

Die von Kehrman, Monier und Ramm<sup>5)</sup> bei der Reduktion von 9.9-Diäthyl-anthron mit Zink und Essigsäure gewonnene Substanz ist wahrscheinlich das entsprechende Tetraäthyl-tetrahydrodianthracyl gewesen und nicht, wie die Genannten annahmen, das 9.9-Diäthyl-dihydro-anthracen. Denn letzterer Kohlenwasserstoff, der schon früher von Goldmann<sup>6)</sup> beschrieben wurde, schmilzt bei 48–50° in Übereinstimmung mit den tiefen Schmelzpunkten, die alle diese unymmetrischen Dialkyl-dihydro-anthracene aufweisen.

Der eine von uns (M. A. Matthews) möchte auch an dieser Stelle dem Department of Scientific and Industrial Research seinen Dank für eine Beihilfe aussprechen, die ihn in den Stand setzte, an dieser Untersuchung teilzunehmen.

Sir John Cass Technical Institute, Department of Chemistry, London.

### 125. H. v. Euler und K. Josephson:

#### Zur Bezeichnung der enzymatischen Aktivität von enzym-haltigen Präparaten, Enzym-Lösungen und lebenden Zellen.

[Aus d. Chem. Laborat. d. Hochschule Stockholm.]

(Eingegangen am 1. März 1926.)

Das Bestreben, eine möglichst vollständige Einheitlichkeit der Bezeichnungsweise für die enzymatische Wirksamkeit von enzym-haltigen Präparaten und Lösungen zu erreichen, hat den Vorschlag veranlaßt, die Aktivität solcher Präparate und Lösungen durch einen der folgenden Ausdrücke zu charakterisieren<sup>1)</sup>:

$$X_1f = k/(g \text{ Enzympräparat}) \dots \dots \dots (1);$$

$$X_2f = (k \times g \text{ Substrat})/(g \text{ Enzympräparat}) \dots \dots (2).$$

In diesen Formeln soll  $k$  einen für jede Enzym-Reaktion in zweckmäßiger Weise zu wählenden Reaktionskoeffizienten darstellen, durch welchen sich die Geschwindigkeit der Reaktion ausdrücken läßt. In vielen Fällen läßt sich dabei der gewöhnliche, für monomolekulare Reaktionen gültige Reaktionskoeffizient

$$k = 1/t \cdot \log (a/a-x)$$

benutzen.

$g$  Enzympräparat bedeutet die in Gramm auszudrückende Menge des bei der Bestimmung von  $k$  benutzten Enzym-Präparates bzw. das Trockengewicht der zur Verwendung gekommenen Enzym-Lösung.

Von den beiden Ausdrücken (1) und (2) ist der erste zu wählen bei solchen Enzym-Reaktionen bzw. bei Untersuchung von solchen Substrat-Konzentrationen (bei Verwendung verdünnter Lösungen bzw. bei schwacher Affinität zwischen Enzym und Substrat), bei welchen der Reaktionskoeffizient  $k$  unabhängig von der Konzentration des Substrates gesetzt werden kann. Der zweite Ausdruck ist dagegen zu wählen bei solchen Enzym-Reaktionen bzw. bei Untersuchung von solchen Substrat-Konzentrationen, wo das Produkt Reaktionskoeffizient mal Substrat-Menge eine wenigstens angenähert kon-

<sup>5)</sup> B. 56, 169 [1923].      <sup>6)</sup> B. 21, 1182 [1888].

<sup>1)</sup> Euler und Josephson, B. 56, 1749 [1923].

stante Größe darstellt. Theoretisch tritt dieser Fall also ein bei Untersuchung von hohen Substrat-Konzentrationen bzw. bei starker Affinität zwischen Enzym und Substrat<sup>2)</sup>.

Nur in solchen Fällen, wo ein Gebiet, in welchem  $k \times g$  Substrat-Konzentration oder  $k$  allein konstant ist, sich nicht in zweckmäßiger Weise (mit hinreichender Genauigkeit) untersuchen läßt, ist es also notwendig (wenn es auch in gewissen anderen Fällen zweckmäßig sein kann) die Konzentration des Substrates bei der Bestimmung der Enzym-Aktivität genau zu präzisieren. In solchen Fällen bedient man sich des ersten der obigen Ausdrücke, wobei die Messung des Koeffizienten  $k$  unter den fixierten Bedingungen ausgeführt wird.

Außerdem ist es natürlich von großer Wichtigkeit, solche Einflüsse wie Konzentration der Wasserstoff-Ionen, Konzentration von Aktivatoren und Hemmungskörpern in möglichst hohem Grade auszuschalten, sei es durch Einhaltung optimaler Bedingungen (Konzentrationen) oder in anderer Weise; vergl. die Bestimmung von Trypsin und Lipase nach Willstätter und seinen Mitarbeitern<sup>3)</sup>.

Von Enzym-Reaktionen, welche sich durch Ausdrücke dieser Form bestimmen lassen, seien hier erwähnt: Rohrzucker-Spaltung durch die Saccharase der Kulturhefen ( $I_f$  = Inversionsfähigkeit<sup>4)</sup>), Stärke-Spaltung durch Malz-Amylase ( $S_f$  = Stärke-Spaltungsfähigkeit, Verzuckerungsfähigkeit<sup>5)</sup>),  $\beta$ -Glucosidase-Wirksamkeit des Mandel-Emulsins ( $Sal. f$  = Salicin-Spaltungsfähigkeit<sup>6)</sup>), Katalase-Wirksamkeit von Leberkatalase-Präparaten ( $Kat. f$ <sup>7)</sup>), Erepsin-Wirksamkeit von Erepsin-Präparaten aus Schweine-Darm ( $Gl. f$  = Glycylglycin-Spaltungsfähigkeit<sup>8)</sup>).

In den Fällen, wo mehrere Substrate von einem gemeinsamen Enzym gespalten werden können, empfiehlt es sich, in der Bezeichnung  $X_f$  das bei der Bestimmung von  $X_f$  benutzte Substrat anzugeben, wie beispielsweise bei der Definition der Ausdrücke  $Sal. f$  und  $Gl. f$  zur Charakterisierung der enzymatischen Aktivität von  $\beta$ -Glucosidase- und Erepsin-Präparaten getan wurde.

Bei der Bestimmung von  $X_{1f}$  oder  $X_{2f}$  wird also immer die Reaktionsgeschwindigkeit pro Gramm Trockengewicht berechnet. Wenn es sich aber um die Messung der enzymatischen Wirksamkeit lebender Zellen handelt, ist es in vielen Fällen zweckmäßig, anstatt pro Gramm Trockengewicht des Zellenpräparates (z. B. Hefe-Suspension, Bakterien-Aufschlammung usw.) auszudrücken, die mittlere enzymatische Wirksamkeit einer Zelle zu bestimmen. In solchen Fällen läßt sich in analoger Weise wie bei Enzym-Präparaten oder Enzym-Lösungen ein zweckmäßiger Ausdruck zur Charakterisierung der Wirksamkeit einer Zelle durch Einführung der Zellenzahl anstatt des Trockengewichtes in den Formeln für die Enzym-Aktivität aufstellen. Dabei können natürlich oft Formeln von derselben

<sup>2)</sup> Josephson, H. **147**, 1, und zwar S. 26ff. [1925].

<sup>3)</sup> siehe hierzu Willstätter, Waldschmidt-Leitz und Memmen, H. **125**, 93 [1923]; Willstätter und Persiel, H. **142**, 245 [1925].

<sup>4)</sup> Euler und Svanberg, H. **107**, 269 [1919].

<sup>5)</sup> Euler und Svanberg, H. **112**, 193 [1920].

<sup>6)</sup> Josephson, H. **147**, 1 [1925].

<sup>7)</sup> Hennichs, Bio. Z. **145**, 289 [1924]; B. **59**, 218 [1926].

<sup>8)</sup> Euler und Josephson, B. **59**, 226 [1926].

Form wie die Ausdrücke (1) und (2) benutzt werden. Wir wollen also hier den Vorschlag machen, in solchen Fällen eine der folgenden Ausdrücke zum erwähnten Zweck zu benutzen:

$$X_1v = k/\text{Zellenzahl} \quad \dots \dots \dots (3),$$

$$X_2v = (k \times g \text{ Substrat})/\text{Zellenzahl} \quad \dots \dots \dots (4).$$

Durch die Anwendung des Buchstabens v (abgeleitet aus dem Vermögen der Zellen zur betreffenden Enzym-Reaktion) anstatt des Buchstaben f, welcher nur im Falle von Messungen berechnet pro Gramm Trockengewicht verwendet werden soll, kann keine Verwechslung eintreten über die in einem speziellen Falle verwendete Berechnungsweise.

Diese Bezeichnungsweise steht also in Analogie mit dem früheren Vorschlag zur Messung des Inversionsvermögens von Hefezellen<sup>9)</sup>:

$$\text{Inv.} = (k \times g \text{ Zucker})/\text{Zellenzahl}.$$

Nach unserem Vorschlag soll also z. B. das Vermögen gewisser Bakterien, Wasserstoffperoxyd zu zersetzen, durch den Ausdruck

$$\text{Kat. v} = (\text{Reaktionskonstante } k)/\text{Zellenzahl},$$

bzw. durch den Ausdruck

$$\text{Kat. f} = (\text{Reaktionskonstante } k)/(g \text{ Enzympräparat})$$

bestimmt werden. Für den ersten dieser beiden Ausdrücke heben neuerdings Virtanen und Karström<sup>10)</sup> einen Vorschlag gemacht, der hierdurch eine Modifikation erfährt. Die Bezeichnung Kat. f<sup>11)</sup> soll nämlich nach unserem Vorschlag nur die zweite der oben angegebenen Bedeutungen haben.

Die Bezeichnungen Xf und Xv stehen also zueinander in folgender Beziehung:

$$Xv = Xf \times (g \text{ Enzympräparat})/\text{Zellenzahl} \quad \dots (5a),$$

oder

$$Xv = Xf \times (\text{mittleres Gewicht einer Zelle}) \quad \dots (5b).$$

Die Bezeichnungen Xf und Xv für die enzymatische Aktivität von Enzym-Präparaten und Enzym-Lösungen bzw. für lebende Zellen sind rein experimentell feststellbare Größen. Wie an anderer Stelle<sup>12)</sup> bemerkt wurde, können aber solche Ausdrücke nicht ohne weiteres als Maß für den Reinheitsgrad verschiedener Enzym-Präparate benutzt werden. Wird nämlich ein Ausdruck dieser Art zu diesem letzteren Zweck benutzt, so werden wenigstens zwei Hypothesen eingeführt:

1. die Annahme, daß nur eine Art des betreffenden Enzyms und zwar von konstanter Wirksamkeit existiert;
2. die Annahme, daß das gesamte Enzym in aktiver Form vorhanden ist, bzw. daß der inaktive Anteil des Enzyms vernachlässigt werden darf.

Bezüglich der Hefen-Saccharase haben wir neuerdings den Nachweis liefern können, daß die erste dieser Annahmen nicht allgemein zutrifft. Schon durch Vorbehandlung einer Hefe durch verschiedene Zuckerarten konnten Saccharasen erhalten werden, welche verschiedene Affinitäten zu den Zuckern Fructose, Glucose und Rohrzucker besitzen und welche also nicht konstante

<sup>9)</sup> Euler und Svanberg, H. 106, 201 [1919].      <sup>10)</sup> Bio. Z. 161, 9 [1925].

<sup>11)</sup> Euler und Josephson, B. 56, 1749 [1923]; Hennichs, a. a. O.

<sup>12)</sup> Euler und Josephson, H. 145, 130 [1925].

Wirksamkeiten besitzen<sup>13)</sup>. Die zweite der oben erwähnten Annahmen ist aber auch keineswegs genügend erfüllt, wie bei der Diskussion über die chemische Zusammensetzung gereinigter Saccharase-Präparate gezeigt worden ist.

Bei Vergleich von Präparaten, die aus verschiedenem Material und nach verschiedenen Verfahren erhalten sind, ist also die Kenntnis des Aktivitätsgrades der verschiedenen Präparate ebenso wichtig wie die Kenntnis ihrer enzymatischen Wirksamkeit.

Der Affinitätsgrad eines Enzym-Präparates wurde zu

$$Xf/Xf_{\max.} = k/k_{\max.} \dots \dots \dots (6)$$

definiert.

Die Verschiedenheiten zwischen der enzymatischen Wirksamkeit  $Xf$  und dem Reinheitsgrad sind also in folgender Weise gegeben:

$$Xf = (\text{Aktives Enzym}) / (g \text{ Trockensubstanz}) \dots (7).$$

$$\text{Reinheitsgrad} = \frac{\text{Gesamtmenge des Enzyms (aktives + inaktives E.)}}{g \text{ Trockensubstanz}} \dots (8).$$

Ebenso wie  $Xf$  mit dem Reinheitsgrad variiert, so ist auch  $Xv$  in ähnlicher Weise variabel. So läßt sich die Katalase-Wirksamkeit von Hefezellen einfach durch Erwärmen beträchtlich steigern<sup>14)</sup>. Dabei tritt also ein Steigen des Wertes von  $Kat. v$  ein wegen Änderung des Aktivitätsgrades. Die Aktivitäts-Erhöhung ist aber kaum mit einer Änderung des Reinheitsgrades (Befreiung von Verunreinigungen) verbunden zu betrachten.

Was die Gärfähigkeit oder Glykolyse von Trockenpräparaten oder lebenden Zellen betrifft, so haben wir bisher mit der Anwendung unseres in Rede stehenden Prinzips noch gewartet, und zwar aus verschiedenen Gründen. Zunächst sind Gärungen keine einheitlichen Enzym-Reaktionen; was wir messen, ist vielmehr entweder die Abnahme des Substrates der ersten Teilreaktion oder aber das auftretende Endprodukt einer Folge von Reaktionen, von welchen wenigstens eine von der Konzentration eines spezifischen Aktivators (der Cozymase) abhängt. Die Wirksamkeit  $Xv$  wird deshalb kein Maß für den Enzym-Gehalt, wie etwa bei der enzymatischen Inversion.

Immerhin kann es Vorteile haben, schon jetzt an die Einführung einer für alle Gärungen gleichheitlichen Bezeichnungweise der Gärwirksamkeit zu denken. Ohne auf spezielle Vorschläge schon einzugehen, möchten wir nur zweierlei betonen: In der Bezeichnung der Wirksamkeit dürfte es notwendig sein, die Art der Gärung zum Ausdruck kommen zu lassen, also z. B. bei der Milchsäure-Gärung<sup>15)</sup> etwa  $M$  vor  $Xv$  oder vor die speziellere Bezeichnung zu setzen.

Ferner aber wird man in der Regel auf Schwierigkeiten stoßen, wenn man die Reaktionsgeschwindigkeit durch eine Reaktionskonstante erster Ordnung  $k$  angeben will; für die alkoholische Gärung ist dies jedenfalls nicht zugänglich. Es wird sich also mehr empfehlen, die Wirksamkeit auf die Anfangsgeschwindigkeit  $dx/dt$  zu beziehen.

<sup>13)</sup> Euler und Josephson, H. 152, 66 [1926].

<sup>14)</sup> Euler und Blix, H. 105, 83 [1919]. <sup>15)</sup> Virtanen, H. 134, 300 [1924].