

## 395. H. v. Euler: Ergebnisse und Ziele der allgemeinen Enzym-Chemie.

[Zusammenfassender Vortrag, gehalten auf Veranlassung der Deutschen Chemischen Gesellschaft bei der Hundertjahrfeier der Versammlung Deutscher Naturforscher und Ärzte in Leipzig am 20. September 1922.]

(Eingegangen am 25. Oktober 1922.)

Der Aufforderung, Ihnen heute über ein Thema aus meinem Arbeitsgebiet zu berichten, möchte ich in der Weise nachkommen, daß ich durch Besprechung einiger zentraler Fragen der allgemeinen Enzym-Chemie den gegenwärtigen Stand dieses Gebietes kurz zu beleuchten versuche, und dann im Anschluß an neuere chemische und biologische Ergebnisse auf einige, wie ich glaube, besonders wichtige Ziele hinweise, die nunmehr für die Enzym-Forschung erreichbar erscheinen.

### I.

Ich gehe in medias res. Daß die Enzyme eine spezielle Gruppe von solchen Stoffen bilden, welche in erster Linie durch ihre Wirksamkeit als Katalysatoren gekennzeichnet sind, hat bereits Berzelius erkannt, der übrigens den Begriff »Katalysator« schon recht klar gefaßt hat.

Innerhalb dieses weiteren und allgemeineren Begriffes Katalysator lassen sich die Enzyme durch ihre Herkunft aus und ihre Rolle in der lebenden Zelle abgrenzen; wir zählen zu den Enzymen keinen kochbeständigen Stoff, und kein Enzym hat sich bisher in eine chemisch bekannte Substanzgruppe eingliedern lassen. Der letzte Umstand ist gewiß zufällig und vorübergehend, und bezüglich der Hitze-Empfindlichkeit existieren Übergänge zu chemisch erforschten Körpern. Wir haben also keinen Anlaß zur Annahme, daß sich die Enzyme materiell oder energetisch von allen anderen organischen Substanzen wesentlich unterscheiden; noch weniger Anlaß sehe ich zu Zweifeln an ihrer stofflichen Natur überhaupt.

Die Ursache, weshalb so viele Arbeiten über die Kinetik der Enzyme, besonders aus den 90er Jahren und aus dem ersten Dezennium dieses Jahrhunderts verhältnismäßig wenig Erfolg gehabt haben, liegt wohl darin, daß beim Aufsuchen quantitativer Formeln und Gesetze die chemischen Voraussetzungen ungenügend geprüft worden waren.

Über die Rolle der Aktivatoren vom Typus des Harden'schen Ko-Enzyms sind noch heute unsere Kenntnisse recht lückenhaft. Der ausschlaggebende Einfluß der Acidität — früher nur von einzelnen Physiologen und Biochemikern beachtet, unter welchen ich Höber und Michaelis nennen möchte — wird erst seit 1909 allgemeiner berücksichtigt, nachdem Sörensen seine auf die Nernstsche Theorie der Konzentrationsketten gegründete Methodik eingeführt hatte; die Messung der Konzentration der Wasserstoff-Ionen in den enzymhaltigen Lösungen selbst war um so wesentlicher, als die meisten Enzympräparate neben störenden Verunreinigungen verschiedenster Art an wirksamem Enzym nur Bruchteile eines Prozentes enthielten.

Die Geschichte unserer Wissenschaft hat also gezeigt — und dies kann meiner Ansicht nach nicht genug betont werden —, wie notwendig für die Enzym-Forschung die feste chemische Grundlage ist. Die Verwendung wohl definierter und wirkungskräftiger Präparate und ebenso die rationelle Reinigung und Anreicherung von Enzym-Lösungen ist auch für den Erfolg kinetischer Untersuchungen die erste Voraussetzung.

In dieser Überzeugung haben wir uns auch im Stockholmer Laboratorium seit längerer Zeit mit Reinigungsarbeiten beschäftigt, um zu möglichst hochaktiven Präparaten zu kommen. Nachdem Hr. Willstätter bereits über seine grundlegende Reinigungsmethodik berichtet hat, will ich nicht näher auf unsere eigenen diesbezüglichen Versuche eingehen. Als letztes Ziel schwebt uns hierbei natürlich immer die Isolierung des Enzyms selbst vor; was wir zunächst angestrebt haben, war eine Vorstellung über die Konzentration unserer Enzym-Lösungen zu erhalten.

Durch Alkohol-Fällung, Dialyse und die von Willstätter<sup>1)</sup> eingeführte Adsorption an Tonerde und Elution sind wir zu einem Saccharase-Präparat gelangt, bei dessen weiterer Reinigung sich der Stickstoffgehalt nicht mehr stark änderte. Die Zahlen für den C- und H-Gehalt sind noch unsicher und können hier übergangen werden. Von erheblich mehr Interesse ist in diesem Zu-

---

<sup>1)</sup> Willstätter und Racker, A. 425, 1 [1921] und 427, 111 [1922].

sammenhang, daß es K. Josephson<sup>1)</sup> vor kurzer Zeit gelungen ist, aus dem oben erwähnten Saccharase-Präparat eine Silberverbindung zu gewinnen und zu analysieren, deren Zusammensetzung sich mit der für Saccharase selbst gefundenen in Einklang bringen läßt. Die direkten analytischen Bestimmungen der isolierten Substanz gaben mit großer Annäherung 1 Atom Ag auf 48 Atome N. Bis es klar geworden ist, ob die mit 1 Atom Ag verbundene Enzym-Menge 1 Molekül ausmacht oder einen einfachen Bruchteil davon, bezeichnen wir diese Menge als Silber-Äquivalent; dasselbe beträgt nach den bisher vorliegenden Analysen rund 5000.

Wir haben uns zur Ermittlung der Enzym-Konzentration auch einer indirekten Methode bedient, indem wir die Bedingungen der Inaktivierung der Enzyme durch kleine Mengen gewisser Metallsalze — man könnte sagen: Gifte — eingehend untersuchten, um die Metallmengen festzustellen, welche für die Inaktivierung einer gewissen Enzym-Menge unter genau definierten Umständen notwendig sind. Versetzt man beispielsweise eine Lösung von  $k \cdot 10^{-4} = 100$  mit etwa 0.01 mg Silbernitrat, so tritt eine — vollständig reversible — Inaktivierung des Enzyms ein, die mit einer Entionisierung des Metallatoms verknüpft ist.

In der Fig. 1 findet man neue diesbezügliche Versuche von Myrbäck zusammengestellt, welche sich über ein großes Gebiet der Silber-Konzentration und der Acidität erstrecken<sup>2)</sup>; der Einfluß der letzteren ist hier z. T. noch größer, als bei den interessanten Versuchen von Rona<sup>3)</sup> über Chinin-Vergiftung.

Die Kurven der Fig. 1 beziehen sich auf eine Lösung von der Reaktionskonstante  $k = 100 \cdot 10^{-4}$ . ( $If = 14.4$ ). Berechnet man für eine Acidität, bei welcher Saccharase noch optimale Wirksamkeit besitzt, etwa  $p_H = 5.5$ , das Silber-Äquivalent aus der halben Inaktivierung, so erhält man für unser reinstes Präparat ( $If = 230$ ) den Wert 5000; andere Messungen an Hg und J<sub>2</sub>, auf die wir uns aber wegen der Unsicherheit der Berechnungsweise noch nicht stützen können, führen zu niedrigeren Werten; wir wollen einst-

<sup>1)</sup> Euler und Josephson, Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi 8, 23 [1922]. — Sv. Kem. Tidskr. 34, 74 [1922].

<sup>2)</sup> Euler und Myrbäck, H. 121, 177 [1922] und Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi 8, Nr. 22 [1922].

<sup>3)</sup> Rona und Bloch, Bio. Z. 118, 185 [1921].

weilen das Mittel 4000 in Rechnung setzen<sup>1)</sup>). Die entsprechenden Werte für die Enzymkonzentrationen schwanken um das Mittel  $10^{-6}$ . Wenn also auch hier die Verhältnisse noch nicht endgültig aufgeklärt sind, so verdient doch wohl der Umstand Beachtung, daß zwei von einander ganz unabhängige Methoden, wie die Analyse der isolierten Silberverbindung und die Messung der Inaktivierungs-Konzentration des Silbernitrates zur gleichen Größenordnung der Enzym-Konzentration (bzw. der Äquivalent-Zahl) führen.

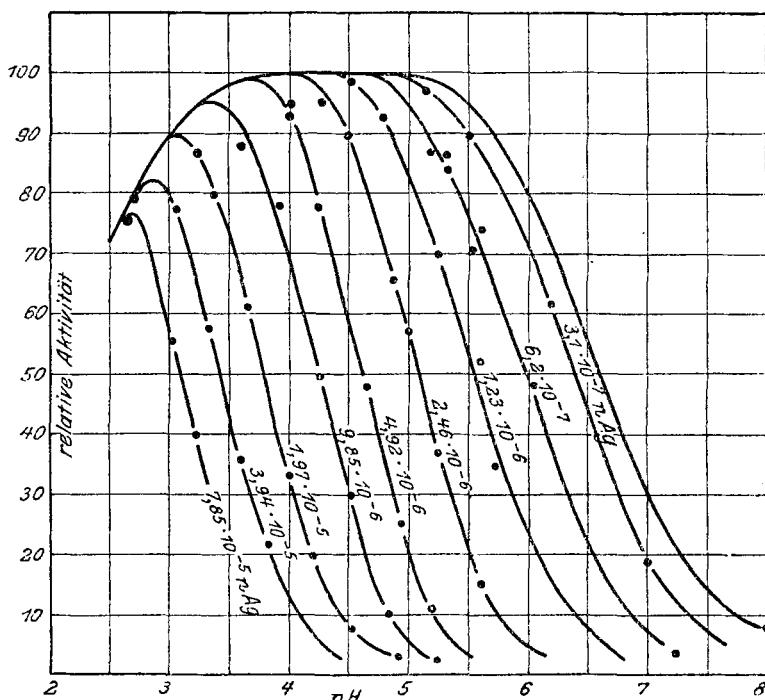


Fig. 1.

Ich komme jetzt auf die Enzyme als Katalysatoren zurück: Bestehen prinzipielle Unterschiede zwischen Enzymen und Katalysatoren bekannter Konstitution oder mit anderen Worten: Wie weit reichen die aus der chemischen Reaktionskinetik bekannten

<sup>1)</sup> Durch Messungen der Diffusionsgeschwindigkeit haben kürzlich Euler und G. Ericson (Koll. Ztschr. 31, 3 [1922]) an einem gut gereinigten Saccharase-Präparat ein scheinbares Molekulargewicht von 20 000 gefunden, also einen erheblich höheren Wert, als dem Äquivalentgewicht entspricht.

Beziehungen aus, um Enzym-Reaktionen als katalytische Reaktionen zu beschreiben? Offenbar ist die Beantwortung dieser Frage für das richtige Verständnis der physiologischen Rolle der Enzyme im lebenden Organismus von wesentlicher Bedeutung. Ich behandle diese Frage an dem verhältnismäßig gut bekannten Beispiel der Rohrzucker-Spaltung und vergleiche also den Einfluß der Salzsäure mit demjenigen des spezifischen Enzyms Saccharase.

Der zeitliche Verlauf der Rohrzucker-Inversion durch verdünnte starke Säuren folgt dem Massenwirkungsgesetz; die per Zeiteinheit gespaltene Rohrzucker-Menge ist proportional der jeweils vorhandenen Menge, also

$$\frac{dx}{dt} = k \cdot (a - x),$$

woraus sich der Koeffizient  $k$  nach der bekannten Formel für monomolekulare Reaktionen berechnet:

$$k = \frac{1}{t} \times \ln a/a - x.$$

Solange wir uns im Bereich der verdünnten Lösungen halten, wo die Konzentration des Zuckers seinem osmotischen Druck proportional gefunden wird, ist der Reaktionskoeffizient  $k$  unabhängig von der absoluten Zucker-Konzentration; von einer etwa 0.01-n. Salzsäure an wird also zur halben Spaltung des Rohrzuckers eine gewisse Zeit notwendig, unabhängig von der Rohrzucker-Konzentration.

Die Größe des Reaktionskoeffizienten wird unter gleichen Umständen (Temperatur, Druck) also nur durch die Konzentration der Salzsäure bestimmt; in sehr verdünnten Lösungen, wo Nebenwirkungen ausgeschlossen sind, wächst  $k$  der Konzentration der katalysierenden Säure proportional, und überhaupt gilt mit großer Annäherung, daß der Geschwindigkeits-Koeffizient  $k$  der Säure-Inversion der Konzentration des dissozierten Anteils der Säure und folglich der Konzentration der Wasserstoff-Ionen proportional ist.

Zu diesen einfachen und theoretisch klaren Beziehungen hat man nicht selten die bei den Enzymen gefundenen Verhältnisse in eine gewisse Gegensätzlichkeit gestellt. Seit Anfang dieses Jahrhunderts ist man bei der theoretischen Behandlung der Enzym-Reaktionen davon ausgegangen, daß das Enzym eine Zwischen-Verbindung mit dem Substrat bildet, und man hat die Existenz solcher Zwischen-Verbindungen bei Enzym-Reaktionen besonders

hervorgehoben<sup>1)</sup>). Gehen wir auf diese Vorstellung ein, welche durch zahlreiche Tatsachen gestützt wird, so werden wir suchen, dieser Idee insofern festere Gestalt zu geben, als wir fragen, wie viel Saccharase an den Rohrzucker gebunden ist.

Bei der Beantwortung gehen wir also von der Voraussetzung aus, daß nur diejenigen Rohrzucker-Moleküle mit merklicher Geschwindigkeit hydrolysiert werden, welche mit dem Enzym verbunden sind. Bei der Saccharase tritt nun eine vollständige Enzym-Bindung an das Substrat, bei welcher also die anwesende Enzym-Menge ihre maximale Wirksamkeit erreicht hat, schon in etwa 4-proz. Rohrzucker-Lösung ein. Bei einer Rohrzucker-Konzentration von rund 0.05-n. ist die Hälfte des Enzyms an das Substrat gebunden<sup>2)</sup>. Also gilt nach dem Massenwirkungsgesetz unter der Voraussetzung, daß die beiden Komponenten in äquimolekularen Mengen zusammentreten, wenn [ ] die Konzentrationen angibt

$$\frac{[\text{Zwischenprodukt}]}{[\text{Saccharase}] \times [\text{Rohrzucker}]} = 50.$$

Auf etwas anderem Wege haben Michaelis und Menten (l. c.) die Konstante  $K_M$  ermittelt und sind zu einem Zifferwert 60 gekommen, während Laurin<sup>3)</sup> Messungen 38 ergeben hatten. Voraussetzung für die Richtigkeit dieser Berechnung ist, daß die durch den Zerfall des Rohrzuckers gestörte Konzentration des Zwischenproduktes mit verhältnismäßig sehr großer Geschwindigkeit wiederhergestellt wird.

Die folgenden einfachen Rechnungen verdeutlichen weiter die Wirkungsweise der Saccharase: Unter den für die Zeitwertbestimmungen festgelegten Umständen setzen 0.05 g reines Enzym-Präparat ( $I_f = 230$ ) in 0.20 Min. rund 3 g oder 0.009 g Moleküle Rohrzucker um, zu Beginn der Reaktion rund  $1.10^{-3}$  g-Mol. per Sek. Setzen wir das Äquivalent der Saccharase mit 4000 in Rechnung, so ergibt sich als Konzentration der Saccharase und damit auch des Zwischenproduktes in einer solchen Lösung  $1.2 \cdot 10^{-5}$ , woraus sich weiter berechnen läßt, daß an jedem Enzym-Molekül der gebundene Rohrzucker sich rund 80-mal in der Sekunde erneuert.

Wie verhält sich nun der anorganische Katalysator HCl? Auch hier wollen wir eine Vereinigung von Rohrzucker mit dem Kata-

<sup>1)</sup> siehe hierzu Euler, Chemie d. Enzyme, 2. Aufl., I. Teil 1920, S. 108.

<sup>2)</sup> Euler und Myrbäck, H. 124 [1922].

<sup>3)</sup> Euler und Laurin, H. 110, 55 [1920].

Katalysator annehmen, so daß nur diejenigen Rohrzucker-Moleküle reagieren, welche mit dem Katalysator verbunden sind.

Über die Art der Bindung zwischen Enzym und Rohrzucker haben wir noch keine speziellen Annahmen gemacht; wir wissen über den Bau des Enzym-Moleküls noch zu wenig. Dagegen führt die Analogie zwischen der Säure-Katalyse des Rohrzuckers und der Säure-Katalyse der Ester, bei deren Behandlung die Einführung des isoelektrischen Punktes etwas weiter geführt hat, zu der Annahme, daß die Säure an den Zucker wie an eine schwache Base gebunden wird. Die Versuche zur direkten Messung der Dissoziationskonstanten  $K_b$  haben bis jetzt nur gezeigt, daß diese Größe kleiner ist als bei niederen Estern; Vergleich mit anderen ätherartigen Stoffen ergab approximativ die Größenordnung für  $K_b$  zu  $10^{-20}$ . Daraus läßt sich wiederum berechnen, daß in einer Rohrzucker-Lösung, welche in bezug auf Salzsäure  $0.1 \cdot n$  ist und für welche der Reaktionskoeffizient  $1.5 \cdot 10^{-4}$  gefunden wird, die Salzbildung zu einer Konzentration des Zwischenproduktes von  $10^{-8}$  führt.

Ich komme nun zu dem Resultat, auf das ich Ihre Aufmerksamkeit lenken möchte, und zwar an der Hand der folgenden Tabelle, welche sich auf eine Reaktionskonstante  $k = 1.5 \cdot 10^{-4}$  bei  $20^\circ$  und eine Rohrzucker-Konzentration von  $0.1 \cdot n$  bezieht:

	Enzymatische Katalyse	Katalyse durch HCl
Konzentr. { Ges. Katalysator . . . . . Katalysator-Substrat . . . . .	$0.6 \cdot 10^{-8}$ $0.5 \cdot 10^{-8}$	0.1 $10^{-8}$
Affinitätskonstante der Verbindung Katalysator-Substrat . . . . .	50	$10^{-6}$

Wie wir aus der Zeile 2, Katalysator-Substrat, sehen, ergibt sich — innerhalb der Sicherheitsgrenzen dieser Berechnung — für die gleiche Reaktionsgeschwindigkeit die gleiche Konzentration der reaktionsvermittelnden Moleküle,  $10^{-8}$ , sei es, daß wir mit dem spezifischen Enzym oder mit Säure katalysieren. Diese gleiche Konzentration ist im einen Fall das Resultat einer kleinen Katalysator-Konzentration und einer hohen Affinität zum Substrat, im anderen Fall einer viel größeren Konzentration des Katalysators, welcher aber eine verhältnismäßig sehr geringe Affinität zum Substrat besitzt<sup>1)</sup>.

1) siehe hierzu eine in der Ztschr. f. anorg. Chemie bald erscheinende Mitteilung von H. v. Euler und E. Rudberg.

Es braucht wohl kaum betont zu werden, daß es sich in obiger Zusammenstellung nicht um die noch unbekannten genauen Zahlenwerte, sondern um die Größenordnung der Konzentrationen handelt.

Bei der mitgeteilten Berechnung habe ich die naheliegende Annahme gemacht, daß im Aciditätsmaximum sämtliche Enzym-Moleküle aktiv, und zwar gleichmäßig aktiv sind. Michaelis<sup>1)</sup> hat zur Deutung der bekannten Aciditätskurve die spezielle Hypothese aufgestellt, daß die Verbindung Saccharase-Enzym eine Säure ist, deren Dissoziationskonstante durch den Parameter dieser Kurve gegeben ist. Die Zeit gestattet nicht, hier näher auf diese Annahme einzugehen, welche zwar mit keiner gegenwärtig bekannten Tatsache in Widerspruch steht, andererseits aber nicht die einzige mögliche Deutung der Aciditätsfunktion darstellt.

Wie im einzelnen auch der Einfluß der Acidität beschrieben werden mag, jedenfalls können wir sagen, daß der elektrochemische Charakter von Enzym und Substrat von wesentlicher Bedeutung für Enzym-Reaktionen ist.

Von mancher Seite wird gegenwärtig die kolloide Beschaffenheit der Enzyme stark in den Vordergrund gerückt und nach dem Vorgang von Bayliss betont, daß die Enzyme als Kolloide behandelt werden müssen. Gewiß würde das Gesamtbild eines Enzyms nicht vollständig sein, wenn nicht auch sein Lösungszustand und die damit zusammenhängenden Eigenschaften aufgeklärt würden, und es scheint der Dispersitätsgrad des Katalysators und der Stoffe, an welchen er haftet, besonders des Protoplasmas, bei vielen enzymatischen Vorgängen eine Rolle zu spielen. Gesetzmäßigkeiten, welche sich beim weiteren Studium der Kinetik kolloider Körper ergeben dürften, wird man bei enzymatischen Reaktionen in der einen oder anderen Form wiederfinden, und manche bereits vorliegende Beobachtung ermuntert zu weiterer Arbeit in dieser Richtung, besonders zu systematischen Untersuchungen über Oberflächenreaktionen.

Allerdings ist gerade bei den bestbekannten Enzymen, den Katalasen, Saccharasen, Amylasen, Glykosidasen und Peroxydasen, der Dispersitätsgrad so groß, daß hochaktive, gereinigte Lösungen optisch leer sind. Nur die Denaturierung dieser Enzyme beim Erhitzen ihrer wäßrigen Lösungen auf 65—85° und z. T. ihre Emp-

---

<sup>1)</sup> Michaelis und Rothstein, Bio. Z. 110, 217 [1922].

findlichkeit gegen Alkohol erinnern an das Verhalten von Emulsions-Kolloiden<sup>1)</sup>.

Wir haben bis jetzt die Inversion des Rohrzuckers als eine typische Enzym-Reaktion behandelt; dieselbe verläuft bekanntlich praktisch vollständig im Sinne der Spaltung, welcher Katalysator auch angewandt wird.

Wie beteiligen sich nun die Enzyme an den Synthesen und an den Gleichgewichten?

Als erste enzymatische Synthese gilt bekanntlich die 1898 von Croft Hill beschriebene Bildung einer Biose aus Traubenzucker mit Hilfe von Hefe-Enzym. Das entstandene Produkt konnte in der Folge durch Hefe-Extrakt nicht wieder hydrolysiert werden, und analoge Ergebnisse lieferten E. Fischers und E. F. Armstrongs Versuche zur Bildung und Spaltung von Lactose.

Diese Resultate wie auch die sehr bemerkenswerten Ergebnisse von Rosenthaler über die Bildung eines optisch-aktiven Oxy-nitrils<sup>2)</sup> mittels Emulsins haben Zweifel aufkommen lassen, ob Enzyme nach Art reiner Katalysatoren bei umkehrbaren Reaktionen Synthese wie Spaltung gleichermaßen beschleunigen und somit das Gleichgewicht im wesentlichen unverändert lassen.

Die Forschungen der letzten Jahre haben für die Annahme besonderer synthetischer Enzyme keine Stützen geliefert. Durch ausgezeichnete Untersuchungen Bourquelots und seiner Mitarbeiter Hérissey, Bridel und Aubry ist die Reversibilität der Wirkung der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Glykosidasen bewiesen worden. Den gleichen Forschern<sup>3)</sup> ist bekanntlich auch die Synthese der Gentiobiose und Cellobiose, mehrerer Galaktobiosen<sup>4)</sup> und zahlreicher Glykoside durch Glykosidasen gelungen. Außerordentlich wirksam ist in manchen Hefen das von Iwanoff entdeckte Enzym, welches die Synthese des Fructose-diphosphorsäureesters bewirkt und für welches ich die Bezeichnung Phosphatese vorgeschlagen habe; über andere interessante synthetische Wirkungen der Hefe wird Ihnen der Entdecker, Hr. Neuberg, selbst berichten. Weniger fortgeschritten sind die Versuche zur Synthese von Eiweißkörpern; aber die Bildung von Plasteinen<sup>5)</sup>

<sup>1)</sup> vergl. hierzu H. v. Euler und Ulf v. Euler, Z. a. Ch. 124, 70 [1922]; Euler und Laurin, H. 108, 64 [1919].

<sup>2)</sup> Rosenthaler, Ar. 246, 365 [1908]. — Bio. Z. 14—19 [1909].

<sup>3)</sup> Bourquelot und Bridel, C. r. 165, 728 [1917].

<sup>4)</sup> Bourquelot und Aubry, C. r. 164, 443 u. 521 [1917].

<sup>5)</sup> Henriques und Gjaldbäck, H. 71—83 [1911—1913]; vergl. auch Bayliss' Kritik der früheren Versuche, Journ. of Physiol. 46, 2365 [1913].

beweist doch, daß die Synthese auch hier nicht an die lebende Zelle gebunden ist.

In denjenigen Fällen, besonders *in vitro*, wo Substrate und Reaktionsprodukte in großem Überschuß über die Enzym-Moleküle vorhanden sind, wird die natürliche Gleichgewichtslage durch das Enzym nicht wesentlich beeinflußt werden. Im heterogenen System und bei den stationären Gleichgewichten mit konstant ab- und zufließenden Reaktionskomponenten kann es aber oft vorkommen, daß sich das Gleichgewicht nicht unerheblich mit der Konzentration des Enzyms und seiner Hilfsstoffe ändert. Solche Schwankungen der Gleichgewichtslage bzw. der Richtung der Reaktion findet man besonders beim Umsatz der Reservestoffe, z.B. des Glykogens und der Stärke, sowie beim Auf- und Abbau der Proteine in der lebenden Zelle. Auch bei den synthetischen Reaktionen haben wir die Bildung von reaktionsvermittelnden Zwischenprodukten zwischen dem Enzym und wenigstens einem der Substratmoleküle anzunehmen.

In diesem Zusammenhang möchte ich auf die Umgrenzung des Enzym-Begriffes zurückkommen. Man hat früher die Wirkung des Protoplasmas von derjenigen der Enzyme streng zu unterscheiden versucht, und noch in den 90er Jahren wurde im Anschluß an Versuche zur Isolierung der »Zymase« vielfach die Frage diskutiert: »Enzym-Wirkung oder Protoplasma-Wirkung?«; diese Diskussion kam mit der Herstellung eines zellarmen Preßsaftes zu einem gewissen Abschluß.

Was die Zymase betrifft, so habe ich 1911 aus Versuchen von B. af Uggla den Schluß gezogen<sup>1)</sup>, daß der Zymase-Komplex in den Hefen meist nur zu einem geringen Teil in freiem Zustand enthalten, zum größten Teil an das Protoplasma gebunden ist. Nicht lange nachher hat sich unabhängig davon auch Rubner<sup>2)</sup> in einer bemerkenswerten Arbeit in gleichem Sinne ausgesprochen.

Dem heutigen Stand der Wissenschaft entspricht überhaupt die strenge Trennung von Enzym-Wirkung und Protoplasma-Wirkung oder auch von Ekto- und Endo-enzymen nicht mehr. Wir müssen erkennen, daß für Vorgänge in Zellen und Geweben, welche überhaupt eines Katalysators bedürfen, die Katalysatoren am Plasma ausgebildet werden und sich davon je nach den Umständen schwerer

---

<sup>1)</sup> Euler und B. af Uggla, H. 70, 279 [1911]; *Ztschr. f. allgem. Physiol.* **12**, 364 [1911].

<sup>2)</sup> Rubner, *Arch. f. Physiol.* Suppl. 1912.

oder leichter abtrennen; diese ihrer Natur nach unbekannten Spaltstücke des Plasmas nennen wir eben Enzyme. Die vollständige Isolierung der einzelnen spezifisch wirksamen Gruppen von anderen Bestandteilen des Plasmas bzw. der Zelle ist eine Aufgabe der chemischen Methodik, welche allerdings noch viel Arbeit kosten wird. Daß aber die Katalysatoren der Atmung, des Eiweiß- und Fett-Stoffwechsels sich prinzipiell nicht von den leicht extrahierbaren Enzymen, wie Katalasen, Amylasen usw., unterscheiden, darf schon heute behauptet werden. Die wichtigen Fragen sind hier die, wie man sich das Zusammenwirken der Enzyme im Plasma energetisch zu denken hat, und von welchen Umständen die Bildung der Enzyme abhängt.

Damit kommen wir auf die Enzym-Kinetik in der lebenden Zelle. Während einfache, typische Enzym-Reaktionen, welche im homogenen System, also nicht unter Mitwirkung lebender Zellen verlaufen, im wesentlichen auf Grund der Gesetze der chemischen Dynamik beschrieben werden können, treten bei den Enzym-Wirkungen lebender Zellen oft neue Erscheinungen hinzu.

Zwar ist dies keineswegs immer der Fall. Um bei unserem Schulbeispiel zu bleiben, so finde ich in weiten Konzentrationsgrenzen die gleichen kinetischen Beziehungen, ob ich die Saccharase isoliert anwende, also in einer hochdispersen, optisch leeren Lösung, oder ob ich so viel frische Zellen einer Kulturhefe zur Wirkung bringe, daß die gleiche Geschwindigkeit erzielt wird. Dieser Umstand ist für die Gehaltsbestimmung der Saccharase außerordentlich wertvoll. Die Erklärung ist die, daß der Diffusionsstrom des Rohrzuckers zum Enzym hinreicht, um sämtliche Enzym-Moleküle dauernd mit Substrat zu versehen; die Beweglichkeit des Enzyms kommt nicht in Betracht, und deshalb können wir unter gewissen Umständen das Enzym auch an ein Sorbens verfestigt zur Wirkung bringen.

Ganz eigenartig für den Versuch *in vivo* ist aber die Hervorrufung des Katalysators durch das Substrat oder gewisse Begleitstoffe<sup>1)</sup>. Die lebende Zelle reguliert ihre Enzym-Menge und auch die zugehörigen Aktivatoren gewissermaßen nach ihrem und ihrer Umgebung Bedürfnis, und zwar entspricht sie teils durch Anpassung konstant gewordenen äußeren Umständen, teils reagiert sie schnell auf kürzere,

---

<sup>1)</sup> In einigen einfachen Fällen hat sich dieser Effekt auf die Abfangung des Enzyms und Nachlieferung dem Massenwirkungsgesetz zufolge zurückführen lassen.

von den Substraten ausgehende äußere Reize. Solche momentane Wirkungen beobachtet man bei der Sekretion aus Drüsen mit Ausfuhrgängen; sie treten aber auch bei der inneren Sekretion auf, die übrigens in enzymatischer Hinsicht noch ganz unaufgeklärt ist.

## II.

Da der Einladung der Abteilung Chemie auch Vertreter der biologischen Wissenschaften gefolgt sind, möchte ich nicht unterlassen, einige biologische Aufgaben hervorzuheben, zu deren Lösung die Enzym-Forschung herangezogen werden kann und muß.

Ich glaube, daß wir nach den methodischen Ergebnissen der letzten Jahre in eine neue Periode eintreten. Die Typen der Reaktionen, welche in den einzelnen Organen verlaufen, sind im großen und ganzen festgestellt; in dieser Hinsicht handelt es sich jetzt um die Klarlegung der Teilreaktionen und die Abgrenzung der Teilenzyme — Aufgaben, welche wohl in erster Linie dem präparativen Chemiker zufallen, jedenfalls müssen seine Methoden zur Anwendung kommen. Für die quantitative Bestimmung der wichtigsten Enzyme sind die Methoden, zum Teil wenigstens, vorhanden; aber die diesbezügliche Durcharbeitung von Zellen, Säften und Geweben, so zu sagen die Ermittlung der enzymatischen Leistungsfähigkeit der Organe, steht noch aus. Ich will hier, was mir als Ziel vorschwebt, durch ein Beispiel erläutern.

Der menschliche Verdauungstraktus kann die Spaltung einer gewissen Höchstmenge Rohrzucker bewirken; wird diese überschritten, so erscheint Rohrzucker im Blut und im Harn. An dieser Spaltung ist die Salzsäure des Magens nur wenig beteiligt; sie muß also durch das spezifische Enzym vermittelt werden; sie geht besonders im Jejunum vor sich und zwar — abgesehen von einer Wirkung der Leukocyten — in resp. an den Sekretionsdrüsen der Mucosa. Wir haben den Darm kurz nach dem Tode des Individuums untersucht und seine invertierende Wirksamkeit per qcm gemessen<sup>1)</sup>. Eine Rohrzucker-Menge von rund 10 g wurde in 1 Stde. hydrolysiert. Wie eine Fortsetzung dieser Versuche durch Knaffl-Lenz<sup>2)</sup> zeigte, erhöht sich die Inversionsfähigkeit etwas im überlebenden Darm; die Wirkung der Reizung anderer Teile des Ver-

---

<sup>1)</sup> Euler und Svanberg, H. 115, 43 [1921]. — Euler und Myrback, H. 115, 68 [1921].

<sup>2)</sup> Knaffl-Lenz, H. 119, 60 [1922].

dauungstraktus zur Hervorrufung eines enzym-haltigen Sekretes bleibt noch zu untersuchen. Jedenfalls hat die quantitative Untersuchung der Darm-Mucosa ergeben, daß ihr enzymatischer Apparat für die Spaltung normaler Rohrzucker-Dosen, nicht aber für einen wesentlichen Überschuß ausreicht.

Leider gestattet die Zeit nicht, andere untersuchte Fälle, wie die Konzentrationsschwankungen von Amylasen in pflanzlichen Organen<sup>1)</sup> zu besprechen. Bei der quantitativen Bestimmung des enzymatischen Atmungsapparates treffen wir nicht nur interessante Sonder-Enzyme, sondern auch verschiedenartige Aktivatoren und Paralysatoren an, über welche wir besonders Embden und Meyerhof<sup>2)</sup> wertvolle Beobachtungen verdanken. Die hierbei beteiligten, vermutlich einem gemeinsamen Typus angehörigen Ko-Enzyme stehen übrigens an Wirksamkeit per g Präparat weit hinter den eigentlichen Enzymen zurück<sup>3)</sup>.

Während die enzymatische Bearbeitung tierischer Organe noch in den allerersten Anfängen steckt, sind unsere quantitativen Versuche an Mikroorganismen schon etwas weiter fortgeschritten.

Die erste Frage gilt natürlich der Konstanz des normalen Enzym-Gehaltes. In 20 an Unterhefen angestellten Untersuchungsreihen, welche sich auf die Dauer von 12 Jahren verteilen, hat sich der Quotient

$$\text{Inv.} = \frac{\text{Reaktionskonst. } k \times \text{g Zucker}}{\text{Zellenzahl}}$$

bei gleicher technischer Vorbehandlung so konstant erwiesen<sup>4)</sup>, wie die folgenden Zahlen zeigen:

10.2	8.0	9.9	10.6	10.8	12.1	18—19	10.0	9.0	12
11	12.2	9.3	9.35	6.3	8.4	8.4	11	9.45	8.0

Auch an anderen Hefen und an anderen Enzymen, Katalase und Phosphatase, hielten sich die Abweichungen vom Mittelwert innerhalb ähnlicher Grenzen.

Die bei gleichmäßiger Vorbehandlung der Zellen so konstanten Enzym-Wirkungen erfahren durch Einflüsse verschiedenster Art starke Änderungen, welche ebenfalls vollständig reproduzierbar sind, und zwar Änderungen ihres Endzustandes und der Geschwindigkeit, mit welcher sie diesen erreichen.

<sup>1)</sup> siehe z.B. die Untersuchung von K. Sjöberg, Bio. Z. 133, 218 [1922].

<sup>2)</sup> Meyerhof, H. 101, 165 und 102, 1 [1914].

<sup>3)</sup> siehe Euler und S. Karlsson, H. 123, 90 [1922].

<sup>4)</sup> siehe Euler und Svanberg, H. 106, 201 [1919].

Bei den ersten derartigen Untersuchungen, über die Saccharase-Bildung in einer Unterhefe<sup>1)</sup>, hat sich Folgendes ergeben: Die Geschwindigkeit der Enzym-Bildung ist proportional der Differenz zwischen der jeweils herrschenden enzymatischen Wirksamkeit und der Wirksamkeit am Schluß der Behandlungsperiode (Gärung); die Proportionalitäts-Konstante oder Konstante der Enzym-Bildung  $k_e$  läßt sich durch Integration in bekannter Weise berechnen. Überführt man die einmal angereicherte Hefe in eine neue gärfähige Nährlösung, so tritt von neuem eine Enzym-Vermehrung per Zelle ein, und in dieser Weise ist eine Anreicherung bis auf den 8-fachen ursprünglichen Wert gelungen. Dabei hat sich gezeigt, daß diese Vermehrung des Enzym-Gehaltes mit der Wachstumsfähigkeit der Zellen zusammenhängt, indem die Zellen ihren normalen Saccharase-Gehalt nur während der Periode der Vermehrung überschreiten.

Die Grenzen, welche einer solchen Enzym-Bildung gesetzt sind, habe ich bis jetzt noch mit keiner anderen Eigenschaft der Zellen in Beziehung bringen können; dazu ist wohl ein tieferer Einblick in den Reaktionsmechanismus notwendig, als wir ihn jetzt besitzen. Besonders muß hervorgehoben werden, daß diese Anreicherung nicht an das Nährsubstrat Rohrzucker gebunden ist, sondern durch einen beliebigen gärfähigen Zucker in Gegenwart einer Stickstoff-Nahrung hervorgebracht wird.

Vom biologischen Gesichtspunkt aus leichter verständlich sind enzymatische Anpassungen an ein Substrat; eine solche Anpassung liegt z. B. vor, wenn sich die Hefe allmählich an die Vergärung der Galaktose gewöhnt<sup>2)</sup>. Nach einem regelmäßigen zeitlichen Verlauf der Anpassung, welchen Sie in Fig. 2 sehen, erreicht die Hefe nach Vorbehandlung einen Zustand, in welchem sie die Galaktose ebenso rasch vergärt wie den Traubenzucker.

Einen Fall, in welchem ein lange Zeit vollständig latentes Enzym durch Gewöhnung an ein neues Substrat hervorgerufen wird, habe ich vor 5 Jahren mit Dr. Emb erg<sup>3)</sup> untersucht. Ein Stamm von *Mucor mucedo*, an welchem ursprünglich die Fähigkeit

<sup>1)</sup> Euler und D. Johansson, H. 76, 388 [1912], 84, 97 [1913]; ferner Euler, Bio. Z. 85, 406 [1918]; Euler und Svanberg, Bio. Z. 106, 201 [1919].

<sup>2)</sup> Euler und D. Johansson, H. 78, 246 [1912]. — Euler und Laurin, Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi 7, Nr. 28 [1920].

<sup>3)</sup> Euler, Z. El. Ch. 24, 173 [1918].

zur Stärke-Verzuckerung nicht wahrgenommen werden konnte, erlangte dieselbe nach Symbiose mit einer Hefe, und hierauf hat sich der in Erscheinung getretene Amylase-Gehalt durch Kulturen auf Stärke-Lösungen in recht hohem Grad weiter entwickeln lassen. Auch hier ist die Erwerbung einer neuen Eigenschaft wohl nur scheinbar, und es dürfte sich also um eine Art von Regeneration handeln.

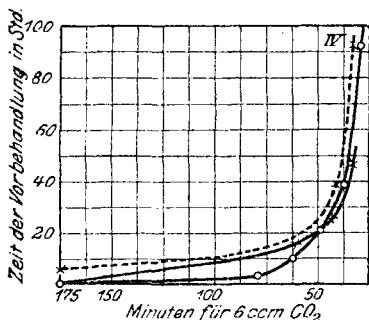


Fig. 2.

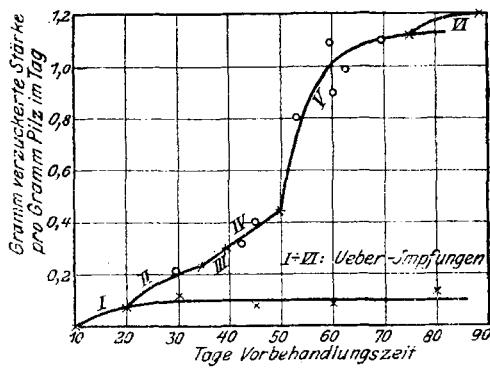


Fig. 3.

Ich erwähne hier kurz diese Versuche über den zeitlichen Verlauf der Anpassung, weil ich glaube, daß solche quantitativen Messungen geeignet und sogar notwendig sind, um zunächst an Mikroorganismen den Verlauf von Eigenschaftsänderungen exakt kennen zu lernen und dadurch zur Klärung der Begriffe im Gebiet der Entwicklungslehre und Anpassungslehre beizutragen.

Ich halte mich wieder an das Beispiel Hefe: Was den Normalzustand bzw. den Ausgangszustand betrifft, so ist zu den Ergebnissen der gezeigten Tabelle (S. 3595) Folgendes nachzutragen: Da die in der Tabelle verzeichneten Zahlen mit relativ großen Hefemengen gewonnen worden sind, so zeigen dieselben nur die Konstanz eines Mittelwertes innerhalb gewisser Grenzen. Wie sich ein solcher Mittelwert auf die einzelnen Zellen verteilt, ist experimentell schwer festzustellen, da die katalytischen Wirkungen einer einzelnen Zelle zu gering sind. Wurden Abimpfungen weniger Zellen in vollkommen gleichartige Nährlösungen vorgenommen, so konnten in den daraus entstandenen Kulturen in Bezug auf Saccharase und Katalase keine Abweichungen vom Mittel festgestellt werden, welche außerhalb der Versuchsfehler lagen.

Wurden dagegen mit den Tochter-Kulturen in der Weise Gärungsversuche angestellt, daß diese entweder frisch in Gegenwart

von Toluol oder getrocknet zur Anwendung kamen, so ergaben sich hinsichtlich der Vergärung des Traubenzuckers und noch mehr der Maltose Unterschiede bis zu 200%, was auf Verschiedenheiten bezüglich des Bindungsgrades der Zymase deutet, die sich bei der Zellteilung einige Zeit erhält.

Sehen wir aber hiervon ab, so sind die bisher festgestellten Fluktuations-Intervalle<sup>1)</sup> gering; bei anderen Mikroorganismen, z. B. Mucoraceen und bei Coli-Bakterien sind sie größer; immer ist natürlich äußerste Vorsicht in der Deutung eines Fluktuations-Intervalls geboten, da schon kleinste Mengen von Verschiedenheiten in der Zusammensetzung der Nährösung, also Spuren von Aktivatoren oder Giften, eine Fluktuation vortäuschen können.

Ändern wir nun für Zellen von quantitativ definierten Eigenschaften die äußeren Bedingungen, so werden wir finden, daß alle Mikroorganismen mit Änderungen ihrer enzymatischen Wirksamkeit bzw. ihres Gehaltes an Enzymen und Ko-Enzymen antworten, und daß damit auch andere Eigenschaftsänderungen verbunden sind.

Wir können diese Änderungen einer enzymatischen Wirksamkeit als Modifikation bezeichnen, ich messe sie durch einen

$$\text{Modifikations-Quotienten} = \frac{\text{Änderung des Enzymgehaltes}}{\text{Änderung der äußeren Variablen}}$$

Natürlich müssen wir dem Modifikations-Quotienten als Index das gemessene Enzym und die Variable zufügen und die Bedingungen angeben.

Dieser Wert wird erst nach einer gewissen Zeit oder, richtiger, nach einer gewissen Anzahl Generationen konstant. Da Modifikationen in vielen Fällen als Anpassungen aufgefaßt werden können, so habe ich früher von einer Anpassungs-Geschwindigkeit gesprochen und solche in einzelnen Fällen gemessen, z. B. die Anpassung der Hefezellen an ungewöhnliche äußere osmotische Drücke<sup>2)</sup>.

Für die maximale Ausbildung des Enzym-Gehaltes von Mikroorganismen lassen sich im allgemeinen ziemlich enge Grenzen ziehen. So habe ich mit Svanberg<sup>3)</sup> für die Saccharase-Bildung einer Unterhefe die Temperaturgrenzen  $27.5 \pm 1^\circ$  gefunden.

<sup>1)</sup> Bezgl. der früheren Terminologie verweise ich auf die sehr lesenswerte Studie von H. Pringsheim: Die Variabilität niederer Organismen. Berlin 1910.

<sup>2)</sup> Euler und Palm, Bio. Z. 60, 97 [1914].

<sup>3)</sup> Euler und Svanberg, H. 106, 201 und zwar 228 [1919].

Schwieriger ist natürlich ein solches Maximum oder Optimum hinsichtlich der Konzentration der Nahrungsbestandteile aufzustellen, da die Anzahl der sich gegenseitig beeinflussenden Variablen sehr groß ist.

Modifikationen sind nicht konstant, d. h. wenn ich die betr. Zellen in ihre Normalbedingungen zurückversetze, so nehmen sie ihre ursprünglichen Eigenschaften und auch ihre ursprünglichen enzymatischen Wirksamkeiten im allgemeinen wieder quantitativ an. Auch dies geschieht aber nicht unmittelbar. Die Gärwirkung der Hefe, welche nach Fig. 2 erreicht worden ist, klingt, wie Fig. 4 zeigt, allmählich wieder ab, indem neue Zellen aussprossen, deren Enzym-Gehalt (Galaktase?) den neuen Bedingungen mehr angepaßt ist.

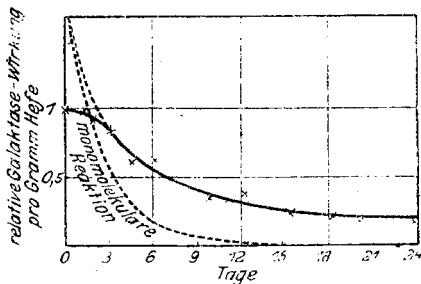


Fig. 4.

Die Anpassungsfähigkeit ist aber auch insofern von der Zeit abhängig, als eine um so größere Abweichung vom normalen Enzym-Gehalt mit dem gesamten biologischen Zustand verträglich wird, je vollständiger Diskontinuitäten vermieden werden, und auf je mehr Generationen sich die Gesamtänderung erstreckt. Abweichungen von den Normalbedingungen (Temperatur, Acidität, Aktivator- und Paralysator-Konzentrationen), welche bei direkter Überimpfung tödlich wirken, werden vertragen, wenn diese Abweichungen im Verlauf vieler Generationen allmählich ansteigen. Demgemäß ist

$$\text{Anpassungsfähigkeit} = \frac{\text{Modifikations-Quotient}}{\text{Anzahl Generationen}}.$$

Es entsteht hier die Frage, ob sich Enzyme an äußere Bedingungen nicht nur quantitativ, sondern qualitativ anpassen, also nicht nur ihre Menge per Zelle, sondern auch ihre Eigenschaften verändern. Behauptungen, daß solches der Fall ist, haben einer eingehenderen Prüfung in der Regel nicht standgehalten.

Der Befund, daß Darm-Saccharase, welche im schwach alkalischen Darm wirkt, ein anderes Wirkungs-Optimum und ein anderes Stabilitäts-Optimum besitzt als Hefen-Saccharase läßt allerdings vermuten, daß z. B. bei Saccharasen auch qualitative Veränderungen auftreten, etwa bedingt durch kleine Unterschiede in der Zusammensetzung.

Einen Fall, in welchem man auf eine eigentliche Anpassung oder eine Regeneration schließen könnte, habe ich mit Laurin<sup>1)</sup> bei einer Hefenrasse *Saccharomyces thermantitonum* gefunden, welche ihre aus den Tropen stammende hohe Resistenz gegen Temperaturen über 40° durch Anpassung an die mittel-europäische Zimmertemperatur in 15 Jahren verloren zu haben scheint.

Wo also Anpassungen von einiger Konstanz vorliegen, sind dieselben erst in langen Zeiträumen erreicht worden; im allgemeinen scheinen Dauer der Anpassung und Dauer der Regeneration von gleicher Größenordnung zu sein. Abweichungen hiervon würden in das noch wenig erforschte Gebiet der Mutationen führen, welche im wesentlichen durch die Diskontinuität einer Beziehung, wie die für Modifikationen aufgestellte, gekennzeichnet sind. Selbst besitze ich darüber keine Erfahrungen.

Sicher wäre es in hohem Grade wünschenswert, daß solche langdauernden Anpassungsversuche in größerem Maßstabe ausgeführt würden. Die Beschaffung der dafür erforderlichen besonderen Hilfsmittel und Arbeitskräfte würde sich nicht nur durch die wissenschaftlich biologische Wichtigkeit der Aufgaben rechtfertigen, sondern sie verspricht auch direkten Nutzen für die technische Biochemie und somit praktisch unmittelbar verwertbare Ergebnisse.

Es sind nur Streiflichter, die ich in diesem Vortrag auf das Gebiet der Enzym-Chemie werfen konnte; manche wesentlichen Resultate und Aufgaben habe ich nur andeuten können, andere, habe ich ganz unerwähnt lassen müssen. Aber vielleicht darf ich hoffen, daß Sie schon aus dem Gesagten entnehmen konnten, wie neben und mit den präparativen und konstitutionsaufklärenden rein chemischen Methoden auch diejenigen Methoden, welche der physikalischen Chemie, besonders der Kinetik, entnommen sind, brauchbare Werkzeuge bilden zum Eindringen in die neuen Probleme der organischen Lebens, welche mit den Enzymen verknüpft sind.

---

<sup>1)</sup> Euler und Laurin, Bio. Z. 97, 156 [1919].

---