

einer 2-proz. Permanganat-Lösung, die 2 g KOH enthielt. Beim Aufarbeiten des Oxydations-Ansatzes in der üblichen Weise erhielten wir eine Apocamphersäure vom unscharfen Schmp. 170—190°, während ihr mit Acetylchlorid bereitetes Anhydrid nach dem Umkrystallisieren aus Benzol-Petroläther weiße Nadeln vom scharfen Schmp. 176—177°, korr., bildete, das den eines Vergleichs-Präparates anderer Herkunft vom Schmp. 177—178° nicht herabdrückte.

112. C. N. Ionescu: Gleichgewichts-Lage und Spezifität der β -Glucosidase-Wirkung.

[Aus d. Biolog.-chem. Laborat. d. Pharmazcut. Fakultät, Bukarest.]

(Eingegangen am 17. Januar 1936.)

In einer früheren Arbeit haben wir gezeigt, daß man bei den mit β -Glucosidase katalysierten Reaktionen das Massenwirkungs-Gesetz rückhaltlos anwenden kann, wenn man in die Gleichgewichts-Formel: $[\text{Glucose}] \cdot [\text{Alkohol}] = K [\text{Glucosid}] \cdot [\text{Wasser}]$ die Konzentrationen der β -Glucose einsetzt, da ja nur diese von den beiden epimeren Formen α und β der Glucose, die sich in der Lösung befinden, vom Enzym aktiviert wird¹⁾. Die so für die verschiedene Alkohol-Konzentrationen von 10—90 Vol.-% und für eine gleichbleibende Konzentration von 1% Glucose berechnete Konstante hat sehr naheliegende Werte, die ungefähr 0.149 betragen²⁾. Wenn man aber das Massenwirkungs-Gesetz in der Weise anwendet, daß man in die obige Gleichung die gesamte Glucose-Menge einsetzt, wie es andere Autoren taten, so erhält man nicht konstante Werte, sondern Zahlen, die mit der Alkohol-Konzentration von 0.24 (für 10 Vol.-% Methanol) bis 0.32 (für 90 Vol.-% Methanol) ansteigen. Wir konnten beweisen, daß diese Abweichung vom Massenwirkungs-Gesetz nicht der Inaktivierung des Enzyms zuzuschreiben ist, wie es einige Forscher³⁾ getan haben, sondern daß diese Abweichung von der Verschiebung des Gleichgewichtes β -Glucose \rightleftharpoons α -Glucose gegen die α -Form, die durch den Alkohol bewirkt wird, verursacht wird, was eine Verminderung der Konzentration an β -Glucose zur Folge hat, so daß man für die Konstante K , (für die gesamte Glucose-Konzentration) steigende Werte erhält.

In der vorliegenden Arbeit wollen wir einen neuen Beweis für diese Theorie erbringen. Wenn das Ansteigen der Gleichgewichts-Konstanten den verschiedenen Alkohol-Konzentrationen zuzuschreiben ist, die das früher erwähnte Gleichgewicht dadurch verschieben, daß die Konzentration der β -Glucose, die allein für die Synthese aktiv ist, verringert wird, so muß man, wenn mit gleichen Alkohol-Konzentrationen, aber verschiedenen Glucose-Mengen gearbeitet wird, Gleichgewichts-Konstanten erhalten, die dieselben Werte besitzen, selbst dann, wenn diese mittels der gesamten Glucose-Menge berechnet werden, weil in diesem Falle (bei gleich bleibender Alkohol-Konzentration) zwischen der gesamten Glucose-Menge und der β -Glucose ein konstantes Verhältnis besteht.

Ein solcher Versuch, in welchem die Synthese des β -Methyl-glucosids mit verschiedenen Glucose-Mengen, aber mit gleicher Alkohol-Konzen-

¹⁾ Bulet. 16, 3—4, 145 [1934].

²⁾ B. 67, 990 [1934].

³⁾ H. v. Euler u. Josephson: Ztschr. physiol. Chem. 186, 30 [1924]; H. v. Euler, Chemie der Enzyme, T. I, 308 [1925].

tration durchgeführt wurde, ist von Bourquelot und Verdon⁴⁾ gemacht worden, um festzustellen, inwieweit die Glucose-Menge, die sich in der Lösung befindet, die Menge des unter der Einwirkung der β -Glucosidase gebildeten Glucosids beeinflusst. Die Autoren gebrauchten 70-proz. Methanol (in Gewichtsprozenten) und bereiteten daraus 12 Lösungen, von welchen je 100 ccm 1, 2, 4, 6, 8, 12, 14, 16, 18, 20 und 30 g Glucose enthielten. Jeder Lösung wurden hierauf 0.60 g Emulsin hinzugefügt; der Synthesengang wurde dann sowohl polarimetrisch als auch durch Dosieren der überschüssigen (nicht-gebundenen) Glucose verfolgt.

In Tabelle 1 befinden sich bei dem Versuch von Bourquelot und Verdon in den Reihen 1 und 2 die Glucose-Mengen, die jede Lösung zu Beginn der Synthese enthielt, und diejenigen Mengen Glucose, die als β -Methylglucosid gebunden wurden.

Berechnung der Alkohol- und Wasser-Konzentrationen.

Die Mengen des Alkohols und des Wassers entsprechen bei den erwähnten Versuchen von Bourquelot und Verdon nicht der Konzentration von 70%, wie es die Autoren angeben: Wenn man 70 g Methanol = 85.5 ccm mit 30 g Wasser mischt, erhält man 100 g verdünnten Alkohol. Dieser hat, unter Berücksichtigung der Volum-Verminderung, die beim Mischen von Alkohol und Wasser auftritt und in diesem Falle 1.5 ccm beträgt, ein Volumen von 114 ccm. Wenn man von dieser Lösung die nötige Menge nimmt, um zusammen mit dem Volumen der Glucose eine Lösung von 100 ccm zu bereiten, so werden natürlich die Konzentrationen des Alkohols und des Wassers geringer sein als 70 und 30, und zwar um so kleiner, je mehr Glucose für die Bereitung der Lösung verwendet wird (s. in der Tabelle die Reihen: Glucose %, Alkohol % und Wasser %).

Die Konzentrationen des Alkohols und des Wassers wurden auf folgende Weise berechnet:

Wenn man mit V das Volumen des Alkohols und des Wassers in 100 ccm Glucose-Lösung und mit D die Dichte des Methylalkohols bezeichnet, und wenn man ferner berücksichtigt, daß das spezifische Gewicht des Wassers 1 ist, dann läßt sich schreiben:

$$Al/D + Wa = V. \dots\dots\dots 1)$$

Wenn man weiterhin berücksichtigt, daß zwischen dem Gewicht des Alkohols und dem des Wassers bei allen Versuchen das Verhältnis 70/30 besteht, erhält man:

$$Al/Wa = 7/3 \dots\dots\dots 2)$$

Das Volumen V ergibt sich auch aus der Differenz zwischen dem Gesamtvolumen von 100 ccm und dem Volumen, das die Glucose in der Lösung einnimmt:

$$V = 100 - v. \dots\dots\dots 3)$$

Wenn man mit G das Gewicht der Glucose in 100 ccm Lösung und mit δ das spezifische Gewicht der Glucose bezeichnet, erhält man:

$$v = G/\delta \dots\dots\dots 4)$$

⁴⁾ Journ. Pharm. Chim. 7, 575 [1913].

Ta-

g Glucose in 100 ccm Lösung	α (1 = 2) Anfangs- Drehung	α (1 = 2) End- Drehung	Gebundene Glucose g	Alkohol g-%	Wasser g-%
1	+ 1° 8'	—26'	0.826	58.635	25.131
2	+ 2° 18'	—50'	1.652	58.253	24.965
4	+ 4° 40'	—1° 40'	3.304	57.489	24.637
6	+ 7° 04'	—2° 30'	4.970	56.725	24.309
8	+ 9° 28'	—3° 20'	6.620	55.961	23.981
10	+ 11° 54'	—4° 08'	8.270	55.197	23.653
12	+ 14° 10'	—4° 50'	9.870	54.433	23.335
14	+ 16° 42'	—5° 34'	11.420	53.669	22.997
16	+ 19°	—6° 14'	12.990	52.905	22.669
18	+ 21° 30'	—7°	14.602	52.141	22.341
20	+ 23° 05'	—7° 40'	16.186	51.372	22.016

Wenn nun die Gleichungen 1, 2, 3 und 4 aufgelöst werden, erhält man die Konzentrationen des Alkohols und des Wassers (in Gewichts-%) für 100 ccm Lösung; diese Konzentrationen sind von der Glucose-Menge abhängig:

$$Al = 7D/7 + 3D(100 - G/\delta) \dots 5) \quad Wa = 3D/7 + 3D(100 - G/\delta) \dots 6)$$

Wenn man in (5) und (6) das spezifische Gewicht des Methylalkohols $D = 0.79$ und das der Glucose $\delta = 1.544$ einsetzt, erhält man:

$$Al = 59.017 - 0.382 G \dots 7) \quad Wa = 25.293 - 0.164 G \dots 8)$$

Die Gleichungen (7) und (8) gestatten uns, die Konzentrationen des Alkohols und des Wassers für jede Lösung zu berechnen; wir erhielten die Werte, die in der Tabelle in den Reihen Al und Wa angegeben sind. (Wie man sieht, ändert sich die Alkohol-Konzentration von 58.635 für 1% Glucose bis 51.372 für 20% Glucose und die des Wassers von 25.131 bis 22.016.)

Bourquelot und Verdon stellen ferner fest, daß die prozentual gebundene Glucose, besonders in den Lösungen von 12% Glucose an, sinkt. Diese Tatsache läßt sich leicht erklären, wenn wir die für die Alkohol-Konzentrationen berechneten Zahlen in Augenschein nehmen. Das Sinken dieser Konzentrationen wird natürlich auch eine Verringerung der gebildeten Glucosid-Menge verursachen, die durch das Abnehmen der Wasser-Konzentration nicht ersetzt werden kann.

Mittels dieser für den Alkohol und das Wasser erhaltenen Werte, wie auch mit den von Bourquelot und Verdon für die als Glucosid gebundene Glucose und für die anfänglich in die Lösung eingebrachte Glucose angegebenen Zahlen, haben wir die Gleichgewichts-Konstante aus dem Massenwirkungsgesetz für jede Glucose-Konzentration berechnet. Die für die Konstante K_t (für die gesamte Glucose) erhaltenen Werte sind in der Tabellen-Reihe K_t wiedergegeben. Wie man sieht, sind sie einander fast gleich und steigen nicht an, wie es der Fall ist, wenn man mit wachsenden Alkohol-Konzentrationen arbeitet. Der Mittelwert dieser Konstanten ist 0.2679. Das

belle 1.

Konzentrat. d. Glucose Norm.	Konzentrat. d. Wassers Norm.	Konzentrat. d. Alkohols Norm.	Konzentrat. d. Glucosids Norm.	K_t
0.000966	1.401	1.8264	0.004586	0.2746
0.001938	1.394	1.800	0.009173	0.2592
0.00392	1.387	1.786	0.01834	0.2751
0.00573	1.3234	1.7434	0.02759	0.2738
0.00766	1.3687	1.7101	0.03676	0.2603
0.00960	1.360	1.677	0.04592	0.2579
0.01182	1.351	1.644	0.05481	0.2625
0.01433	1.341	1.6126	0.06341	0.2717
0.016713	1.3315	1.5798	0.07227	0.2748
0.01887	1.3221	1.5469	0.08108	0.2724
0.02114	1.3130	1.4775	0.08997	0.2647

Mittelwert $K_t = 0.2679$.

Verhältnis zwischen der β -Glucose und der gesamten Glucose in einer der Lösungen von 70% Methanol ist β -Glucose/gesamte Glucose = 0.5567*).

Die Konstante K_β (nur für die Konzentration der β -Glucose nach der Gleichung $K_\beta = K_t \times \beta$ -Glucose/gesamte Glucose) ergibt den Wert 0.149. Der Mittelwert der Konstanten K_β , der von uns für 9 Lösungen von 10—90 ccm Alkohol auf 100 ccm Lösung und einer konstanten Menge von 1% Glucose festgestellt wurde, beträgt 0.149. Das Massenwirkungs-Gesetz läßt sich also auch bei Lösungen von verschiedenen Glucose-Konzentrationen mit Erfolg anwenden, und man erhält für die Gleichgewichts-Konstante K_β den Wert 0.149, der identisch ist mit dem, den wir für dieselbe Konstante bei Versuchen mit verschiedenen Alkohol-Konzentrationen gefunden haben. Der Umstand, daß die Synthesen, von welchen in dieser Mitteilung die Rede ist, und in welchen die Alkohol-Konzentration nur wenig verschieden war, nicht nur für die Konstante K_β , sondern auch für die Konstante K_t (für die gesamte Glucose) gleichbleibende Werte geben, beweist um so mehr, daß die ansteigenden Werte für die Konstante K_t , die man bei Synthesen mit verschiedenen Alkohol-Konzentrationen erhält, der Verschiebung des Gleichgewichtes β -Glucose \rightleftharpoons α -Glucose, die vom Alkohol verursacht wird, zuzuschreiben sind.

*) Die Verschiedenheit der Glucose-Konzentration beeinflußt nur wenig das Gleichgewicht β -Glucose \rightleftharpoons α -Glucose, und zwar verschiebt die Konzentration von 20% Glucose das Verhältnis β -Glucose/gesamte Glucose nur von 0.6334 (bei 1% Glucose) bis 0.6278, während der Alkohol dieses Verhältnis von 0.6334 (bei 0% Alkohol) in 0.5292 für 70% Alkohol ändert. Man kann also bei der Berechnung der Gleichgewichts-Konstanten die Änderung der Konzentration der β -Glucose, die durch verschiedene Konzentrationen der gesamten Glucose bewirkt wird, vernachlässigen. Die Änderungen der Glucose-Konzentrationen werden durch den Alkohol in viel größerem Maße bewirkt und dürfen daher nicht außer acht gelassen werden.