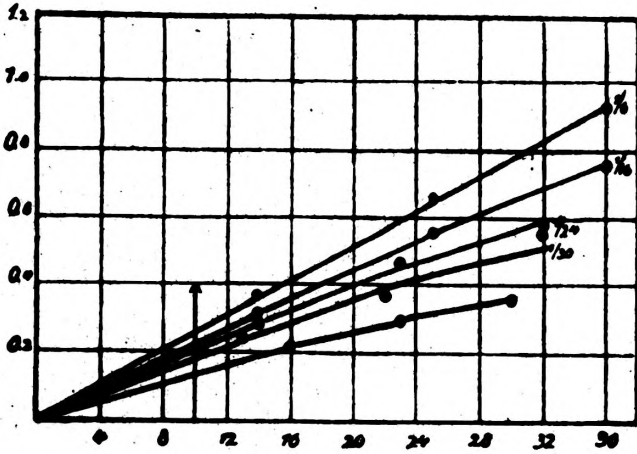


Fig. 5a.

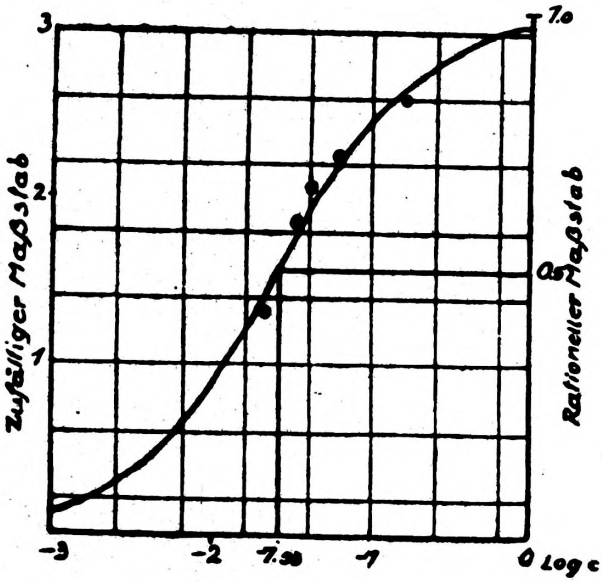


Fig. 5b.

Versuchsreihe 5. Inversionstemperatur 25°. $p_H = 5,65$.
 Hierzu Fig. 5a und 5b.

I Anfangskonz. der Saccharose; Normalität (c)	II Minuten	III Drehung	IV Drehungs- änderung	V Rel. Anfangs- geschwin- digkeit	VI Log c.
21. $\frac{1}{6} = 0,167$	0	[6,21]	—	2,6	— 0,78
	0,5	6,185	—		
	14	5,84	0,37		
	25	5,55	0,66		
	36	5,275	0,935		
22. $\frac{1}{16} = 0,0625$	0	[2,35]	—	2,25	— 1,20
	0,5	2,34	—		
	14	2,03	0,32		
	25	1,79	0,56		
	36	1,58	0,77		
23. $\frac{1}{24} = 0,0417$	0	[1,56]	—	2,05	— 1,38
	0,5	1,55	—		
	14	1,27	0,29		
	23	1,09	0,47		
	32	0,975	0,585		
24. $\frac{1}{30} = 0,0333$	0	[1,27]	—	1,85	— 1,48
	0,5	1,26	—		
	13	1,025	0,245		
	22	0,90	0,37		
	32	0,695	0,575		
25. $\frac{1}{48} = 0,0209$	0	[0,78]	—	1,35	— 1,68
	0,5	0,77	—		
	16	0,56	0,22		
	23	0,48	0,30		
	30	0,42	0,36		

Aus Fig. 5b ergibt sich $k = 0,026$.

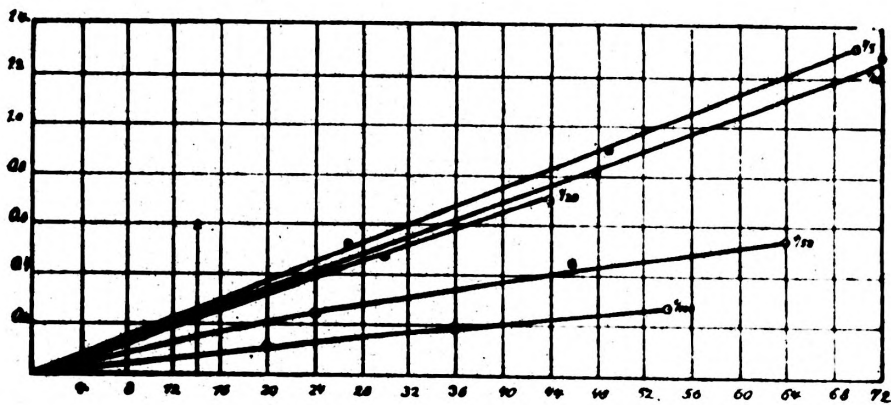


Fig. 6a.

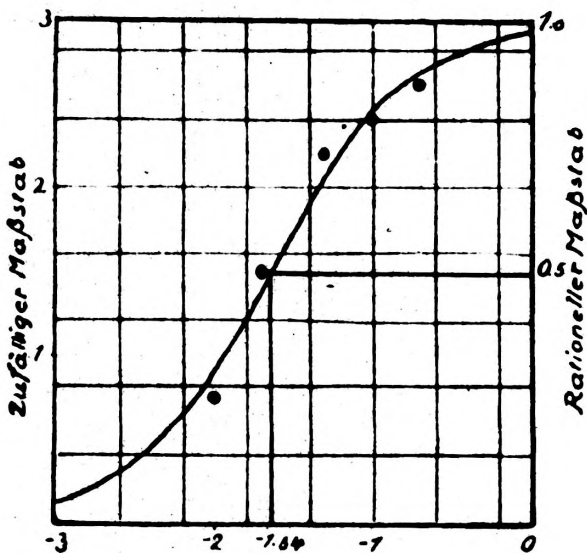


Fig. 6b.

Versuchsreihe 6. Inversionstemperatur 25°.

Polarisationstemperatur 20°. Hierzu Fig. 6 a und 6 b.

10 ccm Saccharaselösung von Verdünnung 1 : 500. Enzymmenge also halb so groß als in den Versuchsreihen 1—5.

I Anfangskonz. der Saccharose; Normalität (c)	II Minuten	III Drehung	IV Drehungs- änderung	V Rel. Anfangs- geschwin- digkeit	VI Log c.
26. $\frac{1}{5} = 0,20$	0	[7,38]	—	2,6	— 0,70
	0,5	7,37	—		
	27	6,87	0,51		
	49	6,48	0,90		
	70	6,07	1,31		
27. $\frac{1}{10} = 0,10$	0	[3,70]	—	2,4	— 1,00
	0,5	3,69	—		
	25	3,28	0,42		
	48	2,89	0,81		
	72	2,425	1,275		
28. $\frac{1}{20} = 0,05$	0	[1,89]	—	2,2	— 1,30
	0,5	1,88	—		
	18	1,58	0,31		
	30	1,42	0,47		
	44	1,19	0,70		
29. $\frac{1}{50} = 0,02$	0	[0,79]	—	1,5	— 1,70
	0,5	0,79	—		
	24	0,55	0,24		
	46	0,35	0,44		
	64	0,25	0,54		
30. $\frac{1}{100} = 0,01$	0	[0,40]	—	0,75	— 2,00
	0,5	0,40	—		
	20	0,29	0,11		
	36	0,21	0,19		
	54	0,13	0,27		

Aus Fig. 6 b ergibt sich $k = 0,023$.

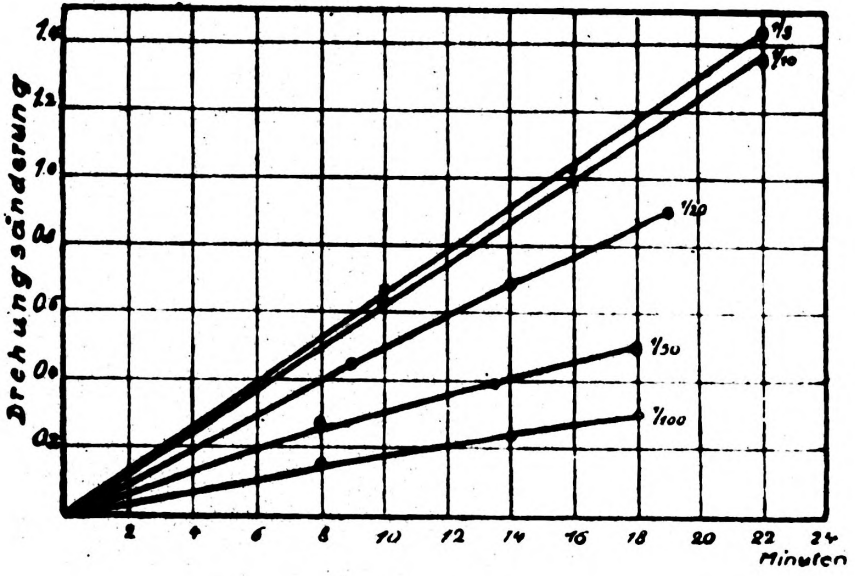


Fig. 7a.

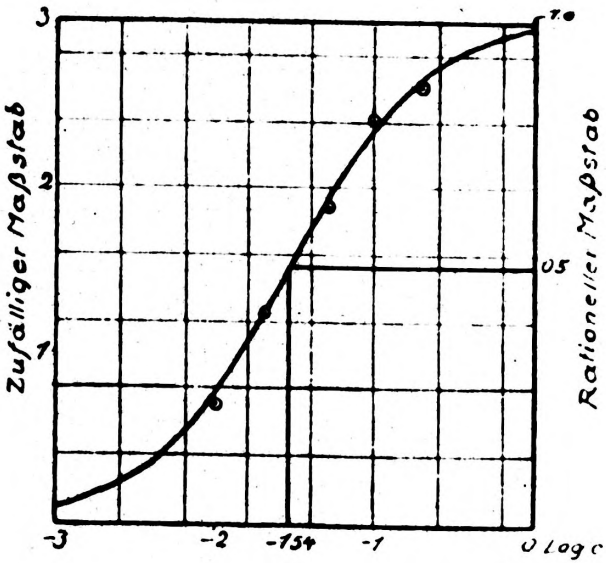


Fig. 7b.

Versuchsreihe 7. Inversionstemperatur 25°.

Polarisationstemperatur 19°. Hierzu Fig. 7a und 7b.

20 ccm Saccharaselösung. Enzymmenge also die doppelte gegenüber den Versuchsreihen 1—5.

I Anfangskonz. der Saccharose; Normalität (c)	II Minuten	III Drehung	IV Drehungs- änderung	V Rel. Anfangs- geschwin- digkeit	VI Log c.
31. $\frac{1}{5} = 0,200$	0	[7,45]	—	2,6	— 0,70
	0,5	7,42	—		
	10	6,79	0,66		
	16	6,42	1,03		
	22	6,02	1,43		
32. $\frac{1}{10} = 0,100$	0	[3,77]	—	2,4	— 1,00
	0,5	3,74	—		
	10	3,10	0,64		
	16	2,78	0,99		
	22	2,425	1,345		
33. $\frac{1}{20} = 0,050$	0	[1,905]	—	1,9	— 1,30
	0,5	1,88	—		
	9	1,455	0,45		
	14	1,22	0,685		
	19	1,01	0,895		
34. $\frac{1}{50} = 0,020$	0	[0,78]	—	1,25	— 1,70
	0,5	0,765	—		
	8	0,51	0,27		
	13,5	0,39	0,39		
	18	0,29	0,49		
35. $\frac{1}{100} = 0,010$	0	[0,42]	—	0,7	— 2,00
	0,5	0,41	—		
	8	0,27	0,15		
	14	0,185	0,235		
	18	0,12	0,30		

Aus Fig. 7b ergibt sich $k = 0,029$.

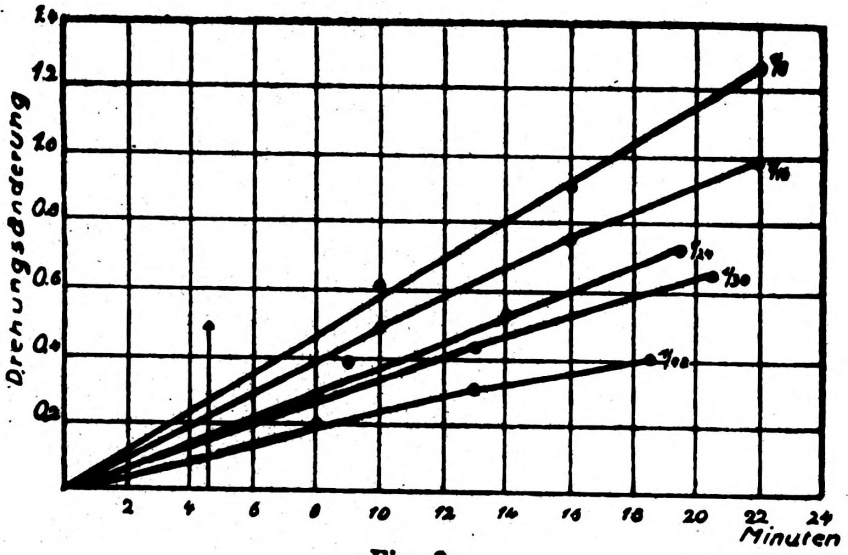


Fig. 8a.

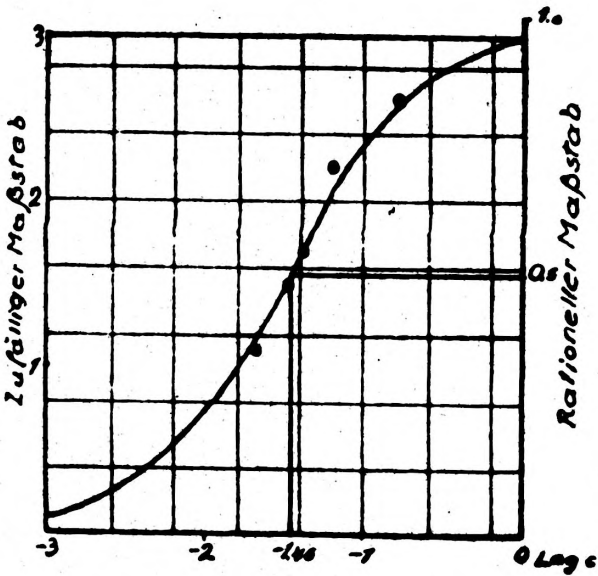


Fig. 8b.

Versuchsreihe 8. Inversionstemperatur 39°.

Polarisationstemperatur 18—19°.

Hierzu Fig. 8a und 8b.

I Anfangskonz. der Saccharose; Normalität (c)	II Minuten	III Drehung	IV Drehungs- änderung	V Rel. Anfangs- geschwin- digkeit	VI Log c.
36. $\frac{1}{6} = 0,167$	0	[6,17]	—	2,6	— 0,78
	0,5	6,14	—		
	10	5,56	0,61		
	16	5,26	0,91		
	22	4,91	1,26		
37. $\frac{1}{16} = 0,0625$	0	[2,33]	—	2,2	— 1,20
	0,5	2,31	—		
	10	1,845	0,485		
	16	1,58	0,75		
	22	1,34	0,99		
38. $\frac{1}{24} = 0,0417$	0	[1,55]	—	1,7	— 1,38
	0,5	1,53	—		
	9	1,16	0,39		
	14	1,02	0,53		
	19,5	0,83	0,72		
39. $\frac{1}{30} = 0,0333$	0	[1,24]	—	1,5	— 1,48
	0,5	1,225	—		
	8	0,96	0,28		
	13	0,805	0,435		
	20,5	0,59	0,65		
40. $\frac{1}{48} = 0,0209$	0	[0,77]	—	1,1	— 1,68
	0,5	0,76	—		
	8	0,57	0,20		
	13	0,465	0,305		
	18,5	0,365	0,405		

Aus Fig. 8b ergibt sich $k = 0,035$.

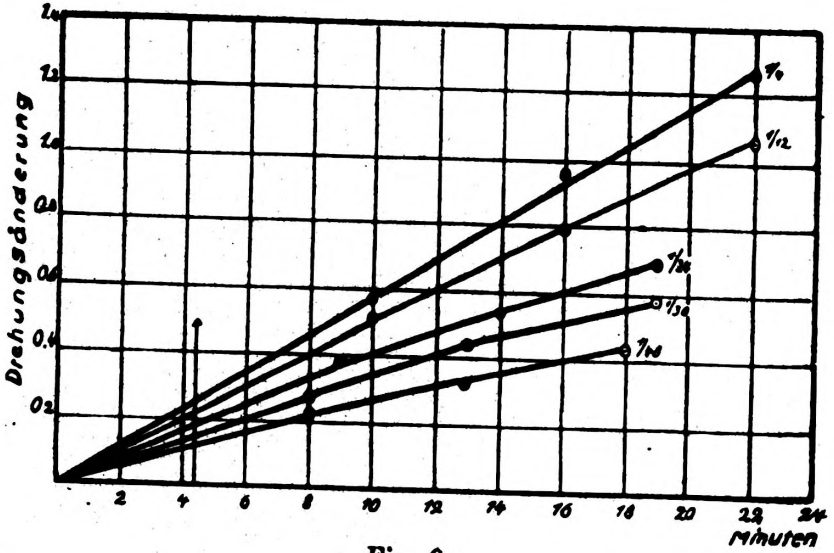


Fig. 9a.

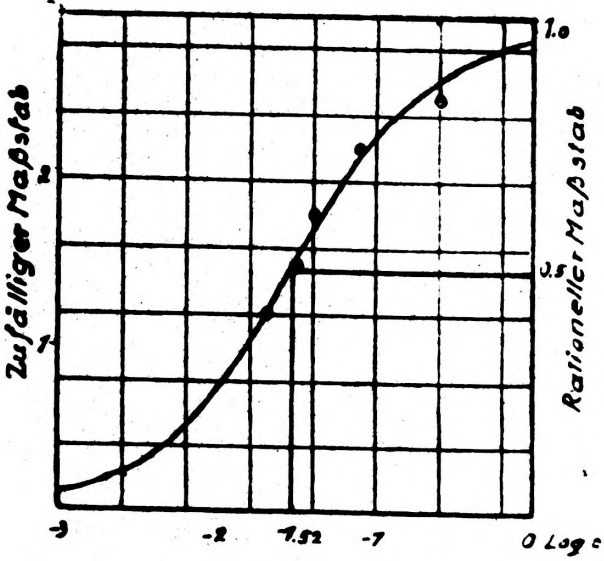


Fig. 9b.

Versuchsreihe 9. Inversionstemperatur 39°.

Polarisationstemperatur 18—19°.

Hierzu Fig. 9a und 9b.

I Anfangskonz. der Saccharose; Normalität (c)	II Minuten	III Drehung	IV Drehungs- änderung	V Rel. Anfangs- geschwin- digkeit	VI Log c.
41. $\frac{1}{4} = 0,25$	0	[9,29]	—	2,5	— 0,60
	0,5	9,26	—		
	10	8,72	0,57		
	16	8,34	0,95		
	22	8,03	1,26		
42. $\frac{1}{12} = 0,0833$	0	[3,12]	—	2,2	— 1,08
	0,5	3,10	—		
	10	2,61	0,51		
	16	2,33	0,79		
	22	2,06	1,06		
43. $\frac{1}{24} = 0,0417$	0	[1,59]	—	1,8	— 1,38
	0,5	1,57	—		
	9	1,21	0,38		
	14	1,055	0,535		
	19	0,90	0,69		
44. $\frac{1}{30} = 0,0333$	0	[1,21]	—	1,5	— 1,48
	0,5	1,20	—		
	8	0,935	0,275		
	13	0,77	0,44		
	19	0,63	0,58		
45. $\frac{1}{48} = 0,0209$	0	0,77	—	1,2	— 1,68
	0,5	0,76	—		
	8	0,55	0,22		
	13	0,45	0,32		
	18	0,34	0,43		

Aus Fig. 9b ergibt sich $k = 0,060$.

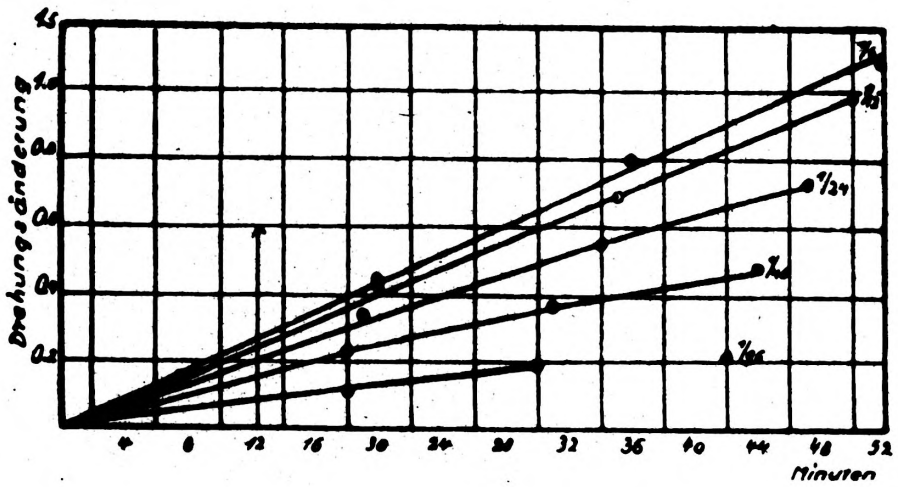


Fig. 10a.

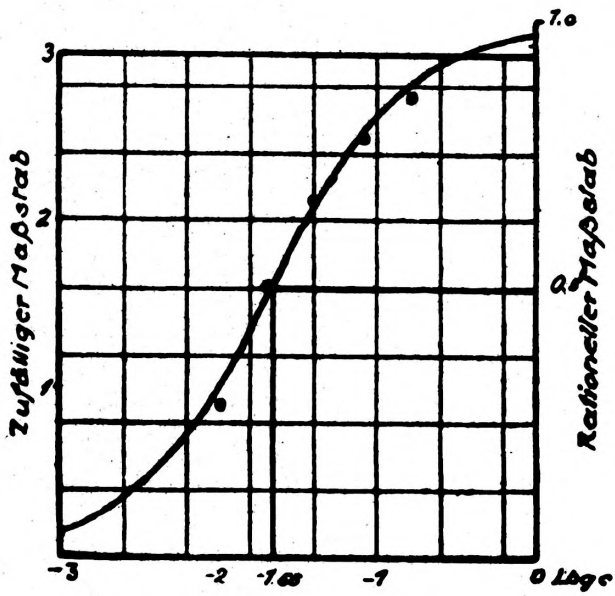


Fig. 10b.

Versuchsreihe 10. Inversionstemperatur 1°.

Polarisationstemperatur 16—18°.

Hierzu Fig. 10a und 10b.

30 ccm Saccharaselösung. Enzymmenge also dreimal so groß als in den meisten Versuchsreihen.

I Anfangskonz. der Saccharose; Normalität (c)	II Minuten	III Drehung	IV Drehungs- änderung	V Rel. Anfangs- geschwin- digkeit	VI Log c.
46. $\frac{1}{6} = 0,167$	0	[6,21]	—	2,75	— 0,78
	0,5	6,20	—		
	20	5,77	0,44		
	36	5,41	0,80		
	52	5,11	1,10		
47. $\frac{1}{12} = 0,0833$	0	[3,10]	—	2,5	— 1,08
	0,75	3,085	—		
	20	2,68	0,42		
	35	2,40	0,70		
	50	2,105	0,995		
48. $\frac{1}{24} = 0,0417$	0	[1,56]	—	2,1	— 1,38
	0,5	1,55	—		
	19	1,225	0,335		
	34	1,00	0,56		
	47	0,82	0,74		
49. $\frac{1}{48} = 0,0209$	0	[0,79]	—	1,6	— 1,68
	0,5	0,78	—		
	18	0,55	0,24		
	31	0,42	0,37		
	44	0,30	0,49		
50. $\frac{1}{96} = 0,0104$	0	0,39	—	0,9	— 1,98
	0,75	0,38	—		
	18	0,27	0,12		
	30	0,19	0,20		
	42	0,16	0,23		

Aus Fig. 10b ergibt sich $k = 0,022$.

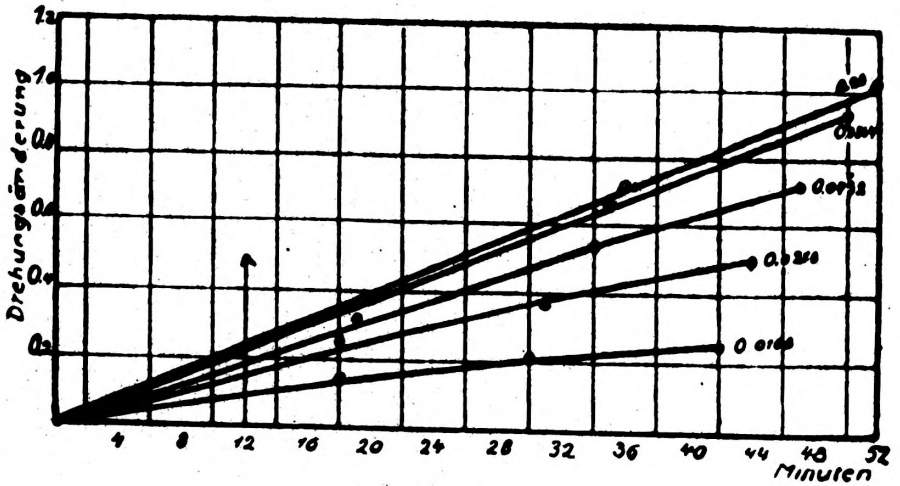


Fig. 11a.

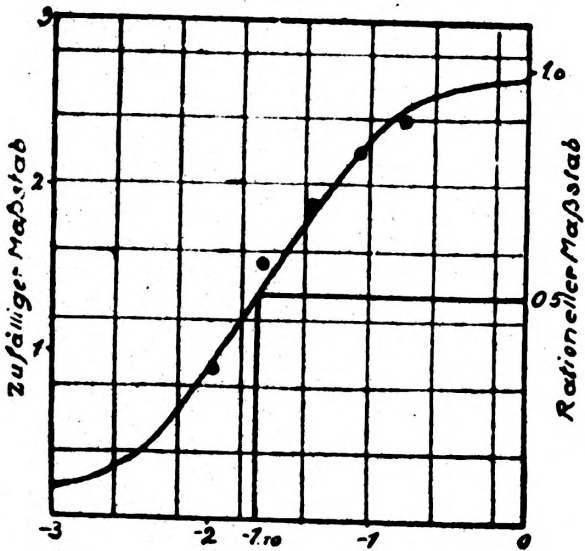


Fig. 11b.

Versuchsreihe 11. Inversionstemperatur 1°.

Polarisationstemperatur 17—18°.

Hierzu Fig. 11a und 11b.

Enzymmenge gleich der der Versuchsreihe 10 (30 ccm).

I	II	III	IV	V	VI
Anfangskonz. der Saccharose; Normalität (c)	Minuten	Drehung	Drehungs- änderung	Rel. Anfangs- geschwin- digkeit	Log c.
51. 0,216	0	[7,99]	—	2,4	— 0,77
	0,5	7,98	—		
	20	7,60	0,39		
	36	7,27	0,72		
	52	6,95	1,04		
52. 0,0864	0	[3,205]	—	2,2	— 1,06
	0,75	3,19	—		
	20	2,825	0,38		
	35	2,535	0,67		
	50	2,26	0,945		
53. 0,0432	0	[1,64]	—	1,9	— 1,36
	0,5	1,62	—		
	19	1,315	0,325		
	34	1,10	0,54		
	47	0,91	0,73		
54. 0,0216	0	[0,86]	—	1,55	— 1,67
	0,5	0,85	—		
	18	0,61	0,25		
	31	0,49	0,37		
	44	0,36	0,50		
55. 0,0108	0	[0,43]	—	0,9	— 1,97
	0,5	0,43	—		
	18	0,29	0,14		
	30	0,22	0,21		
	42	0,175	0,255		

Aus Fig. 11b ergibt sich $k = 0,020$.

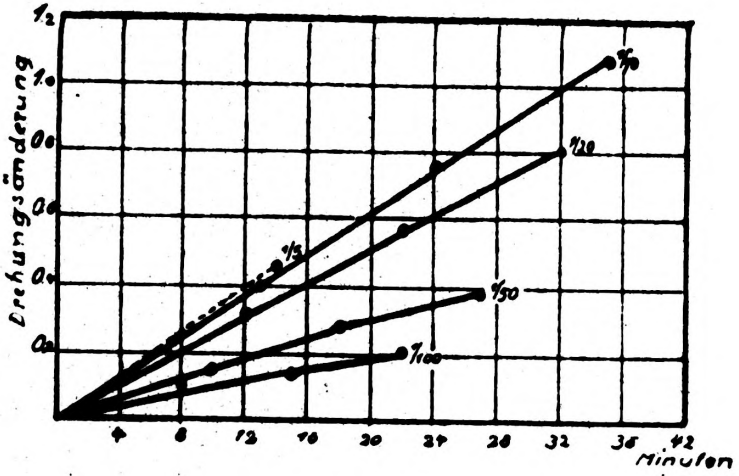


Fig. 12a.

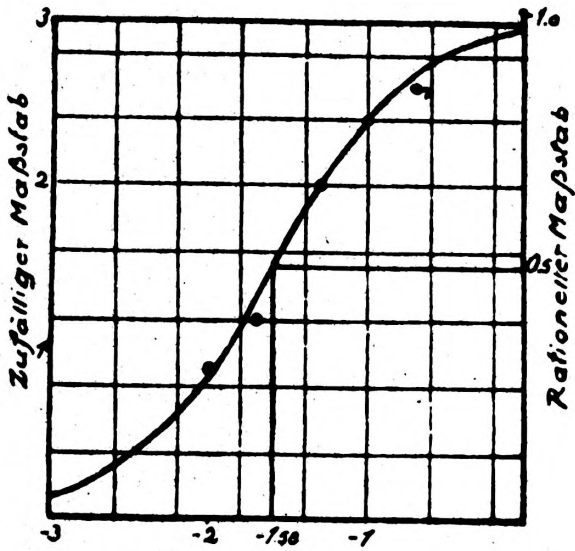


Fig. 12b.

Versuchsreihe 12. Inversionstemperatur 25°.

Polarisationstemperatur 18°.

Hierzu Fig. 12a und 12b.

Ein gewisses Volumen der Enzymlösung 3 G α 2, Verdünnung 2 : 250 (doppelte Konzentration), wurde durch viertelstündiges Erhitzen auf 75—80° inaktiviert. Von dieser Lösung wurden 10ccm der Versuchslösung zugesetzt. Die Absicht war, zu untersuchen, ob die Bestandteile des Enzymsaftes das Enzym binden.

I Anfangskonz. der Saccharose; Normalität (c)	II Minuten	III Drehung	IV Drehungs- änderung	V Rel. Anfangs- geschwin- digkeit	VI Log c.
56. $\frac{1}{5} = 0,200$	0	[7,445]	—	2,6?	— 0,70
	0,5	7,43	—		
	14	6,985	0,46		
	25	ging verloren			
57. $\frac{1}{10} = 0,100$	0	[3,76]	—	2,4	— 1,00
	0,5	3,745	—		
	13	3,36	0,40		
	24	3,00	0,76		
	35	2,69	1,07		
58. $\frac{1}{20} = 0,050$	0	[1,87]	—	2,0	— 1,30
	0,5	1,86	—		
	12	1,555	0,315		
	22	1,30	0,57		
	32	1,06	0,81		
59. $\frac{1}{50} = 0,020$	0	[0,72]	—	1,2	— 1,70
	0,5	0,71	—		
	10	0,57	0,15		
	18	0,445	0,275		
	27	0,34	0,38		
60. $\frac{1}{100} = 0,010$	0	[0,39]	—	0,9	— 2,00
	0,5	0,385	—		
	8	0,28	0,11		
	15	0,255	0,135		
	22	0,185	0,205		

Aus Fig. 12b ergibt sich $k = 0,036$.

Kein Einfluß des Saftes.

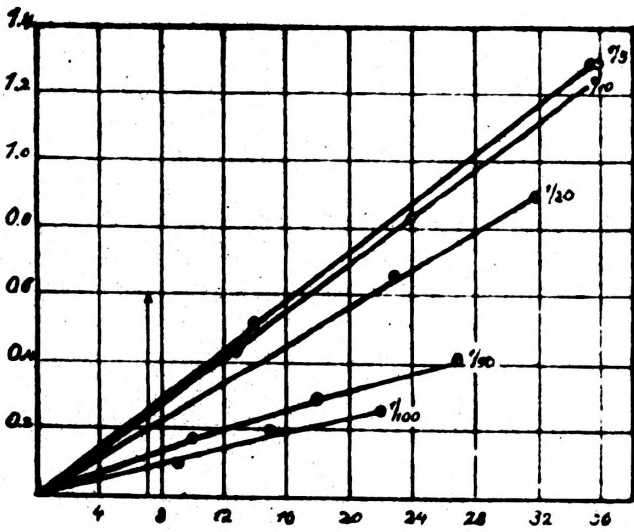


Fig. 13a.

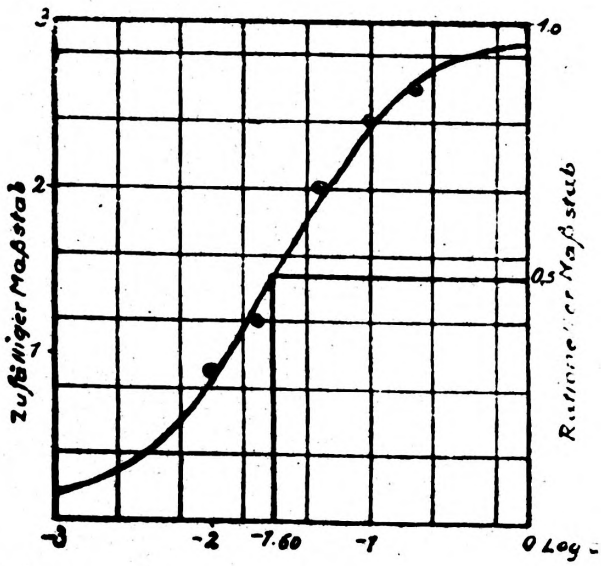


Fig. 13b.

Versuchsreihe 13. Inversionstemperatur 15°.

Polarisationstemperatur 17–18°.

Hierzu Fig. 13a und 13b.

20 ccm Saccharaselösung. Enzymmenge also die doppelte.

I Anfangskonz. der Saccharose; Normalität (c)	II Minuten	III Drehung	IV Drehungs- änderung	V Rel. Anfangs- geschwin- digkeit	VI Log c.
61. $\frac{1}{5} = 0,200$	0	[7,39]	—	2,6	— 0,70
	0,5	7,37	—		
	14	6,85	0,51		
	25	?	?		
	36	6,06	1,30		
62. $\frac{1}{10} = 0,100$	0	[3,71]	—	2,4	— 1,00
	0,5	3,69	—		
	13	3,27	0,44		
	24	2,88	0,83		
	35	2,415	1,295		
63. $\frac{1}{20} = 0,05$	0	[1,88]	—	2,0	— 1,30
	0,5	1,865	—		
	12	?	?		
	28	1,22	0,66		
	32	0,98	0,90		
64. $\frac{1}{50} = 0,020$	0	[0,74]	—	1,2	— 1,70
	0,5	0,73	—		
	10	0,565	0,175		
	18	0,45	0,29		
	27	0,32	0,42		
65. $\frac{1}{100} = 0,010$	0	[0,42]	—	0,9	— 2,00
	0,5	0,41	—		
	9	0,32	0,10		
	15	0,22	0,20		
	22	0,16	0,26		

Aus Fig. 13b ergibt sich $k = 0,025$.

Besprechung der Ergebnisse.

Was die Reproduzierbarkeit der Konstanten K_M betrifft, so wurden die ersten Messungen unter denjenigen Bedingungen ausgeführt, für welche auch Michaelis und Menten diese Konstante angegeben haben, nämlich 25° und optimale Acidität ($p_H = 4,5$).

Aus den Versuchsreihen 1—3 und den Fig. 1—3 erhielten wir den Wert

$$K_M \cdot 10^3 = 25, 25, 28. \quad \text{Mittel} = 26.$$

Dieser Wert ist erheblich größer als der von Michaelis angegebene 16.

Wir haben deswegen zunächst untersucht, ob die Konstante K_M von der Acidität innerhalb der Grenzen der optimalen Inversion, also etwa zwischen 3,3 und 5,7, abhängig ist. Wir fanden in

Versuchsreihe 4 bei $p_H = 3,35$	$K_M \cdot 10^3 = 25$
" 5 " $p_H = 5,65$	$K_M \cdot 10^3 = 26$

innerhalb der genannten Grenzen finden wir also die K_M -Werte von p_H unabhängig.

Die nächsten Versuche beziehen sich auf den Einfluß der Enzymkonzentration. Dieselbe wurde im Verhältnis 1:3 variiert, wobei sich keine andere Änderung der Michaelisschen Konstanten mit Sicherheit ergab, als die durch die Versuchsfehler bedingte.

Daß Bestandteile des Enzmysaftes das Enzym nicht binden, zeigt die Versuchsreihe 12, welche innerhalb der Versuchsfehler die gleiche Konstante ergab, wie die Versuchsreihen 1—7.

Michaelis und Menten haben für die Temperatur 25° und $p_H = 4,5$ die Konstante $K_M = 16,5 \cdot 10^{-3}$ angegeben.

Die für vier verschiedene Temperaturen erhaltenen Konstanten des Gleichgewichtes

$$[S] \cdot [E - \varphi] = K_M \cdot \varphi$$

sind in folgender Tabelle zusammengefaßt. Daneben haben wir die Dissociationswärme Q nach der Gleichung

$$Q = -RT^2 \frac{d \ln k}{dT} = - \frac{4,58 (\log K_2 - \log K_1) T_1 T_2}{T_2 - T_1} \text{ cal.}$$

berechnet.

Unter der Voraussetzung, daß Q sich mit der Temperatur nicht ändert, erhalten wir als Mittelwert etwa $Q = 2000$ und kommen durch Ausgleichung zu den in den letzten Spalten angegebenen Werten für K_M .

Temperatur	Versuchsreihen	$K_M \cdot 10^3$ gefunden (Mittel)	$K_M \cdot 10^3$ berechnet	
			$Q = 2000$	$Q = 2000$
1°	10, 11	21	19	20
15°	13	25	23	24
25°	1—7, 12	26	26	27
39°	8,9	32	30	31

Wie ersichtlich, ändert sich das Gleichgewicht Rohrzucker — Saccharase mit der Temperatur nicht stark, rund 1% per Grad.

Leider sind für chemische Gleichgewichte, welche mit dem vorliegenden verglichen werden könnten, die Temperaturkoeffizienten (also die Dissociationswärmen) nicht gemessen.

Wir kommen jetzt auf den Temperaturkoeffizienten der enzymatischen Inversion und auf das Seite 275 darüber Gesagte zurück.

Da sich die Anfangsgeschwindigkeit v nicht proportional mit K_M , sondern mit

$$\frac{[S]}{[S] + K_M}$$

ändert und der Temperaturkoeffizient von K_M , wie in dieser Untersuchung gefunden wurde, nur etwa 1% per Grad beträgt, so reichen die hier angegebenen Versuche, die sich nur auf eine einzige Rohrzuckerkonzentration beziehen, zur Prüfung der Formel

$$v = C \cdot [\varphi] = C [E] \frac{[S]}{[S] + K_M}$$

noch nicht aus, sondern müssen durch Versuche mit mehreren und kleineren Zuckerkonzentrationen ergänzt werden.

Hinsichtlich des Eingangs erwähnten Vergleiches zwischen dem Temperaturkoeffizienten der enzymatischen Inversion und der Inversion durch Mineralsäuren können wir auf Grund der hier mitgeteilten Messungen sagen, daß der Unterschied nicht auf einer abnormen Änderung des Gleichgewichtes Saccharase —

Rohrzucker beruhen kann. Nun kann der erheblich größere Temperaturkoeffizient der nicht enzymatischen Inversion darauf beruhen, daß die Konzentration der Verbindung Rohrzucker—Säure mit steigender Temperatur zunimmt. Wir versuchen, hierüber Anhaltspunkte zu gewinnen.

In diesem Zusammenhang mag daran erinnert werden, daß der Temperaturkoeffizient der nicht enzymatischen Inversion wesentlich davon abhängt, wie der elektrolytische Dissociationsgrad der katalysierenden Säure sich mit der Temperatur ändert¹⁾.

Über die Änderung des Dissociationsgrades der Saccharase als Säure wissen wir bis jetzt noch nichts.

Schließlich muß betont werden, daß wir bei unserer Überlegung über den Temperaturkoeffizienten der enzymatischen Inversion die Michaelissche Annahme zu Grunde gelegt haben, daß die Anfangsgeschwindigkeit der enzymatischen Inversion nur von den Konzentrationen des Rohrzuckers, der Konzentration der Saccharase und der Größe der Gleichgewichtskonstanten beruht. Diese Annahme ist hypothetisch, und besonders bleibt es zu untersuchen, ob nicht durch die Acidität (p_H) die Reaktionsfähigkeit des Rohrzuckers selbst, etwa durch Umlagerung innerhalb des Moleküls, verändert wird.

Für Zimmertemperatur, 18° , wurde von uns ein nicht unerheblich höherer Wert der Michaelisschen Konstante K_M gefunden, als der von Michaelis und Menten angegebene, nämlich $26 \cdot 10^{-3}$ statt $16 \cdot 10^{-3}$.

Michaelis hat das große Verdienst, zuerst eine Theorie der enzymatischen Reaktionsgeschwindigkeiten mit zahlenmäßigen Belegen geliefert zu haben. Eine weitere Prüfung seiner Grundannahmen gehört zweifellos gegenwärtig zu den wichtigsten Aufgaben der allgemeinen Enzymchemie.

¹⁾ Während die H-Konzentration bei Anwendung von beispielsweise HCl fast ganz konstant ist, würde etwa bei Phosphorsäure, Nitrobenzoesäure und bei den sehr schwachen Säuren eine starke Änderung eintreten.