

Verseifungsgeschwindigkeit der Ester³¹⁾.

Ester	Mole in 2 ccm Pyridin	ccm $n/_{10}$ -Ba(OH) ₂ nach Minuten							
		$\frac{1}{2}$	1	2	3	4	5	10	20
Acetylglykolsäure- naphthylamid-(2)	$5 \cdot 10^{-5}$	—	0.06	0.11	0.15	0.18	0.21	0.28	0.43
Acetylglykolsäure- [1-brom-naphthyl- amid-(2)].	$5 \cdot 10^{-5}$	—	0.05	0.10	0.13	0.16	0.19	0.29	0.40
Acetylglykolsäure- [1-methoxy-naph- thylamid-(2)] . . .	$5 \cdot 10^{-5}$	—	0.04	0.07	0.11	0.15	0.18	0.30	0.39
Acetylglykolsäure- [3-methoxy-naph- thylamid-(2)] . . .	$5 \cdot 10^{-5}$	—	0.01	0.03	0.06	0.09	0.12	0.26	0.36
Acetylglykolsäure- [6-methoxy-naph- thylamid-(2)] . . .	$5 \cdot 10^{-5}$	—	0.07	0.12	0.17	0.22	0.26	0.41	0.42
Acetylglykolsäure- [7-methoxy-naph- thylamid-(2)] . . .	$5 \cdot 10^{-5}$	—	0.07	0.14	0.21	0.27	0.32	0.44	0.46
Phenanthroyl-(9)- carbinolacetat ..	$5 \cdot 10^{-5}$	—	0.03	0.05	0.08	0.13	0.18	0.37	0.42
Phenanthroyl-(2)- carbinolacetat ..	$5 \cdot 10^{-5}$	—	0.09	0.24	0.39	0.44	0.46	—	—
Phenanthroyl-(3)- carbinolacetat ..	$5 \cdot 10^{-5}$	0.12	0.28	0.42	0.46	0.47	0.47	—	—
Buttersäuremethyl- ester	10^{-3}	—	—	—	—	—	—	0.05	0.16

242. Fritz Schlenk, Harry Hellström und Hans v. Euler: Desamino-cozymase.

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

(Eingegangen am 8. Juni 1938.)

1) Die Desamino-cozymase als Co-Enzym der alkoholischen Gärung.

Im Molekül der Cozymase wurde die Funktion des quartär gebundenen Nicotinsäureamids als wasserstoffübertragende Gruppe von Euler, Adler und Hellström aufgeklärt¹⁾. Über die Bedeutung des Adenylsäure-Teiles hingegen ließen sich bisher keine Aussagen machen. Zwei Annahmen lagen besonders nahe: Erstens, daß dieser Molekülbezirk (insbesondere die Amino-gruppe des Adenins) bei der Bindung des Co-Enzyms an das Apo-Enzym beteiligt sei, zweitens, daß die im Molekül vorhandene Adenosin-5-phosphorsäure während der Funktion der Cozymase als Codehydrase, z. B. bei der alkoholischen Gärung, als Co-phosphorylase (phosphatübertragendes Co-Enzym) neben der Co-dehydrase-Wirkung (Wasserstoffüber-

³¹⁾ Meßmethode nach W. Langenbeck u. F. Baehren, a. a. O. S. 518.

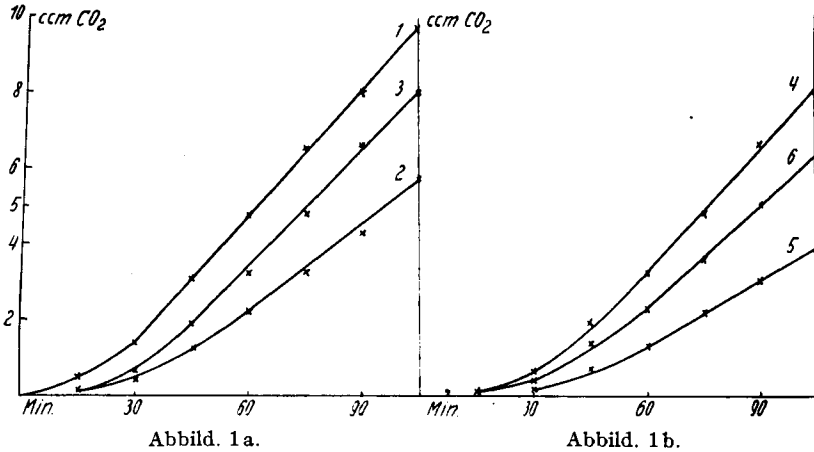
¹⁾ Svensk kem. Tidskr. 47, 290 [1935]; Ztschr. physiol. Chem. 241, 239 [1936].

tragung) fungieren könne²⁾, wobei entweder die Cozymase selbst PO_4 aufnimmt und wieder abgibt, oder während der Wirkung als Codehydrase eine reversible enzymatische Spaltung und Freilegung der Adenylsäure erfolgt.

Wir haben die Nachprüfung dieser beiden Fragen unternommen und berichten im folgenden über die ersten Ergebnisse dieser Untersuchung.

Der Weg war folgender: Durch Einwirkung von salpetriger Säure auf Cozymase wurde die Aminogruppe des im Molekül vorhandenen Adenins entfernt:

Nicotinsäureamid-ribose-phosphors.-phosphors.-ribose-Adenin $\xrightarrow{\text{HNO}_2}$
Nicotinsäureamid-ribose-phosphors.-phosphors.-ribose-Hypoxanthin.



Vergleich von Cozymase und Desamino-cozymase als Aktivatoren bei der alkoholischen Gärung.

Halbmikrogärmethodik nach Myrbäck.

Kurve 1: 19.6 γ Cozymase
 „ 2: 36.4 γ } Desamino-cozymase nach
 „ 3: 54.6 γ } der 1. HNO_2 -Behandlung
 Kurve 4: 19.6 γ Cozymase
 „ 5: 28.6 γ } Desamino-cozymase nach
 „ 6: 42.9 γ } der 2. HNO_2 -Behandlung

Die so erhaltene Desamino-cozymase enthält mit Ausnahme der Aminogruppe des Adenins alle Gruppen des Cozymase-Moleküls, die für die Bindung an das Apo-Enzym in Betracht kommen. Bei der Prüfung der Desamino-cozymase im Gärssystem mit Apozymase zeigte es sich, daß die Aktivität als Co-Enzym nur etwa $\frac{1}{3}$ von der der Cozymase war³⁾. Der Aminogruppe im Cozymase-Molekül kommt also für die Bindung an das Apo-Enzym und somit die Holo-Enzymwirkung beträchtliche Bedeutung zu. (Vergl. Abbild. 1a u. 1b.)

Die spektrophotometrischen Untersuchungen (vergl. S. 1475) zeigen besonders deutlich die quantitativen Beziehungen bei der Bindung Co-Enzym-Apo-Enzym und bei der Wasserstoffübertragung.

²⁾ v. Euler, Adler, Günther, Heiwinkel u. Vestin, Ark. Kem. Mineral. Geol. (B) **12**, Nr. 24 [1936]; Schlenk, v. Euler, Heiwinkel, Gleim u. Nyström, Ztschr. physiol. Chem. **247**, 23 [1937]; Ostern, Baranowski u. Terszakowec, Ztschr. physiol. Chem. **251**, 258 [1938].

³⁾ Schlenk, v. Euler u. Günther, Ark. Kem. Mineral. Geol. (B) **12**, Nr. 53 [1938]; v. Euler u. Hellström, ebenda Nr. 55 [1938].

Da die Cozymase mehrere Apo-Enzyme zu Holo-Enzymen ergänzen kann, soll in den entsprechenden Fällen die Co-Enzym-Wirkung der Desamino-cozymase untersucht werden. Es ist möglich, daß sich Unterschiede für die einzelnen Systeme ergeben werden, indem die Aminogruppe der Cozymase vielleicht nicht bei allen Apodehydrasen eine bindungsvermittelnde Rolle spielt.

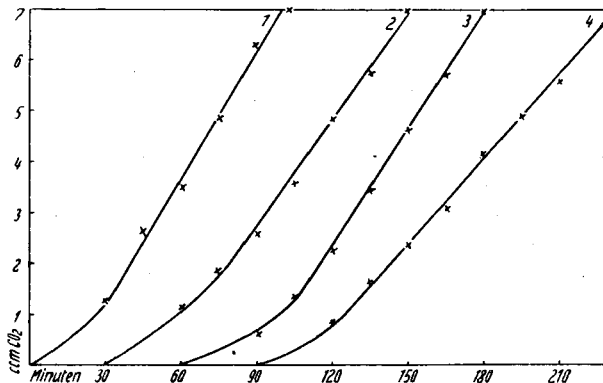
Auch für die Klärung der Frage, ob die Cozymase bei der alkoholischen Gärung zu Co-phosphorylase und einem wasserstoffübertragenden Rest reversibel aufgespalten wird, kommt der Desamino-cozymase Bedeutung zu.

Der Aufspaltung der Cozymase zu Adenylsäure (Adenosin-diphosphorsäure, Adenosin) (Gl. 1) im Apozymase-Test würde an Desamino-cozymase eine Aufspaltung zu einem Derivat der Inosinsäure entsprechen (Gl. 2).

Cozymase \rightleftharpoons Nicotinsäureamid-nucleotid + Adenylsäure (Gl. 1)

Desamino-cozymase \rightleftharpoons Nicotinsäureamid-nucleotid + Inosinsäure (Gl. 2).

Die Derivate der Inosinsäure können aber nicht als phosphatübertragende Co-Enzyme wirken. Der Umstand, daß die Desamino-cozymase die Cozymase bei der alkoholischen Gärung vertreten kann (vergl. Abbild. 2), spricht also gegen die Auffassung, daß die erforderliche Co-phosphorylase durch intermediäre Spaltung der Cozymase (Freilegung der Adenylsäure) entsteht.



Abbild. 2. Gärungsaktivierung durch Desamino-cozymase bei Zusatz von Co-phosphorylase.

Kurve 1:	52 γ	Desamino-cozymase		
„ 2:	52 γ	„	220 γ	Adenosin
„ 3:	52 γ	„	400 γ	Adenosin-diphosphorsäure
„ 4:	52 γ	„	250 γ	Adenylsäure

Im Gärungssystem mit Desamino-cozymase und Apozymase kann man auch noch auf andere Weise prüfen, ob Gleichung 2 zutrifft. Bei Zusatz von Adenosin, Adenylsäure oder Adenosin-diphosphorsäure müßte nämlich durch Vereinigung dieser Verbindungen mit dem nach Gl. 2 entstandenen wasserstoffübertragenden Rest (Nicotinsäureamid-nucleotid bzw. -nucleosid) Cozymase gebildet werden, die durch ihre dreimal größere Gärungsaktivierung leicht zu erkennen wäre. Die in Abbild. 2 wiedergegebenen Experimente zeigen, daß dies nicht der Fall ist.

In diesem Zusammenhang sei darauf hingewiesen, daß das von uns kürzlich mit Hilfe der Bredereck-Phosphatase⁴⁾ dargestellte Nicotinsäureamid-nucleosid⁵⁾ bei der alkohol. Gärung im Apozymase-System nicht als Codehydrase wirken kann und die Fähigkeit hierzu auch dann nicht erlangt, wenn man dem Gäransatz neben dieser Verbindung die oben aufgezählten, als Co-phosphorylase wirkfähigen Verbindungen zusetzt. Dieses Ergebnis spricht ebenfalls gegen die reversible Aufspaltung der Cozymase beim Wirkungsvorgang während der alkoholischen Gärung.

2) Darstellung der Desamino-cozymase.

500 mg Cozymase werden unter Eiskühlung in 30 ccm 2-n. Essigsäure gelöst und ohne zu rühren 4 g NaNO₂, gelöst in 15 ccm H₂O, tropfenweise zugegeben. Nach 6-stdg. Stehenlassen bei Zimmertemperatur setzt man verd. NaOH bis p_H = 8 und 2 ccm 20-proz. Bariumacetat-Lösung zu und fällt unter Kühlung mit 10 Vol. absol. Alkohol. Der Niederschlag wird abzentrifugiert und mit 50 ccm 90-proz. Alkohol gewaschen, in wenig H₂O gelöst und mit H₂SO₄ Ba⁺⁺ entfernt, die Lösung mit 3 ccm gesättigter Bleiacetat-Lösung versetzt und verd. NaOH bis p_H 6—7 zugegeben. Das Volumen soll 50 ccm nicht überschreiten; wenn erforderlich, engt man im Vak. ein. Erneute Alkohol-Fällung (10 Vol.), abzentrifugieren, Niederschlag in Wasser aufnehmen, Lösung mit HNO₃ schwach ansäuern, mit H₂S zersetzen, filtrieren belüften. Die so erhaltene Lösung wird im Vak. auf 30 ccm eingeeengt und mit 300 ccm absol. Alkohol unter Eiskühlung allmählich versetzt, die Fällung zuerst mit 90-proz., dann mit absol. Alkohol sorgfältig gewaschen und getrocknet. Ausb. 200—300 mg. Weißes staubfeines Pulver, das, im Exsiccator getrocknet, unverändert haltbar ist. Die so gewonnene Desamino-cozymase zeigt im Gärungsversuch etwa 37% der Aktivität der Cozymase (vergl. Abbild. 1a). Sie enthält bisweilen noch Spuren von Nitrit, die durch Umfällen aus wäbr. Lösung mit Alkohol beseitigt werden. Zum Beweis dafür, daß das Aktivierungsvermögen der Desamino-cozymase im Gärungssystem nicht auf beigemengte unveränderte Cozymase zurückzuführen ist, wurde ein solches Präparat erneut der Behandlung mit HNO₂ nach obigem Schema unterworfen. Die Aktivität blieb dabei unverändert (vergl. Abbild. 1b).

Präparat I. 4.150, 4.185 mg Sbst.: 5.50, 5.55 mg CO₂, 1.58, 1.58 mg H₂O. — 2.818, 2.609 mg Sbst.: 2.29, 2.13 ccm n/100-HCl. — 1.961, 3.846 mg Sbst.: 12.10, 23.50 mg Ammoniumphosphormolybdat.

Präparat II. 4.370, 4.070 mg Sbst.: 5.80, 5.40 mg CO₂, 1.65, 1.55 mg H₂O. — 3.338, 3.500 mg Sbst.: 2.73, 2.86 ccm n/100-HCl. — 2.569, 2.961 mg Sbst.: 15.45, 17.65 mg Ammoniumphosphormolybdat.

Die N-Bestimmungen wurden nach der Methode von Kjeldahl-Friedrich ausgeführt (C, H u. N-Bestimmungen Dr. Wallenfels, Heidelberg).

C₂₁H₂₈O₁₅N₆P₂+2H₂O. Ber. C 36.00, H 4.28, N 12.00, P 8.86.

Präparat I. Gef. „ 36.14, 36.17, „ 4.26, 4.22, „ 11.39, 11.44, „ 8.97, 8.90.

Präparat II. Gef. „ 36.20, 36.19, „ 4.22, 4.26, „ 11.46, 11.45, „ 8.75, 8.67.

Titration: 0.330 × 10⁻⁴ Mol: 0.34 × 10⁻⁴ Äquiv. NaOH; Desamino-cozymase ist also einbasisch.

⁴⁾ Bredereck, B. 71, 408 [1938].

⁵⁾ Schlenk, Günther u. v. Euler, Svensk. Vet. Akad. Ark. Kemi 12 B, 56 [1938].

Isolierung der beiden Basen aus Desamino-cozymase.

Bei der Desaminierung der Cozymase unter den oben beschriebenen Bedingungen wird nur die NH_2 -Gruppe der Purinbase mit HNO_2 umgesetzt, die Säureamidgruppe der Pyridinbase bleibt erwartungsgemäß unverändert. Der Beweis hierfür wurde durch Isolierung der beiden Basen aus Desamino-cozymase und ihre Identifizierung erbracht.

26.4 mg Desamino-cozymase wurden in 3 ccm n_{10} - H_2SO_4 gelöst und $2\frac{1}{2}$ Stdn. im siedenden Wasserbade hydrolysiert. Nach dem Abkühlen wurden 2 ccm gesättigte Ag_2SO_4 -Lösung zugesetzt und nach kurzem Stehenlassen in der Kälte zentrifugiert. Der Niederschlag wurde mit verd. Ag_2SO_4 -Lösung gewaschen, in H_2O mit H_2S zerlegt, belüftet, abfiltriert, von Spuren H_2SO_4 mittels $\text{Ba}(\text{OH})_2$ befreit, auf sehr geringes Volumen eingedampft und zur heißen Lösung wenig Pikrinsäure-Lösung gegeben. Beim Stehen in der Kälte schieden sich die typischen, wetzsteinartigen Krystalle des Hypoxanthin-pikrates ab. Sie wurden abgesaugt und mit wenigen Tropfen H_2O gewaschen. Ausb. 10.3 mg.

Bei Zimmertemp. im Hochvakuum getrocknet: kein Gew.-Verlust.

3.030 mg Sbst.: 0.674 ccm N_2 (23°, 761 mm).

$\text{C}_8\text{H}_4\text{N}_4\text{O}$, $\text{C}_8\text{H}_3\text{N}_3\text{O}_7$ + H_2O . Ber. N 25.60. Gef. N 25.67.

Mutterlauge und Waschwasser der Ag-Fällung wurden mit H_2S behandelt, filtriert, von H_2SO_4 mittels Baryts befreit, auf geringes Volumen eingedampft, mit Baryt schwach alkalisch gemacht und mit 10 Vol. absol. Alkohol versetzt. Der Niederschlag (pentosephosphorsaures Barium) wurde abzentrifugiert, die alkohol. Lösung mit H_2SO_4 von Spuren an Ba^{++} genau befreit, dann zur Trockne verdampft und der Rückstand mit 1 ccm H_2O aufgenommen, filtriert und zur Lösung $\frac{1}{2}$ ccm wäbr. gesättigte Pikrinsäurelösung gegeben. Nach kurzem Stehenlassen in der Kälte krystallisierte das Nicotinsäurepikrat in langen haarfeinen Nadeln aus. Schmp. 192°. Ausb. 8 mg.

Bei 60° im Hochvakuum getr.: 0.5% Gew.-Verlust.

3.003 mg Sbst.: 0.520 ccm N_2 (23°, 756 mm).

$\text{C}_8\text{H}_6\text{ON}_2$, $\text{C}_8\text{H}_5\text{O}_7\text{N}_3$. Ber. N 19.95. Gef. N 19.86.

(N-Bestimmungen von Dr. Schoeller, Berlin.)

3) Spektrophotometrische Untersuchungen an der Desamino-cozymase.

Die Veränderung im Cozymase-Molekül bei der Desaminierung läßt, wie schon oben erwähnt war, die oxydoreduktiven Wirkungen in der Hauptsache intakt, was auch vorauszusehen war, da die Aminogruppe im Purinkern abgespalten wird, während die Stelle im Molekül, in welcher sich die Oxydation abspielt, keine konstitutionelle Änderung erfährt. Es war jedoch zu erwarten, daß die Desaminierung eine kleine Veränderung in den elektrochemischen Eigenschaften des ganzen Moleküls hervorruft, was sich im Oxydoreduktionsgleichgewicht bzw. dessen p_{H} -Abhängigkeit im Vergleich zu der Cozymase zeigen könnte. Es war auch zu erwarten, daß die Hydrierungsgeschwindigkeit der Desamino-cozymase im Verhältnis zu der der Cozymase bei der Alkohol-Dehydrierung anders ausfallen würde.

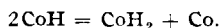
In der Tat zeigen die Gleichgewichtsmessungen, daß die Gleichgewichtskonstanten der Desamino-cozymase und der Cozymase bezüglich der Alkohol-

Dehydrierung bei $p_H = 7.5$ nahe übereinstimmende Werte besitzen, während im sauren Gebiet der p_H -Kurve der Konstanten ein starker Anstieg auf das 2—3-fache beobachtet wurde.

Die Unterschiede kommen auch sehr stark in der Reaktionsgeschwindigkeit der Alkohol-Dehydrierung zum Ausdruck. Werden Cozymase und Desamino-cozymase unter denselben Bedingungen im System Co-Enzym-Alkohol-Apodehydrase reduziert, so wird bei derselben Enzymkonzentration im Anfang der Hydrierung die Cozymase etwa 10-mal schneller reduziert als die Desamino-cozymase. Diese Tatsache steht in bester Übereinstimmung mit dem obigen Befund, daß die Gärwirkung der Desamino-cozymase nur etwa ein Drittel von der der Cozymase ist.

Monohydro-desamino-cozymase: Zur weiteren Charakterisierung der Desamino-cozymase wurde diese in bezug auf die Bildung der monohydrierten Form mit der Cozymase verglichen. Wird Desamino-cozymase in 0.1-n. NaOH gelöst und mit Na-Hydrosulfit reduziert, so entsteht die der Monohydro-cozymase⁶⁾ oder gelben Stufe⁷⁾ entsprechende Verbindung. Die hydrosulfithaltige Lösung, die hellgelb gefärbt ist, behält ihre Farbe beim Aufbewahren im Kühlschrank über Nacht. Bei etwa 12-stdg. Stehen bei Zimmertemperatur wird die Lösung entfärbt, wobei die Bildung der Dihydroform nachgewiesen werden kann. Qualitativ liegt kein Unterschied zwischen der gelben Stufe der Cozymase und der Desamino-cozymase vor. Die Monohydro-Form der letzteren besitzt eine Bande im nahen Ultraviolett mit dem Maximum bei 360μ . Die molare Extinktion wurde ein wenig höher gefunden als für die entsprechende Verbindung der Cozymase. Die monohydrierte Form der Desamino-cozymase scheint stabiler gegen Luftoxydation zu sein. Die Bildung der Monohydro-Form geht langsamer vor sich als bei der Cozymase. Während die letztere in weniger als 10 Sek. bei einer Hydrosulfitkonzentration gleich 1 mg/ccm hydriert wird, kann die Monohydrierung der Desamino-cozymase bei der gleichen Konzentration von Hydrosulfit bequem verfolgt werden.

In einem Versuch wurden 0.5 ccm Desamino-cozymase mit Wasser auf 5 ccm verdünnt und 5 mg Hydrosulfit hinzugegeben, worauf die Extinktion bei 404μ bei verschiedenen Zeiten gemessen wurde. Der Verlauf der Extinktionsänderung geht aus der Abbild. 3 hervor. Man sieht, daß sich die Reaktion erst nach etwa 10 Min. vollzogen hat. Der Überschuß von Hydrosulfit wurde durch Belüften der Lösung oxydiert und das Absorptionsspektrum durchgemessen (Kurve a, Abbild. 4). Nun wurde CO_2 eingeleitet, wobei die gelbe Stufe in einigen Minuten verschwand, was aus dem raschen Extinktionsabfall im Absorptionsmaximum der gelben Stufe bei 365μ hervorging. Daß Spektrum wurde wieder durchgemessen (Kurve b), wobei es sich zeigte, daß die Dihydro-Form sich zu etwa 31% gebildet hatte, während die Dismutation der Monohydro-Form 50% bedingt, gemäß der Gleichung

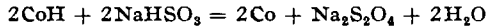


Es ergibt sich also, daß die Monohydro-Form der Desamino-cozymase in der oxydierten und der voll reduzierten Form leichter disproportioniert wird als

⁶⁾ Hellström, Ztschr. physiol. Chem. **246**, 155 [1937].

⁷⁾ Adler, Hellström u. v. Euler, Ztschr. physiol. Chem. **242**, 225 [1936].

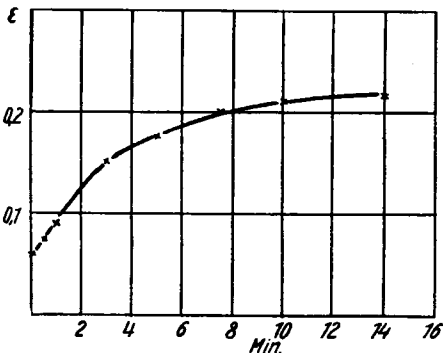
die Monohydro-cozymase, die sich beim Einleiten von CO₂ quantitativ in Cozymase und Hydrosulfit gemäß der Gleichung



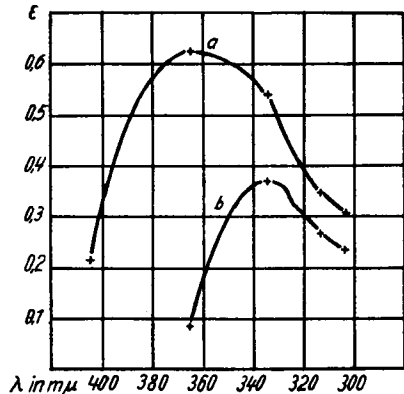
umsetzt⁶⁾.

4) Die Gleichgewichtskonstanten der Cozymase und der Desamino-cozymase.

Der Vergleich der Gleichgewichtskonstanten der Cozymase mit dem Desaminierungs-Produkt erfordert genaue Messungen der Konstanten bei verschiedenen p_H. Bei dieser Gelegenheit schien es uns wichtig, eine Neubestimmung der Gleichgewichtskonstante des Systems Cozymase-Alkohol vorzunehmen. Mit einem reinen Cozymase-Präparat (Nr. 1811) wurden Doppelbestimmungen⁶⁾ der Konstanten bei verschiedenen p_H, unter Einhalten der günstigsten Bedingungen (Minimum der Fehler), die erfüllt werden durch eine Bemessung der Konzentrationen der Cozymase und des Alkohols in der Weise, daß angenähert 58% der Cozymase umgesetzt werden, ausgeführt. Wegen der Methodik im übrigen verweisen wir auf die früheren Arbeiten. Die Zahlenwerte der Konstante findet man in Tafel 1 wieder. Die früheren Werte⁹⁾



Abbild. 3. Zeitreaktion der Bildung der Monohydro-desamino-cozymase.



Abbild. 4. Absorptionsspektren der beiden Hydrierungsstufen der Desamino-cozymase. Kurve a: Monohydrostufe, Kurve b: Dihydrostufe.

liegen alle höher, besonders die im alkalischen Gebiet, was wohl von einer inaktiven Beimengung des damaligen Präparates herrühren dürfte. Die Gesetzmäßigkeit in der p_H-Abhängigkeit des Gleichgewichts kommt besser zum Ausdruck, wenn man die Variation des Redoxpotentials für das System mit dem p_H berechnet. Für das System in Gleichgewicht ist E_{Alk/Ald} = E_{Co/CoH₂}, woraus folgt

$$E_0^1 - E_0^2 = \frac{RT}{2F} \log \frac{(\text{D-Co})\text{Alk}}{(\text{D-CoH}_2)\text{Ald}} = 0.03 \log K.$$

Beim Einsetzen des numerischen Wertes für RT/2F erhält man

$$E_0^1 - E_0^2 = 0.03 \log K.$$

⁶⁾ Für die Doppelbestimmung sprechen wir auch hier Hrn. Fil. Kand. Gunnar Günther unseren Dank aus.

⁹⁾ v. Euler, Adler u. Hellström, Ztschr. physiol. Chem. **241**, 239 [1936].

Das Normalpotential E_0^1 des Systems Alkohol/Aldehyd ist durch

$$E_0^1 = 0.195 - 0.06 \cdot p_H$$

gegeben¹⁰⁾. Setzt man diesen Wert in 3a ein, so erhält man das Normalpotential E_0^2 für das System D-Co/D-CoH₂:

$$E_0^2 = 0.195 - 0.06 \cdot p_H - 0.03 \log K.$$

In der Abbild. 5, Kurve 1, ist der Wert von E_0^2 gegen p_H abgetragen. Die Punkte liegen sehr genau auf einer Geraden, die die Neigung 0.034 Volt/ p_H gegen die Abszisse hat, ein Wert, der dem theoretischen 0.03 nahekommt. Die theoretische Folgerung davon ist, daß im untersuchten p_H -Gebiet keine Dissoziationsstufe vorhanden ist.

Die Gleichgewichtskonstante für das System Desamino-cozymase-Apodehydrase-Alkohol liegt im Vergleich mit der des Cozymase-Apodehydrase-Alkohol-Systems etwas höher. Der Unterschied macht sich besonders im sauren p_H -Gebiet bemerkbar. Bei p_H 6.85 ist die

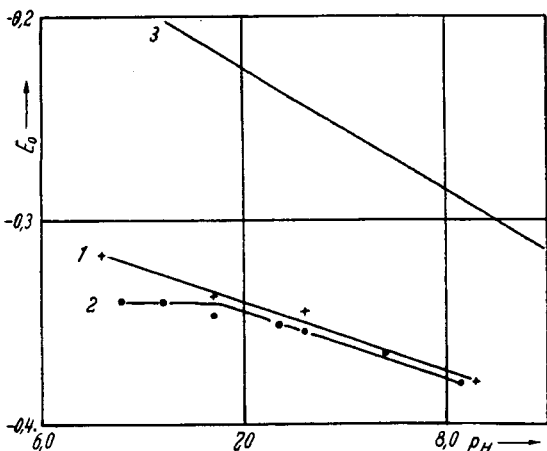


Abbildung 5. Normalpotentiale der Cozymase-Alkoholapodehydrase, Kurve 1, und der Desamino-cozymase-Alkoholapodehydrase, Kurve 2. Kurve 3: Normalpotential des Systems Alkohol/Aldehyd.

Konstante doppelt so groß, bei p_H 6.3 etwa das dreifache des für Cozymase gefundenen Wertes (s. Tafel 1). Wird auch hier aus der Gleichgewichtskonstante das Normalpotential für Desamino-cozymase-Alkoholapodehydrase berechnet (Abbildung. 5, Kurve 2), so findet man eine gute Parallelität mit der Kurve der Cozymase zwischen p_H 7—8. Von p_H 6.75 ab ändert die Kurve jedoch ihre Richtung und geht zwischen diesem Wert und p_H 6.3 mit der Abszisse parallel. Die Richtungsänderung läßt sich durch eine elektrolytische Dissoziationsstufe bei p_H 6.75 erklären.

Bei der Besprechung der obigen Potentialwerte für die Cozymase-Enzym-Verbindung möchten wir ferner eine bemerkenswerte Tatsache erwähnen. Die Redoxpotentiale der Systeme Alkohol/Aldehyd (Kurve 1, Abbild. 6) und Milchsäure/Brenztraubensäure (Kurve 2 Abbild. 6) sind

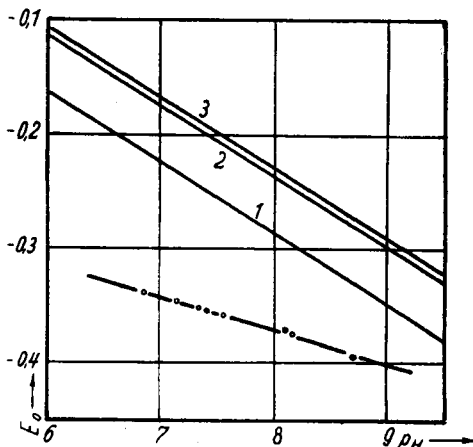


Abbildung 6. Normalpotentiale der Systeme Alkohol/Aldehyd (1), Milchsäure/Brenztraubensäure (2) und Äpfelsäure/Oxal-essigsäure. Cozymase - Alkoholdehydrase, Cozymase-Lactidehydrase.

¹⁰⁾ Briefliche Mitteil. v. Hrn. W. Franke. Vergl. auch Wurmser u. Filitti-Wurmser, Journ. Chim. physique **33**, 577 [1936] (C. 1937 I, 4245).

aus der Literatur bekannt. Für das erste System ist das Gleichgewicht hier oben mitgeteilt, für das zweite liegen Messungen in früheren Arbeiten¹¹⁾ dieses Institutes vor. Wird für das letzte System das Redoxpotential der Cozymase/Lacticodehydrase-Verbindung, wie oben geschehen ist, berechnet, so findet man einen Wert, der dem früheren sehr nahe kommt (s. Abbild. 6 und Tafel 2). Daraus folgt, daß in diesem Beispiel die gleichen Redoxpotentiale für beide Systeme gefunden wurden.

In noch einem Falle kann ein solcher Vergleich angestellt werden, und zwar für das System Äpfelsäure/Oxalessigsäure (Kurve 3, Abbild. 6). Das Redoxpotential dieses Systems ist von Laki¹²⁾ bestimmt, und für die Gleichgewichte liegen Messungen von Günther¹³⁾ vor (Tafel 2). Hier findet man einen Unterschied gegen die oben genannten Werte des Redoxpotentials der Cozymase-Enzym-Verbindung um etwa 0.02 Volt.

Der Vergleich dieser drei Systeme ist von Interesse, weil durch derartige Überlegungen die Entscheidung getroffen werden kann, ob das Apo-Enzym das Redoxpotential der Cozymase mitbestimmt bzw. in jedem besonderen Falle das Potential auf das Substrat eingestellt ist. Es wäre natürlich notwendig, dafür ein größeres Material zur Verfügung zu haben, bei dem sowohl die Redoxpotentiale der Substrate/Reduktionsprodukte als auch die Gleichgewichte Cozymase-Substrat/Dihydrocozymase-Dehydrierungsprodukt genau bekannt sind.

Tafel 1.

Cozymase				Desamino-cozymase			
pH	K. 10 ⁻³	E ₀ ¹ - E ₀ ²	-E ₀ ²	pH	K. 10 ⁻³	E ₀ ¹ - E ₀ ²	-E ₀ ²
8.17	0.445	0.080	0.375	8.06	0.90	0.089	0.381
7.77	1.245	0.093	0.366	7.69	1.77	0.097	0.365
7.61	1.960	0.098	0.361	7.31	4.44	0.109	0.354
7.34	3.350	0.105	0.353	7.18	6.66	0.114	0.351
7.15	5.160	0.111	0.346	6.85	19.8	0.129	0.346
6.85	11.4	0.122	0.339	6.60	33.6	0.136	0.339
6.30	38.0	0.137	0.314	6.39	110	0.151	0.340

Tafel 2.

Cozymase-				Cozymase-			
Lacticodehydrase				Malicodehydrase			
pH	K. 10 ⁻³	E ₀ ¹ - E ₀ ²	-E ₀ ²	pH	K. 10 ⁻³	E ₀ ¹ - E ₀ ²	-E ₀ ²
8.7	6.5	0.115	0.395	8.49	1.6	0.096	0.358
8.1	20.0	0.129	0.374	8.33	4.9	0.111	0.362
7.4	141	0.155	0.355	7.71	20.0	0.129	0.344
				7.46	43.0	0.138	0.336

¹¹⁾ v. Euler, Adler, Günther u. Hellström, *Ztschr. physiol. Chem.* **245**, 232 [1937].

¹²⁾ *Ztschr. physiol. Chem.* **249**, 63 [1937].

¹³⁾ v. Euler, Adler u. Günther, *Ztschr. physiol. Chem.* **247**, 65 [1937].