

Untersuchungen über die chemische Zusammensetzung und Bildung der Enzyme.

I. Mitteilung.

Von

Hans Euler und Beth af Ugglas.

Mit zwei Kurvenzeichnungen im Text.

Der Redaktion zugegangen am 31. Januar 1910.)

Der Temperaturkoeffizient der Invertase.¹⁾

Die hier mitzuteilenden Versuche sind teils von einem praktischen, teils von einem theoretischen Gesichtspunkt aus angestellt worden.

Der praktische Gesichtspunkt war der folgende: Da es nach Angaben — allerdings mehr qualitativer Natur — hervorzugehen scheint, daß schon äußerst geringe Konzentrationen von freien Basen die hydrolysierenden Enzyme der Kohlenhydrate dauernd inaktivieren, und da andererseits für die Wirkung dieser Enzyme gewisse Optima der Wasserstoffkonzentrationen existieren, so war es nicht unwahrscheinlich, daß auch die Stabilität der in wässriger Lösung befindlichen Enzyme durch geringe Säuremengen wesentlich gesteigert würde. Es würde in diesem Fall ein solcher Säurezusatz einen erheblichen Vorteil beim Arbeiten mit gereinigten wässrigen Enzymlösungen bedeuten.

Eine weitere Gruppe von Beobachtungsreihen betrifft den Temperaturkoeffizienten der enzymatischen Rohrzuckerspaltung, über welchen bis jetzt Angaben vorlagen, welche stark von-

¹⁾ Aus Svenska Vet. Akad. Arkiv f. Kemi, Bd. III.

einander abweichen und deshalb als Grundlage für theoretische Betrachtungen kaum verwendbar sind.

Die zwei verschiedenen Temperatureinflüsse, welche also Gegenstand unserer Untersuchung gewesen sind, lassen sich am besten folgendermaßen präzisieren (vgl. Tammann, Z. physik. Chem., Bd. XVIII, S. 436, 1895).

In einer wässerigen Lösung, welche Invertase und Rohrzucker enthält, gehen gleichzeitig zwei Reaktionen vor sich: 1. Das Enzym wird durch eine freiwillige Veränderung unbekannter Art zerstört. 2. Der Rohrzucker wird durch das noch aktive Enzym invertiert.

Bezüglich der Reaktion 1 ist die einfachste Annahme die, daß das Enzym durch eine monomolekulare Reaktion inaktiviert wird, unabhängig von dem, was sich sonst in der Lösung befindet. Wenn also E die anfängliche Enzymkonzentration bedeutet, y die Enzymkonzentration zur Zeit t , so wird man setzen:

$$\frac{dy}{dx} = k_E(E-y)$$

und man erhält durch Integration

$$k_E = \frac{1}{t} \ln \frac{E}{E-y}$$

Bedeutet ferner, wie gewöhnlich, a die Konzentration des ursprünglich vorhandenen Substrates, welches nach der Gleichung 1. Ordnung gespalten wird, so ist

$$v = \frac{dx}{dt} = k(a-x)(E-y)$$

d. h. die Geschwindigkeit, mit welcher sich die Reaktion zur Zeit t vollzieht, muß gleich sein dem Produkt der noch vorhandenen Mengen des Enzyms und des sich umwandelnden Stoffes.

Wir werden im folgenden k_E als die «Inaktivierungskonstante» des Enzyms bezeichnen. Wie wir später sehen werden (S. 128 u. ff.), ist die Invertase bis etwa 50° in Lösungen, welche keinen Überschuß an Hydroxylionen enthalten, recht stabil; läßt man also die enzymatische Rohrzuckerspaltung etwa zwischen

0° und 30° vor sich gehen, und zwar unter solchen Bedingungen, daß die Reaktion innerhalb weniger Stunden verläuft, so kann man sicher sein, daß während der Reaktionszeit die Gesamtkonzentration des Enzyms, E, unverändert bleibt. Machen wir die Annahme, daß die enzymatische Inversionsgeschwindigkeit der Konzentration der wirksamen Invertase proportional ist — eine Annahme, welche, innerhalb eines gewissen Konzentrationsgebietes wenigstens, tatsächlich zutrifft —, so können wir aus der Inversionsgeschwindigkeit die relative Invertasekonzentration berechnen. Will man also ermitteln, wie schnell bei einer gegebenen Temperatur Invertase in wässriger Lösung oder im wässrigen Hefenextrakt inaktiviert wird, will man also die Inaktivierungskonstante k_E messen, so hat man folgendermaßen zu verfahren:

Man hält die invertasehaltige Lösung während gewisser Zeiten auf der zu untersuchenden Temperatur, kühlt dann ab und verwendet sowohl den nicht erwärmten Saft als die höheren Temperaturen ausgesetzt gewesenen Säfte in vergleichbarer Weise als Katalysatoren. Erhalten wir beispielsweise mit dem nicht erwärmten Saft die Inversionsgeschwindigkeit k_0 , mit einem Saft, welcher 30 Minuten auf 60° erwärmt war, die Inversionsgeschwindigkeit (natürlich bei der gleichen Temperatur gemessen) k_1 , so wird für 60°

$$k_E = \frac{1}{30} \ln \frac{k_0}{k_1}$$

Die Konstante k_E ist also das exakte Maß für die Stabilität der Enzyme, — sie ist derselben umgekehrt proportional. — Wie eingangs erwähnt, kam es uns darauf an, die H-Ionenkonzentration zu ermitteln, welche der maximalen Stabilität entspricht, und wir haben deshalb die Beziehung zwischen der Acidität der Lösung der Invertase und der Konstanten k_E untersucht.

Arbeitsmethode.

Bei allen in dieser Arbeit beschriebenen Versuchen wurde mit wässrigem Hefenextrakt gearbeitet, da wir gerade die Haltbarkeit der Invertase im Extrakt behufs passender Anord-

nung der Reinigungsmethoden kennen lernen wollten. Unsere Untersuchung ist also noch durch Versuche mit gereinigter Invertase zu ergänzen.

Die Hefe, welche uns die hiesige Brauerei «Hamburger Bryggeriet» bereitwilligst zur Verfügung gestellt hatte, wurde mit Eiswasser gewaschen, koilert, stark abgepreßt und sofort in einem Passburgschen Vakuumtrockenapparat bei etwa 30° getrocknet. Die vollständige Entwässerung war etwa innerhalb einer halben Stunde vollendet. Dann wurde die trockene Hefe gepulvert und in einem großen Brutschrank etwa 10 Stunden auf 50° erhitzt. Das so hergestellte Hefepulver wurde zu jeder Versuchsreihe in der 10fachen Menge Wasser suspendiert und bei Zimmertemperatur etwa 10 Stunden stehen gelassen. Dann wurde der Extrakt von der Hefe abfiltriert und der klare Saft durch Behandeln mit Kaolin vom größten Teil des Eiweißes befreit. Hierauf wurde durch Zusatz von Salzsäure oder Essigsäure dem Saft der gewünschte Gehalt an H-Ionen erteilt. Entstand durch den Säurezusatz noch eine Trübung, so wurde nochmals filtriert und die Acidität kontrolliert.

Die Acidität wurde nach den Angaben von Sørensen¹⁾ mittels Indikatoren festgestellt, indem der Farbumschlag mit Phosphatmischungen oder Glykokollösungen verglichen wurde.

Die Inversionsgeschwindigkeiten, welche durch Zusätze gewisser Saftmengen eintraten, wurden für die zunächst mitzuteilenden Versuche sämtlich bei 20° ermittelt. Die Lösungen befanden sich genau bei dieser Temperatur im Wasserbad. Unmittelbar nach Herstellung der Saft-Rohrzuckermischung und dann von Zeit zu Zeit wurden Proben von 20 ccm entnommen und in 10 ccm einer 0,2 normalen Sodälösung einpipettiert. Dadurch kam die Reaktion zum Stillstand und gleichzeitig wurde die Multirotation der Glukose beendet. Alle Proben wurden bei 20° im 2 dm-Rohr in einem Polarisationsapparat nach Lippich mit 3teiligem Gesichtsfeld bei Natriumlicht beobachtet.

¹⁾ Biochemische Zeitschrift, Bd. XXI, S. 201 (1909).

1. Versuchsreihe.

Konzentration der H ⁺ -Ionen: $5 \cdot 10^{-6}$	$k \cdot 10^5$	k_E
Inversion mit frischem Hefepresssaft	390	--
„ „ 30 Minuten auf 40° erwärmtem Saft .	380	0,000377
„ „ 60 „ „ 40° „ „ .	370	0,000380
Mittelwert	—	0,000378
Inversion mit 30 Minuten auf 60° erwärmtem Saft .	102	0,0194

Die Konstanten dieser Versuchsreihe sind folgendermaßen ermittelt worden:

Tabelle A.

Minuten	Drehung	a—x	$k \cdot 10^5$
0	7,50°	10,25	—
31,5	4,98	7,73	390
42	4,28	7,03	390
51	3,73	6,48	390
x	— 2,75	—	—

Tabelle B.

Minuten	Drehung	a—x	$k \cdot 10^5$
0	7,50°	10,25	—
35	4,78	7,53	382
47	4,00	6,80	380
62	3,25	6,00	375
x	— 2,75	—	—

Tabelle C.

Minuten	Drehung	a—x	$k \cdot 10^5$
0	7,50°	10,25	—
30	5,23	7,98	362
40	4,51	7,26	375
50	3,92	6,67	374
—	— 2,75	—	—

Tabelle D.

Minuten	Drehung	a-x	$k \cdot 10^5$
0	7,70°	10,45	—
33	6,95	9,70	100
52	6,50	9,25	102
121	5,10	7,85	103

2. Versuchsreihe.

Konzentration der H ⁺ -Ionen: $2 \cdot 10^{-6}$	$k \cdot 10^5$	k_E
Inversion mit frischem Hefepressaft	415	—
„ „ 30 Minuten auf 40° erwärmtem Saft .	405,5	0,000333
„ „ 60 „ „ 40° „ „	398	0,000300
Mittelwert	—	0,000316
Inversion mit 30 Minuten auf 60° erwärmtem Saft .	104	0,0200

3. Versuchsreihe.

	$k \cdot 10^5$		$k \cdot 10^5$ Mittel	k_E
	Konzentration der H ⁺ -Ionen			
	$7 \cdot 10^{-5}$	$7 \cdot 10^{-7}$		
Inversion mit frischem Hefepressaft . . .	257	263	260	—
„ „ 30 Min. auf 57° erwärm. Saft	226	235	230	0,0018
„ „ 30 „ „ 62° „ „	139	157	148	0,0081
„ „ 30 „ „ 65° „ „	66	64	65	0,020

Da die oben mitgeteilten Zahlen darauf hinzudeuten schie-
nen, daß der Temperaturkoeffizient der Inaktivierungskonstanten
 k_E nicht konstant ist, sondern von etwa 60° an größer ist als
unter dieser Temperatur, so wurde ein möglichst großes Tem-
peraturintervall untersucht, nämlich 50—65°. Es ist dies das
größte Temperaturgebiet, das man unter vergleichbaren
Umständen, ohne also die Konzentration des Saftes stärker
als im Verhältnis 1 : 4 zu ändern, untersuchen kann. Ändert
man nämlich die Saftkonzentrationen stärker, so hört die Pro-
portionalität zwischen Konzentration und Enzymgehalt auf und
die Deutung der Resultate wird zu unsicher. Schon in dem

untersuchten Konzentrationsgebiet ändert sich ja die Konstante k_E im Verhältnis 1 : 50.

4. Versuchsreihe.

Konzentration der H-Ionen : 10^{-5}	$k \cdot 10^5$	$k_E \cdot 10^4$ gef.	$k_E \cdot 10^4$ ber.
Inversion mit frischem Hefepreßsaft	265 276	—	—
• • 120 Min. auf 50° erwärmt. Saft	237 244	4	1.4
• • 60 • • 55° • • • •	225	13	7.7
• • 30 • • 57° • • • •	236	19	15
• • 30 • • 60° • • • •	205	40X	40
• • 30 • • 62° • • • •	157	78	76
• • 30 • • 65° • • • •	69	198X	198

Berechnet man aus der obigen Versuchsreihe 4 für k_E die Temperaturkonstante nach der Arrheniusschen Formel

$$k_2 = k_1 \frac{A}{T_2 - T_1} \frac{T_2 T_1}{2}$$

so findet man aus den Werten für 60 und 65°

$$A = 72000.$$

Berechnet man mit dieser Konstanten k_E für die übrigen Temperaturen, so findet man eine bedeutende Abweichung zwischen der gefundenen Zahlenreihe und der berechneten. Da die Arrheniussche Formel durchweg den Gang der Reaktionskonstanten mit der Temperatur sehr gut wiedergibt, so ist also anzunehmen, daß sich bei der Inaktivierung der Invertase ein Einfluß geltend macht, der bei gewöhnlichen chemischen Reaktionen nicht auftritt.

Es hat den Anschein, daß der Temperaturkoeffizient der Inaktivierungskonstanten k_E bis zu einer gewissen Temperatur ansteigt und ein Maximum erreicht. Die Lage dieses Maximums scheint nicht ganz konstant zu sein, sondern mit der absoluten Größe von k_E etwas (innerhalb einiger Grade) zu variieren. Es ist bemerkenswert, daß Tamman¹⁾ etwas Ähnliches für Emulsin gefunden hat. Wir setzen zum Vergleich seine Zahlen hierher.

¹⁾ Zeitschrift f. physikal. Chemie, Bd. XVIII, S. 433 [1895]. Die Konstanten k_E sind daselbst mit Stunden als Zeiteinheit ausgerechnet.

Temperatur	k_F gefunden	k_F berechnet
40	0,04	0,01
50	0,18	0,10
60	0,80	0,80
65	2,86	2,20
70	5,9	5,9
75	14,7	15,3

5. Versuchsreihe.

	$k \cdot 10^5$ Konzentration der H-Ionen		$k \cdot 10^5$ Mittel	k_F
	$8 \cdot 10^{-7}$	$3 \cdot 10^{-5}$		
Inversion mit frischem Hefepressaft . . .	262	274	268	—
» 30 Min. auf 57° erwärmt. Saft	—	241	241	0,0015
» 30 » 62° » »	142	153	148	0,0086
» 30 » 65° » »	—	—	63	0,021

6. Versuchsreihe.

	$k \cdot 10^5$ Konzentration der H-Ionen		$k \cdot 10^5$ Mittel	k_F
	$2 \cdot 10^{-7}$	$1 \cdot 10^{-5}$		
Inversion mit frischem Hefepressaft . . .	223	240	231	—
» 30 Min. auf 55° erwärmt. Saft	180	169	175	0,0039
» 30 » 59° » »	134	147	141	0,0072
» 30 » 62° » »	54	55	55	0,020

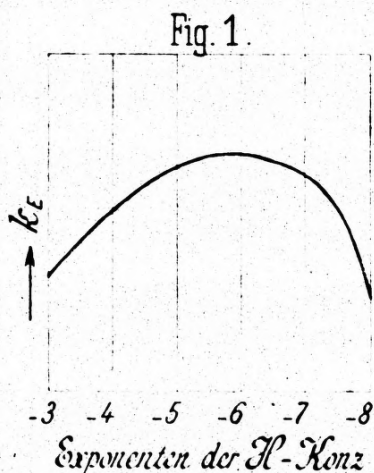
Wir haben in den vorhergehenden Tabellen zur Berechnung von k_F bei verschiedenen Temperaturen das Mittel aus den beiden Parallelversuchen genommen, welche bei verschiedenem Aciditätsgrade ausgeführt worden waren. Die Unterschiede in den gefundenen k -Werten liegen nämlich fast innerhalb der Versuchsfehler. Berechnet man die Inaktivierungskonstanten für die beiden Parallelreihen gesondert, so erhält man z. B. aus der letzten Tabelle folgende Zahlen für k_F :

Temperatur	H ⁺ -Konzentration	
	$2 \cdot 10^{-7}$	$1 \cdot 10^{-5}$
55	0,0031	0,0054
59	0,0073	0,0074
62	0,0205	0,0213

Als Resultat ergibt sich also, daß Invertase im Hefenextrakt für H⁺-Konzentrationen von etwa 10^{-7} bis 10^{-4} nur sehr wenig empfindlich ist.

H⁺-Konzentrationen von 10^{-3} vermindern schon die Stabilität und Konzentrationen von 10^{-2} inaktivieren die Invertase schon bei 50° sehr rasch. (Bei den Versuchen mit diesen Konzentrationen wurde nach dem Erwärmen des Saftes vor dem Zusatz desselben zur Rohrzuckerlösung natürlich die optimale Wasserstoffkonzentration durch Zusatz von Alkali hergestellt.)

Außerordentlich empfindlich ist die Invertase gegen OH-Ionen. Schon OH-Konzentrationen von 10^{-6} rufen bei 50° fast augenblicklich dauernde Inaktivierung hervor, die also durch nachherigen Säurezusatz nicht mehr aufgehoben werden kann. Der Grad der Inaktivierung war bei unseren Versuchen so groß, daß die erhaltenen Zahlen keinen Anspruch auf Genauigkeit machen können; ihre Wiedergabe mag also hier unterbleiben.



Versucht man, die sämtlichen erhaltenen Resultate zu einer Kurve zu vereinigen, welche die Abhängigkeit der Inaktivierungsgeschwindigkeit von der H⁺-Konzentration darstellt, so erhält man nebenstehendes Bild.

Frägt man sich nun, welche Stoffe eine Empfindlichkeit ähnlicher Art gegen H⁺- und OH⁻-Ionen aufweisen, so scheint uns die Analogie mit den multivoltierenden Zucker-

arten am auffallendsten. Den Einfluß der Acidität bzw. Alkalinität auf die Geschwindigkeit des Rückganges der Multirotation der Glukose haben Y. Osaka¹⁾ und C. S. Hudson²⁾ untersucht. Letzterer Forscher hat seine eigenen und Osakas Ergebnisse in einer Formel zusammengefaßt, welche den Einfluß der H⁺- und OH⁻-Ionen auf die Umwandlungsgeschwindigkeit sehr gut darstellt:

$$k = 0,0096 + 0,258 (H^+) + 9750 (OH^-).$$

Man sieht direkt, wie außerordentlich viel empfindlicher die α -Glukose gegen Hydroxylionen als gegen Wasserstoffionen ist. Der Unterschied in der Wirkung der beiden Ionen ist hier also noch viel größer als bei der Invertase im Hefenextrakt; vielleicht nähert sich die reine Invertase in ihrem Verhalten gegen H⁺ und OH⁻ noch mehr der Glukose.

Bereits vor Ausführung der oben erwähnten Versuche mit Hefenextrakt haben wir in der Erwägung, daß die Inaktivierung der Enzyme eine sterische Umwandlung sein könnte, welcher der Umwandlung von α -Glukose entspricht, den Temperaturkoeffizienten des Rotationsrückganges bei der reinen Glukose gemessen. Es lag darüber eine Andeutung in einer Arbeit von Levy³⁾ vor, nach welcher die Geschwindigkeitskonstante sich für einen Temperaturunterschied von 0,15° um etwa 5% ändert.

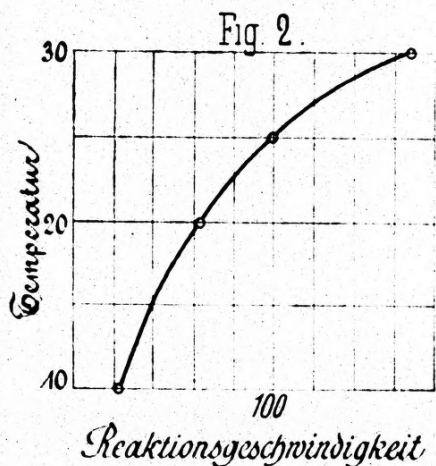
Über die bei diesen Versuchen angewandte Arbeitsmethode braucht kaum etwas Näheres erwähnt zu werden. Die Glukose war Kahlbaums reinstes Präparat, feinst gepulvert und wurde in Mengen von 2 g in 20 ccm Wasser gelöst. Die Lösung wurde unmittelbar nach Herstellung in ein Polarisationsrohr mit Mantel gebracht, welches vermittelt durchströmenden Wassers auf der Versuchstemperatur gehalten wurde. Bei jeder Temperatur wurden 3—4 Versuche angestellt, so daß die in die Kurve eingetragenen Konstanten Mittelwerte darstellen:

Diese Mittelwerte sind:

¹⁾ Zeitschrift f. physik. Chem., Bd. XXXV, S. 661 (1900).

²⁾ Journ. Amer. Chem. Soc., Bd. XXIX, S. 1574 (1907).

³⁾ Zeitschrift f. physik. Chem., Bd. XVII, S. 306 (1895).



Temperatur	10 ³ k gefunden	10 ³ k berechnet
10°	2,25	2,25
10,6°	2,38	—
20°	6,40×	6,40
25°	10,1	10,5
30°	1,70×	1,70

$$A = 17340$$

In der dritten Spalte sind die nach der Arrheniusschen Temperaturformel mit der Konstanten $A = 17340$ erhaltenen

Werte berechnet.

Wie man sieht, ist die Temperaturkonstante der Umwandlungsgeschwindigkeit der Glukose nicht größer als die durchschnittliche Konstante für chemische Reaktionen. Es ist also einerseits die Stabilität der α -Glukose sehr viel geringer als diejenige der Invertase (die Umwandlungskonstante der α -Glukose ist viel größer als die Inaktivierungskonstante der Invertase), andererseits ist die Konstante A für das genannte Enzym über 4 mal größer als für α -Glukose.

Was nun die für Invertase ermittelten Konstanten betrifft, so ist die Inaktivierungskonstante ja allerdings von der Anwesenheit von gleichzeitig gelösten Elektrolyten und Nicht-elektrolyten abhängig, ändert sich aber doch z. B. in Hefenextrakten verschiedener Darstellung ziemlich wenig; man kann sie also sicher als eine für das Enzym charakteristische Größe betrachten und wird versuchen, ihre Abhängigkeit von der Gegenwart anderer Stoffe zahlenmäßig festzustellen. Man erhält dann ein exaktere Vorstellung von der relativen Stabilität der Enzyme. Einstweilen stehen folgende Daten zur Verfügung:

	k_F
Invertase	60° = 0,01
Emulsin	60° = 0,01 (Tammann)

Aus Selters¹⁾ Angaben über Katalase könnte man mit einiger Annäherung ausrechnen

$$k_E 55^\circ = 0,01.$$

Hiernach wären also Invertase und Emulsin etwa gleich stabil, Katalase etwas labiler.

II.

Wir haben, wie eingangs erwähnt, den Einfluß der Temperatur auf die Rohrzuckerspaltung durch Invertase untersucht, und zwar zur Kontrolle der nicht wenigen bereits vorliegenden Versuche.

Es hatten gefunden:

		$K_{t+10} : k_{10}$	A
Tammann	im Temperaturintervall 20—30°	1,5	7000
Kjeldahl	" " 30—40°	1,5	8000
O'Sullivan u. Tompson	" " 45—50°	1,4	7000

Im Mittel wurde also die Temperaturkonstante zu etwa 7300 gefunden. Invertiert man Rohrzucker mit Mineralsäuren, so findet man für diese Reaktion einen viel höheren A-Wert, nämlich 25600. Da diese große Differenz in theoretischer Hinsicht recht bemerkenswert ist, so haben wir eine Prüfung der erwähnten Resultate von Tammann, Kjeldahl und O'Sullivan und Tompson vorgenommen und untersucht, ob die Konstante stark mit dem Säuregehalt der Invertaselösung variiert und ob unter gewissen Umständen die enzymatische Rohrzuckerspaltung denselben Temperaturkoeffizienten erreicht wie die Inversion durch Säuren.

Versuche.

Wie bei den im vorhergehenden mitgeteilten Versuchen wurde die Invertase zu der Rohrzuckerlösung im ursprünglichen Hefenextrakt gelöst zugesetzt. In der Reaktionsmischung betrug der Rohrzuckergehalt stets ca. 10%. Die der Reaktionsmischung von Zeit zu Zeit entnommenen Proben (je 20 ccm) wurde in 10 ccm 0,1 norm. Natriumcarbonatlösung einpipettiert. Alle solchermaßen alkalisch gemachten Proben wurden bei 20°

¹⁾ Zeitschrift f. physik. Chem., Bd. XLIV, S. 257 (1903).

im Lippichschen Polarisationsapparat beobachtet. Der Endwert jeder Beobachtungsreihe wurde berechnet und zwar durch Multiplikation der Anfangsdrehung mit dem Faktor 0,32. Der Gehalt an Wasserstoffionen wurde nach Zusatz der erforderlichen Mengen Schwefelsäure kolorimetrisch nach den Angaben von Sörensen (l. c.) ermittelt. Die Zeitmessungen geschahen mit Chronometer.

Tabelle 1a.

Temperatur: $1,5^{\circ}$. — H⁺-Konzentration: $1 \cdot 10^{-4}$.

Minuten	Drehung	a—x	k · 10 ⁴
0	9,45°	12,85	—
44	7,93	11,33	12,4
177	5,87	9,27	12,0
156	4,75	8,15	12,7
190	4,04	7,44	12,5
∞	— 3,40	—	—

Tabelle 1b.

H⁺-Konzentration: $1 \cdot 10^{-6}$.

Minuten	Drehung	a—x	k · 10 ⁵
0	9,45°	12,85	—
45	8,00	11,40	11,6
100	6,42	9,82	11,7
152	5,15	8,55	11,7
201	3,96	7,36	12,0
∞	— 3,40	—	—

Tabelle 2a.

Temperatur: 20° . — H⁺-Konzentration: $1 \cdot 10^{-4}$.

Minuten	Drehung	a—x	k · 10 ⁴
0	9,40°	12,85	—
12	7,95	11,35	45
32	5,64	9,04	48
43	4,63	8,03	47
50	3,85	7,25	50
—	— 3,40	—	—

Tabelle 2b.

H⁺-Konzentration: $1 \cdot 10^{-6}$.

Minuten	Drehung	a—x	k · 10 ⁴
0	9,45°	12,85	—
10	8,17	11,57	46
33	5,85	9,25	49
41	4,87	8,27	47
50	4,20	7,60	46

Tabelle 3a.

Temperatur: 30°. — H⁺-Konzentration: $1 \cdot 10^{-4}$.

Minuten	Drehung	a—x	k · 10 ⁴
0	9,45°	12,85	—
8	7,80	11,20	74
17	6,30	9,70	72
20	5,70	9,10	75

Tabelle 3b.

H⁺-Konzentration: $1 \cdot 10^{-6}$.

Minuten	Drehung	a—x	k · 10 ⁴
0	9,45°	12,85	—
7	(7,90)	(11,30)	(790)
16	6,35	9,75	750
19	5,95	9,35	730
21	5,60	9,0	740

Man erhält durch die gegebenen Tabellen eine genügende Vorstellung von den Versuchsbedingungen und Fehlergrenzen. Wir können uns daher damit begnügen, von den folgenden Versuchen nur die erhaltenen Konstanten anzuführen.

	1°	18°	A	k _t + 10 · k _t
H ⁺ -Konzentration: 10^{-6} . . .	0,00101	0,0032	11000	2.0
„ $3 \cdot 10^{-5}$. . .	0,00148	0,0047		

	0°	20°	A	$k_{t+10} : k_t$
H-Konzentration: 10^{-7} . . .	0,0027	0,0070	7640	1,6
„ $5 \cdot 10^{-5}$. . .	0,00160	0,0062	10860	2,0
„ 10^{-5} . . .	0,0036	0,0133	11000	2

Wir stellen dann die mit 10^4 multiplizierten Konstanten der obigen 6 Tabellen 1—3 zusammen:

	1,5°	A	20°	A	30°
H-Konzentration: $1 \cdot 10^{-4}$	124	10800	47	8040	74
„ $1 \cdot 10^{-6}$	117	11200	47	8040	74

Und schließlich führen wir noch eine einzelne Versuchsreihe an:

	0°	A	20°	A	30°
H-Konzentration: $1 \cdot 10^{-5}$	0,0036	11000	0,0133	9340	225

Aus den beiden letzten Versuchsreihen scheint hervorzugehen, daß der Temperaturkoeffizient der enzymatischen Rohrzuckerinversion mit steigender Temperatur abnimmt.

Zwischen 0 und 20° ist der Wert der Konstante

$$A = 11000 + 200$$

sichergestellt, wenigstens für Lösungen, deren H-Konzentrationen etwa 10^{-6} bis 10^{-4} beträgt. In neutralen Lösungen scheint A geringere Werte anzunehmen.

Die H-Konzentrationen 10^{-6} bis 10^{-4} , welche, wie oben gezeigt, und für die Stabilität der Invertase die günstigsten sind, sind zugleich diejenigen, bei welchen die optimale Wirkung der Invertase eintritt (Sörensen).

Die Frage, wie ein solches Optimum der Acidität zustande kommt, ist bis jetzt nicht diskutiert worden; sie ist von allgemeiner Bedeutung für die Enzymologie, da die meisten Enzyme in ihrer Wirksamkeit von der Gegenwart von Säuren und Alkalien abhängig sind. Man könnte zunächst vermuten, daß die als Aktivator zugesetzte Säure mit der Invertase, die als Base

fungiert, ein Salz bildet, und würde dann annehmen, daß ein gewisser Überschuß an Säure notwendig ist, um die Salzbildung mit der schwachen Enzymbase vollständig zu machen. Erheblich wahrscheinlicher ist indessen die Annahme, daß die Invertase im neutralen Hefenextrakt als Anion mit einer Base verbunden ist und etwa ein Alkalisalz bildet. Die als Aktivator zugesetzte Säure entbindet dann die Invertase, welche nur als freie Säure aktiv ist, und die optimale H⁺-Konzentration könnte etwa derjenigen Menge H⁺-Ionen, entsprechen, welche die Invertase selbst zu bilden imstande ist.

Jedenfalls steht also fest, daß der Temperaturkoeffizient der enzymatischen Rohrzuckerspaltung viel kleiner ist als derjenige der Rohrzuckerinversion durch Säuren.

Man könnte hieraus zunächst den Schluß ziehen, daß in die Konstante A die bei der Bildung der Verbindungen Rohrzucker-Salzsäure bzw. Rohrzucker-Invertase auftretende Wärmelönung eingeht. Indessen ist auch die Annahme möglich, daß der kleine Geschwindigkeitszuwachs pro Temperaturgrad bei der enzymatischen Inversion dadurch bedingt ist, daß die Invertase mit steigender Temperatur nicht nur irreversibel zerstört, sondern außerdem noch in umkehrbarer Weise inaktiviert wird; abgesehen von dem zerstörten Anteil nähme also die Invertase nach der Rückkehr auf niedrigere Temperatur ihre alte Wirksamkeit wieder an. Die beteiligten Substrate Rohrzucker und Wasser würden also mit steigender Temperatur aktiver, das katalysierende Enzym dagegen inaktiver.

Soweit man aus Angaben der Literatur ersehen kann, besitzt im allgemeinen eine Reaktion, wenn sie durch Enzym ausgelöst wird, einen kleineren Temperaturkoeffizienten, als wenn sie durch Säuren beschleunigt wird. Man beachte besonders:

Äthylbutyrat, Esterase

$$A = 4650$$

Kastle und Loevenhart,

Amer. Chem. J., Bd. XXIV.

Äthylacetat,¹⁾ Salzsäure

$$A = 17000$$

Price, Öfvers. K. Vet. Akad. Förh.,

1899.

¹⁾ Aus der Untersuchung von Price (l. c.) geht hervor, daß die Konstante A bei den Estern der niedrigen Fettsäuren, Ameisensäure ausgenommen, wenig variiert.

Auch die Spaltung der Maltose durch Maltase könnte man noch anführen. Nach Lindners und Kröbers Messungen, die allerdings wenig genau sind, wäre A zwischen 10 und 20° höchstens 8000, während v. Sigmond für die Säurehydrolyse der Maltose zwischen 60 und 74° $A = 34000$ fand.

Herrn stud. phil. Sixten Kullberg, welcher uns durch Ausführung einer größeren Anzahl Kontrollversuche aufs eifrigste unterstützt hat, wollen wir auch hier unsern Dank aussprechen.