

4. Die gegenteiligen Angaben ALBRECHTS erklären sich aus der Unzulänglichkeit seiner Untersuchungen.

Botanisches Institut der Universität Graz.

Erklärung der Abbildungen.

- Fig. 1. *Prunus Padus*. Obere Epidermis des Schattenblattes.
 Fig. 2. *Prunus Padus*. Epidermis des Sonnenblattes.
 Fig. 3. *Cercis filiquastrum*. Epidermiszelle des Schattenblattes.
 Fig. 4. *Cercis filiquastrum*. Epidermiszelle des Sonnenblattes.
 Fig. 5 u. 6. *Ostrya virginica*. Epidermis des Schattenblattes.
 Fig. 7. *Ostrya virginica*. Epidermis des Sonnenblattes.
 Fig. 8. *Cydonia vulgaris*. Epidermis des Schattenblattes.
 Fig. 9. *Cydonia vulgaris*. Epidermis des Sonnenblattes.

58. E. Pantanelli: Über Pilzrevertase.

(Eingegangen am 30. Juli 1908.)

Seit einigen Jahren beschäftige ich mich mit der Frage nach dem Bildungs- und Sekretionsmechanismus der pflanzlichen Enzyme. Zuerst wurde das denkbar einfachste Enzym, die Invertase, untersucht und aus verschiedenen Gründen, die ich in meiner ersten Arbeit auf diesem Gebiete erörtert habe¹⁾, die Invertase von Hefezellen und Schimmelpilzen gewählt. Dabei stieß ich aber auf eine neue Erscheinung, nämlich auf die revertierende Wirkung der Kulturflüssigkeiten und Zellbreie aus diesen niederen Organismen, welche ihr Rohrzuckerspaltungsvermögen unter gewissen Umständen maskiert oder übertrifft. Dadurch wurde die Erforschung der Sekretionsmechanik der Invertase außerordentlich erschwert; wie ich trotzdem ein gewisses Licht über das verwickelte Problem zu werfen versuchte, kann man aus der betreffenden Abhandlung ersehen²⁾.

In neuerer Zeit ist eine kurze Mitteilung von KOHL³⁾ er-

1) Meccanismo di secrezione degli enzimi. I. Influenza dei colloidi sulla secrezione dell' invertasi. *Annali di Botanica*, Vol. III, p. 113 (1905).

2) Meccanismo di secr. d. enz. III. Secrezione reversibile dell' invertasi. *Ann. di Botan.*, Vol. V, pag. 355 (1906).

3) Über die Reversibilität der Enzymwirkungen usw. *Beihefte z. Bot. Centr.* Bd. XXIII, I. Abt., S. 64 a—o (1908).

schiene, der sich mit Heferevertase befaßt und zu meinen Ergebnissen Stellung zu nehmen versucht. KOHL zitiert und kennt offenbar nur die erste vorläufige Mitteilung¹⁾ von mir, wo ich ein paar Angaben über Vorkommen von Revertase machte. Von meinen weiteren Arbeiten, insbesondere der größeren über Bildung und Sekretion der antagonistischen Enzyme²⁾, sowie einer ausführlichen Mitteilung³⁾ über Vorkommen der Revertase bei *Mucor Mucedo*, *Penicillium glaucum*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, Einfluß von Alter auf Bildung und Sekretion usw. ist KOHL nichts bekannt. Darum könnte ich über die Einwände KOHLs hinweggehen, möchte aber an dieser Stelle bereits zeigen, daß solche Einwände gegen meine vorläufige Mitteilung wenigstens verfrüht sind.

KOHL spricht meinen damaligen Angaben jede Berechtigung als Nachweis für die Existenz einer Revertase ab, weil ich mit zu stark sauren resp. alkalischen Invertaselösungen arbeitete. Er hat den italienischen Text offenbar nicht ganz verstanden, denn es handelte sich keineswegs um Lösungen eines irgendwie reinpräparierten Enzyms, sondern lediglich um Kulturflüssigkeiten, welche vor der Aussaat 1 Promille Weinsäure und 0,5 pCt. Monokaliumphosphat enthielten, im ganzen etwa 1,5—2,0 ccm zehntelnormal Natronlauge pro 10 ccm verbrauchten, eine Acidität, welche für das Wachstum dieser Pilze immer noch als infraoptimal anzusehen ist. Hat sich dann der Pilz üppig entwickelt, so kann ich nichts dafür, wenn er soviel organische Säure ausscheidet, daß 10 ccm Kulturflüssigkeit nunmehr von 5—7 ccm $\frac{1}{10}$ norm. Natronlauge gegen Phenolphthaleïn neutralisiert werden; allerdings ist es wohl bekannt, daß *Mucor*, *Aspergillus*, *Botrytis*, ebenso wie die meisten Heferassen bei Darreichung von Ammontartrat und Zuckerarten (bei meinen Kulturen war 10 pCt. Rohrzucker dargeboten) das Substrat stark ansäuern. Trotzdem, oder wohl! infolge dieser Ansäuerung, arbeitet die ausgeschiedene Invertase recht gut und wir finden an der Hand des Experimentes, daß bei solcher Konzentration organischer Säuren das Optimum für ihre Tätigkeit eben erreicht ist. Zur Reversionsprobe vermischte ich die Kulturflüssigkeit oder den Mycelbrei mit dem gleichen Volumen Invertzuckerlösung, so daß die Acidität auf die Hälfte der verzeichneten sank.

1) Proinvertasi e reversibilità dell' invertasi. Rendic. Accad. Lincei. (5) XV. I. Sem. p. 587 (1906).

2) Annali di Bot., Vol. V, p. 355 (1906).

3) Su la revertasi nei funghi. Rendic. Accad. Lincei. (5) Vol. XVI, II. Sem., p. 419 (1907).

Für *Mucor*-Arten finden wir in der Literatur keine ausführlichen Angaben über die Lage des Optimums¹⁾; für die Invertase von Hefezellen fanden O'SULLIVAN und TOMPSON²⁾ das Optimum an Schwefelsäure je nach der Temperatur und dem Verhältnis von Enzym (E:R): Rohrzucker zwischen 0,0125 g und 0,25 g SO₃ im Liter.

Am besten sind in dieser Richtung verschiedene Heferassen und *Aspergillus niger* durch FERNBACH³⁾ untersucht, der alle Messungen bei 56° ausführte. Er fand bei dem letztgenannten Pilze folgende Optimalkonzentrationen:

	Optimaldosis der Säure	Durch Säure und Enzym	Durch Säure	Durch Enzym
		invertierter Rohrzucker		
	g ‰	cg		
Schwefelsäure	0,005	31,3	0,7	30,5
Oxalsäure . . .	0,0066	30	0	30
Weinsäure . . .	0,1	40	8,6	31,4
Bernsteinsäure	0,2	34,2	3,7	30,5
Milchsäure . . .	0,5	41,5	12,2	29,3
Essigsäure . .	1	37,9	7,2	30,7

Bei verschiedenen Heferassen und -arten lag das Optimum an Essigsäure zwischen 0,05 und 0,02 g pCt.⁴⁾

Nach KANITZ⁵⁾ liegt das Säureoptimum für *Aspergillus*-Invertase zwischen $\frac{1}{3000}$ und $\frac{1}{300}$ norm. Wasserstoffionen.

Bei *Mucor Mucedo* habe ich verschiedene Messungen angestellt, die sich besonders auf das Aciditätsoptimum für Revertase beziehen. Zunächst sei ein Beispiel ausführlich mitgeteilt, um die Versuchsanstellung und die Größenordnung der Erscheinungen zu zeigen.

Die Kulturflüssigkeit eines auf der gewöhnlichen⁶⁾ Nährlösung bei 25° C 22 Tage gewachsenen Mycels hatte eine starke, d. h. gegen Methylorange titrierte Acidität gleich 2,2 ccm $\frac{1}{10}$ norm. Lauge, eine schwache, gegen Phenolphthalein titrierte Acidität gleich 5,8 ccm $\frac{1}{10}$ norm. Lauge pro 10 ccm. Sie enthielt in 10 ccm 704 mg Hexose (reduz. Zucker) und 128,6 mg Saccharose (hydrolysierbaren Zucker).

1) Vgl. WEHMER in LAFAR, Handb. d. techn. Mykol., Bd. IV, S. 523 (1907).

2) Invertase usw., Journ. chem. Society, Vol. LVII, S. 859 (1890).

3) Annales de l'Institut Pasteur, Vol. III, p. 473, 532 (1889); Vol. IV, p. 646 (1890).

4) Sur le dosage de l'invertine chez la levure, Ann. Inst. Pasteur, Vol. IV, p. 646 (1890).

5) Archiv f. ges. Physiol., Bd. C, S. 547 (1903).

6) Annali di Bot., Vol. III, p. 121 (1905).

200 ccm dieser Flüssigkeit wurden mit 1 l 95 proz. Alkohol gefällt, der Niederschlag mit 80 proz. Alkohol durch dreimalige Dekantation gewaschen, dann zu 50 ccm mit Wasser gelöst, vom unlöslichen Teil dekantiert, wieder mit 500 ccm 95 proz. Alkohol gefällt, mit 80 proz. Alkohol dreimal durch Dekantation gewaschen und zu 50 ccm mit Wasser gelöst¹⁾. Diese mehr oder minder opaleszierende Lösung wurde als Enzymlösung auf 20 proz. Saccharose einerseits, auf 20 proz. Invertzuckerlösung andererseits bei 55° C einwirken lassen.

Die Bereitung der Invertzuckerlösung erfolgte nach einer bereits mitgeteilten Vorschrift²⁾. Bei diesem Versuche enthielt sie in 10 ccm 3058 mg Hexose gegen 4032,6 mg Gesamtzucker, d. h. 15,29 pCt. Hexose und 4,88 pCt. Rohrzucker (als Hexose berechnet).

Als Säure wurde zunächst Weinsäure angewandt, da sich diese Säure in der Nährlösung befand und der natürlichen Acidität des Pilzes am besten entsprach. Ich bereitete eine 2mal norm. Lösung (150 g im Liter), die ich dann sukzessiv verdünnte und mit Enzymlösung und Invertzuckerlösung in folgender Weise vermischte:

I.	5 ccm Enzymlösg.	+	5 ccm 2 norm. Weinsäure	+	10 ccm Invertzuckerlösg.
II.	„	+	„ 1 „	+	„
III.	„	+	„ 0,5 „	+	„
IV.	„	+	„ 0,25 „	+	„
V.	„	+	„ 0,125 „	+	„
VI.	„	+	„ Wasser	+	„

Daneben wurden 6 gleiche Mischungen hergestellt, nur daß an Stelle der Enzymlösung 5 ccm Wasser standen; wir bezeichnen im folgenden beide Versuchsreihen als enzymatische, resp. Säurereversion.

Die Mischungen waren in oben verjüngte Röhrchen gefüllt und wurden eine Stunde in einem auf 56° C thermoregulierten, geräumigen Wasserbad ruhig gelassen. Nach 60 Minuten wurden 10 ccm sofort ohne Neutralisation auf 500 ccm mit kaltem Wasser gebracht und in Portionen von 10 ccm möglichst schnell der reduz. Zucker bestimmt; die übrigen 10 ccm wurden mit 5 ccm $\frac{1}{10}$ norm. Schwefelsäure und 35 ccm Wasser versetzt und eine halbe

1) Diese Operation bezweckt, die Fremdstoffe, insbesondere die Zuckerarten, zu entfernen. Am schnellsten kann man solche Behandlungen in kognischen Niederschlagsgläsern ausführen, die man mit einem Streifen Millimeterpapier versieht.

2) Rendic. Accad. Lincei. (5). XVI. II. Sem. p. 421 (1907).

Stunde im siedenden Wasserbade gehalten, um durch möglichst weitgetriebene Hydrolyse den Gesamtzucker zu bestimmen.

Die Zuckerzahlen sind alle in mg Hexose für das ganze Gemisch (20 ccm) angegeben.

Gemisch	Acidität norm.	Variation der Hexose in mg			Gesamtzucker am Ende	
		Enzym + Säure	Säure	Enzym	Enzym	Säure
I.	$\frac{1}{2}$	+ 113,2	+ 98,4	+ 14,8	3820	3915
II.	$\frac{1}{4}$	— 243,2	+ 58,7	— 301,9	3792	3920
III.	$\frac{1}{8}$	— 540	+ 32,8	— 572,8	3795	3908
IV.	$\frac{1}{16}$	— 146,9	+ 17,0	— 163,9	3804	3904
V.	$\frac{1}{32}$	— 79,6	— 48,9	— 30,7	3820	3920
VI.	0	— 313,2	— 317,4	— 4,2	3762	3860

Wir sehen, daß die betreffende Ektorevertase von *Mucor Mucedo* ihr Optimum bei $\frac{1}{8}$ norm. Weinsäure (0,947 pCt.) hatte, wo sie 18,74 pCt. der vorhandenen Hexose revertierte. In neutraler Lösung ist von einer enzymatischen Reversion in diesem Falle nichts zu spüren; der ziemlich konzentrierte Invertzucker erfährt hier eine ausgiebige Kondensation zu schwer hydrolysierbaren Polysacchariden. Dieser Umstand, sowie der hemmende Einfluß der Säure auf solche Kondensation, die aber auch in 0,5 norm. Säure noch faßbar erscheint, zeigen zur Genüge, daß bei solchen Aciditätsgraden die Verminderung des Gesamtzuckers von dieser Kondensation, die Hexosenabnahme bei Enzymgegenwart von einer noch stärkeren Kondensation und Reversion herrührt; in keinem Falle ist eine Oxydation der Zuckerarten oder des Enzyms zu befürchten.

Nach derselben Methodik wurde an dieser Kulturflüssigkeit das Säureoptimum für Invertase durch Einwirkung auf 20 pCt. Rohrzuckerlösung bestimmt; es lag zwischen $\frac{1}{8}$ und $\frac{1}{16}$ norm. Weinsäure, wo eine etwa 22 proz. Inversion gemessen wurde.

Man darf aber nicht glauben, daß irgendwelche extrazelluläre oder intrazelluläre Revertase, bzw. Invertase gleich hohe Optima besitzen, vielmehr bin ich durch zahlreiche Versuche¹⁾ mit Ekto- und Endoenzymen von auf verschiedenen sauren Nährlösungen entwickelten Mycelien von *Mucor Mucedo*, *Aspergillus niger* und der vielfach angewandten Rasse der römischen Brothefe zum Schlusse gekommen, daß solche Optima für jeden Organismus keines-

1) Die ausführliche Arbeit ist im Druck in den *Annali di Botanica* des Herrn Prof. R. PIROTTA.

wegs konstant sind, auch nicht einmal etwas spezifisch Bestimmtes darstellen.

Jedes Enzympräparat aus irgendwelchem Organismus erfreut sich jener Acidität als einer optimalen, die sich der natürlichen, in der Kulturflüssigkeit oder im Zellsaft vorhandenen nähert.

So sind die Optima für Endoenzyme durchgehends viel niedriger als für die ausgeschiedene Revertase, bzw. Invertase; die römische Brothefe, welche in sehr schwach saurer Lösung vorzüglich gedeiht, besitzt ebenfalls weniger säurefeste Revertasen oder Invertasen. Meistens ist übrigens auch in neutraler Lösung eine enzymatische Reversion faßbar, welche aber die rein chemische recht wenig übertrifft.

Zweitens wurde gefunden, daß die Alkoholfällung unsere antagonistischen Enzyme, insbesondere aber die Revertase abschwächt und daß dieses Enzym in der unversehrten Kulturflüssigkeit ein etwas höher liegendes Säureoptimum aufweist.

Drittens konnte im Anschluß an die eleganten FERNBACHschen Beobachtungen festgestellt werden, daß die Lage des Optimums bei äquivalenten Zugaben verschiedener Säuren mit der Affinitätsgröße oder Säurekraft der betreffenden Säure variiert. So lag das Optimum für eine Ektorevertase von *Mucor Mucedo* bei $\frac{1}{128}$ norm. Salzsäure und $\frac{1}{16}$ norm. Essigsäure.

Zum Schluß möchte ich die biologisch hochwichtige Erscheinung scharf hervortreten lassen, daß Revertase und Invertase keineswegs das gleiche Aciditätsoptimum zu haben brauchen. Meine Studien, die man in den ausführlichen Abhandlungen finden wird¹⁾, haben ja das Resultate erbracht, daß es sich keineswegs um ein einziges, je nach Umständen invertierendes oder revertierendes Enzym, sondern um zwei antagonistische Enzyme handelt, welche höchstwahrscheinlich einen nach Art der optischen Antipoden antisymmetrischen Bau besitzen, doch aus einem gemeinsamen Zymogen stammen, das sich wie ein Racemkörper verhält.

Der Grund für das Fehlen einer echten reversiven Wirkung der Pilzinvertase liegt sehr wahrscheinlich in dem einfachen Umstande, daß eine reversible Reaktion nicht vorliegt. Wie schon A. WOHL²⁾ und in neuerer Zeit EMMERLING, CROFT HILL,

1) Die erste befaßt sich mit der Feststellung der Optima (Acidität, Alkalität, Zuckerkonzentration, Temperatur); die zweite mit der Aktivierung des Zymogens unter verschiedenen Verhältnissen; die dritte mit der Identifizierung und Bestimmung der Reversionsprodukte.

2) WOHL, A., Zur Kenntnis der Kohlehydrate. Ber. chem. Ges., XXXIII. S. 2084 (1890).

ARMSTRONG¹⁾ usw. gezeigt haben, führt die chemische oder enzymatische Reversion eines Hydrolysenproduktes beinahe niemals zur Rückbildung des ursprünglichen Hydrolytes; die Reversion schlägt einen anderen Weg ein. In unserem Falle habe ich unter den Produkten der enzymatischen Reversion von Invertzuckerlösungen nur ausnahmsweise und in äußerst geringen Mengen Saccharose gefunden; am meisten trifft man Lävulosin und Isomaltose, manchmal auch Dextrin.

An dieser Stelle kann ich auf solche Tatsachen nicht weiter eingehen und kehre vielmehr auf die KOHLschen Vorwürfe zurück, die sich allerdings nach dem Gesagten von selbst erledigen dürften.

Das in meiner vorläufigen Mitteilung angeführte Beispiel bezog sich auf Kulturflüssigkeiten, wovon 10 ccm, 5,6 ccm, resp. 3,8 ccm $\frac{1}{10}$ norm. Natronlauge unter Zusatz von Phenolphthalein als Indikator neutralisierten. KOHL gibt meine Angabe irrigerweise wieder, wenn er von 5,6 ccm $\frac{1}{10}$ norm. Salzsäure spricht; es handelte sich nicht um Salzsäure, sondern um die vom Pilze ausgeschiedene organische Säure. Nun haben wir gesehen, daß das Säureoptimum bei äquivalenten Gaben um so höher verschoben ist, je schwächer die Säure ist.

Außerdem wurden je 10 ccm Kulturflüssigkeit mit 10 ccm neutraler Invertzuckerlösung vermischt, so daß die Acidität auf 2,8, resp. 1,9 ccm $\frac{1}{10}$ norm. pro 10 ccm sank. Das Optimum für *Mucor*-Ektorevertase liegt nun zwischen $\frac{1}{8}$ und $\frac{1}{16}$ norm. Weinsäure, d. h. Lösungen, wovon 10 ccm 12,5, bzw. 6,25 ccm $\frac{1}{10}$ norm. Lauge zur Neutralisation verbrauchen.

Ich konnte also die *Mucor*-Ektorevertase bei jenen (selbstregulierten!) Säurekonzentrationen, die KOHL als schädlich betrachtet, ruhig arbeiten lassen. Es ist zu bemerken, daß die Messungen bei 55°—56° nur eine Stunde dauern, der einzige Weg, um eine vergleichbare Intensitätsmessung auszuführen, wie ich mich durch das Studium der Aktivierung der antagonistischen Enzyme überzeugt habe.

Etwas anders liegt die Sache für die Endorevertasen, die weniger säurefest sind, und Beispiele für ihre kräftige Wirkung in sehr schwach saurem Mycelbrei hatte ich in einer Mitteilung²⁾ angeführt, die KOHL entgangen ist. Außerdem handelte es sich um Kulturflüssigkeiten, nicht um gefällte Präparate, welche, wie oben

1) Für diese Literatur verweise ich auf frühere Schriften, insbesondere: Rendic. Acc. Lincei, Bd. XVI, S. 420 (1907).

2) Sula revertasi nei funghi l. c. p. 422.

gesagt, säureempfindlicher sind; mein Prinzip war ja, bei solchen mehr physiologischen als biochemischen Untersuchungen mit Kulturflüssigkeiten und Mycelbreien direkt zu operieren.

KOHL scheint durch das Verhalten der von ihm angewandten Hefeinvertase verleitet worden zu sein, meine Angaben schief zu betrachten. Nun sind aber Hefezellen für Säure viel empfindlicher als Schimmelpilze und dasselbe gilt für die betreffenden Enzyme, insbesondere, wenn man mit Endoenzymen arbeitet, wie es bei KOHL der Fall war. Dafür verweise ich auf eigene Messungen und auf die Arbeiten von O'SULLIVAN, FERNBACH usw.

Es ist daher unrichtig, an der Hand von Beobachtungen über eine alkoholgefällte Hefeendoinvertase meine an Kulturflüssigkeiten von *Mucor* gewonnenen Resultate für unzulänglich zu erklären.

Bei solcher Kritik ist aber KOHL offenbar mehr vom Gedanken ausgegangen, daß die von mir angewandte (?) Säurekonzentration für den Zucker selbst gefährlich sein dürfte. Nun ist es wohlbekannt, daß eine Oxydation der Zuckerarten erst beim Kochen mit starken Säuren, am besten mit Salpeter- oder Salzsäure, eintritt und wie lange man kochen muß, weiß jedermann, der sich mit der Zuckerchemie beschäftigt hat. Nach WOHL (l. c.) bewirkt ein Teil Salzsäure auf 100 Teile Glucose noch keine Zersetzung, wohl aber Kondensation; von diesem Verhältnis war aber die schwache organische Acidität jener Kulturflüssigkeiten weit entfernt, obwohl KOHL das von O'SULLIVAN angegebene Schwefelsäure-Optimum als eine „Zugabe von Säure“ anspricht, „die ungeheuer viel kleiner ist als die von PANTANELLI angewandte“. Übrigens wird man in der ausführlichen Arbeit Gesamtzuckerzahlen genug finden, um zu sehen, inwieweit eine Zuckersersetzung bei jeder Probe eintreten konnte. KOHL fürchtet offenbar, daß ich mich um das eventuelle Verschwinden von Zucker durch Bestimmung des Gesamtzuckers nicht überzeugt habe, ein Verdacht, den ich unberücksichtigt lassen möchte, um so mehr als in späteren Arbeiten, die KOHL unbekannt sind, auch Gesamtzuckerzahlen öfters angeführt sind.

Der weitere Einwand KOHLs, es können bei der Enzymwirkung in saurer Lösung dextrinartige oder im allgemeinen andere Produkte als Rohrzucker entstehen, wird nach der Feststellung belanglos, daß keine reversible Reaktion in physikalisch-chemischem Sinne vorliegt, wie es übrigens nach anderweitigen Erfahrungen auf chemischem und enzymologischem Gebiete zu erwarten war.

In meiner vorläufigen Mitteilung waren auch einige Zahlen über Reversion in alkalischer Lösung angeführt, die bei KOHL

auf Schwierigkeiten gestoßen sind. Ich neutralisierte damals einige Kulturflüssigkeiten, setzte dann verschiedene Mengen norm. NaOH, in einem Falle bis 16,2 ccm $\frac{1}{10}$ norm. Alkali pro 20 ccm Mischung, d. h. bis zu einer 0,123 norm. Alkalität, und fand, daß mit der Alkalität die Reversion — das Abnehmen des reduzierenden Vermögens — ganz erheblich zunahm. Wir wollen eine Messung des Alkalioptimums ausführlich mitteilen, um zu sehen, ob der Einwand KOHLs, daß dadurch einfach die Zuckerzersetzung eingeleitet wurde, auf einem faktischen Grunde beruht.

Aus einer Kulturflüssigkeit von 20 Tage altem *Mucor Mucedo* wurde die Revertase in der beschriebenen Weise herauspräpariert. Die Invertzuckerlösung enthielt 3794 mg Hexose und 212 mg Saccharose in 10 ccm. Es wurden folgende Proben angestellt:

	I.	II.	III.	IV.	V.	VI.	VII.	VIII.
	5 ccm Enzymlösg.	„	„	„	„	„	„	„
	+ 5 ccm 1	+ „ 0,5	+ „ 0,25	+ „ 0,125	+ „ 0,0625	+ „ 0,03125	+ „ 0,015625	+ „ Wasser
	norm. NaOH	„	„	„	„	„	„	„
	+ 10 ccm Invertzuckerlösg.	+ „	+ „	+ „	+ „	+ „	+ „	+ „

In einer parallelen Versuchsreihe wurde die Enzymlösung durch 5 ccm Wasser ersetzt. Im übrigen wurde der Versuch nach der gewöhnlichen Schablone ausgeführt.

Gemisch	Alkalität norm.	Variation der Hexose			Gesamtzucker am Ende	
		Enzym + Alkali	Alkali	Enzym	Enzym	Alkali
I.	$\frac{1}{4}$	— 1691	— 1391,6	— 297,4	2960	3208
II.	$\frac{1}{8}$	— 1355,7	— 1014,5	— 341,2	3233	3412
III.	$\frac{1}{16}$	— 1317,4	— 823,2	— 494,2	3316	3537
IV.	$\frac{1}{32}$	— 1262,9	— 649,4	— 613,5	3368	3624
V.	$\frac{1}{64}$	— 890,2	— 482,2	— 408,0	3380	3678
VI.	$\frac{1}{128}$	— 451,4	— 236,8	— 214,6	3462	3714
VII.	$\frac{1}{256}$	— 530,6	— 442,4	— 88,2	3648	3790
VIII.	0	— 724,8	— 638,6	— 86,2	3626	3748

Das Alkalioptimum bei $\frac{1}{32}$ norm. und die Schwelle der chemischen Alkaliwirkung auf den Zucker sind scharf getrennt. Daß es sich aber auch bei den höheren Konzentrationen (bis 0,25 norm.) mehr um Kondensation von schwer hydrolysierbaren Stoffen als um Zuckerzersetzung handelt, wird bewiesen: 1. durch die Schutzwirkung des Enzyms, das eine noch stärkere Kondensation

als das Alkali allein bewirkt, 2. durch die starke Kondensation in neutraler Lösung.

Ich kann hier die Sache nicht weiter verfolgen; ich erinnere nur daran, daß die Endorevertasen ein etwas höheres Alkalioptimum besitzen als die Ektorevertasen. Durch Isolation und Bestimmung der Reversionsprodukte gewann ich dann die Überzeugung, daß eine Reduktion des Zuckers zu Milchsäure oder anderen Säuren erst in 0,5 norm. Alkalilösung spurweise merkbar wird¹⁾. Jedenfalls sind solche Alkaligaben stärker als die in der vorläufigen Mitteilung angegebenen und da jene Beispiele aus Versuchen mit verschiedenen Kulturflüssigkeiten herausgegriffen wurden, so bin ich jetzt nicht mehr imstande, zu beurteilen, ob es sich um verschiedene Lage des Optimums oder um andere Umstände handelte.

Schalten wir die unbegründeten Einwände KOHLs gegen jene Angaben aus, so muß ich das Erscheinen der vorläufigen Mitteilung dieses Forschers mit Freude begrüßen, denn es werden meine Resultate durchaus bestätigt. Allerdings war die Reaktion bei meinen Objekten viel kräftiger als bei KOHL, wie man aus einer neueren Mitteilung ersehen kann, was damit zusammenhängt, daß KOHL mit gereinigten Enzympräparaten arbeitete, welche mehr oder minder geschwächt sind gegenüber dem Enzym im natürlichen Standorte. Das Fehlen jeglicher H^+ oder OH^- Ionen, sowie die Verwendung einer niederen Temperatur und einer ziemlich verdünnten Rohrzucker- oder Invertzuckerlösung²⁾ wird aber auch ganz beträchtlich dazu beigetragen haben.

Bezüglich der Wirksamkeit in ganz neutraler Lösung, die KOHL am Herzen liegt, möchte ich meine abweichende Auffassung aufrecht erhalten. KOHL meint, es sei richtiger, Enzymwirkungen in neutraler Lösung zu untersuchen, damit die reine Fermentwirkung zutage tritt. Meines Erachtens liegt hier ein prinzipieller Fehler vor. Enzyme wirken nur als Katalysatoren zweiter Ordnung, d. h. sie unterstützen die katalytische Wirkung der

1) Man darf natürlich mit dem bekannten Versuch von NENCKI und SIEBER (Journ. f. prakt. Chemie (2), Bd. XXIV S. 498) keinen Vergleich anstellen; denn es handelte sich dort um eine Mischung von 20 g Glucose, 200 ccm Wasser, und 40 g KOH, die bei 35—40° 24 h lag.

2) Im Vers. VIII hat KOHL 40 ccm Glycerinextrakt auf 60 ccm einer Invertzuckerlösung einwirken lassen, die nur 706 mg Invertzucker in 10 ccm enthielt; im Vers. IX waren 100 ccm einer 10 prozentigen Invertzuckerlösung mit 10 ccm Glycerinextrakt versetzt. O'SULLIVAN und FERNBACH haben doch gezeigt, daß die optimale Zuckerkonzentration 20 pCt. ist.

H^+ oder OH^- Ionen, welche allein als Katalysatoren erster Ordnung anzusehen sind. Versucht der Forscher mit der größten Sorgfalt ein neutrales Milieu herzustellen, so werden doch immer im reagierenden Stoffe oder im Enzymmolekül selbst Wasserstoff- bzw. Hydroxylionen vorhanden sein, ohne deren Gegenwart keine Reaktion in Lösungen beschleunigt werden kann.

In unserem Falle ist durch direkte Messungen von KULLGREN¹⁾ nachgewiesen worden, daß Saccharose ebenso wie Invertzucker eine meßbare Menge H^+ Ionen abspalten, und daß bei der Inversion durch kochendes Wasser eine acidimetrisch faßbare Säure entsteht.

Theoretisch erscheint also das Streben nach neutraler Umgebung überflüssig; viel richtiger ist der von O'SULLIVAN, FERNBACH, BROWN u. a. eingeschlagene Weg, die Enzymwirkung aus der Differenz zwischen scheinbarer Wirkung und Ionenwirkung zu erschließen.

Das unregelmäßige Vorkommen und Verschwinden der revertasischen neben der invertasischen Wirkung, wie es KOHL auffiel, bildet nach meinen Erfahrungen kein Mirabile, denn es pflegen die antagonistischen Enzyme (es handelt sich ja keineswegs um ein einziges Enzym) aus dem Zymogen je nach verschiedenen Umständen in ungleichem Verhältnisse zu entstehen. Über diese Seite der Frage wird man eingehende Data in meiner Abhandlung über Revertase finden.

Schließlich muß ich betonen, daß die Umwandlung der invertasischen Wirkung in eine revertasische durch Lichtwirkung in meiner Arbeit über reversible Sekretion bereits und in viel prägnanter Weise festgestellt war als bei KOHL. Ich hatte dieselbe Erscheinung auch beim Erwärmen der Invertaselösung beobachtet. Seitdem habe ich die Sache weiter erforscht und wiederum gefunden, daß es sich um verschiedenartige Aktivierung des scheinbar racemischen Zymogens handelt.

Roma, Juli 1908.

¹⁾ Studien über die Inversion. Zeitschr. f. physik. Chemie, XLI S. 407 (1902).

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft](#)

Jahr/Year: 1908

Band/Volume: [26a](#)

Autor(en)/Author(s): Pantanelli Enrico

Artikel/Article: [Über Pilzrevertase 494-504](#)