

40. A. Bach: Über die Wirkungsweise der Tyrosinase.

(Eingegangen am 9. Januar 1908.)

Im Anschluß an eine eingehende Untersuchung über melanotische Pigmente und fermentative Melaninbildung versuchten O. v. Fürth und E. Jerusalem¹⁾, auch die Wirkungsweise der Tyrosinase zu ermitteln. Um die Wirkung des Ferments messend zu verfolgen, benutzten die Verfasser zwei Methoden: 1. Methode der Sedimentierung, bei welcher die Schätzung der gebildeten Melaninmenge nach dem Volumen des entstandenen Pigmentniederschlags erfolgte, und 2. Spektrophotometrische Methode, nach welcher die relativen Pigmentmengen nach den ermittelten Extinktionskoeffizienten der betreffenden Reaktionsflüssigkeiten geschätzt wurden. Erstere Methode gestattet nur, den Endzustand der Fermentreaktion in grober Annäherung zu bestimmen; mit Hilfe letzterer können dagegen nur die Anfangsphasen der Reaktion, bei welchen die Reaktionsflüssigkeit noch homogen bleibt, genau untersucht werden. Unter Benutzung dieser Methoden erhielten v. Fürth und Jerusalem mit Pilztyrosinase ziemlich unregelmäßige, schwer zu deutende Resultate, aus welchen diese Forscher den Schluß zogen, daß bei der Tyrosinase die Verhältnisse sich viel komplizierter als bei anderen Fermenten gestalten.

Wie in voranstehender Mitteilung angegeben wird, läßt sich die Wirkung der Tyrosinase durch Titrieren mit verdünnter Kaliumpermanganatlösung in Gegenwart von Schwefelsäure mit großer Leichtigkeit messend verfolgen. Da mir andererseits ein sehr gutes tyrosinasehaltiges Material zur Verfügung stand, so versuchte ich, die genannte Methode zur Ermittlung der Wirkungsweise der Tyrosinase anzuwenden.

Zunächst wurde die Abhängigkeit der Melaninbildung von der Tyrosinasekonzentration untersucht.

Von dem aus jungen, gesunden Pilzen (*Russula delica*) gewonnenen, klar filtrierten Saft (vergl. voranstehende Mitteilung) wurden 300 ccm in 1.5 l 96-prozentigen Alkohol gegossen; der entstandene Niederschlag wurde an der Wasserstrahlpumpe abfiltriert, mit Alkohol nachgewaschen und im Vakuum über Chlorcalcium von dem Fällungsmittel befreit. Der trockne Niederschlag wurde mit 300 ccm Wasser verrieben, wobei nur ein geringer Anteil des Präparates in Lösung ging. Die filtrierte, fast vollkommen farblose Lösung wurde für die im Nachstehenden beschriebenen Versuche angewandt.

In eine Reihe von 8 Bechergläsern wurden je 10 ccm Tyrosinlösung (0.05 % Tyrosin und 0.04 % Natriumcarbonat enthaltend), steigende Mengen Fermentlösung und Wasser bis auf 50 ccm gegeben. Die Gläser enthielten

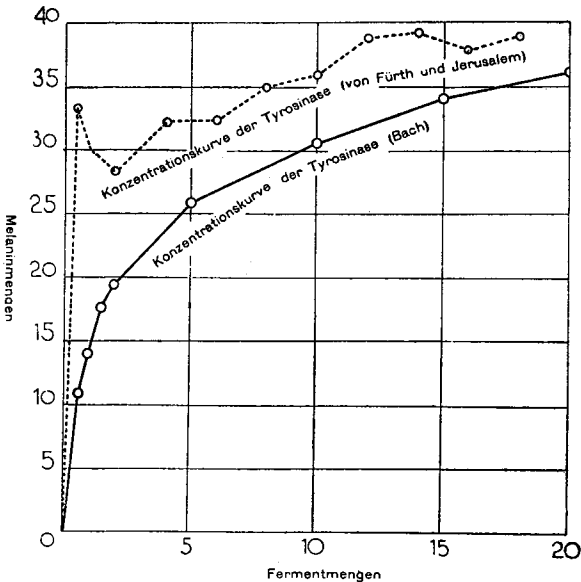
¹⁾ Beiträge zur Chem. Physiologie und Pathologie 10, 4—6, 131 [1907].

der Reihe nach 0,5, 1, 1,5, 2, 5, 10, 15 und 20 ccm Fermentlösung. Die Reaktionsgemische wurden 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen, dann mit je 1 ccm 10-prozentiger Schwefelsäure angesäuert und mit 0.002-n. Permanganatlösung bis zur Entfärbung titriert. Gleichzeitig mit der ersten Reihe wurde eine zweite Reihe von Gläsern unter genau gleichen Bedingungen mit den Reagenzien beschickt. Die Titration erfolgte hier nach 48 Stunden.

Die erhaltenen Zahlen sind in folgender Tabelle angegeben:

Verbrauchte Permanganatlösung.								
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Fermentkonzentration:	0.5	1.0	1.5	2.0	5.0	10.0	15.0	20.0
A. 24 Stunden	10.8	14.2	17.3	19.8	25.8	30.4	33.6	35.8 ccm
B. 48 »	13.2	16.0	17.8	20.4	25.6	31.2	34.4	35.4 »

Aus diesem Versuch geht hervor, 1. daß die Menge des Reaktionsproduktes mit der Fermentmenge, wenn auch langsamer als letztere, steigt, und 2., daß die Reaktion um so schneller zu einem Stillstand kommt, je größer die Fermentkonzentration ist. Die Tyrosinase verhält sich in dieser Hinsicht genau wie die von mir¹⁾ früher untersuchte Peroxydase aus Meerrettig. Trägt man die Fermentkonzentrationen auf der Abszissen- und die Permanganatmengen auf der Ordinatenachse ab, so erhält man die in nebenstehender Figur abgebildete Kurve. Zum Vergleich ist hier auch die von v. Fürth und Jerusalem erhaltene Konzentrationskurve der Tyrosinase (nach 24 Stdn. langer Einwirkung) angegeben.



¹⁾ Diese Berichte **37**, 3786 [1904].

Um die Wirkungsweise der Tyrosinase näher kennen zu lernen, wurde weiter die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der Tyrosinase 1. von der Fermentkonzentration, 2. von der Substratkonzentration festgestellt.

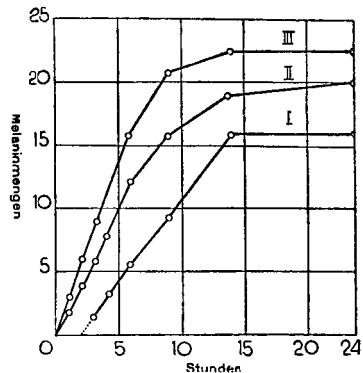
Drei breithalsige Erlenmeyerkolben von 750 ccm Inhalt, I, II und III, wurden mit je 100 ccm Tyrosinlösung, steigenden Fermentmengen und Wasser bis auf 500 ccm beschickt. Kolben I erhielt dabei 10 ccm Fermentlösung, Kolben II erhielt 20 ccm und Kolben III erhielt 30 ccm. Die Gemische wurden bei Zimmertemperatur stehen gelassen; zu bestimmten Zeiten wurden dann von jedem Gemisch 50 ccm abpipettiert, in der oben angegebenen Weise angesäuert und titriert. Dabei wurden folgende Zahlen erhalten.

		Verbrauchte Permanganatlösung.		
		I	II	III
Nach	1 Stunde	0.0 ccm	1.4 ccm	2.8 ccm
»	2 Stunden	0.0 »	3.9 »	5.7 »
»	3 »	1.6 »	5.8 »	8.8 »
»	4 »	2.7 »	7.8 »	11.1 »
»	6 »	5.5 »	11.1 »	16.1 »
»	9 »	9.4 »	16.3 »	20.8 »
»	14 »	15.9 »	19.0 »	22.3 »
»	24 »	16.0 »	19.9 »	22.8 »

Der Übersichtlichkeit wegen ist das erhaltene Zahlenmaterial hier in Kurvenform dargestellt.

Vergleicht man die nach gleichen Reaktionszeiten verbrauchten Permanganatmengen, so scheint hier keine bestimmte Proportionalität zwischen Wirkung und Fermentmenge zu bestehen. Bei den Anfangsstadien der Reaktion wächst die Wirkung schneller als die Fermentkonzentration, nach Verlauf von 6 Stunden ist die Wirkung der Fermentkonzentration genau direkt proportional, oberhalb dieser Reaktionsdauer wächst dagegen die Wirkung langsamer, als die Fermentkonzentration.

Vergleicht man aber nicht gleiche Reaktionszeiten, sondern gleiche Umsätze mit einander, so kommt hier die umgekehrte Proportionalität zwischen Fermentmenge und Reaktionszeit mit voller Klarheit zum Vorschein: das Produkt aus Fermentmenge und Reaktionszeit ist hier eine Konstante. So hat man z. B. bei Fermentkonzentration III den Permanganatverbrauch 5.7 nach 2 Stunden, bei



Fermentkonzentration II den Permanganatverbrauch 5.8 nach 3 Stunden und bei Fermentkonzentration I den Permanganatverbrauch 5.4 nach 6 Stunden:

$$\text{III} \times 2 = \text{II} \times 3 = \text{I} \times 6.$$

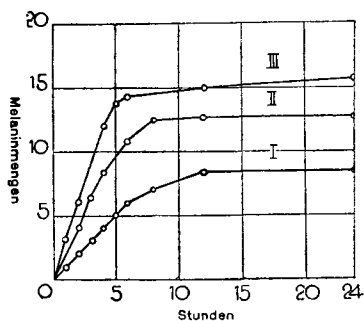
Dieselbe Gesetzmäßigkeit findet man auch bei $\text{III} \times 3$ und $\text{I} \times 9$, bei $\text{III} \times 4$ und $\text{II} \times 6$, bei $\text{III} \times 6$ und $\text{II} \times 9$. Sie fehlt aber sowohl bei den Anfangs- wie bei den Endstadien der Reaktion. So entsprechen z. B. bei $\text{II} \times 1$ und $\text{I} \times 3$, bei $\text{III} \times 1$ und $\text{I} \times 4$, bei $\text{II} \times 9$ und $\text{I} \times 14$ gleichen Umsätzen ungleiche Produkte aus Fermentmenge und Reaktionszeit. Diese Erscheinung erklärt sich dadurch, daß bei den niederen Fermentkonzentrationen die Reaktion langsamer als bei den höheren eintritt, bei den letzteren aber andererseits das Ferment rascher als bei den ersteren außer Tätigkeit gesetzt wird (vergl. obige Geschwindigkeitskurven). Dementsprechend sind nur die mittleren Reaktionsstadien, bei welchen das Ferment sich in voller Tätigkeit befindet, mit einander vergleichbar. Bei diesen aber kommt das Gesetz der Massenwirkung in unverkennbarer Weise zutage.

Von Interesse war noch, die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der Tyrosinase von der Substratkonzentration zu ermitteln.

3 Kolben, I, II und III, wurden mit je 30 ccm Fermentlösung, steigenden Mengen Tyrosinlösung und Wasser bis auf 500 ccm beschickt. Kolben I erhielt dabei 25 ccm, Kolben II 50 ccm und Kolben III 75 ccm Tyrosinlösung. Titration wie oben angegeben.

Verbrauchte Permanganatlösung.

	I	II	III
Nach 1 Stunde	1.0 ccm	1.9 ccm	3.0 ccm
» 2 Stunden	2.1 »	4.2 »	6.0 »
» 3 »	3.1 »	6.3 »	9.2 »
» 4 »	4.1 »	8.4 »	11.7 »
» 5 »	4.8 »	9.4 »	13.9 »
» 6 »	5.8 »	10.8 »	14.4 »
» 8 »	7.0 »	12.4 »	14.7 »
» 12 »	8.5 »	12.5 »	15.1 »
» 24 »	8.4 »	12.6 »	16.2 »



Aus obigen Zahlen ist ohne weiteres ersichtlich, daß bei gleichen Tyrosinasmengen und steigenden Tyrosinmengen die Reaktionszeiten den Substratkonzentrationen genau umgekehrt proportional sind. Diese Gesetzmäßigkeit gilt sowohl für die anfänglichen, wie für die mittleren Stadien der Reaktion, nicht aber für die Endstadien derselben. Denn auch hier wird die Tätigkeit des

Fermentes um so rascher erschöpft, je größer die Substratkonzentration ist.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung können dahin zusammengefaßt werden, daß die Tyrosinase in ihrer Wirkungsweise dem Massengesetz unzweifelhaft gehorcht. Die bei den späteren Reaktionsstadien zu beobachtenden Abweichungen von demselben sind dadurch bedingt, daß die Tätigkeit des Ferments im Laufe der Reaktion erschöpft wird, und zwar erfolgt die Erschöpfung um so schneller, je größer die Ferment- oder Substratkonzentration ist, d. h. je schneller die Reaktion verläuft.

Genf, Privatlaboratorium.

41. A. Bach: Über das Verhalten der Peroxydase gegen Licht.

(Eingegangen am 9. Januar 1908.)

Im Anschluß an frühere Versuche über das Verhalten der Peroxydase gegen physikalische und chemische Agenzien¹⁾ wurde auch die Einwirkung des Lichtes auf dieses Ferment untersucht.

100 ccm Peroxydaseextrakt wurden in einem größeren, gut verschließbaren Erlenmeyerkolben der Einwirkung des direkten Sonnenlichtes ausgesetzt. Zu verschiedenen Zeiten wurden dem Inhalt je 20 ccm entnommen und mit 1 g Pyrogallol in 50 ccm Wasser + 30 ccm 1-prozentiger Hydroperoxydlösung zusammengebracht; der entstandene Purpurogallinniederschlag wurde nach 24 Stunden auf einem tarierten Filter gesammelt, mit 200 ccm Wasser gewaschen, bei 105° bis Gewichtskonstanz getrocknet und gewogen. In dieser Weise wurden folgende Zahlen erhalten.

Dauer der Belichtung:	0 Stdn.	4 Stdn.	8 Stdn.	15 Stdn.	40 Stdn.	76 Stdn.
Purpurogallin:	0.198 g	0.197 g	0.201 g	0.187 g	0.165 g	0.166 g.

Ein anderes Extrakt ergab folgende Resultate:

Dauer der Belichtung:	0 Stdn.	4 Stdn.	22 Stdn.	50 Stdn.	76 Stdn.
Purpurogallin:	0.227 g	0.222 g	0.202 g	0.190 g	0.183 g

Unter dem vereinigten Einflusse des Sauerstoffs und des Lichtes findet also eine langsame Abnahme der Aktivität der Peroxydase statt. In dieser Hinsicht unterscheidet sich die Peroxydase nicht von anderen Fermenten, wenn sie auch im allgemeinen als eines der beständigsten Enzyme anzusehen ist.

Genf. Privatlaboratorium.

¹⁾ Diese Berichte 40, 230 [1907].