

# Versuche zur Darstellung hochaktiver Saccharasepräparate.

## V. Mitteilung.

### Über den Phosphorgehalt gereinigter Saccharaselösungen nach erschöpfender Dialyse und über Mikrobestimmungen des Phosphors.

Von

H. v. Euler und O. Svanberg.

Mit 1 Figur im Text.

---

(Aus dem biochemischen Laboratorium der Hochschule Stockholm.)

(Der Redaktion zugegangen am 17. Januar 1921.)

---

#### 1. Ältere Arbeiten.

Die älteren Saccharasepräparate, welche ohne Anwendung von Dialyse dargestellt worden waren, enthielten meist viel — 10 bis 20%, selbst bis zu 30% — Asche, und es war bald erkannt worden, daß Phosphate den Hauptteil dieser Asche bilden. Man hat dies mit dem Umstand in Verbindung gesetzt, daß die gesamte Hefenasche nach Analysen von Liebig und eingehenderen Untersuchungen von Lintner<sup>1)</sup> im Mittel etwa 50%  $P_2O_5$  enthält.

Die naheliegende Frage, ob die Asche der Saccharasepräparate als wesentlicher Enzymbestandteil anzusehen ist, wurde seither in verschiedener Weise beantwortet.

W. A. Osborne<sup>2)</sup> erhielt in seinem Ausgangspräparat A 44,6 bzw. 31,6% Asche. Die wäßrigen Auszüge daraus (F 1) zeigten Aschengehalte von 29,3 bzw. 19,96%. Durch Dialyse wurden dann diese großen Aschenmengen stark erniedrigt,

<sup>1)</sup> Lintner, Zeitschr. f. d. ges. Brauw. Bd. 6, S. 397 (1883).

<sup>2)</sup> W. A. Osborne, Diese Zeitschr. Bd. 28, S. 399 (1899).

und zwar bis auf 1,72 bzw. 1,83%. Man sieht — schreibt Osborne — daß sich die der wirksamen organischen Substanz ursprünglich beigemengten anorganischen Bestandteile um so vollständiger durch die Dialyse entfernen lassen, je länger die letztere dauert, und zwar ohne daß der organische Rest eine Einbuße an Wirksamkeit erleidet. „Die Aschenbestandteile gehören also jedenfalls nicht zur Konstitution des fraglichen Körpers.“

Kölle<sup>1)</sup> gibt für seine Präparate, deren Aktivität vermutlich gering, jedenfalls ungenügend definiert<sup>2)</sup> war, Aschengehalte von 10,7 bis 3,96% an. Die Zusammensetzung der Asche wird nur qualitativ angegeben: Phosphorsäure, Kalium und Magnesium.

Salkowski<sup>3)</sup> erhielt Präparate mit 25 bis 7% Asche, in welcher die Phosphorsäure quantitativ bestimmt wurde. Er kommt zum Resultat, daß 6,77% P = 15,48% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> „ganz sicher aus organischem Phosphor stammen“, und sieht diesen Wert als Minimalwert des Gesamtpräparates an. Da die Aktivität der Präparate nicht festgelegt ist<sup>4)</sup>, lassen sich seine Angaben (l. c. S. 321 bis 323) nicht weiter verwerten.

Oshima<sup>4)</sup> macht über den Phosphorgehalt seiner Präparate keine Angaben.

Hafners<sup>5)</sup> Ausgangspräparate zeigten ebenfalls einen ziemlich hohen Aschengehalt, welchen dieser Forscher durch Dialyse herabdrücken konnte (ca. 15 bis 5%). Die Asche wurde quantitativ analysiert und ergab 81,54 bzw. 82,70% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Im übrigen enthielt die Asche Kalium, Magnesium, Calcium und SO<sub>4</sub>. Auf Grund seiner Dialyseversuche kommt Hafner zur Auffassung, „daß der Phosphor in seinen verschiedenen Präparaten zum großen Teil organisch gebunden war“. Hafner fügt allerdings die Bemerkung

<sup>1)</sup> Kölle, Diese Zeitschr. Bd. 29, S. 429 (1900).

<sup>2)</sup> Siehe hierzu Euler und Svanberg, Diese Zeitschr. Bd. 107 S. 304 (1919).

<sup>3)</sup> Salkowski, Diese Zeitschr. Bd. 31, S. 305 (1901).

<sup>4)</sup> Oshima, Diese Zeitschr. Bd. 36, S. 42 (1902).

<sup>5)</sup> Hafner, Diese Zeitschr. Bd. 42, S. 1 (1904).

hinzu, daß die Frage unentschieden bleibt, „ob dieser Phosphor zur wirksamen Gruppe des Fermentes gehört, oder ob er von einer Substanz herrührt, die nur eine Verunreinigung der ersteren darstellt“.

Tribot<sup>1)</sup> teilte 1909 einige Versuche mit, aus denen hervorgehen soll: Plus on purifie la diastase (invertine), moins celle-ci est active, et plus que la quantité de MgO est considérable, plus l'action de l'invertine est grande. Aus seinen experimentellen Angaben läßt sich diese Beziehung unseres Erachtens nach nicht entnehmen.

Schließlich ist zu erwähnen, daß Mathews und Glenn<sup>2)</sup> in ihrer in mancher Hinsicht beachtenswerten Untersuchung in ihren besten Präparaten, welche allerdings nur etwa  $\frac{1}{10}$  der Wirksamkeit unserer aktivsten Präparate zeigte, etwa 1% Asche fanden, welche hauptsächlich aus Phosphaten bestand.

In einer Reihe von Mitteilungen<sup>3)</sup> haben wir dargetan, wie aus den Vergiftungsreaktionen der Saccharase Schlüsse über den chemischen Charakter ihrer mit den Giften reagierenden Gruppen gezogen werden können. So sind wir bei vergleichenden elektrometrischen Messungen über die Bindung des Silbers und des Kupfers an Saccharase und an organische Verbindungen bekannter Konstitution zu dem Schluß gekommen, daß die einzigen Atomgruppierungen, welche mit der großen Empfindlichkeit dieses Enzyms für Silbersalze, mit der Regeneration bei dieser Giftwirkung durch Schwefelwasserstoff und mit der relativen Harmlosigkeit des Kupfers gegenüber Saccharase in Parallele gesetzt werden können, teils die SH-Gruppen, teils die phosphorhaltigen Nucleinsäuregruppen sind.

<sup>1)</sup> Tribot, C. r. Bd. 147, S. 706 (1908).

<sup>2)</sup> Mathews und Glenn, Journ. Biol. Chem. Bd. 9, S. 29 (1911).

<sup>3)</sup> H. Euler und Svanberg, Fermentforschung Bd. 3, S. 330; Bd. 4, S. 29 und 142 (1920).

Während der analytische Nachweis organisch gebundener Phosphorsäure in unseren hochaktiven Saccharasepräparaten leicht gelang, haben wir bei unseren Versuchen, evtl. vorhandenen Schwefel aufzufinden, keine positive Reaktion feststellen können. Wie aber aus unserer Überschlagsrechnung, daß drei SH-Gruppen in einem Molekül des Molekulargewichts 20 000 einem Schwefelgehalt von 0,5% entspricht, also bei einem zu 10% aus Saccharase bestehenden Präparat 0,05% (vgl. *Ferm.* 4, S. 152—153) hervorgeht, können aus diesen Versuchen keine bindenden Schlüsse gezogen werden.

## 2. Experimentelles.

Bei den Phosphorsäureanalysen, deren Resultate wir hier vorlegen, wurde eine Mikromethode verwendet, welche sich der vereinfachten Bestimmungsmethode des Phosphors nach der „Säuregemisch-Veraschung“ nach Neumann<sup>1) 2)</sup> anschließt. Die Methode Neumanns eignet sich vorzüglich als Mikromethode, wo es wie hier darauf ankommt, sehr kleine Phosphormengen aufzufinden und mit einer Genauigkeit von etwa 10% zu bestimmen.

Diejenigen Phosphormengen, welche hier in Betracht kommen, liegen zwischen 0,1 und 0,5 mg P. Da über Phosphorbestimmungen an solchen geringen Mengen noch wenig in der Literatur vorliegt und auch bei größeren Phosphormengen verschiedene Autoren mit verschiedenen Rechnungsfaktoren arbeiten<sup>3)</sup>, wurden zuerst die angewandten Reagenzien mit den in Betracht kommenden Phosphorsäuremengen genau kalibriert. Es wurde dabei gefunden, daß es bei einer Methode dieser Art überhaupt unzweckmäßig ist, sämtliche Analysen auf verschiedene Phosphorsäuremengen mit einem und demselben Rechnungsfaktor zu berechnen.

Die Analysen wurden in folgender Weise ausgeführt: In einem 100 ccm fassenden Jenaer Becherglas wurde die zu

<sup>1)</sup> A. Neumann, *Diese Zeitschr.* Bd. 37, S. 115 (1902).

<sup>2)</sup> A. Neumann, *Diese Zeitschr.* Bd. 43, S. 32 (1904).

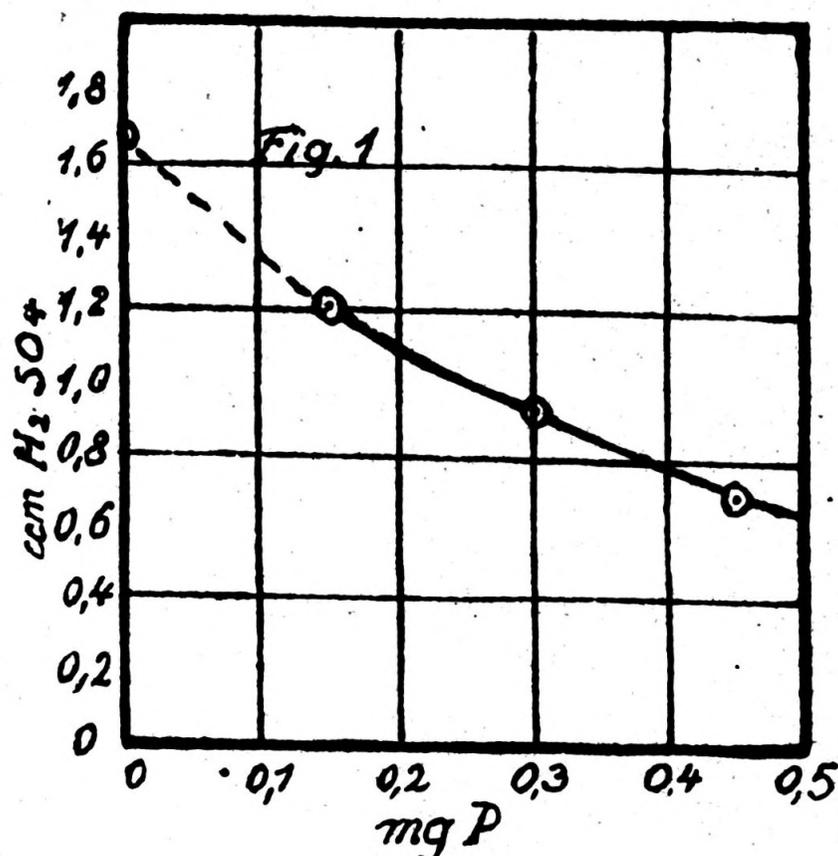
<sup>3)</sup> Vergl. W. Heubner, *Biochem. Zeitschr.* Bd. 64, S. 393 ff. (1914), der mit 5—10 mg P. arbeitete.

analysierende Phosphorsäuremenge in 10 ccm destilliertem Wasser mit 2 ccm reiner Schwefelsäure (dieselbe Menge, welche bei den Verbrennungen zugesetzt wurde) und 5 ccm 50%igem Ammoniumnitrat vermischt und bis zum Blasenwerfen erhitzt. Nun wurden allmählich 5 ccm 10%iges Ammonmolybdat aus einer Pipette zugegeben, wobei sich der wohlbekannte Niederschlag ziemlich grobkörnig ausschied und schwer zu Boden setzte, nachdem die Erhitzung, welche noch  $\frac{1}{2}$  Minute fortgesetzt wurde, abgebrochen worden war. Die überstehende Flüssigkeit wurde durch 5,5 cm-Filter abdekantiert und der Niederschlag äußerst sorgfältig mit 3mal 60 ccm destilliertem Wasser ausgewaschen, welche Operation bei gleichzeitigem Behandeln von 4 Analysen eine Zeit von  $1\frac{1}{2}$  Stunden in Anspruch nahm. Während sich die Niederschläge in den Bechergläsern absetzten, wurden die Filter 2mal mit Wasser ausgewaschen. Zuletzt wurde der Niederschlag und das in kleine Stücke zerteilte Filter in 50 ccm Wasser aufgeschlemmt und mit 2 ccm 0,44 norm. NaOH versetzt. Durch 10—15 Minuten langes Sieden wurde das Ammoniak verjagt; nach Abkühlen der Lösung und Verdünnen bis 50 ccm unter Zusatz von Phenolphthalein wurde mit 0,5-n. Schwefelsäure, die man einer 2 ccm fassenden Mikrobürette entnahm, auf Farblosigkeit titriert. Die Verbrennung der Enzympräparate wurde in der Weise ausgeführt, daß zu der in einem Mikro-Kjeldahl-Kolben abgemessenen Enzymlösung 2 ccm reine Schwefelsäure und 1 ccm 4%ige Kupfersulfatlösung (Bertrand I) zugesetzt wurden, worauf das Verjagen des Wassers und die Verbrennung der Substanz in gewöhnlicher Weise über offener Flamme geschah. Die Verbrennung nahm je nach der Menge der organischen Substanz, die zum größten Teil aus leicht verbrennbaren Kohlehydraten (Hefegummi) bestand, 2—4 Stunden in Anspruch.

### Resultate.

Zur Eichung der Methode wurden die vollständig reinen, von Kahlbaum bezogenen Phosphate  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  und  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  („zu Enzymstudien nach Sörensen“) zugrunde gelegt.

indem eine Reihe Analysen genau eingewogener Mengen dieser Salze ausgeführt wurde. Die Werte der bei den Rücktitrationen verbrauchten ccm Schwefelsäure und die entsprechenden Mengen P sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt und in der Figur zur Anschauung gebracht worden.



ccm H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,5-n.	mg P.
1,40	0,07
1,35	0,085
1,30	0,11
1,25	0,13
1,20	0,15
1,15	0,175
1,10	0,20
1,05	0,225
1,00	0,25
0,95	0,28
0,90	0,31
0,85	0,34
0,80	0,37
0,75	0,405
0,70	0,445
0,65	0,48
0,60	0,515

Bei jeder Bestimmung wurden immer gleichzeitig 4 Doppelanalysen ausgeführt. Um eine Vorstellung über die Genauigkeit der Analysen zu geben, werden die Analysen auf 0,15, 0,30 und 0,45 mg P, welche der Kurve zugrunde liegen, hier mitgeteilt:

0 mg P:					
Rücktitr:	1,66	1,66	1,675	1,665	1,665
Gefunden mg P:					
0,15 mg P:					
Rücktitr:	1,18	1,21	1,18	1,29	1,15
Gefunden mg P:	0,16	0,15	0,16	0,115	0,175
0,30 mg P:					
Rücktitr:	0,96	0,84	0,98	0,89	
Gefunden mg P:	0,275	0,345	0,26	0,315	

0,45 mg P:

Rücktitel:	0,78	0,63	0,71	0,65
Gefunden mg P:	0,385	0,495	0,44	0,48

### Untersuchung der F-Lösungen.

#### Nichtdialysierte Lösung 3F $\alpha$ 2.

Die zahlenmäßige Definition unserer F-Lösungen ist, sowohl was enzymatische Aktivität als quantitative Angaben des Kohlenhydrat- und Stickstoffgehalts betrifft, in zwei früheren Mitteilungen<sup>1)2)</sup> gegeben und wird deshalb an dieser Stelle nicht wiederholt.

Verbrennung von je 3 ccm der Lösung 3F $\alpha$ 2 (138 mg Trockensubstanz). Eine der Proben wurde zu 100 ccm verdünnt und je 10 ccm davon in vier Analysen untersucht. (Eine Vorprobe der einen Verbrennung gab in der nichtdialysierten Lösung etwa die 10fache Phosphorsäuremenge im Vergleich zu den dialysierten.)

Rücktitel:	0,84	0,82	0,84	0,83
Gefunden mg P:	0,345	0,355	0,345	0,35
Mittel:	0,349 mg in 13,8 mg Trockensubstanz, entsprechend 2,53%.			

#### Dreimal dialysierte Lösung 3F $\alpha$ D 3,1.

Diese Lösung war aus der vorhergehenden durch fraktionierte Dialyse (zusammen 9 Tage) erhalten worden<sup>3)</sup>.

Verbrennung von je 10 ccm, entsprechend 158 mg Trockensubstanz.

Rücktitel:	0,98	0,94	0,93	0,88
Gefunden mg P:	0,26	0,29	0,295	0,32
Mittel:	0,291 mg in 158 mg Trockensubstanz, entsprechend 0,185%.			

#### Viermal dialysierte Lösung 3F $\alpha$ D 4.

Der Rückstand der Lösung 3F $\alpha$  D 3,1 wurde in 3 Kolloidiumschräuchen 3 Tage gegen destilliertes Wasser dialysiert, um zu untersuchen, ob die Beseitigung der anorganischen Phosphorsäure, die durch die große Differenz der Analysen

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

<sup>2)</sup> H. Euler und Svanberg, Diese Zeitschr. Bd. 110, S. 175 (1920).

<sup>3)</sup> Vgl. Diese Zeitschr. Bd. 110, S. 185 (1920).

der dialysierten und der nichtdialysierten Lösungen angezeigt wird, eine quantitative war.

Nach beendigter Dialyse wurden die Schläuche aufgeschnitten und der Inhalt aufs neue auf Trockensubstanz und — nach der Verbrennung — auf Phosphorsäure untersucht.

Verbrennung von je 10 ccm, 118 mg Trockensubstanz entsprechend.

Rücktitler: 1,01      0,97      0,94

Gefunden mg P: 0,245    0,27    0,29

Mittel: 0,268 mg in 118 mg Trockensubstanz, entsprechend 0,225%.

Wie schon aus den Stickstoffbestimmungen zu schließen (loc. cit.), ist also die 3fach fraktionierte Dialyse als erschöpfend anzusehen. Die gefundene, unweit der Versuchsfehler liegende Erhöhung des P-Gehalts in der Trockensubstanz kann zum Teil durch ein Fortdiffundieren inaktiver Bestandteile der Enzymlösung erklärt werden.

### Definition und Untersuchung der D-Lösungen.

Unsere D-Lösungen wurden in genau derselben Weise dargestellt, wie die in den III. und IV. Mitteilungen definierten F-Lösungen, jedoch ein Jahr später und mit einer Hefe als Ausgangsmaterial, die sich von der früheren deutlich unterschied. Die Ausgangshefe hatte nämlich diesmal unmittelbar vor der Hochzüchtung, welche wie früher in Grönwalls Brauerei zu Stockholm ausgeführt wurde, eine Kellergärung in steuerpflichtiger Würze durchgemacht (Klasse II) und zeigte sich bei der Vorbehandlung als unberechnet zymasereich. Die Folge davon war die, daß die zugesetzten Zuckermengen sehr rasch vergoren wurden und die Saccharasebildung ziemlich weit unter der früher erzielten stehen blieb. Die vorbehandelte und in der Brauerei abgepreßte Hefe zeigte ein Inversionsvermögen pro Zelle von rund  $24 \cdot 10^{-12}$ , was nur eine Verdoppelung bis Verdreifachung ihres normalen Saccharasegehalts bedeutet, während früher (loc. cit.) Hefen dargestellt werden konnten, deren Saccharasegehalt auf das 5fache des ursprünglichen Wertes gesteigert worden war.

Die abgepreßte Hefe wurde in derselben Weise behandelt wie in unseren früheren Mitteilungen beschrieben worden ist.

Aus den Autolysesäften wurde mit 78% Ausbeute die Saccharase mit Alkohol fraktioniert gefällt und die Lösung (3 D) mit Kaolin adsorbiert. Das angewandte, mit 1% iger Salzsäure und Wasser gut ausgekochte Kaolin wurde besonders auf Freiheit von Phosphorsäure geprüft. Die Lösung 3 D wurde durch Dialyse weiter gereinigt in früher beschriebener Weise. Bei der ersten Dialysefraktion wurde ein geringer Niederschlag in den Membranen erhalten, der durch Filtration mit Kaolin entfernt werden konnte, wobei die Lösung 3 D D1 erhalten wurde (Dialysezeit 4 Tage), welche durch wiederholte 2tägige Dialyse zuletzt die nach den oben mitgeteilten Beobachtungen „erschöpfend“ dialysierte Lösung 3 D D2 ergab.

#### Lösung 3 D.

1 ccm gibt bei 18,5° pH-Optimum und 4,8 g Rohrzucker die Inversionskonstante  $591 \cdot 10^{-4}$  (Beilage 1).

Trockengewicht: 9,1%. If. = 3,12.  $\pm 0^\circ = 14,8$  Minuten.

#### Lösung 3 D D 1.

1 ccm gibt bei 4,8 g Rohrzucker  $k = 356 \cdot 10^{-4}$  (Beilage 2).

Trockengewicht: 2,9%. If. = 5,9.  $\pm 0^\circ = 7,8$  Minuten.

#### Lösung 3 D D 2.

2 ccm gibt bei 4,8 g Rohrzucker  $k = 584 \cdot 10^{-4}$  (Beilage 3).

Trockengewicht: 2,25%. If. = 6,23.  $\pm 0^\circ = 7,4$  Minuten.

Die dialysierten Lösungen wurden auf Kohlenhydrat- und Stickstoffgehalt untersucht. 3 D D1 zeigte im 5 cm-Rohr eine Drehung von  $1,18^\circ \pm 0,01^\circ$ . Für den Hefegummigehalt der Lösung berechnet sich daraus bei  $[\alpha]_D = 0,89$ , 2,65%, also 91,5% des Trockengewichts der Lösung.

Von der Lösung 3 D D2 wurden in 3 Proben 4 ccm, entsprechend je 90 mg Trockensubstanz, nach der Mikrokjeldahlmethode verbrannt. Die 3 Analysen gaben:

1,17 mg N

1,10 mg N

1,16 mg N, Mittel: 1,14 mg N, entsprechend 1,7% N.

10 ccm (3 D D2) wurden mit 10 ccm Wasser verdünnt und mit 1 ccm Schwefelsäure bei Wasserbadtemperatur 5 Stunden hydrolysiert, nach der Hydrolyse zur Marke in einem 50 ccm Meßkolben verdünnt und je 10 ccm in 4 Analysen

nach Bertrand untersucht, entsprechend je 45 mg Trockensubstanz der Enzymlösung. Gefunden wurde:

40,4 mg

40,4 mg

42,3 mg

41,5 mg als Glukose berechnet, Mittel: 41,15, entsprechend 91,5%

in der Trockensubstanz, oder 83—84% Hefegummi, also etwas niedriger als die direkte Polarisationsmessung. Im Vergleich zu unseren früher definierten F-Lösungen ergibt sich also ziemlich vollständige Übereinstimmung.

### Phosphorgehalt der D-Lösungen.

#### Nichtdialysierte Lösung 3 D.

Verbrennung von 1 ccm, entsprechend 91 mg. Die Veraschung wurde zu 100 ccm verdünnt und je 10 ccm, entsprechend 9,1 mg Trockensubstanz, in 4 Proben untersucht.

Rücktitler: 1,32 1,23 1,26 1,28

Gefunden mg P: 0,10 0,14 0,13 0,115

Mittel: 0,12 mg, entsprechend 1,32% P.

#### Lösung 3 D D 1.

Verbrennung von je 5 ccm, entsprechend 147 mg.

Rücktitler: 1,04 0,98 0,90

Gefunden mg P: 0,23 0,26 0,31

Mittel: 0,27 mg, entsprechend 0,18% P.

#### Lösung 3 D D 2.

Verbrennung von je 6 ccm, entsprechend 135 mg.

Rücktitler: 1,09 1,00 1,12 1,07

Gefunden mg P: 0,205 0,25 0,19 0,215

Mittel: 0,215 mg, entsprechend 0,16% P.

Um zu untersuchen, wie leicht hydrolysierbar die phosphorsäurehaltige Substanz der Saccharaselösung war, bzw. ob noch wirklich anorganische Phosphorsäure vorhanden sei, wurde in einer Analyse 10 ccm der Lösung 3 D D 2 direkt, ohne vorhergehende Verbrennung, untersucht. Wie Heubner<sup>1)</sup> bemerkt, kann „die Methode“ (d. h. die Ausfällung anorganischer Phosphorsäure) „auch bei Gegenwart mancher organischer Phosphorsäureverbindungen ohne Schaden Anwendung finden; so

<sup>1)</sup> loc. cit. Heubner, Biochem. Zeitschr. Bd. 64, S. 401 (1914).

ist es durch verschiedene Arbeiten bereits festgestellt, daß Phytinsäure unter diesen Bedingungen, d. h. bei kurzdauerndem Erhitzen auf etwa 80°, nur in sehr geringem Grade hydrolysiert wird<sup>1)</sup>.

Bei unserer direkten Analyse haben wir trotz der Gegenwart von 0,36 mg Phosphor (aus obigen Analysen berechnet) bei der Ausführung des Versuchs in oben mitgeteilter Weise gar keine Ausscheidung von Phosphormolybdat gefunden. Wurde aber 0,18 mg P. als anorganisches Phosphat zugesetzt, so wurde sofort eine entsprechende Ausscheidung des wohlbekannten Niederschlages erhalten, die nach Auswaschen, Lösen in der üblichen Menge NaOH und Titration mit H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> den Rücktiter 1,17 ccm ergab, entsprechend 0,165 mg P. Die Gegenwart des Hefegummis hat also die Ausfällung nicht verhindern können, die Lösung 3 D D 2 ist als vollständig frei von anorganischem Phosphat anzusehen, und die Phosphorsäure wahrscheinlich nicht als (leicht hydrolysierbare) Kohlenhydratphosphorsäure (C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>[PO<sub>4</sub>R<sub>2</sub>]<sub>2</sub>) vorhanden, sondern in Übereinstimmung mit unserem Ausgangspunkt, daß die Phosphorsäure in Zusammenhang mit der Silbervergiftung des Enzyms zu setzen wäre, in anderer Form. Kohlenhydratphosphorsäure und Glycerinphosphorsäure besitzen nämlich (vgl. Euler und Svanberg, Fermentforschung 4, S. 165) die Fähigkeit der Nucleinsäure nicht, sich mit Silber so dissoziationsfrei zu vereinigen, daß sie mit der Giftigkeit der Silberionen für das Enzym in Zusammenhang gesetzt werden könnten.

### Besprechung.

Die hier mitgeteilten Versuche sind natürlich ohne Fortsetzung unvollständig und die gewonnenen Ergebnisse lassen sich nur im Zusammenhang mit anderen verwerten. Den gegenwärtigen Stand unserer Untersuchung können wir durch folgende Überlegungen kennzeichnen:

Gehen wir von unserer früher<sup>1)</sup> gewonnenen Zahl 20 000

---

<sup>1)</sup> Euler, Hedelius und Svanberg, Diese Zeitschr. Bd. 110, S. 190 (1920).

für das Molekulargewicht der Saccharase aus, und nehmen wir wie früher an<sup>1)</sup>, daß unsere besten Präparate etwa 10% Reinenzym enthalten, so wäre, falls der gesamte P-Gehalt unseres Präparates, 0,16%, dem Reinenzym zukommt, der P-Gehalt desselben 1,6%. Knüpft man an unsere aus Vergiftungsversuchen und aus elektrometrischen Bestimmungen hergeleitete Erwägung an, daß — abgesehen von der SH-Gruppe — nur noch die Nucleinsäuregruppe ein ähnliches Bindungsvermögen für Silber besitzt wie das Enzym, und setzt demgemäß den Phosphorgehalt unseres Präparates mit dem Phosphorgehalt eines Nucleinsäurerestes in Zusammenhang, so ergibt sich unter Zuziehung des experimentellen Ergebnisses, daß unser Präparat etwa 90% Hexosen enthält, folgende Überschlagsrechnung: Auf 2 Nucleinsäuregruppen vom Typus der Hefenucleinsäure, also mit 4 PO<sub>4</sub>-Resten, sind 60 Hexosereste erforderlich, um mit dem P-Gehalt 1,6% das Molekulargewicht 20 000 zu vereinbaren. Unter diesen Umständen wäre man indessen gezwungen, <sup>3</sup>/<sub>4</sub> des gefundenen Stickstoffs den Verunreinigungen des Präparates zuzuschreiben, falls man nicht die Gegenwart phosphorfreier Proteinreste im Enzymmolekül annehmen will.

Es ergeben sich aus der gemachten Überlegung folgende Aufgaben:

1. Die eingehende elektrometrische Untersuchung von Nucleinsäuren und ihren Bestandteilen hinsichtlich der Silberbindung.
2. Der Nachweis von Purin- und Pyrimidinbasen und von Ribose in unseren Saccharasepräparaten.
3. Die Untersuchung, inwieweit Phosphatasen verschiedener Herkunft Phosphorsäure aus unseren Präparaten abzuspalten vermögen und inwieweit diese Abspaltung mit der Inaktivierung der Präparate parallel geht.

### Zusammenfassung.

Als Zusammenfassung geben wir die wichtigsten Zahlen-ergebnisse unserer Untersuchung in zwei Tabellen an:

<sup>1)</sup> Euler und Svanberg, Fermentforschung Bd. 114, S. 153 (1920).

If.	Dialyse zeit, Tage	Lösung	Zusammensetzung der Trockensubstanz		
			% P	% N	% Hexosen
6,75	0	3 F $\alpha$ 2	2,53	4,15	73
8,55	9	3 F $\alpha$ D 3,1	0,19	1,58	91,2
—	12	3 F $\alpha$ D 4	0,22	—	—
3,12	0	3 D	1,32	—	—
5,9	4	3 D D 1	0,18	—	—
6,23	6	3 D D 2	0,16	1,27	91,5

Es zeigt sich also, daß in diesen zwei Fällen, unabhängig von der Zusammensetzung der ursprünglichen Lösung, die nach erschöpfender Dialyse organisch und „hochmolekular“ gebundene Phosphorsäure beinahe proportional ist der Inversionsfähigkeit der Trockensubstanz der Saccharaselösung. Es ergibt sich als Wert für den Quotienten:

If.

% P

für die F-Lösung  $8,55 : 0,205 = 42$ für die D-Lösung  $6,23 : 0,16 = 39$ .

## Beilagen.

Nr. der Beilage	Zeit Minuten	Drehung 1 dm-Rohr	$k \cdot 10^4$	Bemerkungen
1	0	2,65	—	1 ccm 3 D
	4	1,18	575	—
	5	0,89	588	—
	6	0,61	610	Mittel: 591
2	0	2,65	—	1 ccm 3 D D 1
	4	1,67	348	—
	5	1,43	362	—
	6	1,25	358	Mittel: 356
3	0	2,65	—	2 ccm 3 D D 2
	4	1,17	580	—
	5	0,89	588	—
	6	0,67	583	Mittel: 584