

## **Diffusionsversuche an hochaktiven Saccharasepräparaten.**

Von

**H. v. Euler, A. Hedelius und O. Svanberg.**

Mit 2 Figuren im Text.

---

(Der Redaktion zugegangen am 17. Mai 1920.)

---

Eine Reihe bemerkenswerter Tatsachen deutet darauf hin, daß viele, besonders hydrolysierende, Enzyme den Kolloiden zuzuzählen sind. Dem Verlauf der Enzymreaktionen zufolge wäre eine solche Annahme allerdings nicht erforderlich, vielmehr würde sich die enzymatische Reaktionskinetik sehr wohl mit der Annahme vereinbaren lassen, daß die hydrolysierenden Enzyme sich als Katalysatoren von mittlerem Molekulargewicht im Reaktionsgemisch echt gelöst befinden.

Es fragt sich hiernach, ob der kolloidale Zustand etwas für das Enzym Charakteristisches ist, auf Grund einer sehr großen Zahl verschiedener Atomgruppen, etwa wie bei komplizierten Eiweißkörpern, oder ob Enzyme Molekularaggregate bilden, welche aus einer großen Zahl von miteinander identischen Teilmolekülen bestehen.

Beide Typen von Kolloiden sind ja bekannt.

Wäre letzteres der Fall, so könnte man erwarten, daß gerade der hochdisperse Anteil des Enzyms der wirksamste ist.

Diese prinzipiell wichtige Frage haben wir versucht, durch neue Diffusionsversuche<sup>1)</sup> an unseren weitgehend gereinigten Saccharaselösungen zu beantworten, indem wir bei der

---

<sup>1)</sup> Vgl. die älteren Diffusionsversuche an Saccharase von Euler und Kullberg, Diese Zeitschr. Bd. 73, S. 335 (1911). Dasselbst Bemerkungen zu den Versuchen von R. O. Herzog, Zeitschr. f. Elektrochem. Bd. 13, S. 533 (1907).

Diffusion diejenigen Bedingungen herstellten, welche geeignet waren, das Enzym in seiner einfachsten Molekularform zur Erscheinung zu bringen. Wir haben also — mit anderen Worten — Anhaltspunkte für die untere Grenze des Molekulargewichts der Saccharase gesucht.

Offenbar bildet die Messung der Diffusionsgeschwindigkeit hier die zweckmäßigste Methode. Wir brauchen nur zu erwähnen, daß die Gefrierpunktserniedrigung unserer Saccharaselösung 0,02—0,03° beträgt, um klarzumachen, daß diejenigen Methoden, durch welche die Summe der osmotischen Partialdrucke aller gelösten Substanzen bestimmt wird, hier nicht zum Ziel führen.

Die Methode der Molekulargewichtsbestimmung aus der Größe der Diffusionskonstanten liefert zwar ohne weiteres durchaus nicht allgemein brauchbare Resultate. Gerade bei höher molekularen Stoffen von amphoterem Charakter sind Molekularverbindungen sehr häufig, und so liegt z. B. bei wenig gereinigten Enzymlösungen die Vermutung sehr nahe, daß die Enzymmoleküle gemeinschaftlich mit Eiweißkörpern diffundieren, und daß der beobachtete Diffusionskoeffizient also nicht der des Enzyms, sondern derjenige der Enzymeiweißverbindung ist, so daß ein zu hohes Molekulargewicht für das Enzym gefunden würde.

Will man also aus Diffusionsmessungen einigermaßen bindende Schlüsse über die Molekulargröße einer Substanz ziehen, so ist zunächst eine möglichst weitgehende Reinigung der Lösung erforderlich. Ferner aber wird man sich überzeugen müssen, inwieweit der Diffusionskoeffizient vom zufälligen Lösungszustand der untersuchten Substanz abhängig ist.

Was dann die Berechnung der Molekulargröße aus dem Diffusionskoeffizienten betrifft, so ist daran zu erinnern, daß die Beziehung<sup>1)</sup>  $D \cdot \sqrt{M} = \text{konst.}$  zunächst eine empirische ist. Dieselbe gilt zwar<sup>2)</sup> bis zu Molekulargewichten von etwa 500

<sup>1)</sup> Euler, Wied. Ann., Jubelband S. 273 (1897).

<sup>2)</sup> Öholm, Medd. Nobel Inst. Bd. 2, Nr. 23 (1912). — Über die Anwendung der Einsteinschen Formel siehe auch Euler, Chemie d. Enzyme, 2. Aufl. 1920, S. 75.

mit recht guter Annäherung, darüber hinaus liegen aber wenig Anhaltspunkte vor. Es war unsere Absicht gewesen, den Diffusionskoeffizienten für das Eieralbumin zu bestimmen, für welches Sørensen durch seine exakte osmotische Untersuchung<sup>1)</sup> das Molekulargewicht 34000 ermittelt hatte. Leider konnte diese Messung noch nicht durchgeführt werden; wir werden sie sobald als möglich nachholen. Überhaupt möchten wir betonen, daß die hier mitgeteilten Ergebnisse, welche aus äußeren Gründen abgebrochen werden mußten, als vorläufige anzusehen sind. Zu endgültigen Schlüssen sind die vorliegenden Messungen in keiner Weise ausreichend.

### 1. Versuchsordnungen.

In einem ziemlich tief liegenden Kellerraum der Hochschule, welcher verhältnismäßig erschütterungsfest ist, wurde an einer Grundmauer die Aufstellung der Diffusionsapparate durchgeführt.

Die Temperatur lag bei den meisten Versuchsreihen zwischen 10° und 12° und hielt sich während der einzelnen Versuche, welche im Durchschnitt eine Woche dauerten, innerhalb etwa 0,2° konstant. Auf den Versuchstischen waren die Stative festgeschraubt und die Diffusionsapparate durch geeignete Klammern senkrecht daran befestigt.

Es kamen zweierlei Diffusionsapparate zur Anwendung. Die Mehrzahl der Versuche wurde mit Diffusionsröhren ausgeführt, wie sie Öholm<sup>2)</sup> beschrieben und vielfach benutzt hat. Die Untersuchung wurde damit begonnen, die aufgestellten Apparate — es waren zum Teil Originalapparate Öholms — mit Rohrzuckerlösungen zu aichen, um einen Anschluß an früher festgestellte Werte der Diffusionskonstanten zu gewinnen. Bei diesen Vorversuchen mit Rohrzucker wurde Quecksilber als Sperrflüssigkeit verwendet, bei den Versuchen mit Enzym Chloroform.

Die zweite Apparatform, mit welcher wir gearbeitet haben, lehnt sich an Apparate an, wie sie Hittorf für Über-

<sup>1)</sup> Sørensen, Diese Zeitschr. Bd. 106, 1; 1919.

<sup>2)</sup> Öholm, Zeitschr. f. physik. Chem. Bd. 50, S. 309 (1905).

führungsversuche und später Schuhmeister, v. Wogau<sup>1)</sup>, Öholm<sup>2)</sup> und Ramstedt zu Diffusionsversuchen angewandt hatten. Wir haben diesen Typus so weit als möglich vereinfacht, und unsere Apparate bestanden demgemäß aus mattgeschliffenen Glasplatten von etwa 10 mm Dicke und 10mal 10 cm Kante, welche vertikale Ausbohrungen von 1 cm Radius enthielten. Diese Ausbohrungen paßten genau aufeinander, wenn die Kanten der Platten koinzidierten. Die 4 gebohrten Platten werden durch je eine Grund- und eine Deckplatte geschlossen. Um die erschütterungsfreie Verschiebung der Platten und die Einstellung der Bohrungen übereinander zu erleichtern, wurden die Platten durch Metallrahmen geführt.

In einer längeren Versuchsreihe wurden diese Platten auch zu Zwei-Schicht-Apparaten zusammengestellt. Mit diesen haben wir im allgemeinen weniger gute Übereinstimmung und im Mittel größere Diffusionskonstanten erhalten als mit den Vier-Schicht-Apparaten.

Schließlich gingen wir zu einer weiteren Änderung des Apparates über, indem die drei obersten Schichten der vorhergehenden Konstruktion miteinander vereinigt wurden, so daß nunmehr nur die unterste Schicht von den drei oberen durch Verschiebung zweier Zylinder getrennt werden konnte. Diese Apparate wurden statt aus Glas aus Messing angefertigt. In der Regel wurden aber diese Apparate nicht zur Bestimmung von Diffusionskonstanten, sondern nur zur Reinigung der zu untersuchenden Enzymlösungen verwendet<sup>3)</sup>.

## 2. Methodik.

### a) Röhrenapparate.

Nachdem das Rohr am Stativ vertikal eingestellt war, wurde Quecksilber, bzw. bei Enzymversuchen Chloroform, eingefüllt, bis es die Kapillare der eingeschliffenen Pipette fast erreichte. Nach Beendigung des Einfüllens wurde die Pipette

<sup>1)</sup> v. Wogau, Ann. d. Physik (4) Bd. 23, S. 345 (1907).

<sup>2)</sup> Öholm, Medd. Nobel Inst. Bd. 2, Nr. 22 (1912).

<sup>3)</sup> Vgl. Euler und Swanberg, Diese Zeitschr. Bd. 111 (1920)

herausgenommen, mit Wasser bis zur oberen Marke gefüllt und danach wieder in den Schliff eingesetzt; der Hahn wurde geöffnet und das Wasser bis zur unteren Marke der Pipette ausgelassen. Diese Operation wurde noch zweimal wiederholt, so daß die Diffusionsröhre nun 3 Wasserschichten vom Volumen der Pipette enthielt.

Nun wurde die Pipette mit der zu untersuchenden Lösung (die notwendig spezifisch schwerer als das Wasser sein mußte) gefüllt und hierauf durch vorsichtiges Öffnen des Hahnes langsam (in etwa  $\frac{1}{4}$  Stunde) entleert. Die untersuchte Lösung stellte dann eine scharf abgegrenzte Schicht dar.

Der so gefüllte Apparat wurde nun sich selbst überlassen. Nach Ablauf der erforderlichen Diffusionszeit wurde der Apparat in folgender Weise entleert. Der Hahn der Röhre wurde geöffnet und das Quecksilber bzw. Chloroform in einem Kölbchen aufgefangen. Nachdem alle Sperrflüssigkeit aus dem Apparat ausgelaufen war, wurde die Lösung schichtenweise in kleine Flaschen abgefüllt, die so kalibriert waren, daß sie genau so viel enthielten, wie die Pipette zwischen ihren beiden Marken.

Der Inhalt jedes Fläschchens wurde dann weiter untersucht.

#### b) Plattenapparate.

Die genau aufeinander geschliffenen Platten, deren Höhe mittels Mikrometerschraube zu 10,50 mm gefunden worden war, wurden gut gefettet, und die Bodenplatte wurde genau horizontal auf dem Tisch der Diffusionskammer eingestellt. Die Bohrung der untersten Platte wurde mit der zu untersuchenden Lösung gefüllt, und zwar so, daß beim Überschieben einer neuen Platte ein wenig Flüssigkeit mit fortgeschoben wurde, wodurch eine exakte Füllung der untersten Schicht erreicht wurde.

Wurde nun mit einem Zwei-Schicht-Apparat gearbeitet, so lag die obere Schichtplatte B zunächst dicht auf der unteren A auf, ohne daß die beiden Bohrungen in Berührung miteinander kamen; ihre Bohrung wurde nun mit Wasser gefüllt und eine Deckplatte wurde darübergeschoben, worauf Platte

B über A verschoben wurde, bis die beiden Bohrungen konzentrisch übereinander lagen.

Mit dem Vier-Schicht-Apparat wurde folgendermaßen gearbeitet: Die auf der Grundplatte aufliegende unterste Schichtplatte wurde, wie oben beschrieben, mit der zu untersuchenden Lösung gefüllt; die drei oberen Platten waren schon vorher mit zentrierten Bohrungen aufeinander eingestellt; sie wurden mit Wasser gefüllt, worauf die drei Schichten auf einmal über die unterste geschoben wurden, nachdem der oberste Flüssigkeitszylinder durch eine Deckplatte verschlossen worden war.

Die Versuche wurden nach geeigneter Diffusionszeit in der Weise abgebrochen, daß die einzelnen Schichten durch vorsichtiges Verschieben der einzelnen Platten vollständig voneinander getrennt wurden. Aus jeder Bohrung konnte dann mittels einer trocknen Pipette der Inhalt entnommen werden, welcher dann in kleine Kolben übergeführt und weiter untersucht wurde (siehe unten).

### c) Gehaltsbestimmung der Diffusionsschichten.

Der Saccharasegehalt jeder Schicht wurde durch die Ermittlung der enzymatischen Wirksamkeit bestimmt, also durch die mit der angewandten Saccharasemenge erhaltenen Inversionskonstanten. Dazu wurde folgendermaßen verfahren:

In einem 200-ccm-Erlenmeyerkolben wurden 4,8 g Rohrzucker eingewogen und 10 ccm einer 4%igen  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Lösung zugefügt. Eine so hergestellte Lösung (auf 60 ccm verdünnt) besaß nach Mischung mit dem gleichen Volumen 5%iger Sodalösung im 2-dm-Rohr eine Drehung von  $+5,24^\circ$ . Nach vollständiger Inversion betrug die Drehung  $-1,92^\circ$ .

Nun wurde für jede zu analysierende Schicht ein Kolben mit Zucker und Phosphatlösung aufgestellt und so viel Wasser zugefügt, daß Zuckerphosphatlösung + Enzymlösung + Wasser genau 60 ccm betrug. Der Versuch wurde damit begonnen, daß zum Inhalt des Kolbens die geeignete Menge Enzymlösung zugefügt wurde (Zeit 0). Nach bestimmten Zeiten wurden je 10 ccm abpipettiert und in kleinere Kölbchen, welche 10 ccm 5%ige Sodalösung enthielten, eingetragen, wodurch die In-

version augenblicklich und vollständig unterbrochen wurde; gleichzeitig wurde auch die Mutarotation aufgehoben.

Die mit dekadischen Logarithmen ausgerechneten Inversionskonstanten

$$k = \frac{1}{t} \log \frac{a}{a-x} = \frac{1}{t} \log \frac{R^\circ + L^\circ}{\alpha^\circ + L^\circ} = \frac{1}{t} \log \frac{5,24^\circ + 1,92^\circ}{\alpha^\circ + 1,92^\circ}$$

( $\alpha$  = Drehung zur Zeit  $t$ )

sind durch je drei Versuche ermittelt; bei der von uns gewählten Versuchsanordnung steigen die Konstanten mit der Zeit etwas an, jedoch nicht stärker, als daß aus diesen drei Zahlen der Mittelwert genommen werden konnte.

### 3. Diffusionsversuche mit Saccharaselösungen.

Bei diesen Versuchen kamen die Apparate 1, 2 und die Plattenapparate 1, 2 und 3 zur Verwendung.

Die Inversionsfähigkeit der Lösungen ist auf 1 ccm bezogen; die Konstanten sind mit Briggschen Logarithmen ausgerechnet. Bei der Bestimmung von geringen Saccharasegehalten sind aber oft mehrere ccm verwendet worden; die Inversionskonstanten sind dann durch die Zahl der verwendeten ccm zu dividieren.

Als Saccharaselösungen haben wir teils einen von Svanberg hergestellten Saft verwendet, welcher mit 3 F  $\alpha$  4 bezeichnet wird<sup>1)</sup>, teils ein Präparat 3 G<sup>2)</sup>.

#### a) Versuche mit Röhren-Apparaten oder 4 Platten.

In den folgenden Tabellen bedeutet:

$d$  = die Diffusionszeit in Tagen,

$n$  = die für die betr. Schicht ermittelte Inversionskonstante,

$n'$  = dieser Wert, umgerechnet unter der Voraussetzung, daß die Gesamtwirkung 10000 beträgt,

$D$  = den Diffusionskoeffizienten.

Die Berechnung der Inversionskonstanten  $k$  findet man in den Beilagen (Versuch 1—9) S. 211.

<sup>1)</sup> Svanberg, Diese Zeitschr. Bd. 109, S. 65 (1920).

<sup>2)</sup> Euler und Svanberg, Diese Zeitschr. Bd. 107, 269 (1919).

Temp.	App.	d	Schicht	n	n'	D
-------	------	---	---------	---	----	---

Lösung: 8Fα 4 + 1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, mit Wasser überschichtet.

Versuch 1.

11,2° ± 0,2	1	3,74	1	144	7484	0,0337
			2	47	2426	0,0347
			3	1,5	78	—
			4	1,2	62	—
						Mittel: 0,0342

Versuch 2.

11,2° ± 0,2	2	3,75	1	143	7065	0,0366
			2	54	2668	0,0379
			3	3,9	193	0,0298
			4	1,5	74	—
						Mittel: 0,0348

Versuch 3.

10,8° ± 0,4	1	6,02	1	178	7019	0,0284
			2	68	2682	0,0289
			3	5,4	(213)	—
			4	2,2	86	—
						Mittel: 0,0287

Versuch 4.

10,8° ± 0,4	2	6,02	1	175	6604	0,0308
			2	76	2868	0,0304
			3	10,8	408	—
			4	3,2	120	—
						Mittel: 0,0306

Versuch 5.

11° ± 0,2	Pl.-App. 1 + 2	6,86	1	245	(7233)	—
			2	79	2333	0,0309
			3	9,1	269	0,0364
			4	5,6	165	—
						Mittel: 0,0336

Wie nunmehr wohl allgemein angenommen wird, bildet ein Enzym sowohl mit seinem spezifischen Substrat als mit den Reaktionsprodukten Verbindungen. Für die Saccharase hat Michaelis die Affinität des Enzyms zu Rohrzucker, Fruktose und Glukose zu berechnen versucht.

Von der Existenz solcher Verbindungen Saccharase-Rohrzucker und Saccharase-Glukose ausgehend, haben wir angenommen, daß in denselben die Saccharase in ihrer einfachsten Molekulargröße auftritt, und wir haben deswegen das Enzym teils in Gegenwart von Glukose (Vers. 6 und 7), teils von Rohrzucker (Vers. 8 und 9) diffundieren lassen.

Temp.	App.	d	Schicht	n	n'	D
-------	------	---	---------	---	----	---

## I.

Lösung: 3Fα 4 + 1,5% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 1,5% Glukose mit einer Lösung von 1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 1% Glukose überschichtet.

## Versuch 6.

11,2° ± 0,1	1	4,86	1	189	7286	0,0291
			2	65	2505	0,0293
			3	2,2	86	—
			4	3,2	123	—

## Versuch 7.

11,2° ± 0,2	2	4,87	1	190	7082	0,0279
			2	67	2498	0,0242
			3	7,8	290	0,0305
			4	3,5	130	—

## II.

Lösung: 3Fα 4 + 1,5% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 1,5% Rohrzucker mit einer Lösung von 1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 1% Rohrzucker überschichtet.

## Versuch 8.

12,0° ± 0,2	1	7,83	1	184	6794	0,0254
			2	78	2881	0,0288
			3	5,4	199	—
			4	3,4	126	—

## Versuch 9.

11,0° ± 0,2	2	7,83	1	186	6472	0,0258
			2	84	2920	0,0252
			3	13,7	476	—
			4	3,8	132	—

Die folgenden Versuche beziehen sich auf das Präparat 3 G.  
 Die Tabellen enthalten außer den früher angegebenen Größen  $d$ ,  $n'$  und  $D$  auch noch die Inversionskonstanten  $k \cdot 10^4$  mit den zu ihrer Berechnung erforderlichen Versuchsdaten, Minuten und Drehung im 2-dm-Rohr und schließlich  $x$  (siehe S. 196).

Versuch 10. App. 1.  $t = 11,6^\circ \pm 0,2^\circ$ .

Schicht	Min.	Drehung Grad	$k \cdot 10^4$	$d$	$n'$	$x$	$D$
1 (2 ccm)	30	1,04	128	6,92	7199	1,0115	0,0217
	60	-0,82	136				
	90	-1,40	(154)				
	Mittel: 132						
		∴ $n = 66$					
2 (2 ccm)	40	2,78	45,8	6,92	2598	0,9636	0,0228
	61	1,92	44,4				
	120	-0,13	50				
	Mittel: 47,6						
		∴ $n = 23,8$					
3 (5 ccm)	60	4,69	5,8	6,92	127	1,346	—
	120	4,20	5,7				
	180	3,68	5,9				
	Mittel: 5,8						
		∴ $n = 1,16$					
4 (5 ccm)	60	4,92	3,3	6,92	76	0,5184	—
	120	4,56	3,6				
	180	4,21	3,7				
	Mittel: 3,5						
		∴ $n = 0,7$					

Versuch 11. App. 2.  $t = 11,6^\circ \pm 0,2$ .

Schicht	Min.	Drehung Grad	$k \cdot 10^4$	d	n'	x	D
1 (2 ccm)	30	1,06	127	6,92	6757	0,7489	0,0243
	60	-0,79	184				
	90	-1,39	(145)				
		Mittel: 130					
		$\therefore n = 65$					
2 (2 ccm)	40	2,55	51,2	6,92	2828	0,7254	0,0251
	80	0,70	54,6				
	120	-0,46	57,5				
		Mittel: 54,4					
		$\therefore n = 27,2$					
3 (5 ccm)	60	3,84	15,8	6,92	354	0,8130	0,0224
	120	2,54	17,2				
	180	1,49	17,9				
		Mittel: 17,0					
		$\therefore n = 3,4$					
4 (5 ccm)	60	4,93	3,3	6,92	61	0,5555	—
	120	4,70	2,8				
	180	4,45	2,8				
		Mittel: 2,9					
		$\therefore n = 0,58$					

Versuch 12. App. 1.  $t = 12,9^\circ \pm 0,3$ .

 [Enzymlösung: 3 G (0,5 g in 50 ccm Wasser mit 1,5%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )].

Schicht	Min.	Drehung Grad	$k \cdot 10^4$	d	$n'$	$\alpha$	D
1 (1 ccm)	10	3,68	107	7,03	6968	0,8603	0,0252
	20	2,50	105				
	30	1,37	112				
	Mittel: 108						
		∴ n = 108					
2 (2 ccm)	10	4,03	81	7,03	2671	0,8835	0,0245
	20	2,96	83				
	30	2,02	86				
	Mittel: 83,8						
		∴ n = 41,7					
3 (5 ccm)	30	4,24	21,8	7,03	284	0,9946	0,0218
	60	3,40	21,6				
	90	2,54	22,9				
	Mittel: 21,9						
		∴ n = 4,4					
4 (5 ccm)	30	4,92	6,7	7,03	(77)	(0,5167)	(0,0418)
	60	4,68	5,9				
	90	4,45	5,6				
	Mittel: 6,1						
		∴ n = 1,2					

Versuch 13. App. 2.  $t = 12,9^\circ \pm 0,3$ .

Enzymlösung wie 12.

Schicht	Min.	Drehung Grad	$k \cdot 10^4$	d	$n'$	$\alpha$	D
1 (1 ccm)	10	3,74	103	7,03	6714	0,7284	0,0246
	20	2,53	103				
	30	1,45	109				
		Mittel: 105					
		$\therefore n = 105$					
2 (2 ccm)	10	4,03	81	7,03	2750	0,8011	0,0224
	20	2,88	87				
	30	1,92	90				
		Mittel: 86					
		$\therefore n = 43$					
3 (5 ccm)	30	3,68	35,5	7,03	447	0,7183	0,0249
	60	2,46	34				
	90	1,42	35,9				
		Mittel: 35,1					
		$\therefore n = 7,0$					
4 (5 ccm)	30	4,89	7,2	7,03	89	0,4957	(0,0362)
	60	4,51	7,7				
	90	4,35	6,5				
		Mittel: 7,1					
		$\therefore n = 1,4$					

## b) Versuche mit Zwei-Schicht-Apparaten.

Die Arbeiten mit Zwei-Schicht-Plattenapparaten haben uns in einer längeren Reihe von Versuchen Diffusionskonstanten geliefert, welche einerseits stärker voneinander abweichen, als die mit Vier-Schicht-Apparaten erhaltenen, andererseits im Mittel erheblich höher lagen als diese. Die Versuchsfehler sind bei diesen Zwei-Schicht-Apparaten offenbar bedeutend größer als bei den Vier-Schicht-Apparaten vom Röhren- oder vom Plattentypus. Die Zwei-Schicht-Methode soll deshalb später in Röhrenapparaten noch geprüft werden.

Einstweilen haben wir bei der Berechnung eines Mittelwertes den unten angegebenen Resultaten nur  $\frac{1}{3}$  des Gewichtes der übrigen Daten beigelegt.

Bezüglich der Inversionskonstanten  $k$  siehe die Beilagen zu Plattenversuch I—III. Temp.  $11^{\circ}$ .

	d Tage	Schicht	n	D
Plattenversuch I (14)	2,91	1	193	0,0306
		2	39	
Plattenversuch II (15)	2,91	1	198	0,0380
		2	43	
Plattenversuch III (16)	2,91	1	199	0,0362
		2	42	

#### 4. Berechnung der Versuche.

Zur Berechnung der Diffusionskoeffizienten  $D$  haben wir die Tabellen von Kawalki verwendet. Der Gebrauch dieser Tabellen setzt voraus, daß man die Schichthöhe jedes Apparates kennt. Für die Öholmschen Originalapparate waren die Schichthöhen schon gemessen. Wir haben sie für sämtliche Apparate neu bestimmt, indem wir drei Schichten bekannter Wasservolumina einpipettierten und die Höhe der Schicht etwa 20mal direkt maßen.

Die Zuverlässigkeit der Diffusionskonstanten, welche man aus den einzelnen Schichten erhält, ist sehr verschieden. Nur wenn die Diffusionszeit genügend groß gewählt ist, kann die dritte Schicht verwendet werden. Aus der vierten (obersten) Schicht haben wir aber stets zu hohe Werte erhalten. Dies beruht möglicherweise darauf, daß beim Abzapfen des Chloroforms ein wenig von dieser Flüssigkeit mit Enzymlösung gemengt an der Wand des Diffusionsgefäßes haftet und erst durch die Oberfläche der letzten Schicht mitgerissen wird. Es handelt sich zwar nur um kleine Mengen, der Fehler wird aber doch prozentisch groß. Wir haben deswegen in der Regel nur die erste und zweite, ausnahmsweise auch die dritte Schicht zur Feststellung der  $D$ -Werte verwendet.

Die Schichthöhe unserer Glasplatten war sehr gleichmäßig; sie betrug, wie schon angegeben, 10,50 mm.

Die Berechnung der Zwei-Schicht-Plattenapparate geschah nach der Formel<sup>1)</sup>:

$$\frac{Q_1 - Q_2}{Q_1 + Q_2} = \frac{8x}{\pi^2} \left(1 + \frac{x^2}{9}\right)$$

$Q_1$  die Substanzmenge der unteren Schicht,

$Q_2$  die Substanzmenge der oberen Schicht,

$d$  die Zeit in Tagen,

$l$  die doppelte Schichthöhe.

Außerdem gilt die Beziehung:  $x = e^{-\frac{\pi^2 D d}{l^2}}$

### 5. Die gefundenen Diffusionskonstanten.

1. Mit der Enzymlösung<sup>2</sup> 3 F α 4 (+ 1%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) wurden für die Diffusion in Wasser folgende Konstanten erhalten<sup>3)</sup>:

Versuch	1	2	3	4	5
D	342	348	287	306	336

Dazu kommen, mit  $\frac{1}{3}$  des Gewichtes, die drei mit dem Zwei-Schicht-Apparat gewonnenen und S. 203 angegebenen Konstanten, welche also als eine Konstante, 350, in Rechnung zu setzen sind. Wir erhalten also als Mittelwert:

$$\text{Temp. } 11^\circ \quad D = 0,0328.$$

Diffundiert das Enzym aus der gleichen Lösung 3 F α 4 (+ 1%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) nicht in reines Wasser, sondern in eine Lösung von 1%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  + 1% Glukose, so ergibt sich als Mittel der Versuch 6 und 7:

$$\text{Temp. } 11^\circ \quad D = 0,0283.$$

<sup>1)</sup> Siehe E. Ramstedt, Medd. Nobel Inst., Arrhenius-Festschr. Nr. 5 (1919).

<sup>2)</sup> Svanberg, Diese Zeitschr. Bd. 109, S. 65 (1920); Euler und Svanberg, Diese Zeitschr. Bd. 107, S. 269 (1919).

<sup>3)</sup> Bei diesen Versuchen waren die hohen Diffusionskonstanten der obersten Schicht noch auffallender als sonst. Vielleicht handelt es sich nicht um methodische Fehler bzw. zufällige Versuchsfehler, sondern um die größere Diffusionsfähigkeit der kleinsten Saccharaseteilchen.

Entsprechende Versuche, bei welchen 1% Glukose durch 1% Rohrzucker ersetzt war, ergaben (Versuch 8 und 9):

Temp. 11°       $D = 0,0263.$

2. Wurden 0,50 g festes Saccharasepräparat 3 G in 50 ccm Wasser gelöst und gegen Wasser diffundiert, so war die Konstante

Temp. 12,9°       $D = 0,0222.$

Das gleiche Präparat diffundiert in eine 1%ige  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Schicht (Versuch 12 und 13):

Temp. 12,9°       $D = 0,0239.$

Die gefundenen Mittelwerte sind nun zunächst zum Vergleich untereinander und mit anderen Werten auf eine geeignete übereinstimmende Temperatur zu bringen. Wir wählen dazu 20°, weil Öholm<sup>1)</sup> die bis jetzt ermittelten Diffusionskonstanten für diese Temperatur umgerechnet und zusammengestellt hat.

Öholm (l. c.) hat auch eine sehr gründliche Untersuchung über den Temperaturkoeffizienten  $\alpha$  der Diffusion angestellt, aus welcher hervorgeht, daß  $\alpha$  um so größer ist, je kleiner  $D$ , also je größer das Molekulargewicht des diffundierenden Stoffes ist. Für unseren Fall ist eine starke Extrapolation erforderlich; wir verwenden, bis Versuche über eine hochmolekulare Substanz vorliegen, den Wert  $\alpha = 0,05$ .

Wir erhalten dann für 20°:

Präparat	Diffusionsflüssigkeit	Diff.-Konst. $D$
3 F $\alpha$ 4	Wasser . . . . .	0,047
	1% Phosphat, 1% Glukose	0,041
	1%     „     , 1% Rohrz.	0,038
3 G	Wasser . . . . .	0,0315
	1% Phosphat . . . . .	0,0323

<sup>1)</sup> Öholm, Medd. Nobel Inst. Bd. 2, Nr. 23, S. 25 (1912).

## Reduktion der Diffusionskonstanten auf unendliche Verdünnung.

Die bei den meisten Versuchen von uns angewandte Enzymlösung hatte einen Trockensubstanzgehalt von etwa 1,5% (Lösung 3 F  $\alpha$  4, vom Trockensubstanzgehalt 4,95% verdünnt im Verhältnis rund 1:3), und zeigte eine innere Reibung von 2,44, bezogen auf Wasser von der gleichen Temperatur.

An anderer Stelle<sup>1)</sup> wurde besprochen, in welcher Weise die an mäßig verdünnten Lösungen direkt erhaltenen Diffusionskonstanten wegen der bei mittleren Konzentrationen auftretenden Einflüsse zu korrigieren sind. Es hatte sich auf Grund von Messungen an Rohrzuckerlösungen ergeben, daß der beste Anschluß an die Erfahrung erreicht wird, wenn man diejenige Konzentration in Rechnung zieht, welche nach dem schließlichen Konzentrationsausgleich eintritt, also  $\frac{1}{4}$  derjenigen der untersten Schicht zu Beginn des Versuches. Um die beobachtete Diffusionskonstante auf Normalbedingungen (unendliche Verdünnung) zu reduzieren, hat man die Konstante mit dem für diese Konzentration gültigen Koeffizienten der inneren Reibung (bezogen auf Wasser = 1) zu multiplizieren. Bei Rohrzuckerlösungen war dann noch eine Korrektur deswegen einzuführen, weil der osmotische Druck der Lösung stärker ansteigt als die Konzentration. In den angewandten Enzymlösungen war der osmotische Druck sehr gering (entsprechend einer Gefrierpunktserniedrigung von 0,03°) und kann hier also vernachlässigt werden. Auch ist die tatsächliche Konzentration, auf die Gewichts- oder Volumeinheit Wasser bezogen, in der Lösung von  $1,5 : 4 = 0,385\%$  Trockensubstanzgehalt nur wenig größer, als wenn die gleiche Enzymmenge im reinen Lösungsmittel vorhanden wäre. Wir haben deswegen eine Korrektur wegen der Konzentration nicht eingeführt.

Um eine Korrektur wegen der inneren Reibung anbringen zu können, haben wir folgende Messungen ausgeführt:

<sup>1)</sup> Euler u. Hedelius, Zeitschr. anorg. Chem. Bd. 110 (1920).

Es wurde die ursprüngliche Lösung von bekannter Aktivität ( $k \cdot 10^4 = 370$ ) weiter verdünnt, und die Viskosität dieser Verdünnungen wurde gemessen.

Für die Lösung 3 F  $\alpha$  4 wurden folgende Zahlen erhalten (20°):

Aktivität $k \cdot 10^4$	Innere Reibung Wasser = 1
370	2,44
150	1,63
80	1,28
40	1,17

Es ergab sich also Proportionalität zwischen den beiden tabellierten Größen (siehe Fig. 1).

Wir haben auch die in Versuch 10—13 verwendete 3 G-Lösung auf Viskosität untersucht, und zwar die Viskosität der ursprünglichen Lösung und die mittlere Viskosität der vier Schichten nach der Diffusion.

Aktivität $k \cdot 10^4$	Viskosität	Lösung
155	1,24	(urspr. Lösung)
108	1,21	Schicht 1
41,4	1,13	" 2
4,4	1,07	" 3
1,2	1,027	" 4

Figur 2 zeigt die Beziehung zwischen Aktivität und Viskosität nach erfolgter Diffusion. Diese Ergebnisse sind später noch durch Ermittlung der Beziehung zwischen Aktivität und Trockensubstanzgehalt nach der Diffusion zu ergänzen.

Es ist nun zu fragen, ob es angebracht ist, an Lösungen, deren innere Reibung zum großen Teil durch hochmolekulare bzw. kolloide Stoffe hervorgerufen ist, die Korrektur wegen der inneren Reibung in der gleichen Weise anzubringen, wie an konzentrierteren Lösungen. Nach dem, was wir über die Beweglichkeit von Molekülen in Gelatinelösungen wissen, würde eine solche Korrektur zu groß ausfallen. Andererseits

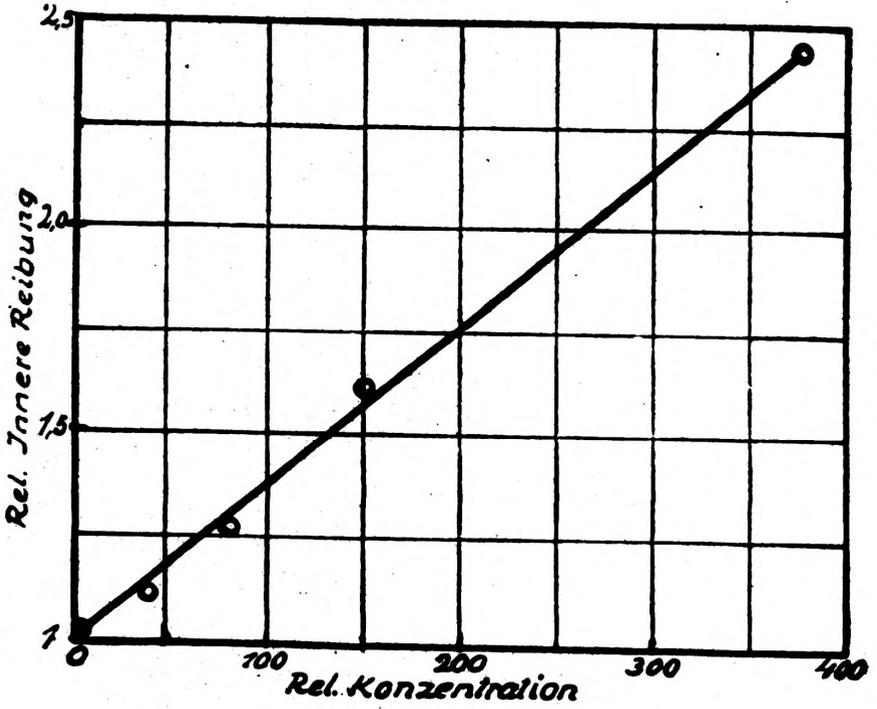


Fig. 1.

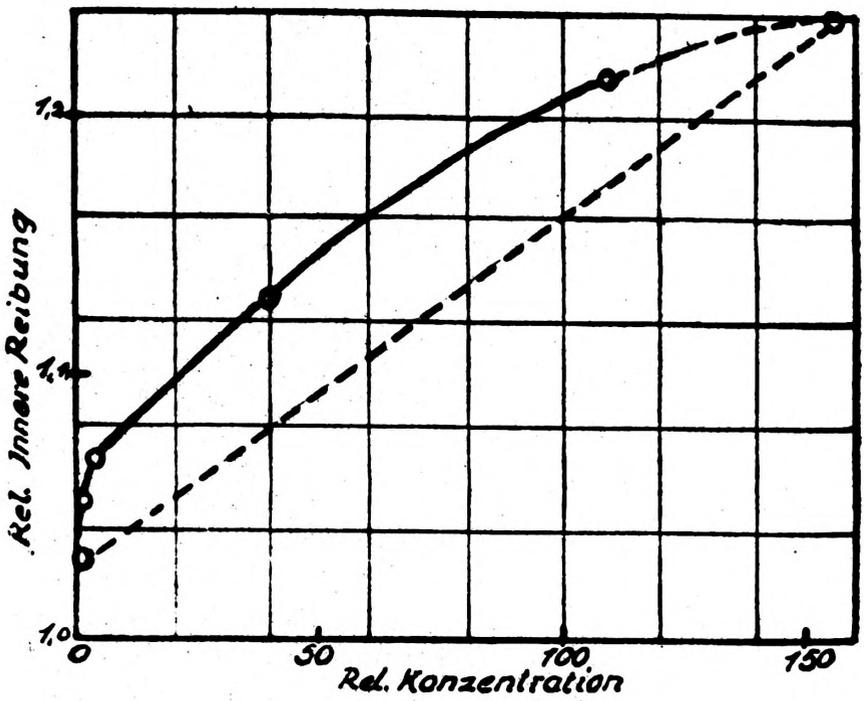


Fig. 2.

haben wir über die Art der Begleitstoffe der Saccharase in unserer Enzymlösung wenig Anhaltspunkte. Wir ziehen es vor, die für Rohrzuckerlösungen (l. c.) berechnete Korrektur einseitig willkürlich mit dem halben Wert anzubringen.

Für die Versuche mit der Enzymlösung 3 F  $\alpha$  4 würde sich der Korrekturfaktor wegen der inneren Reibung zu 1,33 ergeben; wir korrigieren, wie erwähnt, nur mit 1,16.

Für die Versuche mit der Lösung 3 G korrigieren wir entsprechend mit 1,06.

### 5. Vorläufiges Ergebnis.

In der angegebenen Weise haben wir also nun die S. 205 gewonnenen Konstanten auf die Konzentration  $o$  zu reduzieren.

Wir erhalten für 1 a

$$0,047 \times 1,16 = 0,055 \pm 0,005.$$

Bei 1 b und 1 c ist außerdem noch eine Korrektur anzubringen wegen der inneren Reibung der Diffusionsflüssigkeit (das Enzym diffundiert nicht in Wasser, sondern in einer Lösung von 1% Phosphat, 1% Glukose bzw. Rohrzucker). Die innere Reibung einer Lösung, welche 1%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  und 1% Glukose enthält, beträgt 1,07. Es ergibt sich also

$$\text{für 1 b: } 0,041 \times 1,16 \times 1,07 = 0,051,$$

$$\text{für 1 c: } 0,038 \times 1,16 \times 1,07 = 0,047.$$

Nehmen wir auch für 1 b und 1 c die Grenzen  $\pm 0,005$  an, so finden wir, daß die beiden letzten Werte noch innerhalb der Fehlergrenzen von 1 a liegen.

Bei den Lösungen des Präparates 3 G beträgt die Korrektur wegen der inneren Reibung 1,12; die Korrektur wegen der Konzentration ist zu vernachlässigen. Wir finden also:

$$2 \text{ a } 0,0315 \times 1,12 = 0,0353,$$

$$2 \text{ b } 0,0323 \times 1,12 \times 1,03 = 0,0371.$$

In erster Linie fällt hier der große Unterschied zwischen den beiden Gruppen von Diffusionskoeffizienten auf, welche mit der Enzymlösung 3 F  $\alpha$  4 und mit dem Enzympräparat 3 G erhalten worden sind.

Diese Differenz liegt weit außerhalb der Versuchsfehler. Der in der Untersuchung von Euler und Kullberg für

17° erhaltene Wert 0,037 wird, auf 20° umgerechnet, 0,0425, er liegt also zwischen den beiden in dieser Untersuchung erhaltenen Wertgruppen.

Über die Ursache dieser großen Verschiedenheiten der Diffusionsgeschwindigkeit der wirksamen Moleküle verschiedener Saccharasepräparate können wir uns noch nicht aussprechen, bevor weitere experimentelle Ergebnisse gewonnen worden sind.

Wenn wir schließlich versuchen, aus diesen vorläufigen Ergebnissen Anhaltspunkte über die untere Grenze des Molekulargewichtes der Saccharase zu gewinnen, so erhalten wir aus der empirischen Beziehung  $D \sqrt{M}$  nachstehende Werte, wenn wir mit Öholm für 20° den Wert dieses Produktes = 7 setzen, welcher Wert übrigens mit dem von Euler gefundenen, 6 bei 17°, recht nahe übereinstimmt.

Nach obiger Formel erhalten wir aus 1 a das Molekulargewicht<sup>1)</sup>  $M = 16000 + 3000$ .

Entsprechend ergibt sich aus 1 b der Wert 19000 und aus 1 c der Wert 22000 mit den gleichen prozentischen Fehlergrenzen. Wegen dieser noch großen Abweichungen und der verhältnismäßig kleinen Zahl von Messungen können wir bis jetzt noch nicht sagen, ob tatsächlich die Saccharase in Glukose- bzw. Rohrzuckerlösungen (nach Berücksichtigung der inneren Reibung) langsamer diffundiert als in Wasser bzw. sehr verdünnter Phosphatlösung<sup>2)</sup>.

Was sich aber mit Bestimmtheit aus unseren Messungen ergibt, ist das Resultat, daß durch Substrat oder Reaktionsprodukte die Saccharase nicht aus einem höheren Aggregationszustand in kleinere Moleküle übergeführt wird, und daß in optimaler Acidität das Enzym keine sehr wesentlich andere Diffusionskonstante besitzt als in reinem Wasser.

<sup>1)</sup> Dies ist also einstweilen als der Minimalwert der Saccharase zu betrachten.

<sup>2)</sup> Wäre dies der Fall, bzw. würden die erhaltenen Ziffern richtige Mittelwerte darstellen, so könnte man schließen, daß sich an ein Saccharasemolekül eine ziemlich große Anzahl (im Mittel etwa 10) Rohrzucker bzw. Glukosemoleküle anlagern, entsprechend dem höheren Molekulargewicht der diffundierenden Moleküle.

## Beilagen.

## Versuch 1.

Schicht	t (Min.)	Drehung Grad	a — x	k · 10 <sup>4</sup>	k · 10 <sup>4</sup> per ccm		
1 (1 ccm)	8	3,66	5,58	135	144		
	16	2,27	4,19	145			
	24	1,17	3,09	152			
			Mittel:	144			
2 (2 ccm)	11	3,82	5,74	87		47	
	21	2,63	4,55	94			
	31	1,62	3,54	99			
			Mittel:	94			
3 (5 ccm)	20	5,00	6,92	7,2			1,5
	40	4,77	6,69	7,4			
	60	4,52	6,44	7,7			
			Mittel:	7,5			
4 (5 ccm)	20	5,02	6,94	6,8	1,2		
	40	4,89	6,81	5,4			
	60	4,71	6,63	5,6			
			Mittel:	6,0			

## Versuch 2.

Schicht	t (Min.)	Drehung Grad	a — x	k · 10 <sup>4</sup>	k · 10 <sup>4</sup> per ccm		
1 (1 ccm)	8	3,67	5,59	134	143		
	16	2,27	4,19	145			
	24	1,13	3,05	150			
			Mittel:	143			
2 (2 ccm)	11	3,60	5,52	102		54	
	21	2,35	4,27	107			
	31	1,28	3,20	113			
			Mittel:	108			
3 (5 ccm)	20	4,68	6,60	17,8			3,9
	40	4,00	5,92	20,6			
	60	3,50	5,42	20,2			
			Mittel:	19,5			
4 (5 ccm)	20	4,95	6,87	9,2	1,5		
	40	4,80	6,72	6,9			
	60	4,62	6,54	6,7			
			Mittel:	7,5			

## Versuch 3.

Schicht	t (Min.)	Drehung Grad	a — x	k · 10 <sup>4</sup>	k · 10 <sup>4</sup> per ccm
1 (1 ccm)	8	3,30	5,22	171	178
	16	1,81	3,73	177	
	24	0,66	2,58	185	
	Mittel:			178	
2 (2 ccm)	10	3,37	5,29	132	68
	20	1,84	3,76	140	
	30	0,71	2,63	135	
	Mittel:			136	
3 (5 ccm)	20	4,39	6,31	27	5,4
	40	3,66	5,58	27	
	60	3,00	4,92	27	
	Mittel:			27	
4 (5 ccm)	20	4,83	6,75	12,8	2,2
	40	4,60	6,52	10,1	
	60	4,29	6,21	10,3	
	Mittel:			11,0	

## Versuch 4.

Schicht	t (Min.)	Drehung Grad	a — x	k · 10 <sup>4</sup>	k · 10 <sup>4</sup> per ccm
1 (1 ccm)	8	3,33	5,25	169	175
	16	1,83	3,75	176	
	24	0,73	2,65	180	
	Mittel:			175	
2 (2 ccm)	10	3,25	5,17	142	76
	20	1,62	3,54	153	
	30	0,44	2,36	161	
	Mittel:			152	
3 (5 ccm)	20	3,69	5,61	53	10,8
	40	2,45	4,37	54	
	60	1,44	3,36	55	
	Mittel:			54	
4 (5 ccm)	20	4,69	6,61	17,3	3,2
	40	4,28	6,20	15,6	
	60	3,94	5,86	14,5	
	Mittel:			15,8	

## Versuch 5.

Schicht	t (Min.)	Drehung Grad	a - x	k · 10 <sup>4</sup>	k · 10 <sup>4</sup> per ccm
1 (1 ccm)	7	3,10	5,02	221	245
	14	1,28	3,20	250	
	21	0,07	1,99	265	
	Mittel:			245	
2 (1 ccm)	10	4,09	6,01	76	79
	20	2,99	4,91	82	
	30	2,06	3,98	85	
	Mittel:			79	
3 (2 ccm)	40	4,20	6,12	17,0	9,1
	80	3,20	5,12	18,2	
	120	2,27	4,19	19,4	
	Mittel:			18,2	
4 (2 ccm)	60	4,31	6,23	10	5,6
	120	3,29	5,21	11,4	
	180	2,45	4,37	12	
	Mittel:			11,2	

## Versuch 6.

Schicht	t (Min.)	Drehung Grad	a - x	k · 10 <sup>4</sup>	k · 10 <sup>4</sup> per ccm
1 (1 ccm)	8	3,27	5,19	175	189
	16	1,64	3,56	190	
	24	0,44	2,36	201	
	Mittel:			189	
2 (2 ccm)	10	3,51	5,43	120	65
	20	2,06	3,98	128	
	30	0,84	2,76	138	
	Mittel:			129	
3 (5 ccm)	20	4,87	6,79	11,5	2,2
	40	4,56	6,48	10,8	
	60	4,19	6,11	11,3	
	Mittel:			11,2	
4 (5 ccm)	20	4,76	6,68	15,0	3,2
	40	4,24	6,16	16,2	
	60	3,85	5,77	15,7	
	Mittel:			15,8	

## Versuch 7.

Schicht	t (Min.)	Drehung Grad	a — x	k · 10 <sup>4</sup>	k · 10 <sup>4</sup> per ccm
1 (1 ccm)	8	3,21	5,13	181	190
	16	1,66	3,58	188	
	24	0,43	2,35	202	
	Mittel:			190	
2 (2 ccm)	10	3,49	5,41	123	67
	20	1,92	3,84	136	
	30	0,74	2,68	142	
	Mittel:			134	
3 (5 ccm)	20	4,06	5,98	39	7,8
	40	3,14	5,06	38	
	60	2,25	4,17	39	
	Mittel:			39	
4 (5 ccm)	20	4,72	6,64	16,3	3,5
	40	4,21	6,13	16,7	
	Mittel:			16,5	

## Versuch 8.

Schicht	t (Min.)	Drehung Grad	a — x	k · 10 <sup>4</sup>	k · 10 <sup>4</sup> per ccm
1 (1 ccm)	12,5	2,40	4,32	176	184
	19	1,34	3,26	180	
	27	0,23	2,15	190	
	Mittel:			184	
2 (2 ccm)	17	2,10	4,02	148	78
	22,5	1,27	3,19	156	
	31,5	0,30	2,22	162	
	Mittel:			156	
3 (5 ccm)	23	4,30	6,22	26,5	5,4
	40	3,63	5,55	27,6	
	60	3,00	4,92	27,2	
	Mittel:			27,1	
4 (5 ccm)	25	4,50	6,42	19	3,4
	40	4,25	6,17	16,2	
	61	3,80	5,72	16	
	Mittel:			17,0	

## Versuch 9.

Schicht	t (Min.)	Drehung Grad	a - x	k · 10 <sup>4</sup>	k · 10 <sup>4</sup> per ccm
1 (1 ccm)	12	2,42	4,34	181	186
	18,5	1,38	3,30	182	
	26,5	0,26	2,18	195	
	Mittel:			186	
2 (2 ccm)	16,5	2,01	3,93	158	84
	22	1,10	3,02	171	
	31	0,17	2,09	173	
	Mittel:			167	
3 (5 ccm)	22,5	3,17	5,09	66	13,7
	40	1,90	3,82	68,4	
	60	0,74	2,66	71,7	
	Mittel:			68,7	
4 (5 ccm)	24,5	4,50	6,42	19,4	3,8
	40	4,12	6,04	18,6	
	60	3,58	5,50	19,1	
	Mittel:			19,0	

## Platten-Versuch I (14).

Schicht	t (Min.)	Drehung Grad	a - x	k · 10 <sup>4</sup>	k · 10 <sup>4</sup> per ccm
1 (1 ccm)	7	3,42	5,34	183	193
	14	1,94	3,86	192	
	21	0,77	2,69	203	
	Mittel:			193	
2 (1 ccm)	14	4,37	6,29	40	39
	28	3,67	5,59	38	
	42	3,02	4,94	39	
	Mittel:			39	

## Platten-Versuch II (15)

Schicht	t (Min.)	Drehung Grad	a - x	k · 10 <sup>4</sup>	k · 10 <sup>4</sup> per ccm
1 (1 ccm)	7	3,39	5,31	186	198
	14	1,89	3,81	196	
	21	0,64	2,56	212	
			Mittel:	198	
2 (1 ccm)	14	4,34	6,26	42	43
	28	3,48	5,40	44	
	42	2,75	4,67	44	
			Mittel:	43	

## Platten-Versuch III (16).

Schicht	t (Min.)	Drehung Grad	a - x	k · 10 <sup>4</sup>	k · 10 <sup>4</sup> per ccm
1 (1 ccm)	7	3,42	5,34	197	199
	14	1,89	3,81	196	
	21	0,63	2,55	214	
			Mittel:	199	
2 (1 ccm)	14	4,35	6,27	41	42
	28	3,55	5,47	42	
	42	2,86	4,78	42	
			Mittel:	42	