

### 130. Inhibitoren der Saccharase

von Emil Baur.

(22. VIII. 39.)

Die Hemmung von Fermentationen wird mit Vorliebe durch Komplexbildung zwischen Ferment und Inhibitor erklärt. Wenn sich herausstellt, dass es vorzüglich die gleichen Stoffe sind, durch welche fermentfreie und fermenthaltige Systeme gehemmt werden, und dass verschiedene Fermente von denselben Inhibitoren betroffen werden, wenn eine Theorie der Inhibition bis zu einem gewissen Grade vorauszusagen vermag, bei welchen Stoffen Hemmungskraft zu erwarten ist, so erhält die Komplexbildungstheorie starke Konkurrenz.

Nun ist, ausgehend von Verhältnissen, welche die photochemische Desensibilisierung beherrschen, eine Theorie der Antikatalyse entwickelt worden, die dem Inhibitor die Fähigkeit zuschreibt, dass er die aktiven Molekeln eines reagierenden chemischen Systems nicht durch Verbindung, sondern durch einsinnige Zirkularreaktion beseitigt<sup>1)</sup>. Diese Theorie unterstellt die Inhibitionen gewissen qualitativen und quantitativen Bedingungen, nämlich den folgenden: Da die Zirkularreaktion ein Redoxvorgang sein soll, so wird qualitativ verlangt, dass der Inhibitor ein Redoxmittel sei. Dieser Forderung kann etwas zu leicht entsprochen werden, denn alle organischen Stoffe sind grundsätzlich reduzierbar und oxydierbar, und alle Ionen können grundsätzlich auf- oder abgeladen werden. Einschränkend tritt jedoch die Bedingung hinzu, dass die Umladung leicht vor sich gehe; d. h. das zugehörige Redoxpotential soll sich verhältnismässig leicht einstellen und keinen Extremwert besitzen. Statistisch wird verlangt, dass chemisch sehr verschiedene Substrate und chemisch sehr verschiedene Inhibitoren ausgewechselt werden können; d. h. die Inhibitoren sollen weitgehend unspezifisch wirken. Quantitativ folgen aus der Nebenschaltung der inhibitorischen Zirkularreaktionen Konzentrationsabhängigkeiten, die sich im allgemeinen von Massenwirkungseinflüssen unterscheiden, manchmal allerdings auch mit ihnen zusammenfallen.

Wir haben kürzlich zeigen können<sup>2)</sup>, dass bei der Hemmung der Katalase, Tyrosinase und Peroxydase die soeben gekennzeichneten Forderungen der Theorie der Antikatalyse nicht übel erfüllt sind, sowohl qualitativ, wie quantitativ. Der Satz von der generellen

<sup>1)</sup> Baur, E., Über die Theorie der Antikatalyse. Z. physikal. Ch. [B] **41**, 179 (1938).

<sup>2)</sup> Baur, E., Helv. **22**, 810, 818 (1939)

Vertretbarkeit der Inhibitoren erleidet zwar durch individuelle Besonderheiten bei diesen Fermentationen schon mehr Einschränkungen, als bei fermentfreien Systemen, bleibt aber doch noch bestehen.

Es war gewiss wünschenswert, gleichlaufend die Wirksamkeit derselben oder ähnlicher Inhibitoren auf Saccharase durchzuprüfen, die auf Katalase, Tyrosinase und Peroxydase und zuvor auf nicht-enzymatische Systeme<sup>1)</sup> zur Anwendung gekommen waren. Hierüber wird nachfolgend berichtet.

Material liegt zum Teil schon vor in den einschlägigen Untersuchungen von *H. v. Euler* und *Svanberg*<sup>2)</sup>. Danach hemmen Silber-, Quecksilber-, Goldsalze stark; Kupfersalze schwach. Von organischen Stoffen hemmen Anilin und p-Phenyldiamin sehr stark; Phenylhydrazin und Formaldehyd ebenfalls kräftig. Um Vergleich mit unserem rohen Hefe-autolysat zu ermöglichen, haben wir einige dieser Stoffe in die eigene Untersuchung miteinbezogen. Eisen- und Mangansalz, die auf die Säurehydrolyse des Rohrzuckers merklich hemmend wirken<sup>3)</sup>, mussten wir zurückstellen, da hiezu hochgereinigte Saccharase-Präparate heranzuziehen wären. Kaliumcyanid hat, wie man weiss, stark beschleunigenden Einfluss, was sehr auffallen muss. Vielleicht beseitigt es durch Komplexbildung Spuren von Schwermetallionen, die gerade in geringster Konzentration inhibieren möchten.

#### Verfahren.

Frische Bierhefe mit einem Wassergehalt von etwa 75% wird in das gleiche Gewicht Wasser eingetragen und mit etwa 5% Toluol vermischt. Der dünne Brei wird mit träge bewegtem Rührer unter zeitweisem Ersatz des verdampfenden Toluols 14 Tage lang in Bewegung gehalten. Hierauf wird das Autolysat durch Faltenfilter filtriert und mit Toluol überschichtet. Die Filtration wird zweimal wiederholt. Erhalten etwa zwei Liter ziemlich klares Filtrat von dunkelbrauner Farbe, unter Toluol im Eisschrank aufbewahrt. Das Autolysat hält sich monatelang. Während der ersten drei Wochen nimmt sein Fermentgehalt zu, dann bleibt er mehrere Wochen merklich gleich. Sämtliche nachfolgenden Versuche sind mit demselben Autolysat angestellt.

Da die Inhibitoren je nach ihrer sauren oder basischen Natur die Acidität ändern können, diese aber die Saccharase beeinflusst, so war Pufferung angezeigt. Wir pufferten mit primärem Kaliumphosphat auf  $p_H = 4,5$ , wo das Aciditätsoptimum liegt. Das Maxi-

<sup>1)</sup> *Baur, E.* und *Preis, H.*, Oxydationshemmung von Cystein und Ascorbinsäure. Z. physikal. Ch. [B] **32**, 65 (1936). — *Baur, E.* und *Obrecht, M.*, ebenda, **41**, 167 (1938).

<sup>2)</sup> Fermentforschung **3**, 330; **4**, 29 (1920). — *Euler, H.*, Chemie der Enzyme, 2. Aufl., München, Bergmann, II, **1**, 138 (1920).

<sup>3)</sup> *Baur, E.* und *Preis, H.*, Helv. **21**, 437 (1938).

zum ist flach, so dass auch eine mässige Abweichung noch nicht schädlich sein kann.

Die Ansätze haben die Grundzusammensetzung:

50 cm<sup>3</sup> 10% Rohrucker + 5 cm<sup>3</sup> Ferment + 5 cm<sup>3</sup> Wasser + 0,5 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

Inhibitoren werden in der 10-proz. Rohruckerlösung gelöst und durch Verdünnen mit 10-proz. Rohruckerlösung auf die gewünschte Konzentration gebracht.

Polarimeter von *Schmidt* und *Hänsch*. Ablesegenauigkeit  $\pm 0,01^\circ$ . Belichtung mit Natriumdampflampe. Raumtemperatur. Anfangsdrehung  $+11,13^\circ$ ; Enddrehung  $-3,69^\circ$ . Halbwertdrehung  $+3,75^\circ$ . Beobachtungszeit 20—40 Minuten. Für jeden Inhibitor wird eine Schaar Kurven aufgenommen, wie Fig. 1 für Anilinzusatz zeigt.

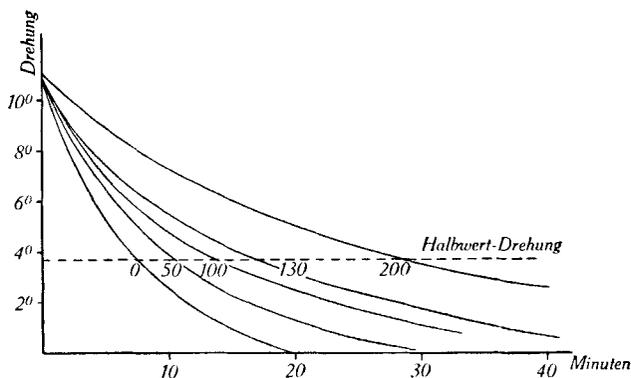


Fig. 1.

### Berechnung.

Die Laufkurven sind erster Ordnung; z. B. entspricht auf Fig. 1 die Kurve mit 130 mg Anilin einer solchen, die ohne Inhibitor mit  $\frac{1}{5}$  der Fermentmenge erhalten wird. Die Wirksamkeit der Inhibitoren kann tatsächlich durch die Konstante erster Ordnung charakterisiert werden. Zum Vergleich eignen sich die Halbwertzeiten, die unmittelbar aus den Kurven abzulesen sind. Diese Darstellung wollen wir benutzen. Für die Halbwertzeiten ergeben sich die folgenden Beziehungen.

Die Theorie unterscheidet zwei Fälle<sup>1)</sup>. Die Verzögerung ist entweder der Inhibitor-Konzentration  $D$  (= Desensibilisator) direkt proportional oder verzögert proportional, nämlich noch von der übrigen Reaktionsgeschwindigkeit abhängig. Im ersten Fall sprechen wir von Blockwirkung, im zweiten von Bremswirkung.

<sup>1)</sup> *Baur, E.*, Formeln usw., *Helv.* **12**, 79 (1929). — *Baur, E.* und *Preis, H.* a. a. O. — *Ouellet, C.*, *Helv.* **14**, 936 (1931).

1. Für die Blockwirkung gilt:

$v_0 - v = kD$  oder  $\frac{v}{v_0} = 1 - \alpha D$   
 ( $v_0$  = Geschwindigkeit im Nullversuch;  $v$  = Geschwindigkeit im inhibierten Versuch.)

Man ersetzt  $v_0 = k \cdot C$   
 und erhält  $v = k(1 - \alpha D) \cdot C$

$$\text{integriert } k(1 - \alpha D) = \frac{1}{t} \ln \frac{A}{C}$$

für die Halbwertzeit  $t_D$  wird  $\frac{\ln 2}{t_D} = k(1 - \alpha D)$

Ist  $D = 0$ , wird die Halbwertzeit  $t_D = t_0$ ,

$$\text{somit } \frac{t_0}{t_D} = 1 - \alpha D \quad \text{oder} \quad \alpha = \frac{t_D - t_0}{t_D} \cdot \frac{1}{D}$$

D. h. die Inhibitorwirkung ist proportional der relativen Verlängerung der Halbwertzeit. Es muss bemerkt werden, dass man dasselbe Zeitgesetz auch erhält, wenn nach dem Vorgang von *Euler* und *Svanberg*<sup>1)</sup> Komplexbildung nach Massgabe des Massenwirkungsgesetzes angenommen wird.

2. Für die Bremswirkung gilt:

$$v_0 - v = v\beta D \quad \text{oder} \quad \frac{v}{v_0} = \frac{1}{1 + \beta D}$$

Man ersetzt  $v_0 = k \cdot C$

und erhält  $v = \frac{k}{1 + \beta D} \cdot C$

$$\text{integriert } \frac{k}{1 + \beta D} = \frac{1}{t} \ln \frac{A}{C}$$

für die Halbwertzeit  $t_D$  wird  $\frac{\ln 2}{t_D} = \frac{k}{1 + \beta D}$  oder  $t_D = a + bD$

$$\text{Ist } D = 0, \text{ so wird } t_D = t_0 = a \quad \text{und} \quad b = \frac{t_D - t_0}{D}$$

D. h. die Inhibitorwirkung ist proportional der absoluten Verlängerung der Halbwertzeit. Dies ist der häufigere Fall.

Wir werden nun an unserem Versuchsmaterial die Konstanten  $\alpha$  und  $b$  auswerten und einander gegenüberstellen.

Messungen.

Wir haben vorwiegend solche Zusätze gewählt, von denen nach unseren früheren Befunden ausgeprägte inhibitorische Wirksamkeit erwartet werden konnte. Metallkationen übergehend, sind es Phenole, Thiokörper, Schlafmittel und Farbstoffe. Hinzu kommen Anilin, Phenylhydrazin und Formaldehyd nach *Euler-Svanberg*. Die folgende Tabelle 1 enthält Halbwertzeiten und daraus gerechnete Konstanten  $b$  und  $\alpha$ ; in der Tabelle 2 folgen für einige weitere Inhibitoren herausgegriffene Halbwertzeiten zum Vergleich ihrer Wirksamkeit.

<sup>1)</sup> a. a. O.

Tabelle 1.

Inhibitor	Halbwertszeit Minuten	Konzentra- tion Inhibitor ( $D$ ) g/L	$b = \frac{t_D - t_0}{(D)}$	$\alpha = \frac{t_D - t_0}{t_D} \cdot \frac{1}{(D)}$
Anilin	7,5	0	—	—
	10,5	0,05	60	5,7
	13,8	0,10	63	4,6
	17,0	0,13	73	4,3
	29,0	0,20	107	3,7
Phenylhydrazin	7,5	0	—	—
	8,5	0,25	4	0,46
	10,0	0,50	5	0,50
	12,0	0,75	6	0,50
	16,0	1,00	8,5	0,54
Formaldehyd	7,5	0	—	—
	8,0	0,1	5	0,62
	9,0	0,2	7,5	0,83
	10,0	0,3	8,3	0,83
	11,5	0,4	10	0,87
	13,0	0,5	11	0,85
Xylyl-thiuronium- chlorid	7,5	0	—	—
	8,5	0,75	1,3	0,16
	10,0	1,5	1,7	0,17
	11,5	2,16	1,9	0,16
Ascorbinsäure	9,5	0	—	—
	10,5(?)	0,2	5	0,47
	12	1,0	2,5	0,21
	15	2,0	2,7	0,18
Thioglykolsäure	9,5	0	—	—
	10,1	0,2	3,0	0,30
	11,5	0,5	4,0	0,35
	12,5	1,0	3,0	0,24
Metol	9,0	0	—	—
	9,5	0,2	2,5	0,24
	10,8	0,5	3,6	0,33
	12	1,0	3,0	0,25
Thioharnstoff	10	0	—	—
	10,3	0,2	1,5	0,14
	12,6	2,0	1,3	0,10
Trypaflavin	10,8	0	—	—
	11,8	0,25	4,0	0,34
	13,6	0,50	5,6	0,41
	15	1,0	4,2	0,28
	18	2,0	3,9	0,24

Tabelle 2.

Inhibitor	$\frac{t_D - t_0}{t_D}$ in Prozenten	Konzentration Inhibitor (D) 10 <sup>-3</sup> Mol/L
AgNO <sub>3</sub> . . . . .	50	10
Salizylsäure . . . . .	35	10
Pyridin . . . . .	25	10
Cystein . . . . .	15	10
Acridin-Orange R	15	1

Mit Zusätzen in der Grössenordnung von 1 g/Liter wurde keine deutliche Hemmung (d. h. kleiner als 10 %) erhalten mit:

Phenole: Hydrochinon, p-Nitrophenol, Phenol, Adrenalin.

Chinonfarbstoffe: Acridingelb, Anthrachinon-disulfosäure, Phosphin.

Schlafmittel: Barbitursäure, Veronal.

Allylkörper: Allyl-thioharnstoff, Allylsenföf.

Naphtylamine: Naphtionsäure (Naphtylamin-4-sulfosäure), Amido-G-salz (Naphtylamin-6,8-disulfosäure).

Hochwirksam scheint Methylenblau. Mit 0,2 mg/Liter bemerkt man schon eine gewisse Hemmung. Die Unsichtigkeit im Natriumlicht verbietet Vergrösserung des Zusatzes.

Wir gewinnen die folgenden

### Ergebnisse.

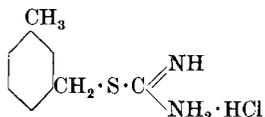
1. Die Hemmungseffekte sind durchgehend viel schwächer als bei den Oxydationsfermenten. Wahrscheinlich würden sie grösser ausfallen mit hochgereinigter Saccharase.

2. Die vier ersten Hemmungsstoffe der Tabelle 1 gehen eindeutig nach der Blockformel; bei den anderen reicht das Material nicht aus zu schlüssiger Entscheidung zwischen Bremsung und Blockierung. Sonst wird bei Inhibitionen die Bremsformel überwiegend bestätigt gefunden<sup>1)</sup>. Die Blockierung wäre auch mit Komplexbildung zwischen Ferment und Inhibitor verträglich. Die fraglichen Komplexe sind aber nicht erwiesen, sondern ad hoc angenommen.

3. Am wichtigsten ist der auswählende Charakter der Hemmungen. Unter den Phenolen wirkt nur Metol (= Dimethyl-aminophenol). Unter den Chinonfarbstoffen wirkt nur Trypaflavin (= 3,6-Diamino-acridin), schwächer Acridinorange-R (= 3,6-Tetramethyl-diamino-acridin), Acridingelb (= Dimethyl-diamino-acridin) schon nicht mehr. Geht man vom Anilin zu Derivaten des Naphtylamins über, so verschwindet die eigentümliche Vorzugstellung, die man der NH<sub>2</sub>-

<sup>1)</sup> Baur-Preis und Baur-Obrecht, a. a. O.

Gruppe sonst zuzuschreiben hätte; Thioharnstoff wirkt, Allyl-thioharnstoff wirkt nicht, aber ein mehr komplizierter Abkömmling, den wir gerade in Händen hatten, das Xylyl-thiuronium-chlorid



wirkt wieder. Die Ureide, die auf Oxydationshemmungen mit Auswahl wirken, scheinen Hydrolysen gegenüber unvermögend.

4. Zusammenfassend ist zu sagen, dass die an Saccharase zutage tretenden Hemmungseffekte mit der kinetischen Theorie der Antikatalyse (nicht Verbindung, sondern Reaktionszirkel) zwar verträglich sind, aber keine in die Augen fallenden Beweisstücke für dieselben liefern.

An den Messungen waren die HH. *H. v. Sprecher*, *Alb. Zarn* und *Fr. Tyber* beteiligt.

Zürich, Physikal.-chem. Laboratorium der Eidg. Techn. Hochschule. August 1939.

### 131. Über die Bildung von Formaldehyd bei der Acetat-Elektrolyse

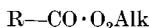
von **Emil Baur**.

(22. VIII. 39.)

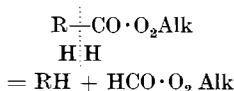
Es ist gezeigt worden, dass photodynamische Farbstoffe, welche mit einer veresterten Carboxylgruppe ausgerüstet sind (*Eosine*, *Rhodamine*, *Chlorophyll*) im Licht Formaldehyd liefern<sup>1)</sup>. Es wird angenommen, dass die Carboxylgruppe die Quelle des Formaldehyds sei, und es wird behauptet, dass die Photolyse in einem Redoxvorgang bestehe: Hinaufoxydation der Carbonsäure zur Stufe der Perkohlen-säure und Herabreduktion der letzteren zur Stufe der Perameisen-säure. Symbolisieren wir den photodynamischen Farbstoff durch die Schreibung



so heisst das primäre anodische Produkt



Aus diesem soll kathodisch werden



<sup>1)</sup> *Baur, E. Helv.* **18**, 1157 (1935). — *Baur, E. und Fricker, H.*, ebenda **20**, 391 (1937). — *Baur, E. und Gloor, K.*, ebenda **20**, 970 (1937). — *Baur, E., Gloor, K. und Kuenzler, H.*, ebenda, **21**, 1038 (1938).