

Über die quantitative Wirkung der Enzyme.

Von

G. Tammann und O. Svanberg.

Mit 9 Figuren im Text.

(Aus dem Institut für physikalische Chemie in Göttingen.)
(Der Redaktion zugegangen am 11. August 1920.)

Im folgenden soll ein möglichst anschauliches Bild gegeben werden über die ideale Wirkung eines Enzyms, dessen Einwirkung der von Emulsin auf Salizin ziemlich nahekommt.

Durch Vergleich der Wirkung eines realen Enzyms mit diesem idealen Bilde werden die Abweichungen des realen Falles vom idealen leicht erkannt werden und dadurch wird die Charakterisierung des realen Falles wesentlich erleichtert werden.

Die Hervorhebung des idealen Bildes hat auch auf anderen Gebieten, den Abweichungen der realen Gase von den Gesetzen der idealen Gase, oder den Abweichungen der Lösungen vom Verhalten der verdünnten Lösungen, wesentliche Dienste geleistet.

Die Einwirkung der Enzyme auf ihre Substrate ist, schon was die Zahl der unabhängigen Variablen betrifft, welche diese Einwirkungen beeinflussen, eine komplizierte Erscheinung. Wer hier einen Überblick über das ganze Erscheinungsgebiet einer einzigen Reaktion zu gewinnen wünscht, wird sich am besten am idealen Fall orientieren, damit er nicht in Gebieten arbeitet, die für die Charakterisierung des Enzyms von untergeordnetem Interesse sind.

Es handelt sich um die Lösung einer Aufgabe der chemischen Kinetik, deren Grundbedingungen schon vor längerer

Zeit durch Experimentaluntersuchungen festgelegt sind¹. Es hatte sich damals herausgestellt, daß das gelöste Emulsin nach dem Reaktionsverlauf monomolekularer Reaktionen zerfällt, und daß für die Spaltung des Substrats (Salizin) derselbe Verlauf in erster Annäherung zutrifft. Kennt man die Abhängigkeit dieser beiden Geschwindigkeitskonstanten von der Temperatur, die durch eine Gleichung mit einer neuen Konstanten wiedergegeben werden kann, so ist die Substratspaltung in Prozenten der ursprünglich vorhandenen Substratmenge in Abhängigkeit von der Zeit, der Temperatur und den ursprünglich vorhandenen Enzym- und Substratkonzentrationen berechenbar.

Diese Konstanten sollen in folgender Weise bezeichnet werden:

die Zerfallskonstante des Enzyms ρ_{T_0} ,

die Konstante der Spaltungsgeschwindigkeit des Substrats c_{T_0}

und zwei Konstanten A_p und A_c , welche in den Gleichungen der Temperaturabhängigkeit für ρ_{T_0} und c_{T_0} vorkommen, nämlich in den Gleichungen

$$\rho_{T_1} = \rho_{T_0} \cdot e^{\frac{A_p (T_1 - T_0)}{T_0 T_1}} \quad 1)$$

und

$$c_{T_1} = c_{T_0} \cdot e^{\frac{A_c (T_1 - T_0)}{T_0 T_1}} \quad 2)$$

Wenn in diesen beiden Gleichungen die Werte ρ_{T_0} und A_p sowie c_{T_0} und A_c bekannt sind, so sind alle Fragen betreffend den quantitativen Verlauf der Reaktion bei Änderung der Ferment- und Substratkonzentration, sowie der Einwirkungszeit und der Temperatur quantitativ beantwortbar.

In der Definition für ρ_{T_0} und c_{T_0} ist enthalten, daß der Zerfall des Enzyms eine monomolekulare Reaktion ist, und daß dasselbe für die Spaltung des Substrats zutrifft.

Jedes Enzym ist charakterisiert durch das Wertepaar

¹) G. Tammann, Zeitschr. f. physik. Chem. Bd. 18, S. 426 (1895).

ρ_{T_0} und A_p und seine Einwirkung auf das Substrat durch das Wertepaar c_{T_0} und A_c . Um die nach verschiedener Einwirkungsdauer von verschiedenen Enzymmengen bei verschiedenen Temperaturen gespaltenen Substratmengen zu berechnen, nehmen wir an, daß die Geschwindigkeit der Substratspaltung

$\frac{dy}{d\vartheta}$ proportional ist der Fermentkonzentration $(X - x)$ und der Substratkonzentration $(B - y)$ zur Zeit ϑ , und daß zu Beginn der Reaktion, $\vartheta = 0$, die Fermentkonzentration gleich X und die Substratkonzentration B ist. Dann gilt die Gleichung

$$\frac{dy}{d\vartheta} = c_T (X - x) (B - y) \quad 3)$$

c_T ist also die in der Zeiteinheit gespaltene Substratmenge bei einer Enzym- und Substratkonzentration, die gleich der Einheit sind.

Verläuft die Enzymspaltung monomolekular, so ist

$$X - x = X \cdot e^{-\rho_T \cdot \vartheta} \quad 4)$$

Setzt man diesen Wert in die vorige Gleichung, so folgt nach einer kleinen Umformung

$$\frac{dy}{B - y} = c_T X e^{-\rho_T \cdot \vartheta} \cdot d\vartheta$$

Integriert man diese Differentialgleichung und führt die Integrationskonstante ein, die sich zu $\ln B - \frac{c}{\rho} X$ ergibt, so erhält man die Gleichung:

$$\ln \frac{B - y}{B} = - \frac{c_T}{\rho_T} X \cdot \left(1 - e^{-\rho_T \cdot \vartheta} \right) \quad 5)$$

Mit dieser Gleichung kann die Menge des nach beliebigen Zeiten ϑ vom Enzym gespaltenen Substrats y berechnet werden, wenn die Anfangskonzentrationen des Ferments X und des Substrats B , sowie die Zerfallskonstante ρ_T des Ferments und die Spaltungskonstante c_T des Substrats für die Temperatur, bei der die Reaktion sich vollzieht, gegeben sind. Für sehr große Zeiten ϑ , streng für $\vartheta = \infty$, wird das zweite Glied

der Klammer verschwindend klein und es ergibt sich nach einer Umformung die Gleichung:

$$y = B - B e^{-\frac{c_T}{\rho_T} \cdot X} \quad 6)$$

oder

$$\frac{y}{B} \cdot 100 = 100 \left(1 - e^{-\frac{c_T}{\rho_T} \cdot X} \right) \quad 7)$$

Diese Gleichung gibt die Abhängigkeit der nach der Zeit $\vartheta = \infty$ gespaltenen Menge des Substrats in Prozenten seiner ursprünglichen Menge von der Fermentmenge bei einer bestimmten Temperatur wieder. Der Verlauf dieser Grenzkurve ist von Interesse, er wird bestimmt von dem Exponenten $\frac{c_T}{\rho_T} X$. Wenn dieser Exponent einen großen Wert hat, $c_T \cdot X$

groß gegen ρ_T ist, so wird $\frac{y}{B} \cdot 100$ sich dem Werte 100 nähern, diesen Wert aber streng genommen nie erreichen. Die Spaltung des Substrats kann also bei noch so großer Enzymmenge und sogar bei 0° nach noch so langer Zeit nicht vollständig werden, praktisch kann sie aber durch hinreichende Vergrößerung der Enzymmenge innerhalb der Versuchsfehler Werte von 100% erreichen. Wird aber ρ_T bei steigender Temperatur groß gegen $c_T \cdot X$, so wird nur ein kleiner Teil des Substrats gespalten, weil das Enzym so schnell zerfällt, daß es nur geringe Wirkungen ausüben kann.

Die Zerfallskonstante des Enzyms in Abhängigkeit von der Temperatur.

Aus folgenden Zerfallskonstanten des Emulsins wurde die Konstante A_ρ der Gleichung 1 für zwei Temperaturintervalle von 25 bis 55° und von 60 bis 75° mit Hilfe der Werte für 25 und 60° berechnet. Die direkt gefundenen Werte (Zeitschr. f. physik. Chem. Bd. 18, S. 433) sind in folgender Tabelle verzeichnet und in Fig. 1 als Kurve ρ zur Anschauung gebracht.

Tabelle 1.

| Temperatur Grad | ρ | $A\rho$ |
|--------------------|--------|----------|
| 25 | 0,0035 | } 15,206 |
| 30 | 0,008 | |
| 40 | 0,04 | |
| 45 | 0,086 | |
| 50 | 0,18 | |
| 55 | 0,37 | |
| 60 | 0,80 | } 22,826 |
| 65 | 2,20 | |
| 70 | 5,9 | |
| 75 | 15,3 | |

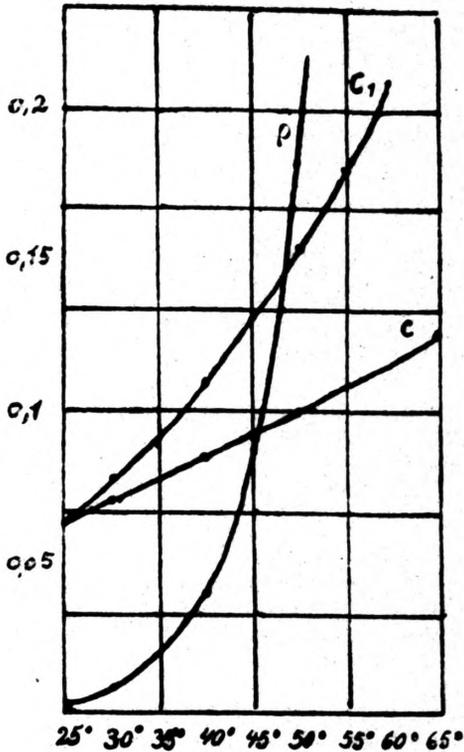


Fig. 1.

Die Spaltungskonstante des Substrats in Abhängigkeit von der Temperatur.

Die Spaltung des Salizins verläuft zwischen 25 und 75 ° (loc. cit. 436) im Vergleich zu einer monomolekularen Reaktion mit einer Verzögerung. Da es wahrscheinlich ist, daß

sie zu Beginn den Verlauf monomolekularer Reaktionen hat, so sind nur die Konstanten zu Beginn der Reaktion berücksichtigt und aus ihnen ist der Wert A_c der Gleichung 2 berechnet. In der folgenden Tabelle sind die Werte für 25 und 45° mit den früher gefundenen identisch, die anderen sind mit Hilfe des Wertes A_c berechnet.

Tabelle 2.

| Temperatur Grad | c | A_c |
|--------------------|-------|--------|
| 25 | 0,064 | } 1668 |
| 30 | 0,070 | |
| 40 | 0,084 | |
| 45 | 0,091 | |
| 50 | 0,099 | |
| 65 | 0,124 | |
| 75 | 0,143 | |

In Fig. 1 sind diese Werte durch die Kurve c wiedergegeben. Der Temperatureinfluß auf die Zerfallskonstante ρ ist ungleich größer als der auf die Spaltungskonstante c. Außerdem wurde noch ein doppelt so großer Wert von A_c angenommen, welcher sich dem Werte A_c der Rohrzucker-spaltung durch Invertase (bei etwa 70°) anschließt¹⁾. Mit diesem Werte und dem von c für 25° sind die Werte für die anderen Temperaturen berechnet, in der Tabelle 3 zusammengefaßt und in Fig. 1 als Kurve c_1 dargestellt.

Tabelle 3.

| Temperatur Grad | c_1 | A_c |
|--------------------|-------|--------|
| 25 | 0,064 | } 3336 |
| 30 | 0,077 | |
| 40 | 0,109 | |
| 45 | 0,128 | |
| 50 | 0,152 | |
| 55 | 0,178 | |
| 60 | 0,208 | |
| 65 | 0,241 | |

¹⁾ H. v. Euler und Laurin, Diese Zeitschr. Bd. 102, S. 64 (1919).

Die Grenzkurven $\vartheta = \infty$ für verschiedene Temperaturen.

Da die Zerfallskonstante des Enzyms und die Spaltungskonstante des Substrats für verschiedene Temperaturen gegeben sind, so können mit Hilfe der Gleichung 7 die nach sehr langen Zeiten von verschiedenen Fermentmengen gespaltenen Substratmengen in Prozenten seiner ursprünglichen Menge für verschiedene Temperaturen berechnet werden. In Fig. 2 sind die Resultate dieser Rechnungen dargestellt. Bei

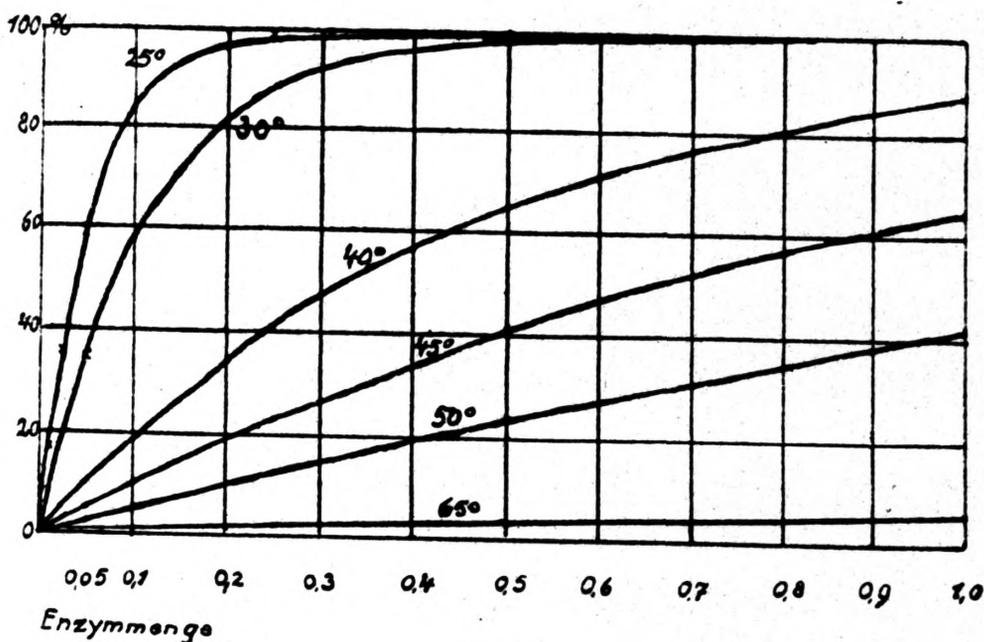


Fig. 2.

größerer Enzymmenge und tieferen Temperaturen, in unserem Falle von der Enzymmenge 0,2 an bei 25°, wird nach sehr langer Zeit die gespaltenen Substratmenge fast gleich 100%. Ferner ist zu ersehen, daß kleinere Fermentmengen auch bei tieferer Temperatur ganz und gar nicht alles Substrat spalten können, und daß mit wachsender Temperatur die von derselben Enzymmenge gespaltenen Substratmengen sehr stark abnehmen.

Logarithmiert man die Gleichung 6, so ergibt sich

$$\ln \frac{B-y}{B} = -\frac{c_T}{\rho_T} \cdot X$$

Der Wert $\ln \frac{B-y}{B}$ ist also proportional der Enzymmenge X, was für die Reaktion von Emulsin auf Salizin bei 65° auch innerhalb der Versuchsfehler zutrifft (loc. cit. S. 439). Wenn diese Gleichung erfüllt ist, so kann aus den nach sehr langer Zeit gespaltenen Substratmengen die Zerfallskonstante ρ_T des Enzyms bei bekannten Werten von c_T und X oder die Spaltungskonstante c_T des Substrats bei bekannten Werten von ρ_T und X berechnet werden. Auch für die Bestimmung von Fermentmengen X ist diese Beziehung von Bedeutung. Die nach sehr langer Zeit gespaltenen Substratmengen wachsen mit der Enzymmenge bei tieferen Temperaturen zuerst stark an und werden dann von weiter wachsender Enzymmenge von dieser nur wenig beeinflusst, weil die Spaltung des Substrats fast vollständig geworden ist. Bei 50° dagegen ist die gespaltene Substratmenge fast proportional der Enzymmenge. Daher empfiehlt es sich, zur Bestimmung von Enzymkonzentrationen über ein weiteres Bereich derselben die Spaltung des Substrats in diesem Falle bei 45—50° vorgehen zu lassen. Die Temperatur, bei der die Proportionalität zwischen Enzym- und gespaltenen Substratmenge angenähert besteht und bei der die gespaltene Substratmenge unabhängig von der Einwirkungsdauer bei gewissen Beträgen derselben wird, ändert sich mit den Werten des Quotienten $\frac{c_T}{\rho_T}$. Hierbei hat man noch den Vorteil, daß die gespaltene Substratmenge bei Temperaturen über 45° bei gewissen Werten der Einwirkungsdauer von der Zeit unabhängig ist, weil bei höheren Temperaturen das Enzym zu Beginn der Einwirkung fast vollständig zerfällt.

Die zur Zeit ϑ gespaltenen Substratmengen erhält man aus den zur Zeit $\vartheta = \infty$ gespaltenen, indem man die entsprechenden Logarithmen mit dem Faktor

$$(1 - e^{-\rho_T \vartheta})$$

multipliziert. Bei größeren Werten von ρ_T und ϑ wird $e^{-\rho_T \vartheta}$ verschwindend klein, der Faktor also gleich 1. In der fol-

genden Tabelle sind für $\vartheta = 50$ und 100 Stunden die Werte des Faktors

$$(1 - e^{-\rho_T \vartheta})$$

für verschiedene Temperaturen und die entsprechenden ρ -Werte berechnet.

Tabelle 4.

| Temperatur Grad | ρ | $\vartheta = 50$ | $\vartheta = 100$ |
|--------------------|--------|------------------|-------------------|
| 25 | 0,0035 | 0,1605 | 0,2953 |
| 30 | 0,008 | 0,3297 | 0,5507 |
| 40 | 0,04 | 0,8647 | 0,9817 |
| 45 | 0,086 | 0,9864 | 0,9998 |
| 50 | 0,18 | 0,9999 | 1 |
| 55 | 0,37 | 1 | 1 |
| 60 | 0,80 | 1 | 1 |
| 65 | 2,20 | 1 | 1 |
| 70 | 5,9 | 1 | 1 |
| 75 | 15,3 | 1 | 1 |

Man sieht, daß von 45° an die nach der Einwirkungs-dauer von 100 Stunden gespaltene Substratmenge sich von der nach der Einwirkungs-dauer $\vartheta = \infty$ nicht mehr merklich unterscheidet. Bei kürzerer Einwirkungs-dauer gilt das für eine etwas höhere Temperatur.

Die Abhängigkeit der gespaltenen Substratmenge von der Temperatur.

Schreibt man die Gleichung 5 in der Form

$$y = B - B e^{-\frac{c_T}{\rho_T} X (1 - e^{-\rho_T \vartheta})}$$

und berücksichtigt, daß $\frac{c_T}{\rho_T}$ und ρ_T von der Temperatur abhängt, so ist ersichtlich, daß y in seiner Abhängigkeit von der Temperatur nur dann ein Maximum haben wird, wenn

$$\frac{c_T}{\rho_T} X (1 - e^{-\rho_T \vartheta})$$

in seiner Abhängigkeit von der Temperatur ein Maximum hat.

Bei niedrigen Temperaturen, bei denen c_T groß im Vergleich zu ρ_T ist, hat dieser Ausdruck verschwindende Werte. Er wächst dann mit der Temperatur an, muß aber wieder abnehmen, weil ρ_T im Vergleich zu c_T sehr groß wird. Von der Enzymmenge X wird die Lage der maximalen Einwirkung unabhängig sein, dagegen wird sie von der Einwirkungszeit abhängen.

Eine notwendige Bedingung für das Auftreten eines Temperaturoptimums der gespaltenen Substratmenge ist, daß $A_p > A_c$ ist, oder daß die Zerfallskonstante ρ_T viel schneller mit der Temperatur zunimmt als die Spaltungskonstante c_T des Substrats. Da die Enzyme allgemein sehr viel weniger stabil als die Substrate sind, so wird diese Bedingung ganz allgemein zutreffen, und daher für alle Enzyme eine Optimaltemperatur ihrer Wirkung zu erwarten sein, was auch zutrifft.

a) Die Abhängigkeit der gespaltenen Substratmenge von der Zeit bei verschiedenen Temperaturen.

Führt man in die Gleichung 5 die ρ_T - und c_T -Werte der Tabellen 1 und 2 ein, so ergeben sich für die Fermentmenge 1 bei verschiedenen Temperaturen die in Fig. 3 ange-

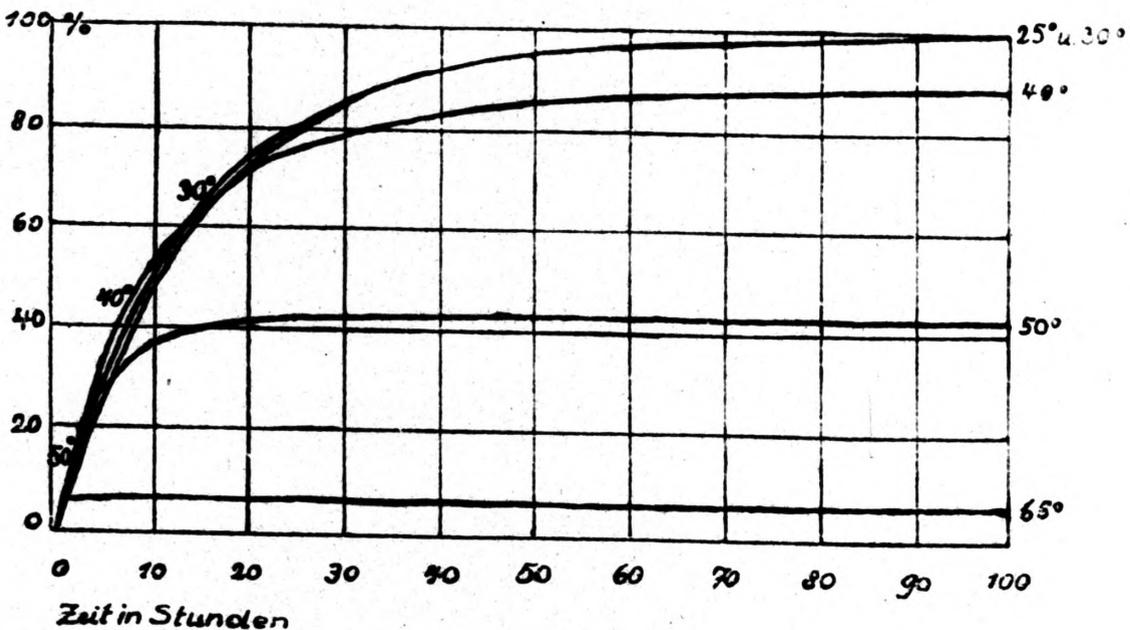


Fig. 3.

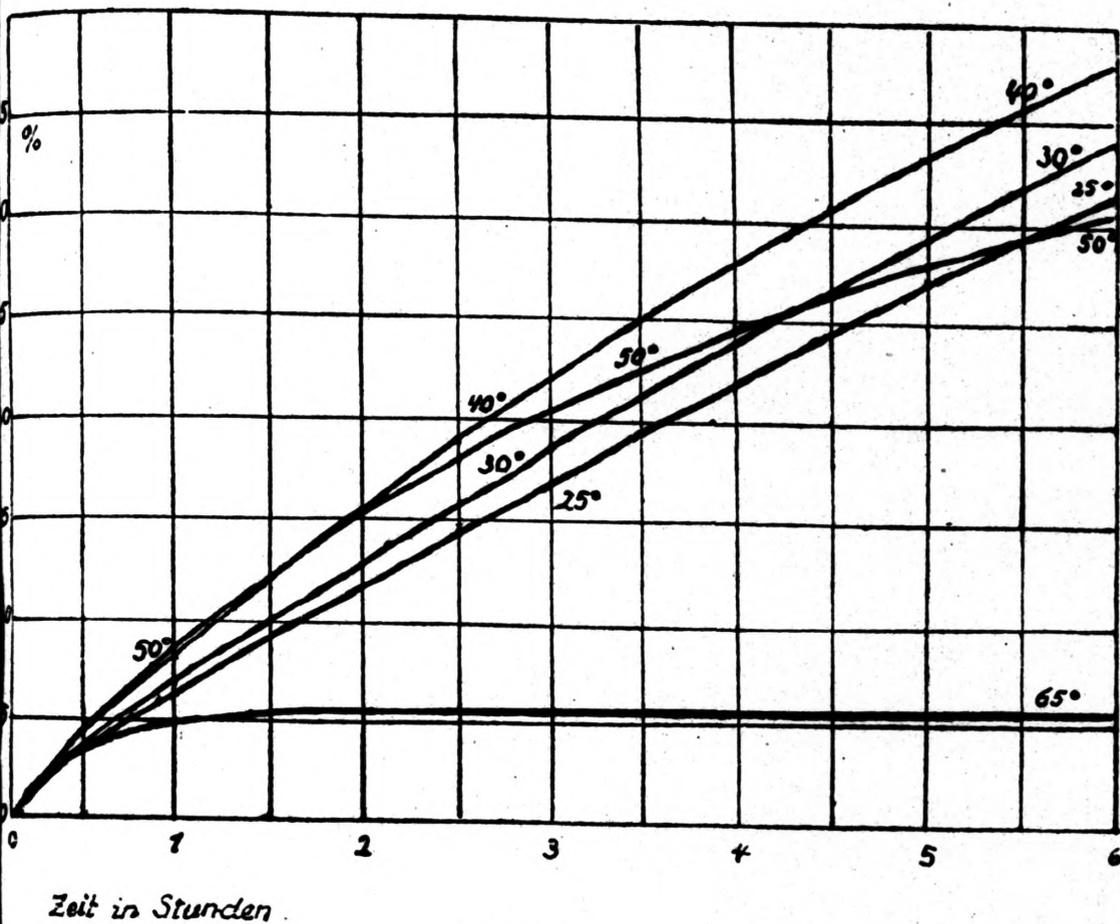


Fig. 4.

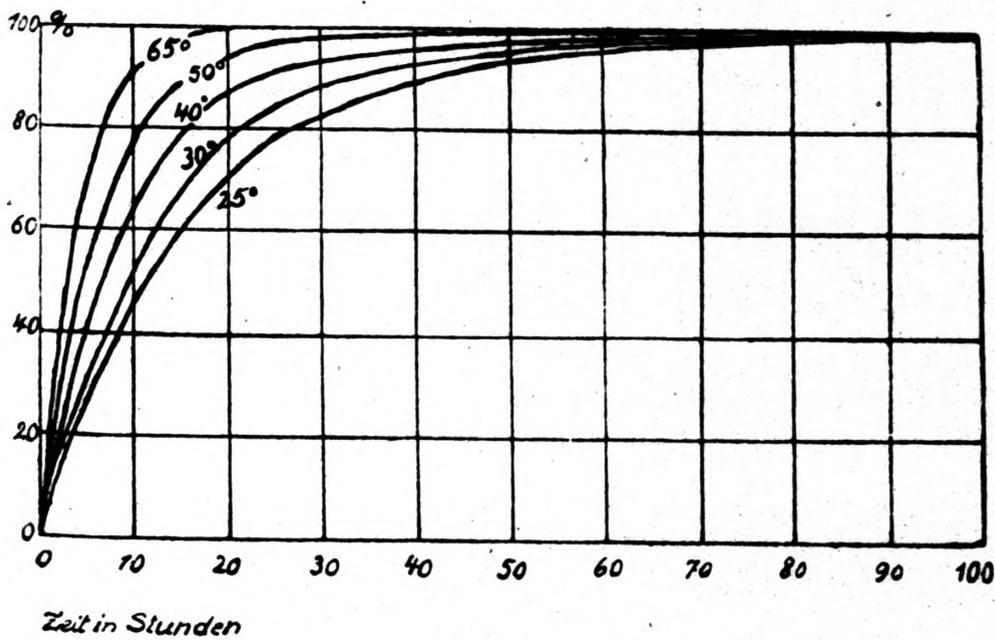


Fig. 5.

gebenen Werte des gespaltenen Substrats $\frac{y}{B} \cdot 100$. Nach längeren Zeiten — 50 und mehr Stunden — unterscheiden sich diese Werte für niedrige Temperaturen unter 30° nicht merklich und nehmen dann mit steigender Temperatur für

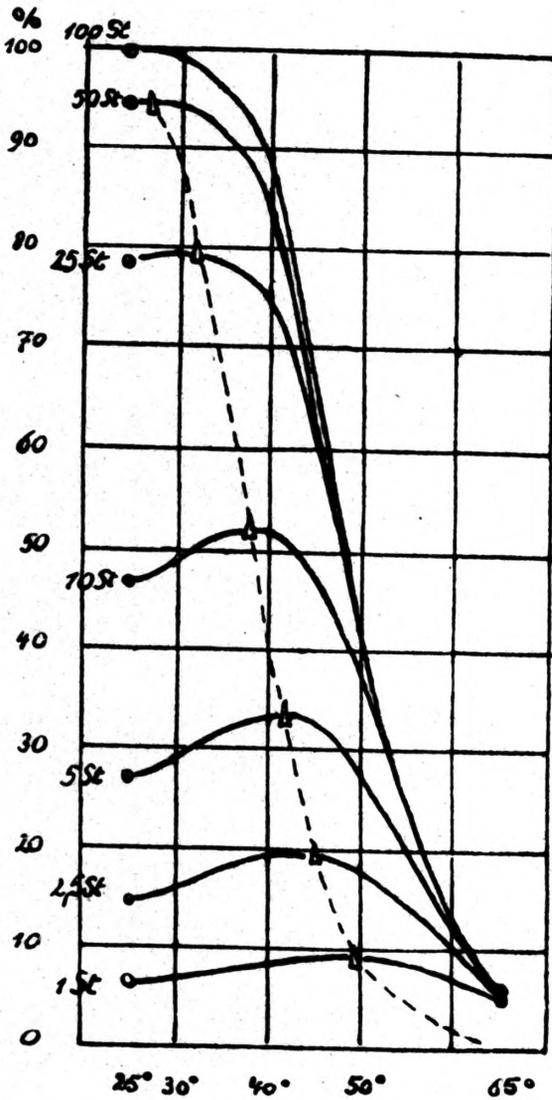


Fig. 6.

gleiche Temperatursteigerungen zuerst wenig, dann stark und schließlich wieder wenig ab. Das interessanteste Gebiet liegt bei kleinen Einwirkungszeiten, in dem sich die Isothermen durchschneiden, und welches daher mit vergrößerter Zeitachse in Fig. 4 dargestellt ist.

Würde das Enzym nicht zerfallen, seine Menge also während der ganzen Einwirkungszeit unverändert bleiben, so würde der Verlauf der Substratspaltung ein wesentlich anderer. Derselbe würde dann mit dem Verlauf einer monomolekularen Reaktion zusammenfallen, und für verschiedene Temperaturstufen würde sich die Kurvenschar Fig. 5 ergeben, die mit Werten von c_T der Tabelle 3 berechnet sind. Die Isothermen würden dann bei kürzerer Einwirkungsdauer sich

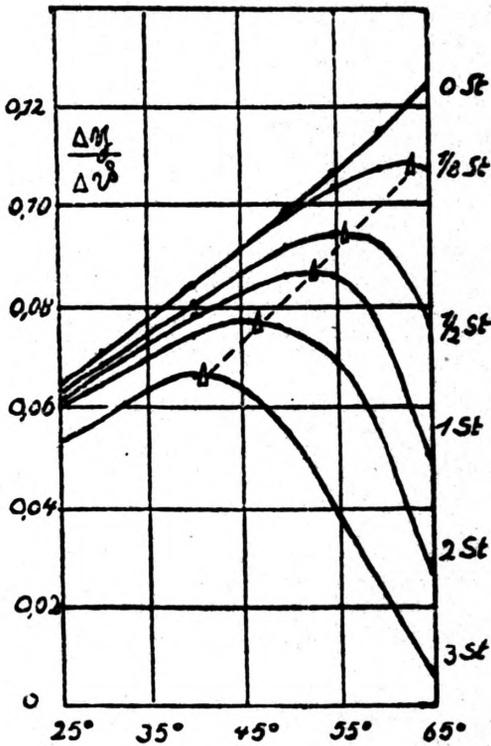


Fig. 7.

nicht schneiden und bei längerer würden sie sich sämtlich dem Werte 100% gespaltenen Substrats asymptotisch nähern.

Entnimmt man aus Fig. 3 die nach gleichen Zeiten, gespaltenen Substratmengen und stellt sie in Abhängigkeit von der Temperatur dar, so ergibt sich Fig. 6. Diese Kurven gleicher Einwirkungsdauer für die Fermentmenge 1 haben deutlich ausgeprägte Maxima, deren Temperatur von der Einwirkungsdauer abhängt und mit wachsender Einwirkungsdauer sich zu tieferen Temperaturen verschiebt.

Für verschiedene Werte kürzerer Einwirkungszeiten gibt

Fig. 7 die Abhängigkeit der pro Zeiteinheit gespaltenen Substratmenge $\frac{\Delta y}{\Delta t}$ von der Temperatur. Je kürzer die Einwirkungszeit ist, zu um so höheren Temperaturen verschiebt sich das Maximum und verschwindet schließlich mit verschwindender Einwirkungsdauer.

b) Das Temperaturoptimum der Enzymwirkung ist von der Enzymmenge unabhängig.

In welcher Weise die Optimaltemperatur von der Einwirkungszeit abhängt, wurde oben in der Fig. 6 gezeigt. In der Fig. 8 ist die Abhängigkeit der gespaltenen Substratmenge

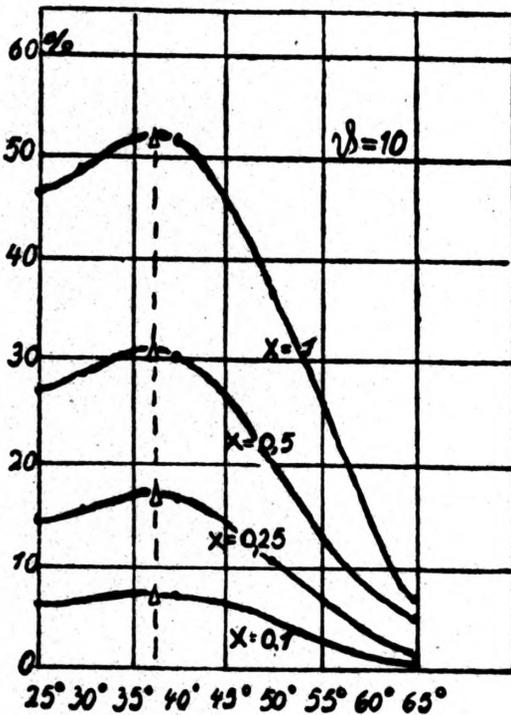


Fig. 8.

für 10 Stunden, nach welcher Einwirkungszeit das Optimum am schärfsten hervortritt, für verschiedene Enzymmengen dargestellt.

Für die Wirkung von Emulsin auf Salizin hatte sich ergeben, daß das Temperaturoptimum von der Enzymmenge in der Tat innerhalb weiter Grenzen, von 15 bis 500 mg per

100 ccm unabhängig ist; nur bei noch kleineren Emulsinmengen verschiebt es sich zu tieferen Temperaturen¹⁾).

Flächen, welche die Menge des gespaltenen Substrats in Abhängigkeit von der Zeit, der Temperatur und der Enzymmenge darstellen.

Die gespaltene Substratmenge hängt von den genannten drei unabhängigen Variablen ab. Will man sie in dreidimensionalem Raume darstellen, so hat man nur zwei Variable zur Verfügung. Als solche kann man wählen die Zeit und die

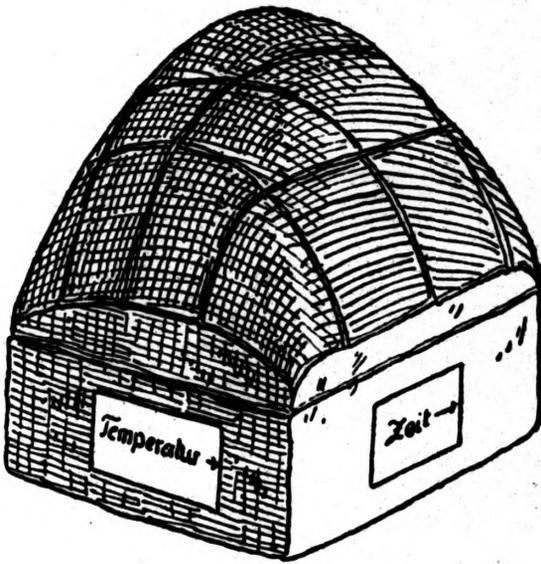


Fig. 9.

Temperatur bei konstanter Enzymmenge, und ein vollständiges Bild würde man erst erhalten, wenn man die Flächen dieser Schar untereinander vergleicht. Oder man wählt als unabhängige Variablen die Enzymmenge und die Temperatur für eine unveränderliche Einwirkungszeit. Die Flächen dieser Art verdienen aber weniger Beachtung als die der ersten. Die Photographie der Fläche für konstante Enzymmenge ist in Fig. 9 wiedergegeben. Die Temperaturachse verläuft nach links, die Zeitachse nach rechts vom Beschauer, die Menge des gespaltenen Substrats ist senkrecht auf die Temperatur-

¹⁾ Diese Zeitschr. Bd. 16, Tafel III (1892).

zeitebene aufgetragen und durch die Endpunkte dieser Ordinaten ist die Fläche gelegt. Projiziert man die Schnitte senkrecht zur Zeitachse auf die Ebene der Temperaturen und gespaltenen Substratmengen, so erhält man die Kurvenschar der Fig. 6. Projiziert man die Schnitte der Ebenen senkrecht zur Temperaturachse durch unsere Fläche auf die Fläche der Zeit und der gespaltenen Substratmengen, so erhält man die Kurven der Fig. 3 und 4.

Vergleich der realen Enzymwirkung mit der idealen.

a) Was die Gültigkeit des monomolekularen Reaktionsverlaufs für die Zerfallsgeschwindigkeit der Enzyme betrifft, so sind die folgenden Tatsachen experimentell festgestellt. Während beim Emulsin¹⁾ der Zerfall bei Temperaturen über 50° nach der Gleichung monomolekularer Reaktionen vor sich geht, ist dies bei der Saccharase nicht der Fall²⁾. Der Zerfall der Saccharase vollzieht sich langsamer, und die Zerfallskonstante ist von der Enzymkonzentration abhängig. Euler und Laurin deuten diese Abweichung wie folgt: „Man kann die Annahme machen, daß sich nicht alle Moleküle der Saccharase, welche sicher eine hochmolekulare Substanz ist (Euler und Kullberg haben an einem sehr reinen Präparat ein Molekulargewicht von ca. 30000 gefunden³⁾), im gleichen Zustand der Hydratation befinden, sondern wie z. B. Eieralbumin (Sörensen und Höyrup⁴⁾ verschiedene Mengen Wasser binden, so daß sich tatsächlich verschiedene Arten von Saccharasemolekülen in der Lösung befinden, welche miteinander im Gleichgewicht stehen.“

„Diesen verschiedenen Hydratationsformen wird eine verschiedene Stabilität zukommen, und bei Erhitzung müssen die labilsten Moleküle zuerst der Inaktivierung durch Zerfall unterliegen. Wenn nun die Einstellung des Hydratationsgleich-

¹⁾ Tammann, Diese Zeitschr. Bd. 18, S. 426 (1895).

²⁾ Euler und Laurin, Diese Zeitschr. Bd. 108, S. 64 (1919).

³⁾ Vgl. Euler, Hedelius und Svanberg, Diese Zeitschr. (1920).

⁴⁾ Sörensen und Höyrup, Diese Zeitschr. Bd. 103, S. 267, 289 ff. (1918).

gewichtet langsamer verläuft als die Inaktivierung, so wird die Folge sein, daß stabilere Enzymmoleküle übrig bleiben.“

Von Bedeutung für den Zerfall der Enzyme sind die Erfahrungen über ihre Stabilisierung durch Gegenwart des Substrats; für Saccharase und Rohrzucker ist diese Erscheinung von Euler und Laurin eingehend untersucht worden¹⁾. Diese Stabilisierung kann durch Bildung von Verbindungen des Substrats mit dem Enzym gedeutet werden. Wenn die Dissoziationskonstante dieser Verbindung gering ist und das Substrat gegenüber dem Enzym sich in großem Überschuß befindet, dann ist nach dem Massenwirkungsgesetz praktisch die ganze Enzymmenge als jene Verbindung vorhanden. In diesem Fall sollte die Reaktionskonstante direkt proportional der Menge des Enzyms sein, was nach Euler und Svanberg²⁾ für die Wirkung von Saccharase auf Rohrzucker zutrifft. Wenn dagegen die Dissoziationskonstante groß ist und das Substrat gegenüber dem Ferment in nicht erheblichem Überschuß vorhanden ist, dann würde das Proportionalitätsgesetz durch andere Gesetze, wie z. B. die Schützsche Regel, nach der die Reaktionsgeschwindigkeit proportional der Quadratwurzel der Enzymkonzentration ist, abgelöst werden. Diese Regel trifft zu sowohl für die Wirkung des Pepsins auf Eieralbumin³⁾ als auch die des Steapsins auf Fette^{4) 5)} und vielleicht auch die des Trypsins auf Eiweiß⁶⁾. Die Bildung von Verbindungen zwischen Enzym und Substrat ist neuerdings durch die Arbeiten von Michaelis und Menten⁷⁾ einerseits und von Euler und Svanberg⁸⁾ andererseits sehr wahrscheinlich geworden. Letztere zeigten, daß die Hemmung der Sac-

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

²⁾ Euler und Svanberg, Fermentforschung Bd. 3, S. 330 (1920).

³⁾ Schütz, Diese Zeitschr. Bd. 9, S. 577 (1885).

⁴⁾ Kanitz, Diese Zeitschr. Bd. 46, S. 482 (1905).

⁵⁾ Engel, Hofmeisters Beitr. Bd. 7, S. 77 (1905).

⁶⁾ Pawlow, Die Arbeit der Verdauungsdrüsen S. 33 (Wiesbaden 1898). Vgl. Hedin, Journ. of Physiol. Bd. 32, S. 468 (1905).

⁷⁾ Michaelis und Menten, Biochem. Zeitschr. Bd. 49, S. 333 (1913).

⁸⁾ Euler und Svanberg, Fermentforschung loc. cit. — Fermentforschung Bd. 4 (1920).

charasewirkung durch Silber- und Quecksilbersalze durch Fällung dieser mit Schwefelwasserstoff aufgehoben werden kann, daß man auf diese Giftwirkung die Massenwirkungsgesetze anwenden kann und daß auch die Giftwirkungen der aromatischen Amine vom Massenwirkungsgesetz beherrscht werden.

b) Über den zeitlichen Verlauf der Spaltung des Substrats unter Einfluß des Enzyms bei unveränderlicher Temperatur gibt es viele Angaben, die einander zum Teil widersprechen. Ein monomolekularer Verlauf ist nur dann zu erwarten, wenn die Zerfallsgeschwindigkeit des Enzyms im Vergleich zur Spaltungsgeschwindigkeit des Substrats zu vernachlässigen ist. Das kann aber nur bei relativ tiefen Temperaturen und größeren Enzymmengen zutreffen. Unter diesen Bedingungen ist für die Wirkung von Saccharase auf Rohrzucker der monomolekulare Verlauf der Spaltung beobachtet worden^{1) 2)}, dasselbe trifft für die Wirkung von Katalase auf Wasserstoff-superoxyd zu³⁾ und für die des Erepsins auf Peptide⁴⁾. Allerdings muß in diesen Fällen noch einer weiteren Bedingung genügt sein, die Konzentration der Wasserstoffionen muß unverändert gehalten werden, worauf von Sörensen⁵⁾ und Michaelis⁶⁾ hingewiesen wurde. Bei der Spaltung des Rohrzuckers kann eine weitere Komplikation dadurch eintreten, daß zuerst α -Glukose entsteht, welche in alkalischen Lösungen unter Verschwinden der Multirotation ihre richtige Drehung sehr schnell annimmt, während in schwach sauren Lösungen, in denen die Spaltungsgeschwindigkeit des Rohrzuckers durch das Enzym am größten ist, die richtige Drehung sich nur langsam einstellt^{1) 2)}. Es liegt die Vermutung nahe, daß bei

¹⁾ O'Sullivan und Tompson, Journ. Chem. Soc. London Bd. 57, S. 834 (1890).

²⁾ Hudson, Journ. Americ. Chem. Soc. Bd. 30, S. 1160—1166 (1908).

³⁾ Siehe Euler und Blix, Diese Zeitschr. Bd. 105, S. 83 (1919).

⁴⁾ Dernby, Biochem. Zeitschr. Bd. 81, S. 107 (1917).

⁵⁾ Sörensen, Biochem. Zeitschr. Bd. 21, S. 131 (1909). — Asher-Spiros Ergebnisse der Physiologie (1912).

⁶⁾ Michaelis, Die Wasserstoffionenkonzentration (Berlin 1914).

Berücksichtigung aller Nebenwirkungen auch für die Spaltung des Substrats der Reaktionsverlauf monomolekularer Reaktionen, wie bei der Katalyse durch Säuren, gilt.

Die Formel von Arrhenius für die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Temperatur scheint für die Zerfallskonstante des Enzyms nur für kleinere Temperaturintervalle zu gelten. Doch ist zu berücksichtigen, daß bei demselben Enzym nicht nur der Wert der Zerfallskonstante, sondern auch ihre durch A_p bestimmte Temperaturabhängigkeit sich mit der Acidität der Lösung stark ändern kann¹⁾.

¹⁾ Euler und Laurin, Diese Zeitschr. Bd. 108, S. 426 (1919).