

0.1553 g Sbst.: 0.0415 g Pt.

(C₁₀H₁₀N₂, HCl)₂PtCl₄. Ber. Pt 26.84 Gef. Pt 26.72

Das Pikrat krystallisiert aus Alkohol in kleinen, gelben Blättchen, die bei 138–139° schmelzen.

0.1531 g Sbst.: 24.2 ccm N (19°, 750 mm)

C₁₀H₁₀N₂, C₆H₅(NO₂)₃.OH. Ber. N 18.09. Gef. N 17.85.

Die Untersuchung wird fortgesetzt

270. H. von Euler und K. Josephson: Bezeichnung der Aktivität und Affinität von Enzymen.

[Aus d. Biochem. Laborat. d. Universität Stockholm.]

(Eingegangen am 2. Juni 1923.)

Seitdem die Aktivität von Saccharase in Invertin-Präparaten zahlenmäßig gemessen wird, hat man teils nach O'Sullivan und Tompson¹⁾ den sogen. »Zeitwert« t ($\pm 0^0 = t \text{ Min.}$) teils nach Euler und Svanberg²⁾ die »Inversionsfähigkeit« If bestimmt. Kürzlich haben Willstätter und Kuhn³⁾ außerdem noch die Bezeichnungen »Saccharase-Einheit« und »Saccharase-Wert« vorgeschlagen. Letztere stehen in einfachen Verhältnissen zum »Zeitwert«. Eine genaue Charakterisierung der Saccharase-Präparate verschiedener Herkunft und verschiedener Affinität kann durch Angabe der Affinitätskonstanten K_M als Index erreicht werden.

Da es wünschenswert ist, daß in der Enzym-Chemie möglichst bald eine Übereinstimmung der Bezeichnungsweise erzielt wird, wollen wir im Folgenden die Grundlage der vorgeschlagenen Einheiten besprechen und zwar zunächst bezüglich der Saccharase und Amylase und daran anschließend bezüglich der Enzym-Aktivität im allgemeinen.

1. Aktivität der Saccharase.

Als »Minutenwert« oder »Zeitwert« eines Saccharase-Präparates gibt man die Zeit in Minuten an, welche erforderlich ist, um durch 0.05 g eines Präparates bei der Temperatur 15.5° 4 g Rohrzucker, gelöst in 25 ccm einer 1-proz. NaH₂PO₄-Lösung, bis zu 75.75% zu spalten, d. h. bis die Drehung nach Aufhebung der Mutarotation 0° beträgt.

Aus dieser Definition sind auch die neuen, von Willstätter und Kuhn eingeführten Bezeichnungen abgeleitet. Die Saccharase-Einheit (S.E.) ist die Enzymmenge in 50 mg saccharase-haltiger Substanz vom Zeitwert 1 unter den Bedingungen der Definition von O'Sullivan und Tompson.

Der Saccharase-Wert (S.W.) gibt die Anzahl der Saccharase-Einheiten in 50 mg Substanz an. S.W. ist somit der invertierte Wert des älteren Zeitwertes. Demgemäß haften ihm alle Nachteile desselben an mit Ausnahme davon, daß S.W. mit dem Reinheitsgrad steigt, während der Zeitwert fällt.

Die Inversionsfähigkeit (If) eines Saccharase-Präparates wird definiert durch die Gleichung

$$If = \frac{k \times g \text{ Zucker}}{g \text{ Präparat}}$$

¹⁾ Soc. 57, 834 [1890].

²⁾ H. 107, 269, u. zw. 273 [1919]

³⁾ B. 56, 509 [1923].

wo k den Reaktionskoeffizienten erster Ordnung bezeichnet; »g Zucker« ist die bei der Inversionsbestimmung anwesende ursprüngliche Rohrzucker- menge, »g Präparat« ist die Menge angewandten Enzym-Präparates bzw. das Trockengewicht der zur Inversionsbestimmung angewandten Enzym- Lösung. Dieser Ausdruck für If hat sich innerhalb gewisser Grenzen als unabhängig von der Enzym- und der Rohrzucker-Konzentration erwiesen. Ein nicht unwesentlicher Nachteil der If -Einheit ist der Umstand, daß die Rohrzucker-Inversion im allgemeinen nicht streng der monomolekularen Reaktionsformel folgt⁴⁾. Dadurch wird die Berechnung eines Mittelwertes für k aus einer Anzahl Polarisationsbestimmungen bzw. Einzelwerte von Reaktionskonstanten bis zu einem gewissen Grad willkürlich. Wendet man jedoch zur Berechnung des Mittelwertes von k mehrere Bestimmungen zwischen etwa 40—75-proz. Spaltung des Rohrzuckers an, so werden die Aktivitätsbestimmungen durchaus reproduzierbar und vergleichbar, wie aus unseren Saccharase-Arbeiten hervorgeht. Indessen muß betont werden, daß der gleiche Nachteil auch der Berechnung des Zeitwertes und des Saccharase-Wertes anhaftet, da im allgemeinen die Drehung nicht gerade bei erreichtem 0-Wert bestimmt wird, sondern oft aus einem ziemlich abweichenden Wert, worauf man aus diesem die Zeit der 0-Drehung unter Anwendung einer logarithmischen Kurve ermittelt. »Den Hauptfehler, dem gegenüber die Versuchsfehler verschwinden, bedingen die Abweichungen der Reaktionskurve von der logarithmischen« (Willstätter und Racke, Zur Kenntnis des Invertins, erste Abhandl.⁵⁾, S. 9). Da die Rohrzuckerspaltung in diesen Fällen nicht immer gleich weit fortschreitet, können diese aus einer oder zwei Bestimmungen extrapolierten Zeiten der 0-Drehung nicht immer ganz vergleichbar sein. Bezüglich der rationalen Berechnung der Zeit der 0-Drehung des Zeitwertes und If siehe unten.

Umrechnung von If auf den Zeitwert bzw. den Saccharase-Wert.

Zur Umrechnung von If auf O'Sullivan's und Tompson's Zeitwert ($\pm 0^\circ = t \text{ Min.}$) wurde von Euler und Svanberg (l.c., S. 303) der Ausdruck berechnet: $If \times t = 46.176$. Dabei war der Umstand nicht berücksichtigt worden, daß nach der Definition des Zeitwertes die Inversionsgeschwindigkeit bei 15.5° zu bestimmen ist, während die Zimmertemperatur bei den der Berechnung von If zugrunde liegenden Inversionsversuchen 18° betrug⁶⁾. Berücksichtigt man den Einfluß der Temperatur auf die Drehung und auf die Inversionsgeschwindigkeit, so gestaltet sich die Rechnung folgendermaßen:

Aus der Formel $L_{\max} = R_{\max} (0.44 - 0.005 t)$ werden die folgenden Werte für L_{\max} erhalten:

15.5°	$L_{\max 15.5} = 0.36 R_{\max 15.5}$
18°	$L_{\max 18} = 0.35 R_{\max 18}$
20°	$L_{\max 20} = 0.34 R_{\max 20}$

Aus der Formel für monomolekulare Reaktionen $k = \frac{1}{t} \log \frac{a}{a-x}$ wird für die Zeit t , nach welcher die Drehung 0° geworden ist, erhalten:

⁴⁾ Euler und Myrbäck, H. 129 [1923] im Druck. — Siehe auch Kuhn, H. 125, 28, u. zw. 73 [1923].

⁵⁾ A. 425, 1 [1921].

⁶⁾ vergl. Euler und Josephson, B. 56, 446 [1923].

$$\begin{aligned}
 15.5^\circ \quad k &= \frac{1}{t} \log \frac{1 + 0.36}{0.36} = \frac{1}{t} 0.5772, \\
 18^\circ \quad k &= \frac{1}{t} \log \frac{1 + 0.35}{0.35} = \frac{1}{t} 0.5862, \\
 20^\circ \quad k &= \frac{1}{t} \log \frac{1 + 0.34}{0.34} = \frac{1}{t} 0.5956.
 \end{aligned}$$

Rechnet man ferner mit einem Temperaturkoeffizienten der Inversionsgeschwindigkeit von 10% per Grad innerhalb des in Betracht kommenden Temperaturgebietes, so erhält man unter Anwendung der oben berechneten Werte von $k \cdot t$ und unter Berücksichtigung der nach der Definition des Zeitwerts anwesenden Mengen Rohrzucker und Enzym-Präparat folgenden Ausdruck für die Umrechnung von If auf den Zeitwert oder den damit inversen Saccharase-Wert:

$$\begin{aligned}
 If_{15.5^\circ} &= \frac{0.5772 \cdot 4}{t \cdot 0.05} = \frac{46.2}{t}, \\
 If_{18^\circ} &= \frac{0.5862 \cdot 4 \cdot 1.25}{t \cdot 0.05} = \frac{58.6}{t}, \\
 If_{20^\circ} &= \frac{0.5956 \cdot 4 \cdot 1.45}{t \cdot 0.05} = \frac{69.1}{t}.
 \end{aligned}$$

Dieser Ausdruck gilt somit unter der Voraussetzung, daß die Polarisationen bei der gleichen Temperatur ausgeführt werden wie die Inversionsversuche. Eine Abweichung der Polarisations-temperatur von 1° oder 2° beeinflusst jedoch die Werte der Umrechnungsfaktoren nur unbedeutend.

Wie bereits betont, folgt die Inversion des Rohrzuckers durch Saccharase der monomolekularen Formel nicht immer streng. Bis die Kinetik der Reaktion in ihren Einzelheiten vollständig aufgeklärt ist, dürfte jedoch diese Formel benutzt werden können, um die Aktivität mit hinreichender Genauigkeit zu bestimmen. Für obige Berechnungen der Umrechnungsfaktoren zwischen den verschiedenen Bezeichnungsweisen der Aktivität hat man den Wert der Inversionskonstanten für die Spaltung des Rohrzuckers auf 75.75% zugrunde gelegt. Bei unseren früheren Umrechnungen von If auf den Zeitwert wurde in die Formel für If das Mittel einer Reihe von k -Werten bei verschiedenen Spaltungsgraden des Rohrzuckers eingesetzt. Wegen der Steigerung der Inversionskonstanten fallen jedoch die Mittelwerte von k stets etwas geringer aus als der für die 75.75-proz. Spaltung geltende Wert. Für die Umrechnung von If auf den Zeitwert ist es jedoch zweifellos rationeller, den k -Wert für 75.75-proz. Spaltung (Drehung = 0°) einzusetzen. Den Wert von If , welcher in dieser Weise erhalten wird, wollen wir mit If^0 bezeichnen. Für die von uns angewandte Inversionstemperatur gilt also: $If^0 \cdot t = 58.6$.

Folgendes Beispiel zeigt, wie die Berechnung ausfällt:

Zum Inversionsversuch wurde 1 ccm der Enzymlösung XII a AKA verwendet.

Inversionsmischung wie gewöhnlich: 4.8 g Rohrzucker, 10 ccm 4-proz. KH_2PO_4 -Lösung, 49 ccm Wasser, 1 ccm Saccharaselösung. Bei den in den Tabellen angegebenen Zeiten wurden 10 ccm der Mischung in 10 ccm 5-proz. Sodalösung einpipettiert, wodurch die Reaktion abgebrochen wurde. Die Lösungen wurden hierauf im 1-dm-Rohr polarisiert.

Das Trockengewicht der Enzymlösung wurde durch Eindampfen einer Probe von 5 ccm bestimmt. Gefundenes Trockengewicht 1.44 mg. Also enthält 1 ccm 0.288 mg. Hieraus berechnet sich If zu $132 \times 4.8 : 2.88 = 220$. ($\pm 0^0 = 0.266$ Min.). Für eine Spaltung auf 75.75% (Drehung = 0^0) wird durch Extrapolation $k \cdot 10^4 = 143$ und $If^0 = 238$. Aus diesem Wert berechnet sich $\pm 0^0 = 0.246$ Min. Die beiden Berechnungsweisen

führen in diesem Fall zu Werten von I_f bzw. Zeitwerten, welche von einander um etwa 8% abweichen. Im allgemeinen dürften die Abweichungen von dieser Größenordnung sein.

Min.	Drehung	$k \cdot 10^4$	$k \cdot 10^4$ Mittel
0	2.65°		
22	1.00°	122	
28	0.62°	130	132
33	0.37°	133	
40	0.04°	142	

Zur Kennzeichnung der Aktivität von Enzymen ist I_f bzw. I_f^0 zweifellos rationeller als der O'Sullivan'sche Zeitwert, für welchen der Spaltungsgrad ja ganz willkürlich gewählt ist. Auch die Festlegung der Aktivität auf 50 mg Präparat ist unserer Ansicht nach wenig gerechtfertigt, da man praktisch nie gerade diese Menge anwendet. Ferner entspricht die Temperatur, 15.5°, nicht der gewöhnlich vorkommenden, vielmehr werden die Inversionen in der Regel bei Zimmertemperatur (18°) oder bei höheren Temperaturen in Thermostaten ausgeführt (vergl. den von Willstätter und Steibelt⁷⁾ vorgeschlagenen sogen. »Vergleichszeitwert«, Zeit der 50-proz. Spaltung mit 0.5 g Präparat bei 30° in Lösungen von nur 1.1875 g Rohrzucker in 25 ccm).

Was die zur Charakterisierung einer Saccharase erforderliche Bestimmung der Affinität durch die Michaelissche Konstante K_M betrifft, so ist vielleicht hier nicht der Platz zu einer eingehenderen Diskussion der zahlreichen Fragen, welche sich an die Bestimmung und Deutung dieser Konstante knüpfen. Wir zweifeln nicht daran, daß diese Konstante zur Kennzeichnung eines Enzyms wertvoll und sogar notwendig ist und auch auf dem gegenwärtigen Standpunkt unserer Kenntnisse erfolgen soll. Nur muß man sich der einstweilen noch herrschenden Unsicherheiten der theoretischen Grundlagen bewußt bleiben, und wir glauben auf die unsicheren Punkte auch hier kurz hinweisen zu sollen.

Die Deutung des Maximums der Aktivitäts- p_H -Kurve nach Michaelis ist zwar die erste, welche zu einer experimentell geprüften theoretischen Behandlung Anlaß gegeben hat und war deshalb sehr wertvoll. Bewiesen ist ihre Richtigkeit aber nicht, wie der eine von uns mehrfach betont hat⁸⁾; speziell gilt dies für die Frage, ob beim Maximum der p_H -Aktivitätskurve die Gesamtmenge des Enzyms zur Wirksamkeit kommt; bei proteolytischen Enzymen ist dies allgemein sicher nicht der Fall.

Was dann die Frage betrifft, welcher Teil des Enzym-Moleküls die Affinität zum Substrat vermittelt, so hat Willstätter⁹⁾ seine Auffassung so formuliert, daß das Molekül eines Enzyms aus einem kolloiden Träger und einer rein chemisch wirkenden aktiven Gruppe besteht. Entschieden weiter geht neuerdings Kuhn¹⁰⁾, wenn er schreibt: Wir werden zu der Anschauung geführt, daß die in der Wirkungssphäre des kolloiden Trägers sich abspielenden Vorgänge durch räumliche Tren-

⁷⁾ H. 111, 157, u. zw. 169 [1920].

⁸⁾ Euler, Chemie der Enzyme, II. Tl., 1 Abschn., S. 191. — Euler und Myrbäck, H. 120, 61 [1922]. — Euler, Sv. Kem. Tidskr. 33, 37 [1921].

⁹⁾ B. 55, 3601, u. zw. 3606 [1922]. ¹⁰⁾ H. 125, 28 [1922].

nung für die wirksamen Gruppen des Enzyms unbemerkt bleiben. Für diesen letzteren Satz können wir einstweilen genügende experimentelle Stützen¹¹⁾ noch nicht sehen. Unserer Meinung nach ist es demgemäß noch unentschieden, ob und in welchem Grad die Affinität der Saccharase (und eines Enzyms im allgemeinen) durch den »kolloiden Träger« mitbestimmt wird. Einstweilen ist es also jedenfalls wichtig, zu Aktivitäts- und Affinitätsbestimmungen hoch gereinigte Präparate zu verwenden und dieselben soweit möglich auch durch ihre chemischen Reaktionen und durch ihre Elementarzusammensetzung zu kennzeichnen.

2. Aktivitätsbestimmung bei Amylase-Präparaten.

Für Amylase läßt sich nach Euler und Svanberg¹²⁾ die Aktivität durch eine Formel von nachstehender Art ausdrücken:

$$Sf = \frac{k \cdot g \text{ Maltose}}{g \text{ Präparat}}$$

Sf bezeichnet die Verzuckerungsfähigkeit der Amylase-Präparate, k ist der Reaktionskoeffizient monomolekularer Reaktionen und »g Maltose« die Anzahl der Gramm dieser Biose, welche im Maximum bei dem ersten schneller verlaufenden Teil der Verzuckerung gebildet werden; diese Teilreaktion führt oft zu etwa 71% der theoretisch möglichen Maltosemenge¹³⁾.

Zur Bestimmung von Sf sind die Reaktionskoeffizienten bei 37° und bei optimaler Acidität zu messen. Als Substrat wurde von Euler und Svanberg eine nach Lintner bereitete lösliche Stärke in Konzentrationen 0.72—2.8% angewandt. Die Stärkelösung wurde vor der Anwendung gekocht. Die Enzym-Konzentration wird geeignet so gewählt, daß der k-Wert der monomolekularen Formel zwischen 0.004 und 0.08 liegt.

Willstätter, Waldschmidt-Leitz und Hesse¹⁴⁾ haben kürzlich zwei neue Bezeichnungsweisen für die Amylase-Wirkung (speziell von Pankreas-Amylase) vorgeschlagen, nämlich »Amylase-Einheit« (Am.-E.) bzw. »Amylase-Wert« (Am.-W.): Die Amylase-Einheit ist als das Hundertfache derjenigen Enzymmengen bestimmt, für die sich unter den angegebenen Versuchsbedingungen (i. c., S. 155) die Konstante der monomolekularen Reaktion = 0.01 ergibt. Daher drückt die Reaktionskonstante zugleich die Zahl von Amylase-Einheiten in der Analysenprobe aus. Den enzymatischen Reinheitsgrad eines Amylase-Präparates soll der Amylase-Wert (Am.-W.) ausdrücken, nämlich die Zahl von Amylase-Einheiten in 1 cg der Substanz.

¹¹⁾ Vielleicht geht Kuhn hier von anderen experimentellen Voraussetzungen aus als wir; daraufhin deutet u. a. folgende Stelle (i. c., S. 31): »Die Fortschritte der präparativen Methodik, die es ermöglichen, Invertin frei von Eiweiß, Kohlenhydrat und Phosphor, überhaupt frei von chemisch nachweisbaren Gruppen in mehr als 1500-facher Konzentration gegenüber dem Ausgangsmaterial darzustellen...« Die Darstellung eines Saccharase-Präparates frei von Eiweiß oder chemisch nachweisbaren Gruppen ist uns bisher nicht gelungen.

¹²⁾ H. 112, 193 [1920]; 115, 179 [1921].

¹³⁾ Für die Spaltungsgrenze der 1. Teilreaktion soll der Wert 71% oder 75% natürlich keineswegs als Normalwert aufgestellt werden; er liegt, wie auch Versuche von Holmbergh zeigen, nicht in der Natur der Sache. Jedenfalls muß die Spaltungsgrenze in jedem einzelnen Fall experimentell ermittelt werden.

¹⁴⁾ H. 126, 143 [1923].

Zur Umrechnung von Am.-W. auf Sf berechnen die erwähnten Forscher den Ausdruck: $\text{Am.-W.} = \text{Sf} \cdot 0.05333$. Bei Berechnung dieses Faktors wurde angenommen, daß von den bei der Bestimmung von Am.-W. ursprünglich anwesenden 250 mg Stärke 187.5 mg Maltose, also 71% der theoretisch möglichen Menge gebildet werden. Bei Berechnung von Sf und von Am.-W. wurde der Reaktionskoeffizient zugrunde gelegt, welcher nach der Formel für Reaktionen erster Ordnung berechnet wird. Ebensowenig wie für die Spaltung des Rohrzuckers ist für die Stärke-Spaltung die Kinetik so vollständig aufgeklärt, daß man ohne weiteres solche Berechnung einführen könnte. Die theoretischen Schwierigkeiten sind besonders dadurch veranlaßt, daß die Bildung von Maltose aus der Stärke durch mehrere aufeinander folgende Reaktionen bedingt wird (vergl. Euler und Svanberg, l. c.).

Was die erste Stufe der Stärke-Spaltung betrifft, nämlich die Verflüssigung, so reichen die vorliegenden Daten noch nicht ganz aus, um hierauf eine Aktivitätsbestimmung zu gründen. Wohlgemuth¹⁵⁾ hat das Verschwinden der blauen Jodreaktion als Maß für die Messung der Stärke-Spaltung vorgeschlagen. So wünschenswert es für das Studium des Stärke-Abbaus wäre, eine Methode zu besitzen, welche sich auf die Konzentrationsabnahme des Substrates gründet, so ist doch die Gruppe von Methoden, welche sich auf die Färbung der Stärke mit Jod gründet, so großen Bedenken unterworfen, daß sie zu einer Bestimmung der Amylase-Wirkung vorläufig nicht genügt.

U. Olssons¹⁶⁾ Untersuchung, in welcher der Verlauf des Stärke-Abbaues durch die Änderung der inneren Reibung gemessen wird, liefert wertvolle Anhaltspunkte. Jedenfalls ist bis auf weiteres die durch die innere Reibung studierte Enzymwirkung von der verzuckernden Fähigkeit zu trennen. Soweit die Wirkung durch eine Reaktionskonstante festgestellt werden kann, wird man versuchen, diese stärke-spaltende Wirkung etwa unter der Bezeichnung Af (amylolytische Fähigkeit) durch einen Ausdruck von gleicher Art wie Sf anzugeben. Die Grenzbedingungen wird Hr. Lic. Olsson noch näher festlegen.

Die Bildung von Maltose stellt sicher die zuverlässigste Bestimmungsmethode dar¹⁷⁾. Die größten Schwierigkeiten bei diesen Messungen liegen teils in dem Umstand, daß verschiedene Stärkearten mit verschiedener Geschwindigkeit gespalten werden, wodurch Bestimmungen, ausgeführt mit verschiedenen Stärkearten, nicht ohne weiteres vergleichbar sind, teils darin, daß die Reaktionsgeschwindigkeit auf einen geringen Bruchteil der ursprünglichen sinkt, wenn die Spaltung eine gewisse Grenze überschritten hat. In mehreren Fällen (Euler u. Svanberg, Willstätter und Mitarbeiter) ist diese Grenze zu 71% bestimmt worden. Wenn diese Grenze erreicht ist, sollten also aus 100 mg Stärke 75 mg Maltose gebildet worden sein. Indessen scheint es, daß die Verzuckerung doch nicht bei allen Stärkearten gleich weit geht¹⁸⁾. Bei Versuchen im hiesigen Laboratorium hat es sich gezeigt, daß besonders bei Anwendung einer nach Zulkowsky¹⁹⁾ bereiteten Stärke der schneller verlaufende Teil der Verzuckerung zuweilen

¹⁵⁾ Bio. Z. 9, 1 [1908]. ¹⁶⁾ U. Olsson, H. 126, 29 [1923].

¹⁷⁾ Bezüglich älterer Arbeiten mit der Verzuckerungsmethode siehe die Literatur bei Euler und Svanberg, l. c.

¹⁸⁾ Euler und Myrbäck, Arkiv f. kemi 8, Nr. 9 [1921].

¹⁹⁾ B. 13, 1395 [1880].

bereits früher aufhört, während in anderen Versuchen mit Pankreas-Amylase eine weitergehende Spaltung beobachtet wurde (O. Holmbergh).

Bevor eine bestimmte Auffassung über die Ursache der Spaltungsgrenzen geäußert werden kann, sind weitere Versuche erforderlich. Einstweilen dürfte man mit genügender Genauigkeit die Berechnung darauf gründen können, daß aus 100 mg Stärke 75 mg Maltose gebildet werden. Legt man der Berechnung der Reaktionskonstante nur Beobachtungen bis zu etwa 40-proz. Verzuckerung zugrunde, so ist der Einfluß kleinerer Abweichungen von obigem Wert gering, wenn man bei vergleichenden Versuchen die gleiche Stärkeart anwendet (siehe die vergleichenden Versuche an verschiedenen Stärkearten in der folgenden Mitteilung von K. Josephson). Für solche Amylasen, welche gleichzeitig Maltase enthalten, muß natürlich eine eventuelle Spaltung der Maltose in Traubenzucker berücksichtigt werden. Im allgemeinen verläuft jedoch die Maltose-Spaltung im Vergleich zur Maltose-Bildung so langsam, daß die Fehler der Maltose-Bestimmungen klein werden.

Einfluß des Substrates

bei der Aktivitätsbestimmung von Amylase-Präparaten.

Es ist bereits oben erwähnt worden, daß Zulkowsky- und Lintner-Stärke mit verschiedener Geschwindigkeit enzymatisch gespalten werden. Außerdem zeigt es sich, daß die erste schnellere Spaltung bei den beiden verschiedenen Präparaten verschieden weit geht. Um vollkommen vergleichbare Aktivitätswerte verschiedener Amylase-Präparate zu erhalten, ist es von Bedeutung, daß man sich davon überzeugt, daß die Bestimmungen der Spaltungsgeschwindigkeit mit der gleichen Stärkeart ausgeführt sind. Deshalb ist es bei Charakterisierung einer Amylase durch die gebräuchlichen Einheiten notwendig, die Stärkeart anzugeben. Bei den von Euler und Svanberg ausgeführten Untersuchungen wurde die Stärke nach Lintner bereitet, bei späteren Messungen ist im hiesigen Laboratorium zum Teil Zulkowsky-Stärke zur Anwendung gekommen. Es war deshalb erforderlich, zu untersuchen, ob die Spaltungsgeschwindigkeit an diesen beiden Substraten übereinstimmend ausfällt. Bereits eine Reihe von Versuchen, welche der eine von uns (K. J.) gleichzeitig mitteilt, haben ergeben, daß ein größerer Unterschied in dieser Hinsicht nicht vorliegt. Die folgenden Tabellen enthalten das Ergebnis eines Vergleichs, der sich über ein größeres Spaltungsgebiet erstreckt. Die Reaktionsmischung enthielt 1% Stärke und Phosphatpuffer von $p_H = 5.3$. Die Maltose-Bestimmungen sind nach der Bertrand'schen Methode ausgeführt.

Min.	Zulkowsky-Stärke		Lintner-Stärke	
	Maltose mg	$k \cdot 10^4$	Maltose mg	$k \cdot 10^4$
6	25.4	300	23.9	278
8	31.0	290	30.7	286
12	40.9	285	40.9	285
25	52.2		54.1	
60	57.3		58.1	
120	60.0		63.6	
240	61.9		64.9	

Bei dieser Versuchsreihe ergab Lintner-Stärke gegen Schluß der Reaktion mehr Maltose als Zulkowsky-Stärke. Verwendet man bei der Aktivitätsbestimmung zur Berechnung der Reaktionskonstante nur Zahlen innerhalb der ersten 40% der Spaltung, so hat die genannte Abweichung keinen Einfluß.

Wir kommen zum Ergebnis, daß die Verwendung von Zulkowsky-Stärke keinen Vorteil vor derjenigen der Lintner-Stärke bietet, welche letztere auch leichter zu bereiten ist und hinsichtlich der Spaltungsgeschwindigkeit und der Grenzen der ersten Spaltung etwas einheitlicher sein dürfte, als die Zulkowsky-Stärke (sofern diese nicht durch Dialyse fraktioniert ist).

Die von Euler und Svanberg »vorläufig« vorgeschlagene Methode zur Messung der Aktivität von Amylase-Präparaten kann also beibehalten werden, geeignet mit der von Willstätter, Waldschmidt-Leitz und Hesse für Pankreas-Amylase gemachten Einschränkung, daß zur Berechnung der Reaktionskonstanten nur die ersten 40% der Spaltung verwendet werden.

Glykogen als Substrat.

Der Vergleich der Stärke mit dem Glykogen bezüglich der Geschwindigkeit und Grenzen der Spaltung durch Amylase ist in zweifacher Hinsicht von Interesse: Erstens ist Glykogen das natürliche Substrat für tierische Amylasen, und letztere sollten vorzüglich an diesem Substrat untersucht werden. Zweitens ist die an Stärke eintretende Spaltungsgrenze oft auf die Anwesenheit eines besonderen Bestandteils, Amylopektin oder dergl., zurückgeführt worden. Unter letzterer Annahme wäre (wenn man vom Einfluß der Reaktionsprodukte absieht) zu erwarten, daß die Spaltungsgrenze bei Verwendung von Glykogen verschwindet.

Gegen die Möglichkeit eines Vergleichs von Stärke und Glykogen sprach die Verschiedenheit des Dispersitätsgrades. Wir haben geglaubt, den Einfluß dieser Ungleichheit dadurch eliminieren zu können, daß wir Kartoffelstärke und Glykogen in gleicher Weise nach Zulkowsky mit Glycerin vorbehandelt und so in einen löslichen Zustand übergeführt haben. Die Reaktionsbedingungen waren folgende: 40 ccm 2-proz. Zulkowsky-Stärke- resp. Zulkowsky-Glykogenlösung + 10 ccm 5-proz. Phosphatlösung ($p_H = 5.3$) + 29 ccm Wasser + 1 ccm Enzymlösung; Totalvolum 80 ccm; Temp. 37°.

Die in folgenden Tabellen angegebenen Werte für die Reaktionskoeffizienten 1. Ordnung k sind unter Annahme von 3 verschiedenen Spaltungsgrenzen, nämlich der theoretischen ($a = 105.6$), 75% und 50% ausgerechnet.

Min.	Stärke		Glykogen		
	Maltose mg	$k \cdot 10^4$ $a = 75$	Maltose mg	$k \cdot 10^4$ $a = 105.6$	$k \cdot 10^4$ $a = 75$ $a = 50$

Versuchsreihe 1.

7	28.9	302	12.9	81	117	185
10	39.5	325	14.7	65	95	151
15	50.9	325	18.8	57	84	137

Versuchsreihe 2.

8	26.1	233	—	—	—	—
10	33.9	261	—	—	—	—
15	42.2	239	26.1	82	124	213
20	50.4	242	30.0	73	111	199
30	53.1	178	33.5	55	86	161
40	—	—	35.7	45	70	136
60	55.7	98	40.8	35	44	124
1440	—	—	55.2	—	—	—
2880	—	—	59.2	—	—	—

Eine eingehendere Diskussion der Messungen soll an anderer Stelle erfolgen. Hier sei nur betont, daß bei Glykogen unsere k-Werte sogar unter Annahme der Spaltungsgrenze 50% stark abnehmen, und ferner, daß die Glykogen-Spaltung erheblich langsamer verläuft als die Stärke-Spaltung.

Ob für die Prüfung tierischer Organ-Amylasen (Leber, Pankreas, Muskel) die Verwendung von Glykogen zu empfehlen ist, müssen erst weitere Versuche zeigen.

3. Allgemeines über die Bezeichnung der Aktivität von Enzym-Präparaten und die Affinität von Enzymen.

Aus den im ersten Abschnitt angeführten Gründen scheint es uns am zweckmäßigsten, die Aktivität von Enzym-Präparaten in der Art zu bezeichnen, wie wir sie für Saccharase und für das stärke-verzuckernde Enzym vorgeschlagen haben, also, wenn a·k konstant ist, durch den Ausdruck:

$$Xf = \frac{k \cdot g \text{ Substrat}}{g \text{ Enzympräparat}}$$

Gilt hingegen die theoretisch einfachste Beziehung, daß k von der Substrat-Konzentration unabhängig ist, so sei:

$$Xf = \frac{k}{g \text{ Enzympräparat}}$$

In den speziellen Fällen sind natürlich die Grenzen und Bedingungen der Gültigkeit der Beziehungen anzugeben. Die Reaktionskonstante wird immer bei optimaler Acidität²⁰⁾ und in der Regel bei optimaler Aktivator-Konzentration anzugeben sein und zwar zweckmäßig bei 18° bzw. 20° oder bei 37°, so daß Xf dann für diese Temperaturen gilt.

Die Bezeichnung Xf wurde so gewählt, daß f die enzymatische Fähigkeit des betr. enzymatischen Bestandteils ausdrücken soll (f ist der Anfangsbuchstabe dieses Begriffes in den meisten Kultursprachen: Fähigkeit, faculty, schwed. förmåga usw.); für die speziellen Enzyme — abgesehen von den Bezeichnungen If und Sf — ist soweit möglich der Anfangsbuchstabe des Enzyms zu wählen, also etwa Uf für Urease, Lf für Lipase oder, um Verwechslungen zu vermeiden, die Anfangssilbe, also statt Kf Kat. f für Katalase.

Zur Charakteristik eines Enzyms ist die Angabe von Xf durch diejenige der Affinitätskonstante zu ergänzen. Die früher vorgeschlagene Bezeichnung K_M (Michaelis-Konstante) wird von nun an am besten als Affinitätskonstante (nicht wie z.B. von Euler und Myrbäck früher als Dissoziationskonstante) verwendet, also

$$K_M = \frac{[\text{Enzymsubstrat}]}{[\text{Enzym}] \times [\text{Substrat}]}$$

²⁰⁾ Über die Sicherheit der Grundlagen siehe Abschn. 2.

K_M scheint sich mit der Temperatur nicht sehr stark zu ändern, immerhin ist auch hier die Temperatur anzugeben und in Übereinstimmung mit der für X_f gültigen zu wählen. K_M schwankt nach vorliegenden Messungen bei Saccharasen zwischen 25 und 60, beträgt bei Urease nach einer vorläufigen Berechnung rund 90 und bei einer Lipase etwa 15.

271. K. Josephson:

Vergleichende Versuche über verschiedene Bestimmungsmethoden für die bei der Stärke-Spaltung gebildete Maltose.

[Aus d. Biochem. Laborat. d. Universität Stockholm.]

(Eingegangen am 2. Juni 1923.)

Zur Bestimmung der bei der Stärke-Spaltung gebildeten Maltose hat man seit langer Zeit bei zahlreichen Untersuchungen das Reduktionsvermögen der Maltose in alkalischer Kupferlösung zugrunde gelegt. Die bequemste Ausführungsform dieses Prinzips ist wohl die von Sonntag¹⁾ und Bertrand²⁾ beschriebene. Bei den Untersuchungen von Willstätter und seinen Mitarbeitern ist neuerdings die von Willstätter und Schudel³⁾ ausgearbeitete Methode zur Anwendung gekommen, nach welcher Aldehyd-Zucker mit Hypojodit bestimmt werden. Nach Willstätter, Waldschmidt-Leitz und Hesse⁴⁾ soll die Hypojodit-Methode der Bertrand'schen Methode überlegen sein, und zwar wegen ihres vollständig stöchiometrischen Verlaufs. Um uns für eine Reihe in Gang befindlicher Arbeiten über Amylase von den relativen Vorteilen und Nachteilen der beiden Methoden zu überzeugen, sind einige vergleichende Versuche ausgeführt worden.

Was die Nachteile der Hypojodit-Methode betrifft, so sind dieselben von Willstätter selbst hervorgehoben worden: »Bei der Anwendung der Hypojodit-Methode darf nicht außer acht gelassen werden, daß Hypojodit auch verbraucht wird 1. schon von der Stärke in Beträgen, die nach Herkunft und Alter derselben wechseln, 2. von den Proteinen und Amino-säuren in der rohen Enzymlösung (sei es aus der tierischen Drüse oder den gekeimten Samen), 3. von Glycerin oder anderen Alkoholen, gegebenenfalls auch dem Thymol der Enzymlösung, 4. von den Ammoniumsalzen, die in Elutionen enthalten sind« (l. c., S. 146).

Wegen der genannten Umstände muß die Bertrand'sche Methode, wie Willstätter betont, in gewissen Fällen, wo die Anbringung einer Korrektur wegen des Leerverbrauches von Jod nicht ausführbar ist, zur Anwendung kommen. Die Reduktion der Fehlingschen Lösung durch Aldehyd- und Keton-Zucker verläuft zwar nie stöchiometrisch, aber bei Verwendung der Bertrand'schen Tabellen werden richtige Maltose-Werte erhalten.

Die folgenden Tabellen enthalten das Resultat meiner Untersuchungen über reine Maltose-Lösungen. Die angewandte Maltose (Hydrat) war Merck's »Maltose cryst.« Zur Hypojodit-Methode wurde eine 0.1008-n. Thiosulfat-Lösung verwendet. Es entspricht also 1 ccm derselben 17.25 mg Maltose (Anhydrid). Für die Bertrand'sche Methode wurde zur Titrierung eine 0.1515-n. Permanganat-Lösung verwendet. 1 ccm entspricht also 9.63 mg Cu. Die Permanganat-Lösung wurde mit Hilfe der erwähnten Thiosulfat-Lösung eingestellt. Die erhaltenen Titer sind also vollständig vergleichbar.

¹⁾ C. 1903, I 998.

²⁾ Bl. 35, 1285 [1906].

³⁾ B. 51, 780 [1918].

⁴⁾ H. 126, 143 [1923].