

113. C. N. Ionescu und A. Kizyk: Kinetik der β -Glucosidase-Wirkung.

[Aus d. Biolog.-chem. Laborat. d. Pharmazeut. Fakultät, Bukarest.]
(Eingegangen am 17. Januar 1936.)

In einer früheren Arbeit, die in dieser Zeitschrift veröffentlicht worden ist¹⁾, haben wir gezeigt, daß bei der biochemischen Synthese von β -Methylglucosid das Massenwirkungs-Gesetz seine volle Gültigkeit behält. Das Verhältnis der Geschwindigkeits-Konstanten für die Hydrolyse und Synthese des β -Methylglucosids (beide Reaktionen unter gleichen Bedingungen ausgeführt) hat denselben Wert wie die Gleichgewichts-Konstante. Diese Feststellung widerspricht den Schlußfolgerungen von H. v. Euler und K. Josephson, die auf Grund derselben von Bourquelot angegebenen experimentellen Daten, deren auch wir uns bedienten, den Schluß ziehen, daß die Gleichgewichts-Konstante, die aus dem Verhältnis der Geschwindigkeits-Konstanten für die Hydrolyse und Synthese berechnet wird, einen 4-mal größeren Wert hat als die Gleichgewichts-Konstante, die sich aus den Konzentrationen der aktiven Körper am Ende der Reaktion ergibt. Die genannten Autoren ziehen auf Grund dieser Zahl den Schluß, daß die Affinität der β -Glucosidase für die Glucose 4-mal größer ist als für das Glucosid. Wie wir in der früheren Mitteilung gezeigt haben, entspricht diese Ungleichheit der Gleichgewichts-Konstanten, die aus den Konzentrationen beim Gleichgewicht und aus dem Verhältnis der Geschwindigkeits-Konstanten berechnet werden, nicht der Wirklichkeit und ist nur einer fehlerhaften Berechnung der beiden Konstanten zuzuschreiben. Wenn man richtig rechnet, erhält man sowohl für die Gleichgewichts-Konstante aus den Konzentrationen beim Gleichgewicht, als auch für die, die sich aus dem Verhältnis der Geschwindigkeits-Konstanten ergibt, gemäß dem Massenwirkungs-Gesetz fast denselben Wert von 0.246.

In letzter Zeit hatten K. P. Jacobsohn und A. da Cruz²⁾, die ebenfalls die Anwendung des Massenwirkungs-Gesetzes für den reversiblen Prozeß: Fumarsäure + Wasser \rightleftharpoons Äpfelsäure studierten, festgestellt, daß die Gleichgewichts-Konstante aus dem Konzentrationen beim Gleichgewicht 0.26 ist, das Verhältnis der Geschwindigkeits-Konstanten aber, die gesondert für den Wasser-Additions und -Abspaltungsprozeß bestimmt wurden, 0.50 beträgt. Es könnte daher scheinen, daß im Falle der Fumarase zum Unterschied von dem, was wir für die Synthese der β -Glucoside festgestellt haben, das Massenwirkungs-Gesetz nicht gültig ist. Auf diese Arbeiten werden wir in Kürze in einer anderen Mitteilung zurückkommen.

Der Versuch von Bourquelot und Verdon, dessen sich für die obigen Berechnungen sowohl H. v. Euler und K. Josephson als auch wir uns bedienten, ist unter ganz besonderen Bedingungen durchgeführt worden. Die Synthese und Hydrolyse des β -Methylglucosids wurde mit 2 Lösungen bewirkt, von welchen jede 30. 2 g-% Methanol enthielt. In dieser Alkohol-Konzentration geht sowohl die Hydrolyse als auch die Synthese, in den beiden Versuchs-Lösungen, mit gleichen Geschwindigkeiten dem Gleichgewichtszustand entgegen. —

Um zu zeigen, daß unsere Anschauungen, die im früheren Artikel mitgeteilt wurden, nicht nur für diese speziellen Bedingungen, unter welchen

¹⁾ B. 67, 990 [1934].

²⁾ B. 67, 1481 [1934].

Bourquelot gearbeitet hat, gültig sind, haben wir die Geschwindigkeits-Konstanten für die Hydrolyse und Synthese des β -Methylglucosids bei verschiedenen Alkohol-Konzentrationen festgestellt, bei welchen die beiden Geschwindigkeiten nicht mehr gleich sind, um dann das Verhältnis der unter diesen Bedingungen ermittelten Konstanten zu der Gleichgewichts-Konstanten zu vergleichen.

Wenn andererseits die Hypothese von H. v. Euler im allgemeinen richtig ist, daß die Geschwindigkeit der Hydrolyse und Synthese nicht von den Konzentrationen der aktiven Körper in jedem Moment abhängt, sondern von den Konzentrationen der Zwischenkörper Enzym-Substrat, so könnte man behaupten, daß unsere Schlüsse, die sich aus den Studium des β -Methylglucosids ergeben, trotz ihrer Richtigkeit die Theorie von H. v. Euler unberührt lassen, da die Affinität der β -Glucosidase für die Glucose und das Glucosid dieselbe sein kann. Dies ist im Falle des β -Methyl-Glucosids sogar wahrscheinlich, da dieses Glucosid sich sowohl durch seine Struktur, als auch durch sein Molekulargewicht von der β -Glucose nicht besonders stark unterscheidet. Um diese Hypothese zu kontrollieren, haben wir in der vorliegenden Arbeit von demselben Gesichtspunkt aus, die Anwendbarkeit des Massenwirkungs-Gesetzes auf die Synthese und Hydrolyse des β -Äthylenglykol-monoäthyläther-glucosids studiert. Zwischen diesem Glucosid und der Glucose besteht ein viel größerer Unterschied, als zwischen der Glucose und dem β -Methylglucosid. Ganz gleich, ob wir nun annehmen, daß der Komplex Enzym-Substrat ein wahrer chemischer Körper ist oder ein Adsorptionsprodukt des Substrats an das Enzym, wird die Affinität der β -Glucosidase für die Glucose einerseits und für das Glucosid des Äthylenglykol-monoäthyläthers andererseits sehr verschieden sein müssen; wenn also die Hypothese von H. v. Euler einen realen Grund hat, wird man für die Gleichgewichts-Konstante, die nach dem Massenwirkungs-Gesetz aus dem Verhältnis der Geschwindigkeits-Konstanten oder aus den Konzentrationen beim Gleichgewicht berechnet wird, verschiedene Werte erhalten müssen.

a) Synthese und Hydrolyse des β -Methyl-Glucosids in Methanol 50 Vol.-%.

Bei der Glucosid-Synthese gehen im Reaktions-Medium vom ersten Moment an, gleichzeitig zwei entgegengesetzte Reaktionen vor sich. Einerseits verbindet sich die Glucose mit dem Alkohol (Glucosid-Bildung), andererseits vollzieht sich der entgegengesetzte Prozeß, die hydrolytische Spaltung des gebildeten Glucosids in Alkohol und Glucose.

Nach dem Massenwirkungs-Gesetz wird die Geschwindigkeit der Synthese in jedem Moment proportional sein der Konzentration der Glucose und des Alkohols, so daß man schreiben kann:

$$V_1 = k_1^{(6)} [\text{Glucose}] [\text{Alkohol}] \dots \dots \dots 1)$$

In derselben Weise erhalten wir für die Hydrolyse:

$$V_2 = k_2^{(6)} [\text{Glucosid}] [\text{Wasser}] \dots \dots \dots 2)$$

Die scheinbare Geschwindigkeit der Glucosid-Synthese wird eine Resultante dieser beiden gleichzeitigen, aber entgegengesetzten Reaktionen sein und ist in jedem Moment gleich der Differenz zwischen den Geschwindig-

keiten der Synthese und der Hydrolyse nach den obigen Gleichungen, demnach:

$$dx/dt = V_1 - V_2 = k_1^{(s)} [\text{Glucose}] [\text{Alkohol}] - k_2^{(s)} [\text{Glucosid}] [\text{Wasser}] \quad . \quad 3)$$

Bezeichnen wir mit x die Glucose-Menge, die als Glucosid gebunden wird, mit a die Glucose-Menge zu Beginn der Reaktion, mit Al den Alkohol und mit Wa das Wasser, so erhalten wir durch Integrieren:

$$t (Al k_1^{(s)} + Wa k_2^{(s)}) = \lg \frac{Al k_1^{(s)} a}{Al k_1^{(s)} a - x (Al k_1^{(s)} + Wa k_2^{(s)})} \quad \dots \quad 4)$$

Ferner ist: $k_2^{(s)} / k_1^{(s)} = K_t \quad \dots \quad 5)$

und man erhält:

$$k_1^{(s)} = \frac{1}{Al t \left(1 + K_t \frac{Wa}{Al} \right)} \lg \frac{a}{a - x \left(1 + K_t \frac{Wa}{Al} \right)} \quad \dots \quad 6)$$

und für die Hydrolyse:

$$k_2^{(s)} = \frac{K_t}{Al t \left(1 + K_t \frac{Wa}{Al} \right)} \lg \frac{a}{a - x \left(1 + K_t \frac{Wa}{Al} \right)} \quad \dots \quad 7)$$

wobei K_t die Gleichgewichts-Konstante für die gesamte Glucose-Menge ist (nicht für die Konzentration der β -Glucose) und für die bei dem Versuch angewandte Alkohol-Konzentration.

Die Gleichungen (6) und (7) gestatten uns, die Geschwindigkeits-Konstanten für die Synthese (k_1) und Hydrolyse (k_2) mittels der für die Synthese (s) des β -Methyl-glucosids erhaltenen Daten zu berechnen.

Dieselben Geschwindigkeits-Konstanten für die Hydrolyse und Synthese haben wir auch aus den experimentellen Daten, die sich aus dem Versuch für die Hydrolyse des β -Methyl-glucosids ergaben, der in gleicher Weise wie jene Synthese angestellt wurde, berechnet, indem wir uns auf dieselben Anschauungen wie oben stützten.

Die scheinbare Geschwindigkeit der Hydrolyse wird in diesem Falle gleich sein der Differenz zwischen der Geschwindigkeit der Hydrolyse und jener der Synthese. Wenn man mit a die anfängliche Menge des β -Methyl-glucosids (die molekular gleich ist der Glucose-Menge im Versuch für die Synthese) bezeichnet und mit y die Menge des hydrolysierten Glucosids, dann kann man schreiben:

$$dy/dt = V_2 - V_1 = k_2^{(h)} [a - y] [Wa] - k_1^{(h)} [Al] [y] \quad \dots \quad 8)$$

Durch Integrieren erhalten wir:

$$k_2^{(h)} = \frac{1}{Wa t \left(1 + \frac{Al}{K_t Wa} \right)} \lg \frac{a}{a - y \left(1 + \frac{Al}{K_t Wa} \right)} \quad \dots \quad 9)$$

und für die Synthese:

$$k_1^{(h)} = \frac{1}{Wa t \left(K_t + \frac{Al}{Wa} \right)} \lg \frac{a}{a - y \left(1 + \frac{Al}{K_t Wa} \right)} \quad \dots \quad 10)$$

Die Formeln (9) und (10) ergeben die Geschwindigkeits-Konstanten für die Hydrolyse (k_2) und Synthese (k_1) mit den experimentellen Daten aus dem Versuch für die Hydrolyse (h) des Glucosids.

Bekanntlich ist die Gleichgewichts-Konstante nach dem Massenwirkungs-Gesetz gleich dem Verhältnis der Geschwindigkeits-Konstanten: $K_t = k_2 \cdot k_1$. Um dies mit den aus den Formeln (6) und (9) wie auch (7) und (10) berechneten Geschwindigkeits-Konstanten zu beweisen, haben wir einen Versuch für die Synthese und Hydrolyse des β -Methyl-glucosids in 50 Vol.-% Methanol durchgeführt.

Der Gang der Reaktion wurde in zwei Lösungen polarimetrisch verfolgt, von welchen zu verschiedenen Zeiten Proben entnommen wurden.

Mit den erhaltenen Daten haben wir die entsprechenden Geschwindigkeits-Konstanten für die Synthese und Hydrolyse berechnet, indem wir die Formeln (6), (7) und (9), (10) anwandten. Wir konnten auf diese Art beweisen, daß die Geschwindigkeits-Konstante für die Synthese zwischen $123 \cdot 10^{-7}$ und $132 \cdot 10^{-7}$ liegt (s. in Tabelle 1 die Reihen k_1^a und k_1^b). Für die Geschwindigkeits-Konstanten der Hydrolyse erhält man Werte von $302 \cdot 10^{-8}$ — $334 \cdot 10^{-8}$ (s. in Tabelle 1 die Reihen k_2^a und k_2^b). Das Verhältnis $k_2^b/k_1^b = K_t$, wie auch das von $k_2^a/k_1^a = K_t$ hat Werte, die zwischen 0.237—0.269 liegen (s. in Tabelle 1 die Reihen $K_t^a = k_2^a/k_1^a$ und $K_t = k_2^b/k_1^b$) und ebenso der Konstanten K_t , die aus den Konzentrationen beim Gleichgewicht nach der Formel $K_t = [\text{Alkohol}][\text{Glucose}]/[\text{Wasser}][\text{Glucosid}]$ für 50 Vol.-% Methanol berechnet und = 0.252 gefunden wurde, sehr nahe kommen¹⁾.

Wir konnten auf diese Art beweisen, daß die Affinität des Enzyms für die beiden Substrate nicht in der von H. v. Euler und K. Josephson gezeigten Weise eine Rolle spielt, sondern daß man denselben Wert für die Gleichgewichts-Konstante sowohl aus dem Verhältnis der Geschwindigkeits-Konstanten, als auch aus den Konzentrationen der aktiven Körper beim Gleichgewicht erhält, sogar in jenen Fällen, in welchem die beiden Geschwindigkeiten nicht mehr gleich sind, wie in dem von Bourquelot angestellten Versuch.

Tabelle I: Synthese und Hydrolyse des β -Methyl-glucosids.

50.0 Vol.-% Methanol, 0.4000 g Emulsin, Eigendrehung des Emulsins $\alpha = -0.04^\circ$ ($l = 2$).												
Synthese: 2.000 g Glucose Anfangs-Drehung $\alpha = +2.26^\circ$ ($l = 2$)						Hydrolyse: 2.1540 g β -Methyl-glucosid Anfangs-Drehung $\alpha = -1.35^\circ$ ($l = 2$)						
Zeit in Min.	α Verdün- nung 1 + 5	α korrigiert	x = gebun- dene Glucose	k_1^a	k_1^b	α Verdün- nung 1 + 5	α korrigiert	x = hydrolysiert. Glucosid	k_2^a	k_2^b	k_1^b/k_1^a	k_2^b/k_2^a
164	+1.68 ^o	+2.06 ^o	0.1108	$123 \cdot 10^{-7}$	$314 \cdot 10^{-8}$	-1.05 ^o	-1.22 ^o	0.0720	$316 \cdot 10^{-8}$	$126 \cdot 10^{-7}$	0.256	0.249
986	+1.05 ^o	+1.30 ^o	0.5318	$123 \cdot 10^{-7}$	$314 \cdot 10^{-8}$	-0.66 ^o	-0.75 ^o	0.3324	$302 \cdot 10^{-8}$	$119 \cdot 10^{-7}$	0.245	0.263
1506	+0.74 ^o	+0.93 ^o	0.7368	$129 \cdot 10^{-7}$	$326 \cdot 10^{-8}$	-0.47 ^o	-0.55 ^o	0.4598	$313 \cdot 10^{-8}$	$124 \cdot 10^{-7}$	0.243	0.262
2566	+0.37 ^o	+0.48 ^o	0.9860	$132 \cdot 10^{-7}$	$334 \cdot 10^{-8}$	-0.23 ^o	-0.28 ^o	0.6150	$313 \cdot 10^{-8}$	$124 \cdot 10^{-7}$	0.237	0.269

b) Synthese und Hydrolyse des β -Äthylenglykol-monoäthyläther-glucosids.

In derselben Weise, wie der Versuch mit 50 Vol.-% Methanol ausgeführt worden ist, studierten wir auch die Hydrolyse und Synthese des Äthylenglykol-monoäthyläther-glucosids.

Mit den erhaltenen experimentellen Daten wurden hierauf die Geschwindigkeits-Konstanten nach den früheren Formeln berechnet. Die Geschwindigkeits-Konstante für die Synthese hat den Wert von $355 \cdot 10^{-7}$ — $373 \cdot 10^{-7}$, die Konstante der Hydrolyse ist $222 \cdot 10^{-7}$ — $235 \cdot 10^{-7}$ (s. in Tabelle II die Reihen: k_1^a , k_1^b und k_2^a , k_2^b).

Die Gleichgewichts-Konstanten $K_t = k_2^b/k_1^a$ und $k_t = k_2^a/k_1^b$, die sich aus dem Verhältnis der Geschwindigkeits-Konstanten für die Hydrolyse und Synthese ergeben, haben einen Wert von 0.615—0.653 (s. in Tabelle II die Reihen: $k_t = k_2^b/k_1^a$ und k_2^a/k_1^b).

Die Gleichgewichts-Konstante, die man aus den Konzentrationen der aktiven Körper beim Gleichgewicht berechnet, beträgt für 60 Vol.-% Äthylenglykol-monoäthyläther 0.635.

Wir erhielten also für die Gleichgewichts-Konstante fast denselben Wert, ohne Unterschied, ob wir sie aus dem Verhältnis der Geschwindigkeits-Konstanten oder aus der Formel für das Gleichgewicht berechneten.

Tabelle II: Synthese und Hydrolyse des β -Äthylenglykol-monoäthyläther-glucosids.

Äthylenglykol-monoäthyläther 60 Vol.-%, Emulsin 0.4000 g, Eigendrehung des Emulsins $\alpha = -0.04^\circ$ ($l = 2$)

Zeit in Min.	Synthese: 2.0000 g Glucose Anfangs-Drehung $\alpha = +2.26^\circ$ ($l = 2$)					Hydrolyse: 2.8000 g β -Äthylenglykol-monoäthyläther-glucosid Anfangs-Drehung $\alpha = -1.48^\circ$ ($l = 2$)						
	α Verdünnung 1 + 5	α korrigiert	x = gebun- dene Glucose	k_1^a	k_2^a	α Verdünnung 1 + 5	α korrigiert	x = hydro- lysiertes Glucosid	k_2^b	k_1^b	$\frac{k_2^a}{k_1^b}$ $K_t = \frac{k_2^a}{k_1^b}$	$\frac{k_2^b}{k_1^a}$ $K_t = \frac{k_2^b}{k_1^a}$
347	+1.44°	+1.77°	0.2620	357.10 ⁻⁷	222.10 ⁻⁷	+0.14°	+0.21°	0.9038	228.10 ⁻⁷	361.10 ⁻⁷	0.638	0.615
850	+1.13°	+1.40°	0.4598	368.10 ⁻⁷	234.10 ⁻⁷	+0.82°	+1.02°	1.5562	235.10 ⁻⁷	373.10 ⁻⁷	0.638	0.627
1082	+1.08°	+1.33°	0.4972	355.10 ⁻⁷	226.10 ⁻⁷	+0.97°	+1.20°	1.6898	232.10 ⁻⁷	365.10 ⁻⁷	0.653	0.619

Beschreibung der Versuche.

a) Versuch mit 50 Vol.-% Methanol.

Es wurden 2 Lösungen von 50 Vol.-% Methanol bereitet, von denen die eine 2.0000 g Glucose, die andere die gleichwertige Menge (2.1540 g) β -Methyl-glucosid enthält. Beiden Proben wurden hierauf zu gleicher Zeit 0.4000 g fein pulverisiertes Emulsin hinzugesetzt. Die Proben wurden auf einer Schüttelmaschine mit 20 Umdrehungen in der Minute bei einer Temperatur von + 20° geschüttelt. Um die optische Eigendrehung des Emulsins in Betracht zu ziehen, wurde ein Kontrollversuch mit 0.4000 g Emulsin in 100 ccm Methanol (50 ccm%) gemacht, der eine Drehung von $\alpha = 0.04^\circ$ ergab.

Nach verschiedenen Zeiten wurden beiden Proben, nach Umschütteln, um das Enzym gleichförmig zu verteilen, zu gleicher Zeit 5.0 ccm entnommen und in ein Probierröhr, das 1.0 ccm 40-proz. Formol enthielt, gebracht, um die Reaktion sofort zu unterbrechen. Die Lösungen wurden hierauf unverzüglich wieder auf der Schüttelmaschine befestigt. Die so entnommenen Proben wurden filtriert und 24 Stdn. aufbewahrt. In dieser Zeit geht die Mutarotation der β -Glucose, die bei der Hydrolysen-Reaktion entsteht und die der α -Glucose, die in der Synthesen-Reaktion in schwachem Überschuß vorhanden sein kann, vor sich, und die beiden epimeren Formen erreichen das Gleichgewicht, das sich während der Reaktion schwach verschieben kann. Die so erhaltenen polarimetrischen Werte wurden hierauf korrigiert, wobei sowohl die Verdünnung der Lösungen mit Formol, als auch die Eigendrehung des Emulsins in Betracht gezogen wurde.

Um die Menge der gebundenen Glucose im Synthesen-Versuch, wie auch die des hydrolysierten Glucosids in der zweiten Lösung zu berechnen, bedienen wir uns der Formel: $x = a \frac{(\alpha_0 - \alpha)}{\alpha_0 - \alpha_0'}$.

b) Versuch mit 60 Vol.-% Äthylenglykol-monoäthyläther.

Die Lösungen wurden in gleicher Weise wie die früheren bereitet. Die der Synthese enthielt 2.0000 g-% Glucose, die der Hydrolyse die gleichwertige Menge (2.8000 g). Äthylenglykol-monoäthyläther-glucosid mit $[\alpha]_D = -25.62^\circ$. Jede Lösung enthielt ferner 0.4000 g-% Emulsin mit der Eigendrehung $\alpha = -0.04^\circ$.

Schlußfolgerungen.

Sowohl aus den Versuchen von Bourquelot, die wir in einem früheren Artikel besprochen haben, als auch aus den gegenwärtigen Versuchen mit dem β -Methylglucosid und β -Äthylenglykol-monoäthyläther-glucosid ergibt sich, daß keine Abweichungen vom Massenwirkungs-Gesetz festzustellen sind. Wenn man gesondert die Hydrolyse einer gewissen Menge β -Methylglucosid und parallel die Synthese ebendesselben Glucosids durchführt, wobei man von einer gleichwertigen Menge Glucose und Glucosid ausgeht, kann man aus diesen beiden Versuchen vier Geschwindigkeits-Konstanten berechnen, und zwar aus dem Hydrolysen-Versuch eine Geschwindigkeits-Konstante für die Hydrolyse k_2^h und eine für die Synthese k_1^h , auf Grund des reversiblen Prozesses. In analoger Weise erhält man aus dem Synthesen-Versuch eine Geschwindigkeits-Konstante für die Synthese k_1^s und eine für die entgegengesetzte Hydrolysen-Reaktion k_2^s . Das Verhältnis irgendeiner der Geschwindigkeits-Konstanten zur Hydrolyse zu irgendeiner der Geschwindigkeits-Konstanten der Synthese bleibt immer dasselbe und ist identisch mit der Gleichgewichts-Konstanten aus den Konzentrationen beim Ende der Reaktion. Das Massenwirkungs-Gesetz läßt sich also uneingeschränkt anwenden. Die Hypothese von H. v. Euler findet keine Anwendung bei der Synthese der β -Glucoside, nicht einmal im Falle jener Glucoside, deren Affinität für die β -Glucosidase nach dieser Hypothese fühlbar verschiedener sein müßte als die der Glucose, was eine Abweichung vom Massenwirkungs-Gesetz zur Folge hätte.