

Jusqu'ici, la réponse à ces questions est donnée par l'expérience; la thermodynamique ne nous renseigne pas sur cette question par suite des phénomènes irréversibles qui se produisent; nous ne pouvons recueillir d'elle que des notions de possibilité de réaction, non des certitudes. Ainsi, elle nous affirmera d'après la considération des énergies libres que l'oxyde de cuivre peut dans tous les cas être amené à l'état de cuivre métallique mais il n'est pas du tout contraire aux principes dont elle découle que la réaction n'ait pas lieu par suite de l'absence d'une catalyse nécessaire. Dans le cas présent, nous connaissons un catalyseur: c'est l'acidité du milieu.

C'est d'ailleurs dans cet esprit que l'on peut considérer la nomenclature des innombrables recettes de bains de galvanoplastie, dans lesquels par suite de constatations empiriques, on ajoute les substances les plus hétéroclites; l'expérience nous enseigne ainsi les meilleures conditions à réaliser pour que l'hydrogène atomique donne du métal réduit ayant la structure physique la plus appropriée à l'emploi qu'on en veut faire.

Il résulte de toutes ces considérations que la théorie que nous proposons englobe plus de faits expérimentaux que l'ancienne et qu'elle donne une part très importante au dissolvant. Comme l'ancienne théorie elle est avant tout fondée sur l'hypothèse des ions et de ce fait inspirée par le génie clairvoyant de *Scante Arrhénius*.

Paris, Ecole Nationale supérieure des Mines.

49. Die Steuerung eines enzymatischen Abbaues durch einen anderen

von **Ch. Wunderly**.

(15. II. 40.)

Obwohl man annehmen muss, dass die Koppelung von Enzymreaktionen in der Zelle die Regel darstellt und also das Studium solcher Vorgänge von Interesse wäre, sind entsprechende Modellreaktionen nur selten versucht worden. Es sind dafür die analytischen Schwierigkeiten verantwortlich, welche sogleich dann auftreten, wenn mehr als eine Enzymreaktion für sich getrennt gemessen werden soll. So hat *Northrop*¹⁾ die tryptische Spaltung von Gelatine- und Caseinsubstraten erst getrennt gemessen und darauf dieselbe Enzymmenge auf eine Lösung wirken lassen, die beide Substrate gemeinsam enthielt. Hier konnte er durch den Zuwachs an Amino-N wohl die Summe des Abbaues feststellen, jedoch nicht angeben, wieviel von jedem einzelnen Substrat abgebaut worden war. Damit

¹⁾ *J. H. Northrop, J. Gen. Physiol.* **4**, 487 (1922).

blieb die Frage nach der verschiedenen Enzymaffinität unbeantwortet.

Ähnlich schwierig gestaltet sich folgende Problemstellung. Der Caseinabbau durch Kathepsin einerseits und durch Pepsin andererseits ist bis in alle Einzelheiten bekannt. Lässt man jedoch beide Enzyme gleichzeitig angreifen, so lässt sich nicht angeben, wie gross der Anteil des Einzelnen am Abbau ist. Als Einzelfall sei die Trennung von Trypsin- und Erepsinwirkung in Enzymgemischen genannt, welche *Kleinmann* und *Werr*¹⁾, sowie *Stern*²⁾ auf Grund einer nephelometrischen Mikromethode gelungen ist.

Beispiele für die Koppelung gleichartiger Enzymreaktionen, gleichgültig, ob es sich um proteolytische oder hydrolytische bzw. oxydative Vorgänge handelt, lassen sich beliebig vermehren. Im biologischen Geschehen häufen sich die Möglichkeiten noch mehr, indem die Koppelung auch verschiedenartiger Enzymreaktionen anzunehmen ist. Als Beispiel dafür sei an die Versuche von *Waldschmid-Leitz*³⁾ erinnert, wo die Koppelung zwischen Oxydation und Proteolyse mit Hilfe des Gluthations gezeigt wurde. Die Erkenntnisse, welche sich aus diesen Modellreaktionen ergaben, waren für die Zellpathologie äusserst wertvoll. Man darf es als Beweis ansehen, dass, wenn man in vitro die Nachbildung der intracellulären Steuerung der Enzymreaktionen ausreichend genau durchführt, die praktischen Nutzenanwendungen nicht ausbleiben. Aus der Unzahl der Probleme wird man sich diejenigen herausuchen, wo das Nebeneinanderlaufen der Reaktionen analytisch messbar bleibt; wobei auch der Versuchung, die Verhältnisse möglichst denen der Zelle anzugleichen, nur so weit entsprochen werden darf, als diese erste Forderung gestattet.

I.

*St. v. Przylecki*⁴⁾ hat in umfassender Weise die vielerlei Faktoren bestimmt, welche die Amylasewirkung intracellulär regulieren. Bei der Durchsicht dieser Arbeiten stellte sich das Problem, wie es hier im ersten Abschnitt behandelt wird. Damit wird eine Reihe bekannter Einzeltatsachen zu einer Modellreaktion zusammengefasst. So ist bekannt, dass der Abbau von Stärke oder Glykogen durch Amylase von Casein gehemmt wird. Man nimmt an, dass diese Hemmung die Folge ist der Okklusion der Stärke durch die grossen Casein-Molekeln, somit ein Fall von reversibler Substratbeeinflussung. Wird die Casein-Konzentration genügend hoch gewählt, so wird da-

¹⁾ *H. Kleinmann* und *F. Werr*, *Bioch. Z.* **241**, 181 (1931).

²⁾ *K. G. Stern*, *Bioch. Z.* **236**, 464 (1931).

³⁾ *E. Waldschmid-Leitz*, *Naturwiss.* **17**, 85 (1929).

⁴⁾ Zusammenfassg. in *Ergebn. d. Enzymforschg.* IV, 111 (1935) — *v. Przylecki* und *Gurfinkel*, *Biochem. J.* **24**, 179 (1930).

durch jegliche Amylase-Wirkung unterbunden. Diese kann wieder in Gang gesetzt werden, wenn man durch tryptische Verdauung einen Teil des Casein abbauen lässt. Es war nun interessant zu erfahren, wieviel Casein eben notwendig sind zur völligen Hemmung, und wieviel Trypsin benötigt werden, um die Amylase-Aktivität wieder zu erwecken. Diese beiden Faktoren bestimmen im gewählten Beispiel die Steuerung des Stärke-Abbaues.

Allgemeine Versuchsbedingungen.

Es stellte sich das Problem, diejenige analytische Methode herauszufinden, welche es erlaubte, den primären Vorgang, nämlich die Stärkeverflüssigung, in Anwesenheit von Trypsin, Casein und dessen Abbauprodukten zu messen. Nun fehlt der enzymatischen Stärkespaltung ein einheitliches Substrat, und entsprechend schwer fällt es, Messungen zu erzielen, die untereinander vergleichbar sind. Wie *van Klinkenberg*¹⁾ für die Lintnerstärke zeigen konnte, hat man die Stärke als Gemisch einer α -Stärke und β -Stärke aufzufassen. Es ist wahrscheinlich, dass das Verhältnis je nach Provenienz in gewissen Grenzen variiert. Nur die α -Stärke gibt mit Jod eine blaue Färbung, und somit kann die ursprüngliche Methode von *J. Wohlgemuth* zu ihrer Bestimmung dienen. Die Methode hat jedoch den Nachteil, dass sie nur gestattet, jenen Zeitpunkt zu bestimmen, in welchem alle Stärke abgebaut ist. Deshalb konnte sie für vorliegende Arbeit nicht in Betracht kommen. Genauer, weil auf einem streng stöchiometrischen Verlauf basierend, ist die Bestimmung der Aldehydzucker nach *Willstätter* und *Schudel*²⁾. Wie später gezeigt wird, wurde es aus technischen Gründen notwendig, den Spaltansätzen Glycerin beizumischen. Dasselbe, wie übrigens auch gewisse Spaltprodukte des Caseins, hätten ebenfalls Hypojodit verbraucht, so dass diese Methode nicht zu eindeutigen Ergebnissen geführt hätte. *Ohlsson*³⁾ und neuerdings *Johnson* und *Jozsa*⁴⁾ haben die Stärkeverflüssigung mit Viskositätsmessungen verfolgt, jedoch hätte in unserem Fall das Casein-Sol solche Messungen in schwer zu bestimmender Weise beeinflusst. *Caldwell* und *Hildebrand*⁵⁾ bestimmen die restliche Stärke oder Amylose durch quantitative Fällung mit Äthylalkohol. Diese Fällung verläuft unbeeinflusst durch Maltose oder Dextrine, jedoch würde Casein mitgefällt und damit die nachfolgende gravimetrische Bestimmung im *Gooch*-Tiegel erschwert. Schliesslich blieb bei der Durchsicht der analytischen Möglichkeiten noch die

¹⁾ *Van Klinkenberg*, *Ergebn. d. Enzymforschg.* III, 73 (1934).

²⁾ *R. Willstätter* und *S. Schudel*, *B.* 51, 780 (1918).

³⁾ *E. Ohlsson*, *Z. physiol. Ch.* 119, 1 (1922) — *Compt. rend. Soc. biol. Paris* 87, 1183 (1922).

⁴⁾ *W. R. Johnson* und *S. Jozsa*, *Am. Soc.* 57, 701 (1935).

⁵⁾ *M. L. Caldwell* und *F. C. Hildebrand*, *J. Biol. Chem.* 111, 411 (1935).

nephelometrische Methode, welche die zur Stärkekonzentration proportionale, stabile Trübung misst. Diese Art der Messung wurde erstmals von *Rona* und *Eweyk*¹⁾ angewandt und später von *Krijgsman*²⁾ zur Mikromethodik entwickelt. Sie misst die Substratabnahme, was in unserem Falle der Ermittlung einzelner Spaltstücke überlegen sein musste. Will man hingegen die Maltose- resp. Dextrinbildung gesondert messen, so wird eine weitere Bestimmungsmethode notwendig. Da keine derselben imstande ist, die andere ganz zu ersetzen, ist es angezeigt, wo immer die Versuchsbedingungen dies erlauben, mehrere Methoden parallel zu führen. Während die oben erwähnten nephelometrischen Arbeiten die Erfüllung des *Beer'schen* Gesetzes für reine Stärke- oder Glykogenlösungen bestätigen, musste dies erneut untersucht werden bei der Anwesenheit von Caseinsol. Da sowohl Stärke- wie Caseinsol stark lyophile Kolloide darstellen, findet im gewählten p_H -Abschnitt keine gegenseitige Flockung statt. Dagegen findet durch die grossen Caseinmolekeln, Mol.-Gew. nach *Svedberg*³⁾ 75—375,000, eine Okklusion der Stärke statt. Die nephelometrische Betrachtungsweise ermöglicht es, die dadurch verursachte Änderung des Dispersitätsgrades genau zu verfolgen. Es zeigt sich, dass nach geraumer Zeit die Trübungen nicht stabil bleiben, sondern die Tendenz haben, sich zu verstärken. Zufolge der Okklusion nimmt die Teilchenzahl zwar ab, jedoch das Teilchenvolumen gleichzeitig zu; das Streulicht wächst aber mit dem Quadrat des letzteren. So musste ein Stabilisator gefunden werden, welcher einerseits die Trübung während des beobachteten Zeitintervalles konstant hält und andererseits die enzymatischen Reaktionen weder aktiviert noch hemmt. Schliesslich erwies sich Glycerin in einer Konzentration von 8,6 Vol.-% als am vorteilhaftesten. Die kleine Hemmung, welche es dann verursacht, bleibt noch innerhalb der Fehlergrenze des Messvorganges. Die Spaltversuche wurden zudem so angesetzt, dass sie nach 30 Minuten beendet waren (alle 10 Minuten eine Messung). Dadurch wurde erreicht, dass die Trübung der Nullabnahme konstant blieb, die Stärkespaltung nie weiter als 30% ging, also im monomolekularen Bereich blieb und schliesslich die kolloidalen Eigenschaften der unzersetzten Stärke sich nicht messbar änderten. Wie labil solche verdünnte Stärkelösungen bei länger dauernden Versuchen sind, hat neuerdings *Geinitz*⁴⁾ an Hand genauer Viskositätsmessungen gezeigt. Er benutzte dazu *Merck's* „lösliche Stärke“ und Kartoffelstärke in 0,2-proz. Lösung. Da schon kleine Temperaturänderungen die Lösungen lyophiler Kolloide beeinflussen können, wurde dafür gesorgt, dass sich die Spaltansätze auch während der

1) *P. Rona* und *v. Eweyk*, *Bioch. Z.* **149**, 174 (1924).

2) *B. Krijgsman*, *Z. physiol. Ch.* **230**, 190 (1934).

3) *Th. Svedberg*, *L. M. Carpenter* und *D. C. Carpenter*, *Am. Soc.* **52**, 241, 701 (1930).

4) *H. Geinitz*, *Koll. Z.* **90**, 58 (1940).

Messung nicht abkühlen konnten. Dazu wurde durch den Temperierboden, wie er sich unter der Wasserkammer des *Pulfrich*-Photometer von *Zeiss* befindet, ein Wasserstrom von 37° geleitet. Bei der Auswahl der Stärke war die Stabilität ihrer kolloidalen Lösung wegleitend. So wurde der hochgereinigten Mais-Stärke (Firma *Blattmann*, Wädenswil) vor Kartoffelstärke, Reisstärke und Weizenpuder der Vorzug gegeben. Alle diese Stärke-Sorten waren nicht säurevorbehandelt, somit nicht „löslich“. Glykogen (*Merck*) gibt zwar stabile Trübungen, jedoch sind sie bei gleicher Konzentration wesentlich kleiner, was die Messgenauigkeit ungünstig beeinflusst.

Als Amylase diente stets frisch gewonnene Speichel-Amylase, in einer Verdünnung von 1 : 2000. Diese α -Amylase hat gegenüber Malzamyase den Vorteil der Löslichkeit und grösseren Einheitlichkeit. Malzamyase, wie übrigens auch Trypsin, kann bei noch so feiner Aufschwemmung nicht mit derselben Genauigkeit abgemessen werden, was bei einer Halbmikromethode nachteilig ist. Die Wirksamkeit des verwendeten Speichels wurde wiederholt bestimmt¹⁾; in 0,1 g wurden im Durchschnitt von Messungen 5,2 Amylase-Einheiten festgestellt. Wennschon nach *Pringsheim* und *Beiser*²⁾ der menschliche Speichel, wenn nachmittags entnommen, wirksamer ist, wurde aus technischen Gründen der morgendliche Speichel benutzt. Seine Aktivität wurde stets zuerst in einem Leerversuch gemessen und darauf erst die eigentliche Messreihe angesetzt. Der Durchschnittswert einer Reihe von Leerversuchen wurde als Standard betrachtet und dessen Aktivität die jeweiligen Messresultate angeglichen. Immer wurde eine Messreihe mit demselben Speichel durchgemessen. Es sei erwähnt, dass *Hattori*³⁾ versucht hat, durch vorhergehendes Kauen von Paraffin den ziemlich beträchtlichen Schwankungen der Aktivität von Speichel-Amylase zu begegnen.

Besondere Versuchsreihen waren notwendig, um den geeigneten p_H -Wert der Spaltansätze herauszufinden. Von seiner richtigen Wahl hängt in der Hauptsache die Stabilität der Trübungen ab und damit überhaupt die Messgenauigkeit. Nun hat *Myrbäck*⁴⁾ das p_H -Optimum der Kochsalz-aktivierten Speichel-Amylase zu 6,7—6,8 bestimmt. Für Trypsin dagegen liegt das Optimum über p_H 8. Vorversuche zeigten, dass die Trübungen unterhalb p_H 6 nicht stabil blieben; so wurden die Versuche über das Gebiet von p_H 6,33 bis 7,52 ausgedehnt und zum Standardversuch das p_H 7,23 gewählt. Gepuffert wurde mit m./15 Phosphatlösungen nach *Soerensen*.

1) *Bertho* und *Grassmann*, *Biochem. Praktikum* 1936, S. 129.

2) *H. Pringsheim* und *A. Beiser*, *Bioch. Z.* **148**, 336 (1924).

3) *K. Hattori*, *J. Pharm. Soc. Japan* **516**, 9 (1925).

4) *K. Myrbäck*, *Z. physiol. Ch.* **159**, 1 (1926).

Empfindlichkeit der Stärkebestimmung und Fehlerberechnung.

Die Zusammensetzung des Ansatzes war so gewählt, dass die Stärke-Verflüssigung im beobachteten Zeitintervall 30% nicht überschritt. Dadurch bewegte sich die Trübung ausschliesslich im Gebiet von $860 - 450 \times 10^{-5}$ absolut. Das Volumen des Ansatzes war stets 12 cm^3 ; da für die Messung in den Spezialbechergläsern von *Zeiss* 26 mm nur $7-8 \text{ cm}^3$ benötigt werden, blieb ein genügender Überschuss für die jeweiligen Casein-Bestimmungen ($0,5 \text{ cm}^3$ pro Bestg.). Im Ansatz sind 6 cm^3 einer Stärkelösung von $0,2\%$, somit 1 mg Stärke pro cm^3 . Reihenversuche ergaben, dass je 1 mg Stärke (Mais-Stärke) eine absolute Trübungszunahme von 83×10^{-5} verursachen. Da die Reproduktionsfähigkeit der Stärkeverflüssigung bis auf 17×10^{-5} absolut genau gelingt, ist die Genauigkeit der Bestimmung der Stärke-Trübung $\pm 0,10 \text{ mg}$ Stärke in 12 cm^3 Ansatz. Der Versuchsfehler bleibt somit unter 2% . *Krijgsman* (l. c.) misst in 5 cm^3 Ansatz 63γ Glykogen mit $2,5\%$ Fehler.

Im vorliegenden Falle hat die nephelometrische Messmethode nicht nur den Vorteil der ausreichenden Genauigkeit und zuverlässigen Reproduktionsfähigkeit, sondern sie gestattet noch, selbst kleinste Änderungen der Dispersität des kolloidalen Systemes, wie es der Ansatz darstellt, wahrzunehmen. Es wäre wünschenswert und sicherlich nutzbringend, wenn die nephelometrischen Methoden nicht nur für analytische Messzwecke, sondern gerade bei der Betrachtung kolloidchemischer Vorgänge vermehrt benutzt würden.

Empfindlichkeit der Casein-Bestimmung.

Von diesem zweiten Substrat wurde dem Ansatz nur eben soviel zugesetzt, dass die Stärkeverflüssigung während der beobachteten 30 Minuten völlig gehemmt war. Reihenversuche zeigten, dass dies mit einer Casein-Konzentration von $8,33 \text{ mg}\%$ erreicht wird. Daneben waren im Ansatz noch $8,6 \text{ Vol}\%$ Glycerin und wenigstens anfänglich noch $100 \text{ mg}\%$ Stärke. Als Trübungsreagens wurde Chinidin-chlorhydrat verwendet, von dem *Kleinmann* und *Scharr*¹⁾ gefunden hatten, dass die Trübung mit Casein spezifisch ist. Dazu wurde aus dem Ansatz alle 10 Minuten je $0,5 \text{ cm}^3$ herauspipetiert (mit Mikropipetten, wie sie bei der morphologischen Blutuntersuchung üblich sind) und in kleine Bechergläschen fließen lassen, welche $0,5 \text{ cm}^3$ $m/15$ Phosphatpuffer von p_H $7,52$ enthielten. Gibt man $0,2 \text{ cm}^3$ einer ges. Lösung von Chinidin-chlorhydrat hinzu, so erhält man nach 10 Minuten eine stabile Trübung. Die maximale Caseinmenge, welche in dem so zusammengesetzten Mikrotrübungsansatz erwartet werden kann, ist 41γ . Wie Kontrollmessungen ergeben, sind rund 4γ Casein noch einwandfrei messbar; dennoch

¹⁾ *H. Kleinmann* und *G. Scharr*, *Bioch. Z.* **252**, 343 (1932).

erschien die Fehlerbreite als zu gross, und es wurde darauf verzichtet, die Messung des Casein-Abbaues in den Kreis der Betrachtung aufzunehmen. Dagegen wurde festgestellt, dass dem verwendeten Speichel im beobachteten p_H -Gebiet keinerlei Casein-Spaltungsvermögen zukommt und ferner, dass die Casein-Konzentration von einer nebenher verlaufenden Stärke-Verflüssigung nicht verändert wird. Beide Beobachtungen waren notwendig, um die Eindeutigkeit des Reaktionsablaufes zu belegen.

Benötigte Reagenzien und Apparatur.

Mais-Stärke (Firma *Blattmann*, Wädenswil), hochgereinigt, davon 0,2 g abwägen und mit wenig Wasser quellen lassen. Nach 10 Minuten in siedendes destilliertes Wasser schütten (ca. 90 cm³); 2mal für je 2 Minuten aufkochen, abkühlen lassen und auf 100 cm³ auffüllen. Die Spaltungsversuche sind innerhalb der nächsten 3 Stunden auszuführen.

Speichel-Amylase, morgens entnommen; sogleich abzentrifugiert; 3 Minuten bei 10,000 T.; von der überstehenden völlig klaren Flüssigkeit mit Mikroblutpipette (Abmessung bis 0,0005 cm³) 0,1 cm³ entnommen und mit doppelt destilliertem Wasser 1:2000 hergestellt. Verwendung innert der nächsten 3 Stunden.

Casein (*Hammarsten*, *Kahlbaum*); 0,05 g werden in einem Schälchen mit 2,5 cm³ n. Natriumacetat übergossen, etwas umgerührt und bis zur Lösung stehen gelassen; auf 25 cm³ aufgefüllt und filtriert. 1 Tropfen Toluol zugegeben; kühl aufbewahrt; Verwendung innert der nächsten 6 Stunden.

Trypsin puriss. (*Witte*) in doppelt destilliertem Wasser so gelöst, dass 0,1 cm³ 10 γ enthalten.

NaCl (zur Amylase-Aktivierung), übliche physiologische Kochsalzlösung.

Glycerin, doppelt destilliert (*Kahlbaum*).

Phosphat-Puffer, m./15 nach *Soerensen*, Kontrolle mit hochohmiger Glaselektrode und Röhren-Verstärkungs-Potentiometer.

Trübungsmessung, im *Pulfrich*-Photometer (*Zeiss*); Bechergläser von geblasenem Spezialglas (Innendurchmesser 26 mm) für die Stärketrübung, und Plankvötte von 2,5 mm Tiefe für die Casein-Trübung; stets Vergleichslicht 4 und Filter L_2 ; Trübungswert des benutzten Glaskörpers 0,00479.

Wasserthermostat mit Präzisions-Temperatur-Regelung.

Standard-Versuch (Durchschnittswert von 8 Versuchen).

Speichel-Amylase/Mais-Stärke-Substrat, Halbmikro-anordnung.

Spaltansatz: 6,0 cm³ Mais-Stärke 0,2%
 1,0 „ Glycerin = 8,6 Vol. %
 0,5 „ Phosphatpuffergemisch p_H 7.23
 0,2 „ NaCl, physiologisch
 4,2 resp. 4,1 cm³ H₂O

Absolute Trübungskontrolle ohne Speichel-Amylase.

Zeit in Minuten	0,1 cm ³ Sp.-Amylase		Absolute Trübungs- Kontrolle	0,2 cm ³ Sp.-Amylase		Absolute Trübungs- Kontrolle
	Absolute Trübung $\times 10^{-5}$	Ver- zuckerung %		Absolute Trübung $\times 10^{-5}$	Ver- zuckerung %	
0	823	—	827	823	—	823
10	737	9	827	669	14	823
20	686	13	831	566	23	831
30	651	16	831	531	27	827

Der Berechnung der Verzuckerung wurde eine maximale Verzuckerungsgrenze von 75 % zugrunde gelegt. Totalflüssigkeit des Ansatzes stets 12 cm³, Temperatur 37,5°; alle 10 Minuten wird der gesamte Ansatz in das Spezialbecherglas gegossen und die Trübung gemessen. Damit wird eine gute Homogenisierung erreicht. Die Spezialbechergläser hängen zur Vorwärmung mit im Wasserbad.

Substrat-Hemmung durch Casein.

Spaltansatz: 6,0 cm³ Mais-Stärke 0,2%
 1,0 „ Glycerin
 0,5 „ Phosphatpuffergemisch p_H 7,23
 0,2 „ NaCl, physiologisch
 0,1 „ Speichelamylase
 0,1–0,3–0,5 cm³ Casein 0,2%
 4,1–3,9–3,7 cm³ H₂O

Zeit in Minuten	1,66 mg-% Casein		4,99 mg-% Casein		8,33 mg-% Casein	
	Absolute Trübung × 10 ⁻⁵	Ver- zuckerung %	Absolute Trübung × 10 ⁻⁵	Ver- zuckerung %	Absolute Trübung × 10 ⁻⁵	Ver- zuckerung %
0	823	—	806	—	789	—
10	746	7	771	3	789	—
20	711	10	754	5	789	—
30	694	12	746	6	789	—

Die Zahlen sind die Durchschnittswerte von 3 parallel geführten Messreihen mit Benutzung derselben Speichelamylase. Es gilt dies auch für alle folgenden Untersuchungen. Durch das Casein-Sol tritt eine mässige Aufhellung des Ansatzes ein, die im Maximum 4 % der Trübung des Standardversuches ausmacht. Temperatur 37,5°, p_H 7,23.

Es ergibt sich, dass bei Gegenwart von 8,6 Vol-% Glycerin und dem p_H von 7,23, 8,33 mg-% Casein notwendig sind, um 100 mg-% Stärke für 0,1 cm³ Speichelamylase (1 : 2000) unangreifbar zu machen.

Einwirkung von Trypsin.

Spaltansatz: 6,0 cm³ Mais-Stärke 0,2%
 1,0 „ Glycerin
 0,5 „ Casein 0,2%
 0,5 „ Phosphatpuffergemisch, p_H 7,23
 0,2 „ NaCl
 0,1 „ Speichelamylase (1 : 2000)
 0,1–0,2–0,4 cm³ Trypsin-Lösung
 3,6–3,5–3,3 cm³ H₂O

Zeit in Minuten	10 γ Trypsin		20 γ Trypsin		40 γ Trypsin	
	Absolute Trübung × 10 ⁻⁵	Ver- zuckerung %	Absolute Trübung × 10 ⁻⁵	Ver- zuckerung %	Absolute Trübung × 10 ⁻⁵	Ver- zuckerung %
0	789	—	789	—	793	—
10	720	7	669	11	617	17
20	686	10	617	16	514	26
30	669	11	583	19	463	31

Wie weitere Versuche gezeigt haben, bringen schon 5 γ Trypsin eine gut messbare Stärke-Verflüssigung in Gang. Die Resultate mit 5 γ wie mit 30 γ sind neben obigen Zahlen in Fig. 1 verzeichnet. Die tryptische Caseinverdauung beeinflusst die Trübungsänderung nur innerhalb der Fehlergrenze. 20 γ Trypsin und steigende Mengen ergeben im beobachteten Zeitintervall eine Stärkeverflüssigung, die grösser ist als jene des Standardversuches. Diese Aktivierung der Speichelamylase kann ihren Grund haben in einer schützenden Wirkung der Casein-Abbau-Produkte oder dadurch, dass das Trypsin imstande ist, Begleitstoffe der Amylase abzubauen und damit die letztere wirkungsbereiter zu machen. Analoge Versuche, deren Dauer aber bis auf 3 Stunden ausgedehnt wurde, ergaben, dass nicht die absolute Menge der verflüssigten Stärke sich ändert, sondern lediglich die Kinetik des Reaktionsablaufes.

Darstellung der Abhängigkeit der Stärkeverflüssigung von der Trypsinkonzentration.

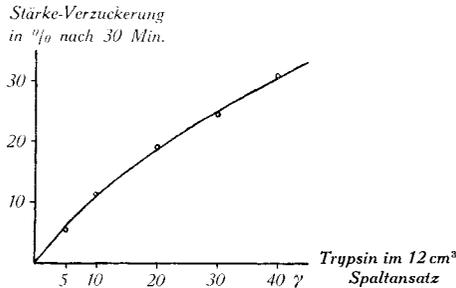


Fig. 1.

p_H-Abhängigkeit von Hemmung und Aktivierung.
Hemmung.

- Spaltansatz: 6,0 cm³ Mais-Stärke 0,2%
 1,0 .. Glycerin
 0,5 .. Casein
 0,5 .. Phosphatpuffer (p_H 6,33–6,84–7,52)
 0,2 .. NaCl, physiologisch
 0,1 .. Speichel-Amylase
 3,7 .. H₂O wenn Hemmung; 3,5 cm³ H₂O + 0,2 cm³ Trypsin wenn Aktivierung

Hemmung.

Zeit in Minuten	p _H 6,33		p _H 6,84		p _H 7,52	
	Absolute Trübung × 10 ⁻⁵	Verzuckerung %	Absolute Trübung × 10 ⁻⁵	Verzuckerung %	Absolute Trübung × 10 ⁻⁵	Verzuckerung %
0	823	—	810	—	780	—
10	823	—	814	—	780	—
20	827	—	814	—	780	—
30	827	—	814	—	784	—

Aktivierung durch 20 γ Trypsin.

Zeit in Minuten	p_H 6,33		p_H 6,84		p_H 7,52	
	Absolute Trübung $\times 10^{-5}$	Ver- zuckerung %	Absolute Trübung $\times 10^{-5}$	Ver- zuckerung %	Absolute Trübung $\times 10^{-5}$	Ver- zuckerung %
0	823	—	814	—	780	—
10	729	9	703	10	609	16
20	694	12	651	15	531	24
30	677	13	625	17	506	26

Die Hemmung wird im beobachteten p_H -Gebiet nicht verändert. Die Trübungen haben die Tendenz mit steigendem p_H -Wert leicht abzunehmen.

Die Aktivierung dagegen ist von p_H -Wert stark abhängig. Dabei wird die Regel, dass enzymatische Vorgänge durch den Zusatz organischer oder anorganischer Aktivatoren auf Verschiebungen des Dissoziationsgleichgewichtes stärker reagieren wie die unaktivierten Reaktionen, bestätigt. Die Aktivierung tritt mit steigendem p_H -Wert immer stärker hervor, sie erscheint demzufolge mehr vom p_H -Optimum des Trypsins abhängig zu sein wie vom Optimum der Amylase.

Die Steuerung der Stärkeverflüssigung durch die Trypsinkonzentration einerseits und den p_H -Wert andererseits, ist hiemit gezeigt.

II.

Gleichzeitiger Abbau von 2 Stärkesorten durch Speichel-Amylase.

Im ersten Teil wurde eine Arbeit von *Northrop* (l. c.) erwähnt, in welcher er erst gesondert und darauf zusammengegeben, 4-proz. Casein- und 3-proz. Gelatinelösung der tryptischen Verdauung aussetzt. Er fand die Spaltgeschwindigkeit der Mischung grösser als in jeder Lösung allein, jedoch kleiner wie ihre Summe. Wenn somit Trypsin auf ein Gemisch zweier Substrate wirkt, ergibt sich kein rein additiver Effekt. Dieser ist allerdings noch abhängig vom Verhältnis Substrat/Enzym resp. der Sättigung des letzteren.

Nachfolgend werden Versuche beschrieben, wo paarweise Gemische pflanzlicher Stärke-Sorten durch Speichel-Amylase verzuckert werden. Nach entsprechender Versuchsdauer wird jedoch nicht nur die Summe der gebildeten Zucker angegeben, sondern die Methode erlaubt, den Anteil jedes einzelnen Substrates zu messen. Dies wurde dadurch ermöglicht, weil solche Stärke, welche durch geeignete Säurebehandlung „löslich“ gemacht wurde, ungetrübte Lösungen gibt, im Gegensatz zu unvorbehandelten Stärkelösungen.

*Chodat*¹⁾ und Mitarbeiter haben die Verflüssigung von Reis-, Weizen-, Arrow root- und Kartoffelstärke durch Gersten-Amylase gemessen und gefunden, dass die Verzuckerungsgeschwindigkeit der Stärkearten sich nicht ändert, wenn man sie vorher durch Digerieren mit Salzsäure löslich gemacht hatte. Diese Feststellung war für die Beurteilung der Ergebnisse nachstehender Versuche wesentlich, denn wenn man annehmen kann, dass die Enzymaffinität zu der unvorbehandelten Stärke und ihrer „löslichen“ Form dieselbe ist, wird die neue Methode für enzym-kinetische Arbeiten sowie die Messung von Affinitätskonstanten besonders brauchbar.

Unter obiger Voraussetzung stellt sie einen Weg dar, um den Abbau von zwei enzym-chemisch gleichwertigen Substraten nebeneinander messen zu können.

Analytische Unterlagen.

Zur Messung gelangt die Verzuckerung von zwei verschiedenen Stärkesorten, und zwar erst einzeln und darauf im Gemisch gleicher Anteile. Der eine der Partner war stets die „lösliche“ Stärke *Kahlbaum*, der andere bestand aus unvorbehandelten, jedoch hochgereinigten Produkten der Stärkefabrik *Blattmann*, Wädenswil. Diese Kombination hat den Vorteil, dass die Verzuckerungsgeschwindigkeit der *Kahlbaum*-Stärke den Standard gibt für die Aktivität der jeweiligen Speichelamylase. Deshalb wurde ihre Bestimmung nach der Methode von *Willstätter* und *Schudel* (l. c.) der betreffenden Messreihe vorangestellt. Anschliessend wird die Verflüssigung des zweiten Substrates, einer unvorbehandelten Stärke, in gewohnter Weise nephelometrisch gemessen. Nach diesen beiden Einzelbestimmungen wird ein Spaltansatz zusammengestellt, in welchem beide Stärkesorten, in gleicher Konzentration wie im Einzelversuch, vorhanden sind. Auch die absoluten Mengen der beiden Stärkesorten waren sich stets gleich. Nun wird gleichzeitig mit Hypojodit der Gesamtstärkeabbau und nephelometrisch der Einzelabbau der unvorbehandelten Stärke gemessen. Die Differenz der beiden Messergebnisse gibt die Verzuckerung der „löslichen“ Stärke im Gemisch. Die Methode hat somit zur Voraussetzung, dass die Bestimmung der Stärkeabbau-Produkte mit Hypojodit und die Messung der übrigbleibenden Stärke durch ihre Trübung gleichwertig sind. Besondere Messungen haben gezeigt, dass dies zumindest im monomolekularen Bereich des Reaktionsablaufes der Fall ist. Wird die Spaltung über 45 % Verzuckerung hinaus verfolgt, so eilt die nephelometrische Methode der Titriermethode etwas voraus, d. h. die Desaggregation der Stärkemolekeln verläuft rascher, als dass Abbauprodukte entstehen, welche mit Hypojodit titrierbar sind. Reagenzien und Apparatur sind dieselben wie im vorigen Abschnitt.

¹⁾ *R. Chodat, J. W. Ross und M. Philia, Arch. Gen. [5] 6, Suppl. 122 (1924).*

Ausführung.

Reis-Stärke + „Lösliche“ Stärke/Speichel-Amylase.

Das Volumen des Spaltansatzes ist stets 36 cm³; die Konzentration der Stärke im Einzelversuch 150 mg-%; und die Gesamtstärke im gemischten Versuch 300 mg-%. Gleich zu Beginn, dann nach 30 Minuten und nochmals nach 60 Minuten wird erst gut homogenisiert und 10 cm³ herauspipettiert. Ist im Ansatz eine unvorbehandelte Stärke enthalten, so wird deren Trübung bestimmt und das Resultat durch Titration nach *Willsättter* und *Schudel* (l. c.) kontrolliert, sind beide Stärkearten gemischt im Ansatz vorhanden, so wird gleich verfahren, wobei die Titration den gesamten Zucker angibt und die Trübung nur den Rest der unvorbehandelten Stärke. Im Ansatz der „löslichen“ Stärke wird nur titriert. Dazu werden 4,5 cm³ 0,1-n. Jodlösung vorgelegt und der Überschuss mit 0,025-n. Thiosulfat aus 2 cm³ Mikrobürette mit $\frac{1}{100}$ Teilung zurücktitriert. Die Anzahl cm³, welche dazu notwendig war, wird in den Tabellen angegeben. Unter Berücksichtigung des Jodverbrauches für Stärke und Enzym ergab sich der Nullwert von 1,72 cm³ 0,025-n. Thiosulfat. Die Ansätze, welche der Trübungskontrolle dienen, wurden ebenfalls zu Kontrolltitrationen benutzt. Es zeigte sich, dass es schwieriger hält, durch Titration zu konstanten Werten zu gelangen, wie durch die Trübungsmessung. Die in den Tabellen angeführten Zahlen sind die Durchschnittswerte von zwei parallel geführten Messreihen. Als maximale Verzuckerungsgrenze wurde wieder 75% der Berechnung zugrunde gelegt.

Spaltansatz:

Resultat:

a) „lösliche“ Stärke 5,4 cm ³ „lösliche“ Stärke 1% 2,0 „ Phosphatpuffer 0,3 „ NaCl physiologisch 0,5 „ Speichel-Amylase (1:2000) 27,8 „ H ₂ O	Zeit in Minuten		Thiosulfat 0,025-n. cm ³	Verzuckerung %		
	0		1,72	—		
	30		1,65	31,0		
	60		1,60	53,2		
b) Reis-Stärke 27,0 cm ³ Reisstärke 0,2% 2,0 „ Phosphatpuffer 0,3 „ NaCl 0,5 „ Speichel-Amylase 6,2 „ H ₂ O	Zeit in Minuten		Abs. Trübung × 10 ⁻⁵	Verzuckerung %		
	0		1646	—		
	30		1159	22,2		
	60		740	39,9		
c) Gesamtstärke 27,0 cm ³ Reisstärke 0,2% 5,4 „ lösliche Stärke 1,0% 2,0 „ Phosphatpuffer 0,3 „ NaCl 0,5 „ Speichel-Amylase 0,8 „ H ₂ O	Zeit in Min.	Gesamtstärke		Reisstärke		„lösl.“ Stärke Ver- zuck. %
		Thio- sulfat cm ³	Ver- zuck. %	Abs. Trüb- g. × 10 ⁻⁵	Ver- zuck. %	
	0	1,69	—	1650	—	—
	30	1,59	22,2	1247	18,3	26,1
	60	1,52	37,7	988	30,1	45,3

Für diese wie alle folgenden Messreihen wurde stets mit m./15 Phosphatpuffergemisch ein p_H von 6,84 eingehalten, das dem Optimum der verwendeten, NaCl-aktivierten Speichel-Amylase entspricht. Kontrollen zeigten, dass der p_H -Wert im beobachteten Zeitintervall konstant bleibt. Temperatur stets 37,5°.

Die Dispersion der Reisstärke-Lösung ist relativ grob, so dass eine hohe Trübung entsteht. Ihr Anteil an der Verzuckerung der Gesamtstärke bleibt denn auch kleiner wie derjenige der „löslichen“ Stärke.

Weizenpuder + „lösliche“ Stärke/Speichel-Amylase.

Spaltansatz:

Resultat:

a) „lösliche“ Stärke 5,4 cm ³ „lösliche“ Stärke 2,0 „ Phosphatgemisch 0,3 „ NaCl 0,5 „ Speichel-Amylase 27,8 „ H ₂ O	Zeit in Minuten		Thiosulfat cm ³	Verzuckerung %		
	0		1,72	—		
	30		1,63	39,9		
	60		1,59	57,6		
b) Weizenpuder 27,0 cm ³ Weizenpuder 0,2% 2,0 „ Phosphatgemisch 0,3 „ NaCl 0,5 „ Speichel-Amylase 6,2 „ H ₂ O	Zeit in Minuten		Abs. Trübung × 10 ⁻⁵	Verzuckerung %		
	0		1642	—		
	30		1257	17,7		
	60		966	31,0		
c) Gesamtstärke 27,0 cm ³ Weizenpuder 5,4 „ „lösliche“ Stärke 2,0 „ Phosphatgemisch 0,3 „ NaCl 0,5 „ Speichel-Amylase 0,8 „ H ₂ O	Zeit in Min.	Gesamtstärke		Weizenpuder		„lösl.“ Stärke Ver-zuck. %
		Thio-sulfat cm ³	Ver-zuck. %	Abs. Trübg. × 10 ⁻⁵	Ver-zuck. %	
	0	1,69	—	1650	—	—
	30	1,60	20,0	1387	11,8	28,2
	60	1,53	35,1	1201	20,3	49,9

Die beiden Substrate haben etwa gleichen Anteil an der Verzuckerung im Gesamtstärke-Ansatz. Der Abbau desselben bleibt beträchtlich zurück, gegenüber der Summe der beiden Einzelversuche a) und b).

Die Verflüssigung der Mais-Stärke schreitet um Weniges rascher voran wie diejenige der „löslichen“ Stärke. Dasselbe gilt auch im gemischten Spaltansatz Beider; derselbe zeigt ferner, dass die Mais-Stärke in ihrem Abbau durch die Anwesenheit von löslicher Stärke nicht behindert wird. Die Enzymaffinität scheint bei der Mais-Stärke besonders gross zu sein und wird vielleicht unterstützt durch die hohe Dispersion ihrer Lösung.

Mais-Stärke + „lösliche“ Stärke/Speichel-Amylase.

Spaltansatz:

Resultat:

a) „lösliche“ Stärke 5,4 cm ³ „lösliche“ Stärke 1% 2,0 „ Phosphatgemisch 0,3 „ NaCl 0,5 „ Speichel-Amylase 27,8 „ H ₂ O	Zeit in Minuten		Thiosulfat cm ³	Verzuckerung %		
	0		1,72	—		
	30		1,65	31,0		
	60		1,60	53,2		
b) Mais-Stärke 27,0 cm ³ Mais-Stärke 0,2% 2,0 „ Phosphatgemisch 0,3 „ NaCl 0,5 „ Speichel-Amylase 6,2 „ H ₂ O	Zeit in Minuten		Abs. Trübung × 10 ⁻⁵	Verzuckerung %		
	0		1203	—		
	30		632	35,5		
	60		278	57,6		
c) Gesamtstärke 27,0 cm ³ Mais-Stärke 5,4 „ „lösliche“ Stärke 2,0 „ Phosphatpuffer 0,3 „ NaCl 0,5 „ Speichel-Amylase 0,8 „ H ₂ O	Zeit in Min.	Gesamtstärke		Mais-Stärke		„lösl.“ Stärke Verzuck. %
		Thio-sulfat cm ³	Verzuck. %	Abs. Trübg. × 10 ⁻⁵	Verzuck. %	
	0	1,69	—	1207	—	—
	30	1,55	31,0	682	32,4	29,6
	60	1,47	49,2	347	53,3	45,1

Kartoffelstärke + lösliche Stärke/Speichel-Amylase.

Spaltansatz:

Resultat:

a) „lösliche“ Stärke 5,4 cm ³ „lösliche“ Stärke 2,0 „ Phosphatgemisch 0,3 „ NaCl 0,5 „ Speichel-Amylase 27,8 „ H ₂ O	Zeit in Minuten		Thiosulfat cm ³	Verzuckerung %		
	0		1,72	—		
	30		1,64	35,4		
	60		1,60	53,2		
b) Kartoffelstärke 27,0 cm ³ Kartoffelstärke 2,0 „ Phosphatpuffer 0,3 „ NaCl 0,5 „ Speichel-Amylase 6,2 „ H ₂ O	Zeit in Minuten		Abs. Trübung × 10 ⁻⁵	Verzuckerung %		
	0		1149	—		
	30		561	39,9		
	60		208	62,0		
c) Gesamtstärke 27,0 cm ³ Kartoffelstärke 5,4 „ „lösliche“ Stärke 2,0 „ Phosphatgemisch 0,3 „ NaCl 0,5 „ Speichel-Amylase 0,8 „ H ₂ O	Zeit in Min.	Gesamtstärke		Kartoffelstärke		„lösl.“ Stärke Verzuck. %
		Thio-sulfat cm ³	Verzuck. %	Abs. Trübg. × 10 ⁻⁵	Verzuck. %	
	0	1,69	—	1153	—	—
	30	1,54	33,2	744	28,5	37,9
	60	1,46	51,0	512	43,0	59,0

Wie ein Vergleich von a) und b) zeigt, wird die Kartoffelstärke rascher verflüssigt wie die „lösliche“ Stärke; es mag dies zum Teil mit der besonders feinen Dispersion ihrer Lösungen zusammenhängen. Im gemischten Spaltansatz c) ist der Anteil der „löslichen“ Stärke dagegen grösser. Noch ausgesprochener wie bei der Maisstärke, ist hier die Gesamtverzuckerung nahezu soweit fortgeschritten wie die Summe der beiden Einzelversuche.

Schlussbetrachtung und Ausblick.

Da grundsätzlich jede Stärkeart in „lösliche“ Form gebracht werden kann, steht der beschriebenen paarweisen Betrachtungsweise jede mögliche Kombination offen, so z. B. auch dieselbe Stärke in unvorbehandeltem und „löslich“ gemachten Zustand, wo sich also die verschiedene Dispersion im Lösungsmittel auf die Geschwindigkeit der Verflüssigung auswirken würde. Die vom zellphysiologischen Standpunkte aus besonders interessierende Sol-Gel Beziehung kann hiemit enzymchemisch ausgewertet werden. Ebenso können Gemische von Stärkesorten pflanzlicher und tierischer Provenienz vergleichend geprüft werden. Neue Einblicke in die Spezifitätsverhältnisse können sich ergeben, wenn dazu wechselweise Speichel- oder Pankreas-amylase einerseits und Gersten- oder Malz-amylase andererseits benutzt wird. Die vorliegenden Untersuchungen wollten in erster Linie die Brauchbarkeit der Methodik erweisen und damit den Weg ebnen zur systematischen Bearbeitung. In den 4 untersuchten pflanzlichen Stärkesorten sind α - und β -Stärke in wechselnder Weise gemischt. Da nun im Speichel in erster Linie α -Amylase wirksam ist, werden jene Stärkesorten bevorzugt abgebaut, die überwiegend aus α -Stärke bestehen. Hierdurch, sowie zufolge ungleicher Dispersion, wird es erklärlich, dass die Geschwindigkeit der Verzuckerung solche Unterschiede aufweist.

Meilen, Laboratorium für biochemische
Mikromethoden.

50. L'alchilazione degli orto-ossiazocomposti e la riduzione anomala degli eteri ottenuti

di Elisa Ghigi.

(26. II. 40.)

H. E. Fierz-David in un suo recente lavoro in collaborazione con *Hans Ischer* (Helv. Chim. Acta **21**, 679 (1938)) pone in dubbio la possibilità di ottenere gli eteri del fenilazo- β -naftolo per alchilazione del corrispondente o-ossiazocomposto esprimendosi testualmente così: „Die einfachste Methode, die Reduktion von Benzol-azo-o-methoxy-naphthalin, scheidet trotz gegenteiligen Literaturangaben an der Unmöglichkeit, die Hydroxyl-