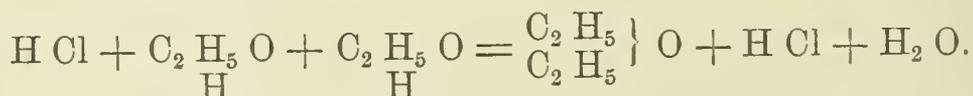
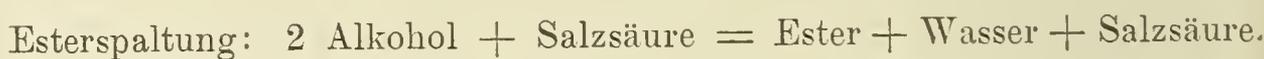


Enzymhydrolysen sah man häufig nicht zu Ende geführt. Man war nunmehr vor die Aufgabe gestellt, nach einer Erklärung für diese „Unvollständigkeit der Enzymwirkungen“ zu suchen. Nach der Ansicht der einen (Tammann, 1892 etc.) sollte die Hydrolyse dadurch zum Stillstande kommen, daß die sich anreichernden Spaltungsprodukte die Enzyme in eine unwirksame Modifikation überführen, nach der Ansicht der anderen (Hill u. A.) dagegen dadurch, daß die Enzyme nach zwei entgegengesetzten Richtungen zu arbeiten imstande sind, und daß der scheinbare Stillstand in der Reaktion eintritt, wenn die hydrolytische Spaltung der enzymatischen Synthese das Gleichgewicht hält. Die Enzyme würden sich nach dieser Auffassung ähnlich verhalten wie die Säure bei der Esterbildung; unter ihrem Einflusse bildet sich unter Wasserabspaltung der Ester, den sie weiter unter Wasseraddition in Alkohol zurückverwandelt. Auch hier tritt Gleichgewicht, Stillstand ein, wenn der eine Teil der Reaktion, die Esterbildung, sich mit derselben Geschwindigkeit vollzieht wie der entgegengesetzte, die Esterspaltung<sup>1)</sup>. Es galt nunmehr, die Existenz einer derartigen rückläufigen Bewegung im Verlaufe der Enzymwirkung experimentell zu beweisen. Daß dazu der Beweis eines Stillstandes der Enzymhydrolyse nicht genügt, ist nach dem Gesagten ohne Weiteres klar, da der Stillstand auch Folge einer Enzymzerstörung sein kann. Es mußte vielmehr darauf ankommen, durch genauen Verfolg des Prozesses Vor- und Rückwärtsschwankungen zu konstatieren oder die Bedingungen so zu gestalten, daß überhaupt zunächst nur die rückläufige Bewegung eintreten konnte. Endlich war es notwendig, die chemische Natur des Produktes der Reversionstätigkeit des Enzyms festzustellen und wünschenswert, die Bedingungen kennen zu lernen, unter welchen die Reversion eintritt und fortschreitet und die Faktoren zu ermitteln, welche den Verlauf des Prozesses regulieren und beherrschen.

Croft Hill<sup>2)</sup> gelang es zuerst (1898) durch Hefemaltase Glukose in Maltose umzuwandeln. Emmerling<sup>3)</sup> fand wenige Jahre später die Amygdalin-Synthese; Kastle und Loevenhart<sup>4)</sup> sahen die Lipase der Tiere Fettsäureester aufbauen, Hill<sup>5)</sup> in einer zweiten



<sup>2)</sup> Croft Hill; Journ. of the chem. Society. Vol. LXXXIII. 1898. p. 534.

<sup>3)</sup> Emmerling, Ber. d. chem. Gesellsch. Bd. XXXIV. 1901. p. 600. Croft Hill, ibid. p. 1380, 1384. Emmerling, ibid. p. 2206—2207.

<sup>4)</sup> Kastle und Loevenhart, Amer. chem. Journ. Vol. XXIV. 1900. p. 491.

<sup>5)</sup> Croft Hill, Proceed. of the chem. Society. Vol. LVII. 1901. p. 184. — Journ. of the chem. Soc. Transactions. 1903. 1. p. 578—98.

Untersuchung die Taka-Diastase Maltose aus Glukose bilden. 1902 wiesen Fischer und Armstrong<sup>1)</sup> nach, daß die Laktase Glukose und Galaktose zu Laktose vereinigt und Cremer<sup>2)</sup>, daß Hefepreßsaft Laevulose zu Glykogen kondensiert. In der Publikation, in der Hill über die Reversibilität der Wirkung der Taka-Diastase Mitteilung macht, stellt er es als wahrscheinlich hin, daß bei der Maltosesynthese gleichzeitig eine Biose entsteht, die er als „Revertose“ bezeichnet. Armstrong<sup>3)</sup> gelang es in einer Untersuchung, die einen wichtigen Beitrag zum Studium der reversiblen Enzymwirkungen darstellt, zu entdecken, daß die Hill'sche Revertose Isomaltose ist, welche aus der  $\beta$ -Glukose, die in der gewöhnlichen Glukose die  $\alpha$ -Glukose begleitet, hervorgeht. Neuerdings haben Visser<sup>4)</sup> und Pantanelli<sup>5)</sup> versucht, die synthetische Wirkung der Invertase wahrscheinlich zu machen. Bei Visser war jedoch die Menge des entstandenen Disaccharids eine so minimale, kaum 1% nach Monaten, daß man einen sicheren Beweis für die Existenz einer Synthese in seinen Experimenten nicht erblicken kann. Auch die Versuche über die Reversionswirkung der Invertase von Pantanelli sind meiner Meinung nach hierzu unzureichend. Es hängt ihnen ein Fehler an, in den ich anfänglich bei meinen diesbezüglichen Untersuchungen ebenfalls geraten war. Er hat nämlich meines Erachtens mit zu stark sauren und alkalischen Lösungen gearbeitet. Durch Säuren sowohl als durch Alkalien werden bekanntlich Glukose und Laevulose zerstört und die Abnahme dieser Hexosen darf unter solchen Umständen nicht ohne weiteres als untrügliches Zeichen einer Reversion gedeutet werden. Es ist unerläßlich, sich bei jedem Einzelversuch oder mehrere Male in jeder Versuchsreihe durch vorgenommene Säurehydrolysierungen davon zu überzeugen, daß der Gesamtzucker (reduzierender + durch Hydrolyse reduzierend gemachter) sich nicht vermindert hat. Mit anderen Worten, es muß durch Säurehydrolyse die Existenz des nicht reduzierenden Zuckers, der Biose ev. der Saccharose quantitativ ermittelt werden. Es ist keineswegs ausreichend, aus der Differenz zwischen der Menge reduzierenden Zuckers vor und nach der Invertasewirkung die Anwesenheit von revertierter Saccharose erschließen zu wollen, denn eine solche Differenz würde auch vorhanden sein, wenn der reduzierende Zucker zum Teil zerstört worden wäre. Und eine solche partielle Zerstörung ist in den Pantanelli'schen Versuchen nicht nur nicht ausgeschlossen, sondern vielmehr sehr wahrscheinlich. Laevulose und Glukose werden, das ist erwiesen, sowohl von Säuren als auch von Alkalien angegriffen, die Laevulose bei erhöhter Temperatur leichter als die Glukose

<sup>1)</sup> Fischer, C. und Armstrong, E. F., Ber. d. chem. Ges. XXXV. 1902. p. 3144—3153. Armstrong, Chem. News. Vol. LXXXVI. 1902. p. 166—67.

<sup>2)</sup> Cremer, Ber. d. chem. Ges. Bd. XXXII. 1899. p. 2062.

<sup>3)</sup> Armstrong, E. F., Proceed. Royal Society. Ser. B. T. LXXVI. n<sup>o</sup>. B. 513. nov. 1905. p. 592—99.

<sup>4)</sup> Visser, Zeitschr. f. phys. Chem. Bd. LII. 1905. p. 257—309.

<sup>5)</sup> Pantanelli, E., Rendiconti della R. Accad. dei Lincei. Vol. XV. 1<sup>o</sup> sem. ser. 5<sup>a</sup>. fasc. 10<sup>o</sup>. 20 maggio. 1906.

unter Bildung von Ameisensäure, Laevulinsäure etc. Es entstehen dabei durch Alkohol fällbare Substanzen, deren Drehungsvermögen etwa nur die Hälfte von dem der Laevulose, deren Reduktionskraft sogar nur ein Drittel von der der Laevulose ausmacht. Laevulose geht bei Gegenwart von Kalk schon bei gewöhnlicher Temperatur in Saccharin, Glukosaccharin etc. über. In Berührung mit Alkalien entstehen aus Glukose ebenfalls schon bei Zimmertemperatur Mannose, Laevulose, Glukose etc., und wenn die Glukose auch verdünnten Säuren gegenüber resistenter ist als die Laevulose, so spielen sich doch sicher unter dem Einflusse von Säuren ebenfalls langsam Veränderungen ab, es entstehen Isomaltose, Dextrine etc., ganz abgesehen davon, daß gleichzeitig auch eine Reversion durch Säure, wie sie nachgewiesen ist, eine Enzymreversion vortäuschen kann. Bei dieser Lage der Dinge wird es gewagt erscheinen, aus einer Abnahme der Menge reduzierenden Zuckers auf eine Reversion desselben schließen zu wollen. Bei den grundlegenden Versuchen wird man sich vielmehr ausschließlich neutraler Lösungen bedienen müssen. Unter Berücksichtigung dieser Vorsichtsmaßregeln ist es mir bei meinen seit längerer Zeit betriebenen Studien über die Hefeenzyme, die ich im chemisch-biologischen Laboratorium des Institut Pasteur zu Paris fortzusetzen Gelegenheit hatte, gelungen, die Reversion der Invertasewirkung, mit anderen Worten die Saccharosesynthese, durch Hefeinvertase aufzufinden. Ausführlich werde ich über meine diesbezüglichen Arbeiten an anderer Stelle unter Beibringung eines reichen Zahlenmaterials berichten, hier sei nur ein Teil meiner Resultate in Kürze und unter ausdrücklichem Hinweis auf den ausführlichen Bericht mitgeteilt.

Ich benutze mit Freuden die Gelegenheit, den Herren, welchen ich die Aufnahme in das weltberühmte Institut und die denkbar liberalste Gewährung aller zu meinen Untersuchungen erforderlichen Hilfsmittel verdanke, in erster Linie den Herren Roux und Metchnikoff, sowie dem Leiter des chemisch-biologischen Laboratoriums, Herrn G. Bertrand, der mich mit seinem wertvollen Rate bei meinen speziellen Untersuchungen in liebenswürdigster Weise unterstützte, meinen verbindlichsten Dank zum Ausdruck zu bringen.

In geeigneter Weise<sup>1)</sup> hergestellte Hefeextrakte wurden auf ihren Enzymgehalt genau untersucht und von ihnen diejenigen be-

<sup>1)</sup> Die Invertase-Auszüge aus der Hefe wurden nach zwei verschiedenen Methoden gewonnen. I. Ein Teil Hefe wird in zwei Teilen Glyzerin verteilt, zwei bis drei Tage unter öfterem Umschütteln digeriert und durch Papier und sodann durch Porzellan filtriert: Glyzerinextrakt ( $\alpha$ ). II. Ein Teil Hefe wird in der 4—5fachen Menge Alkohols  $\frac{1}{2}$ —1 Stunde belassen, filtriert, und diese Behandlung 2—3 mal wiederholt. Dann wird die Hefe abgepreßt und rasch an der Luft getrocknet. Das erhaltene Hefepulver wird in der 5—10fachen Menge Chloroformwasser mit  $\frac{1}{2}$  0/0 Guajacol während 1—2 Stunden verteilt gelassen und dann durch Papier und Chamberlandkerzen filtriert: Chloroformwasserextrakt ( $\beta$ ). Die beiden Extrakte enthalten in verschiedener Menge Amylase, Inulase, Glykogenase, Trypsin, Invertase. An Invertase sind beide Extrakte reich,  $\alpha$  enthält viel Amylase,  $\beta$  sehr wenig; auch der Glykogenasegehalt scheint bei  $\alpha$  größer als bei  $\beta$  zu sein. Über den Maltasegehalt folgen später ausführliche Mitteilungen.

nutzt, bei denen Versuche ein bedeutendes Überwiegen der Invertase erkennen ließen. Ließ ich diese Invertaselösungen, von welchen ich die in Glyzerin ganz besonders invertasereich fand, auf Saccharoselösungen von bekannter Konzentration bei konstanter Temperatur im Dunkeln und bei Ausschaltung jedweder Bakterien-Infektion durch Thymol, Chloroform etc. einwirken, so zeigten in bestimmten Zwischenräumen vorgenommene titrimetrische Bestimmungen des Invertzuckers nach der überaus empfindlichen Methode von G. Bertrand<sup>1)</sup>, die man wohl als die zuverlässigste unter den jetzt gebräuchlichen bezeichnen darf, meist zunächst eine regelmäßige, stetige Zunahme an Invertzucker, nach etwa 20—24 Stunden (die Zeit ist nach Konzentrationsverhältnissen und bei verschiedenen Temperaturen verschieden) aber häufig ein Stillstehen oder ein Vor- und Rückwärtsschreiten der Enzymwirkung. Die anfangs gleichmäßig fortschreitende Inversion macht einer periodisch wiederkehrenden Reversion Platz. Die jeweils gefundene Invertzuckermenge stellt die Resultante aus den Wirkungen der beiden entgegengesetzt verlaufenden Prozesse, der Inversion und der Reversion, dar. Da in vielen meiner Versuchsreihen die Reaktion sich nach scheinbarem Stillstand oder deutlichem Rückgange im hydrolytischen Sinne fortsetzte, kann von einem Aufhören der Enzymwirkung infolge Unwirksamwerdens der Invertase nicht wohl die Rede sein. Der Tammann'schen Auffassung ist damit sicher wenigstens für die Invertasewirkung der Boden entzogen. Trat in der Reaktion Umkehrung ein, so verriet sie sich durch Abnahme des Invertzuckergehalts der Versuchsflüssigkeit, d. h. durch Abnahme des Reduktionsvermögens in Fehling'scher Lösung.

Die Kupferreduktion ist bekanntlich bedingt durch die Anwesenheit von Aldehydgruppen im Zuckermolekül. Es konnte nun entweder die Glukose des Invertzuckers in Maltose (resp. Isomaltose) übergeführt werden, indem unter Wasserabgabe aus zwei Molekülen Glukose ein Molekül Maltose entsteht; dabei verschwindet eine der Aldehydgruppen, was eine Herabminderung des Kupferreduktionsvermögens im Gefolge hat; oder aber es konnte Saccharose unter Wasserabgabe aus Invertzucker entstehen, wobei die Aldehydgruppe der Glukose verschwindet; die mit der Glukose zusammentretende Laevulose enthält an Stelle der Aldehydgruppe die Ketongruppe  $C=O$ , und es ist klar, daß bei einer Maltosebildung das Reduktionsvermögen der Lösung vorübergehend niemals total verschwinden kann, und daß ein vollständiges Ausbleiben der Kupferreduktion ein strikter Beweis einmal für das vollständige Verschwinden der Glukose und zweitens für die Bildung eines überhaupt nicht reduzierenden Zuckers, also hier von Saccharose sein muß. Ich führe hier einen Versuch an, in dem sich eine derartige totale Reversion abspielte:

**Versuch I.** Begonnen am 19. Juli 1907. Temperatur = 20° C. Zu jeder Zuckerbestimmung wurden 5 cc einer 10%-Saccharose-

<sup>1)</sup> Bertrand, G., Le dosage des sucres réducteurs. (Bull. des Sciences pharmacologiques n°. 1. Janvier 1907.)

lösung benutzt, zu der 1 cc Glycerininvertase und etwas Thymol zugefügt waren.

Zeit der Invertasewirkung in Stunden (obere Ziffernreihe):												
Prozentgehalt an redivierendem Zucker in 5 cc-Lösung (untere Ziffernreihe):												
1	2	4	6	14	16	17	18	23	24	38 <sup>15</sup>	38 <sup>40</sup>	
4,6(2)	5,2(2)	14,2(2)	22,1(2)	32,0	40,2(2)	50,0	26,4	27,0	0.0.1,1	2,4	44,2	38,2

(250 grm oxalsaures Ammoniak gebrauchen 24,7 cc K Mn O<sub>4</sub>-Lösung. Titer der Kaliumpermanganatlösung 0,906. Die eingeklammerten Zahlen bedeuten, daß mehrere Titrationsen vorgenommen wurden.)

Bis zur siebzehnten Stunde stieg die Inversion des Rohrzuckers bis zu 50,1 %; nach Verlauf von 18 Stunden war bereits die Hälfte des Invertzuckers wieder revertiert; nach 24 Stunden war der Invertzucker in zwei Proben beinahe ganz, in zwei anderen total verschwunden. Nach 38 Stunden ungefähr waren bereits wieder 44,2 % reduzierender Zucker vorhanden. Gleichzeitig entnommene Proben wurden durch 25 Minuten langes Kochen mit Salzsäure hydrolysiert. Nach vollständiger Abkühlung wurde mit Natriumkarbonat neutralisiert, und nach 3 Minuten langem Kochen mit Fehling das reduzierte Kupfer durch Titration mit der Lösung von übermangansaurem Kali von bekanntem Titer bestimmt. In allen Fällen wurde die ursprüngliche Zuckermenge wiedergefunden.

Bei einem ähnlichen Versuch, der bei etwas höherer Temperatur angestellt wurde, begann die Reversion nach 26 Stunden 15 Minuten und betrug nach 49 Stunden 35 Minuten 8,2 %, wurde aber in der Zwischenzeit durch eine schwache Inversion unterbrochen:

**Versuch II.** Begonnen am 28. August 1907 11 Uhr 45 Min. vorm. Dunkelkammer. Temperatur = 26° C.

Zu je 10 cc einer fünfprozentigen Saccharoselösung war je 1 cc Glycerininvertase und Thymol zugefügt.

Zeit der Invertasewirkung in Stunden (erste Ziffernreihe):									
Prozentgehalt an reduzierendem Zucker in 10 cc-Lösung (zweite Ziffernreihe):									
21 <sup>15</sup>	22 <sup>15</sup>	23 <sup>15</sup>	24 <sup>15</sup>	26 <sup>15</sup>	27 <sup>15</sup>	29 <sup>15</sup>	30 <sup>15</sup>	47 <sup>35</sup>	49 <sup>35</sup>
42,2	52,0	53,8	58,0	58,8	58,0	54,8	55,0	56,8	50,6
0,8 % rev. 3,2 % rev. 0,2 % inv. 1,8 % inv. 6,2 % rev.									

(Titer der Kaliumpermanganatlösung 0,8476.)

Ganz ähnlich verlief unter abwechselnder Inversion und Reversion nach Verlauf von 29 Stunden 30 Minuten der Prozeß bei Anwendung einer nach der Methode  $\beta$  hergestellten Invertaselösung, wie folgende Zahlen darlegen:

**Versuch III.** Begonnen am 24. August 1907. 10 Uhr 30 Min. vorm. Temperatur = 26° C. Auf 5 cc 10 % Saccharoselösung wurde zugefügt 1 cc Invertaselösung. Da letztere chloroformhaltig war, wurde Thymol nicht zugesetzt. Das Chloroform muß selbst-

verständlich, da es Fehling'sche Lösung reduziert, vor der Kupferreduktion entfernt werden.

Zeit der Invertasewirkung in Stunden (erste Ziffernreihe):  
 Prozentgehalt an reduzierendem Zucker (zweite Ziffernreihe):

29 <sup>30</sup>	30 <sup>30</sup>	31 <sup>30</sup>	32 <sup>30</sup>	33 <sup>30</sup>	49 <sup>15</sup>	51 <sup>40</sup>	54 <sup>50</sup>
23	20,4	24,8	35,0	44,0	39,8	36,4	37,0
2,6 % rev. 4,4 % inv. 10,2 % inv. 9,0 % inv. 4,2 % rev. 3,4 % rev. 0,6 % inv.							

(Titer der Kaliumpermanganatlösung 1—4 = 0,9060; 5—8 = 0,9401.)

Woher es kommt, daß bei einzelnen Versuchen die Reversion ausbleibt oder erst sehr spät einsetzt, soll hier vorläufig noch nicht erörtert werden, da meine Untersuchungen über die Abhängigkeit der Enzymwirkung von äußeren Verhältnissen, von der Konzentration der angewandten Zuckerlösung etc. noch im Gange sind; ich möchte jedoch auch hierfür ein Beispiel genauer anführen.

**Versuch IV.** Begonnen am 1. Oktober 1907. Temperatur = 35° C. 10 gm Saccharose gelöst in 100 cc destilliertem Wasser und 10 cc Glycerininvertase ( $\alpha$ ). Dunkelzimmer. (Titer der Kaliumpermanganatlösung = 1,032.)

Zeit der Invertasewirkung in Stunden (obere Ziffernreihe):  
 Prozentgehalt an reduzierendem Zucker (untere Ziffernreihe):

0	1	2	3	18	20	23	25	27	41	43	48	50	69	73	75
0	7,5	10,2	14,5	51,0	55,0	60,0	59,3	60,0	71,8	78,2	80,4	82,0	90,0	90,8	92,2
rev.															

Hier schreitet, wie man sieht, die Inversion stetig fort, nur nach Verlauf von 23 Stunden ist eine minimale Reversion zu konstatieren, die jedoch nach weiteren zwei Stunden wieder ausgeglichen ist. Nach Verlauf von 1, 2, 21 und 75 Stunden wurde hydrolysiert und stets derselbe Wert erhalten, der = 100 gesetzt wurde (14,9—15,1 cc Kaliumpermanganatlösung) und mit dem bei Beginn des Versuches erhaltenen genau übereinstimmt.

Bei weiteren Versuchen wurde von Invertzucker ausgegangen, hergestellt durch Hydrolyse von Saccharose mit Schwefelsäure. Auf je 5 gm Saccharose wandte ich 50 cc zweiprozentige Schwefelsäure an und erhitzte 30 Minuten lang auf 100° C. Nach dem Erkalten wurde mit Baryumkarbonat gegen Methylorange neutralisiert und filtriert.

**Versuch V.** Begonnen am 7. Oktober 1907. T = 19° C., 60 cc Invertzuckerlösung (1 cc = 70,6 mgr Invertzucker) und 40 cc Glycerininvertase und Chloroform. (Titer der Permanganatlösung = 1,032.)

Dauer der Invertasewirkung in Stunden (obere Ziffernreihe):  
 Menge reduzierenden Zuckers in milligr (untere Ziffernreihe):

0	1	2	3	6	7	8	9	15 <sup>15</sup>	16 <sup>30</sup>	18	22 <sup>15</sup>	24 <sup>30</sup>
70,6	72,3	73,8	69,2	69,9	64,2	69,2	67,3	68,5	70,6	71,8	68,5	69,9

Aus diesen Worten geht deutlich hervor, daß während der ersten zwei Stunden noch vorhandener Rohrzucker invertiert wurde, wogegen von da ab bis nach Ablauf der siebenten Stunde 13,0 % des erreichten Maximalgehaltes an Invertzucker revertiert wurde; von da ab bis zum Abschlusse des Versuches nach 24 Stunden 30 Minuten wurde mit kleinen Schwankungen in reversivem Sinne im Wesentlichen invertiert.

In ganz analoger Weise verliefen weitere Versuche mit neutralen Invertzuckerlösungen, bei denen nur die Konzentration der Invertase herabgemindert wurde. Ich greife noch einen derselben heraus, der deutlich erkennen läßt, daß bei so geringen Invertasemengen die Enzymwirkung nur anfänglich flott verläuft, nach einem Tage aber bereits äußerst träge zu werden beginnt.

**Versuch VI.** Begonnen am 11. Oktober 1907. 10 Uhr 45 Min. vorm. Temperatur = 19° C. Dunkelzimmer. 20 grm Saccharose + 200 cc aq. dest. + 4 cc H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 25 Minuten hydrolysiert, mit Baryumkarbonat neutralisiert und filtriert, von dieser Lösung wurden 100 cc mit 10 cc  $\alpha$  und etwas Chloroform versetzt. (Titer der Permanganatlösung = 0,9857.)

Dauer der Invertasewirkung in Stunden (erste Ziffernreihe):							
Menge des reduzierenden Zuckers in milligr (zweite Ziffernreihe):							
0	4 <sup>15</sup>	6	22 <sup>15</sup>	24 <sup>15</sup>	30 <sup>15</sup>	53 <sup>15</sup>	185 <sup>45</sup>
92,9	91,0	84,1	82,1	84,5	82,1	82,6	84,1
→			→		→		→
Reversion von 11,6 %			Inversion von 2,5 %		Reversion von 2,5 %		Inversion von 2,1 %

Hier waren also nach 22 Stunden 15 Minuten 11,6 % des ursprünglich vorhandenen Invertzuckers revertiert, dann wechselten schwache Inversionen mit ebensolchen Reversionen ab. Nach ca. drei Tagen wurde der Versuch abgebrochen.

Diese sehr beschränkte Auswahl aus meinen Versuchsprotokollen möge vorläufig genügen, um zu zeigen, daß es mir unter Anwendung neutraler Lösungen gelungen ist, die Befähigung der Hefe-Invertase, aus Invertzucker Saccharose aufzubauen, einwurfsfrei zu beweisen. Ich wiederhole, daß gegen alle bisherigen Versuche, die Reversibilität der Invertasewirkung zu beweisen, der Einwurf geltend gemacht werden durfte, daß die vorhandenen Säuren oder Alkalien nicht nur die gegen beide überaus empfindlichen Enzyme, sondern auch einen Teil des reduzierenden Zuckers zerstört haben konnten, und daß die beim Kochen mit Fehling'scher Lösung zutage tretende Verminderung der Quantität des reduzierenden Zuckers irrtümlich als durch Reversion hervorgerufen angesehen wurde; daß es ferner unterlassen worden war, durch von Zeit zu Zeit vorgenommene Säurehydrolyse den Gesamtzuckergehalt der Versuchslösung zu bestimmen. Pantanelli wandte bis 5,6 cc  $\frac{1}{10}$  N. Salzsäure und bis 16,2 cc  $\frac{1}{10}$  N. Natron-

lauge an, Konzentrationen, bei denen sicherlich, besonders bei höheren Temperaturen, eine vollständige Zerstörung des Enzyms und eine teilweise des Invertzuckers erfolgen mußte. Wir wissen, daß sehr kleine Säuremengen die Invertasewirkung in bemerkenswerter Weise beschleunigen, als günstigsten Maximalzusatz fanden O'Sullivan und Tompson 0,00025 Schwefelsäure, eine Zugabe von Säure, die ungeheuer viel kleiner ist als die von Pantanelli angewandte; dasselbe gilt in noch höherem Grade von den Alkalien, die selbst in kleinster Menge auf pflanzliche Invertase sofort und dauernd zerstörend wirkt. Aus diesem Grunde habe ich stets ganz besondere Aufmerksamkeit darauf verwendet, alle Versuchslösungen aufs Genaueste zu neutralisieren und erst dann, wenn der Gang der Inversion und Reversion unter diesen Umständen festgelegt war, wurde zum Studium des Einflusses äußerst geringer Quantitäten von Säuren und Alkalien geschritten. Die letzteren Untersuchungen sind noch im Gange, ebenso die über den Einfluß der Temperatur und des Lichtes auf die Invertase und den Verlauf ihrer hydrolytischen oder synthetischen Tätigkeit, weshalb ich über die diesbezüglichen Ergebnisse später Mitteilung machen werde.

Nur was den Lichteinfluß auf die Invertasewirkung anlangt, möchte ich hier auf einige Beziehungen hinweisen, die sich aus den von mir erhaltenen Werten schon jetzt erkennen lassen.

Der hemmende Einfluß des zerstreuten Tageslichtes auf die Inversion der Saccharose ist sehr deutlich sichtbar und wahrscheinlich auf eine partielle Zerstörung des Enzyms durch das Licht zurückzuführen. Bisher wurde ein ähnlicher schädigender Einfluß des Lichtes nur für die Diastase nachgewiesen (Green, Brown und Morris). Hier bei der Invertase gelang es mir nun nicht nur zu beobachten, daß im Dunkeln die Inversion bedeutend schneller vorwärts schreitet wie im Lichte, sondern auch, daß sie früher einer Reversion Platz macht, wie nebenstehendes Versuchsprotokoll vorläufig illustrieren mag.

**Versuch L.** Begonnen am 29. Oktober 1907 3 Uhr 30 Min. nachm. Temperatur = 19° C. — 100 cc neutraler Invertzuckerlösung + 100 cc Glyzerininvertase + Chloroform. (Titer der Permanganatlösung = 0,9857.)

Dauer der Invertasewirkung:	Menge reduzierenden Zuckers in milligr	
	im zerstreuten Licht:	im Dunkeln:
30 Min.	75,4	75,4
24 Std.	76,0 = + 0,6 invertiert.	81,6 = + 6,2 invertiert.
48 ..	82,1 = + 6,7 ..	85,2 = + 9,8 ..
72 „	84,6 = + 9,2 ..	82,1 = - 3,1 revertiert.
96 „	82,1 = - 2,5 revertiert.	86,0 = + 3,9 invertiert.

Im Dunkelversuch erreicht die Inversion bereits nach 48 Stunden einen höheren Wert, als im Lichtversuch nach 72 Stunden.

Im Dunkelversuch beginnt die Reversion schon nach 72 Stunden energisch, während sie im Lichtversuch erst nach 96 Stunden einsetzt.

Von den Substanzen, welche man als sehr aktive Beschleuniger der Diastasehydrolyse bisher kennen gelernt hat (Calciumphosphat 0,5 %, Ammoniakalaun 0,25 %, essigsäure Tonerde 0,25 % und Asparagin 0,05 %), habe ich zunächst aus hier nicht zu erörternden Gründen das Asparagin auf seinen Einfluß auf die Invertasehydrolyse geprüft. Eine Dosis von 0,05 % erwies sich als nicht beschleunigend.

**Versuch VII.** Begonnen am 9. Oktober 1907 5 Uhr 30 Min. nachm. Temperatur = 35° C. 200 cc. 20 % Saccharoselösung + 50 cc. Invertaselösung + Chloroform.

Zeit der Invertasewirkung (in Stunden):	1.	2.	3.	4.	Differenz zwischen 1. u. 4.
verbrauchte cc Permanganat- lösung:	16 <sup>20</sup>	21 <sup>30</sup>	24 <sup>30</sup>	40 <sup>15</sup>	
ohne Asparagin	9,9	11,2	12,4	14,3	4,4
mit Asparagin	10,0	11,7	12,6	14,6	4,6
	Diff. 0,1	0,5	0,2	0,3	0,2

Da 0,2 cc noch im Bereich der Beobachtungsfehler liegen, kann von einem beschleunigenden Einflusse des Asparagins nicht wohl gesprochen werden.

Daß mein Hefeglyzerinextrakt auch Maltase enthielt, mußte ich aus der Tatsache folgern, daß dasselbe den Zuckergehalt einer reinen Glukoselösung von bestimmter Konzentration stets sofort verminderte, um ihn alsdann wieder zu vergrößern. Die Maltase arbeitet also anfangs synthetisch, indem sie Glukose zu Maltose (resp. Isomaltose) kondensiert, um sodann wieder wechselnde Mengen der letzteren in Glukose zu spalten, was mit einer Vermehrung des Gehaltes an reduzierendem Zucker verbunden ist. Auch bei diesen Experimenten wurde durch mehrfache Säurehydrolysierungen der jeweilige Gesamtzuckergehalt festgestellt. Wurde mit vollkommen zellfreiem Extrakt gearbeitet, so blieb letzterer während des ganzen Versuches nahezu derselbe. Waren dagegen einzelne Hefezellen im Extrakt verblieben, was im Anfang meiner Arbeiten einige Male der Fall war, ehe ich das Extrakt stets vor dem Versuche durch sterilisierte Porzellanfilter passieren ließ, so wurde der Gesamtzuckergehalt im Laufe des einzelnen Versuches durch schwache Gärung langsam etwas vermindert, wie z. B. in folgendem Versuche:

**Versuch VIII.** Begonnen am 17. September 1907. 16,639 grm Glukose gelöst in 100 cc destillierten Wassers + 5 cc Glycerinhefeextrakt (a) + Chloroform. T = 26° C. Titer der Permanganatlösung = 10,020.

Zeit der Maltasewirkung in Stunden (erste Ziffernreihe):

Reduzierender Zucker in milligr (zweite Ziffernreihe):

0	1/2	1 <sup>45</sup>	2 <sup>45</sup>	19
170	161	156	159	151
(2)	= 8,23 % revertiert		= 11,17 % revertiert	

[ 19 hydrolysiert 165 ]	24 <sup>30</sup>	24 <sup>30</sup>	[ 26 <sup>30</sup> hydrolysiert 164 ]	39	40	[ 40 hydrolysiert 163 ]
	164	163		161	163	

Infolge schwacher Gärung verminderte sich also hier der Gesamtzucker von 165 auf 163.

Bei anderen Versuchen mit durch Chamberland-Kerzen filtriertem Extrakte fiel der Verlust an Gesamtzucker weg. Die Reversion erreichte nicht selten die Höhe von 25 % und mehr % wie z. B. in folgendem Versuche:

**Versuch IX.** Begonnen am 10. September 1907 10 Uhr 15 Min. vorm. 18,703 grm Glukose (95,7 %) gelöst in destilliertem Wasser + 5 cc Glyzerinextrakt ( $\alpha$ ) auf 100 cc ergänzt und mit Thymol versetzt. Temperatur = 26 ° C. (Titer der Permanganatlösung = 10,092.)

	1.	2.	3.	4.	5.
Dauer der Enzymwirkung (in Stunden):	24 <sup>45</sup>	28 <sup>45</sup>	46 <sup>30</sup>	52 <sup>15</sup>	69 <sup>45</sup>
Reduzierender Zucker in % der ursprünglichen Menge:	65,2 %	86,8 %	83,1 %	85,6 %	89,5 %
Menge des reduzierenden Zuckers nach Säurehydrolyse:	90,9 %	88,7 %	89,4 %	89,8 %	91,1 %

Es wurden also bei	1	25,7 %	} revertiert.
" " " "	2	1,9 %	
" " " "	3	6,3 %	
" " " "	4	4,2 %	
" " " "	5	1,6 %	

Nehmen wir mit Armstrong in der Glukose die Anwesenheit von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Glukose an, so werden wir im Kondensationsprodukt Maltose und Isomaltose erwarten dürfen, die man nach rationeller Anwendung von maltasefreier Hefe (*Saccharomyces Marxianus*) und Maltasehefe (*Sacch.-intermedians*) getrennt als Osazone nachweisen kann. Jedenfalls ist durch meine Versuche die Befähigung der Hefemaltase, Glukose zu Maltose zu revertieren, sicher nachgewiesen, und zwar, worauf ganz besonders aufmerksam gemacht sei, in viel kürzerer Zeit und in stärkerem Maße als in den bisher vorliegenden Versuchen.

Unsere Anschauung von der primären Bildung von Kohlehydraten im assimilierenden Pflanzenblatte haben bekanntlich Brown und Morris neuerdings wesentlich zu modifizieren versucht. Sie nehmen aufgrund sorgfältiger Zuckerbestimmungen in

Blättern vor und nach der Belichtung an, daß auf assimilatorischem Wege zunächst nicht Hexosen (Glukose, Laevulose), sondern Biosen (Saccharose, Maltose) entstehen, die alsdann durch enzymatische Spaltungen Glukose und Laevulose, kurz zur Plasmaernährung und zu sonstigem Verbräuche geeignete Hexosen liefern. Die in den Chloroplasten erscheinende Stärke ist immer das Symptom einer Kohlehydratüberproduktion und also Reservekohlehydrat. Es zeigten sich im Allgemeinen folgende Kohlehydratwandlungen im Blatt:

1. Am Morgen ist der Gehalt an Stärke, Rohrzucker und Maltose gering, Glukose und Laevulose aber haben sich angesammelt. In abgeschnittenen Blättern nimmt nach längerer Verdunkelung der Gehalt an Glukose und Laevulose zu.
2. Infolge der Assimilation am Lichte steigt der Gehalt an Stärke, Rohrzucker, Laevulose und Glukose, wenn die Stoffableitung durch den Blattstiel verhindert ist.
3. Bei ermöglichter Ableitung vermindern sich während der Assimilation im Lichte Glukose, Laevulose und Rohrzucker, Stärke und vor allem Maltose dagegen nehmen zu.

Wie haben wir uns diese Wandlungen vorzustellen? Wenn Glukose und Laevulose in der Dunkelheit zunehmen, so geschieht dies durch die enzymatische Spaltung des Rohrzuckers; gleichzeitig aber wird ein Teil der Stärke durch Diastase in Maltose umgewandelt, diese aber durch Maltase in Glukose gespalten und zum Teil veratmet.

Im Lichte werden Glukose und Laevulose nach ihrer Entstehung zum Teil zu Rohrzucker kondensiert, zum Teil gespeichert, wenn die Ableitung unmöglich ist, verschwinden aber fast ganz, wenn das Gegenteil der Fall ist.

Um eine auf den ersten Blick ganz unverständliche Erscheinung handelt es sich, wenn wir die Maltose in abgeschnittenen Blättern nach lebhafter Assimilation abnehmen, in an der Pflanze belassenen dagegen sich in ansehnlicher Weise vermehren sehen. Vermutlich wird sie im abgeschnittenen Blatte in Glukose gespalten, wogegen sich in den an der Pflanze verbleibenden Blättern die Konzentrationsverhältnisse so gestalten, daß nicht nur aus dem Stärkeabbau Maltose resultiert, sondern auch eine Maltose-synthese aus Glukose sich vollzieht. Im Dunkeln aber wird die aus der Stärke gebildete Maltose bei unterbrochener Ableitung in Glukose gespalten. Im Lichte erleidet im abgeschnittenen Blatte die Maltose hydrolytische Spaltung, im an der Pflanze festsitzenden Blatte findet Maltosereversion statt; im Dunkeln wird Maltose hydrolysiert.

Diastase, Invertase und Maltase sind hiernach im Blatte fortwährend tätig, die Kohlenhydratumwandlungen zu bewerkstelligen. Die Invertase scheint vorwiegend synthetisch zu arbeiten bei abgeschnittener Abfuhr, hydrolysierend bei gestatteter Ableitung; die Maltose gerade umgekehrt synthetisch

bei gestatteter Ableitung, hydrolysierend bei abgeschnittener Abfuhr.

Diese Vorgänge hat man bisher nur zum geringen Teil als im Blatte sich abspielend nachweisen können. Über den diastatischen Abbau der Stärke sind wir zwar im Einzelnen noch längst nicht im Klaren, aber wir wissen, daß er sich unter dem Einflusse der Amylase jedenfalls unter Bildung von Maltose und Dextrinen als Endprodukten vollzieht. Äußerst mangelhaft sind unsere Kenntnisse über Invertase. Brown und Morris<sup>1)</sup> und Kosmann<sup>2)</sup> fanden sie in Blättern, aber genauere Untersuchungen über ihre zweifellos auch im Blatte, sowohl nach der synthetischen wie nach der hydrolysierenden Seite entfaltete Tätigkeit fehlen noch gänzlich. Die Maltase endlich wurde bis heute in Blättern überhaupt noch nicht gefunden. Es klafft hier eine fühlbare Lücke im Bestande unserer Erfahrungen. Die aus dem hydrolytischen Abbau der Stärke durch die Amylase resultierende Maltose muß weiter abgebaut werden, da sie als Disacharid für weitere Verwendung im Haushalt der Pflanze wenig geeignet ist; die vermutlich zunächst zu Hexosen kondensierten ersten Produkte der Assimilation müssen in Maltose und Stärke umgewandelt werden; für beide Vorgänge ist das vorläufig hypothetische Agens die Maltase, und doch wissen wir über sie, soweit es sich um ihr Vorkommen im grünen Pflanzenblatte handelt, so viel wie Nichts. Es wird daher als hinreichend begründet erscheinen, wenn ich mich im Anschlusse an die bereits hier mitgeteilten Untersuchungen über die Reversion der Wirkung der Hefeinvertase und Hefemaltase weiter der Erforschung der Blattinvertase und Blattmaltase zugewandt und an der klassischen Stätte, von der bereits so gewichtige Beiträge zur Kenntnis der Enzyme ausgegangen sind, die Bearbeitung dieses für die Pflanzenphysiologie so überaus bedeutungsvollen Gegenstandes in Angriff genommen habe. Es wird der Bericht über die von mir erhaltenen diesbezüglichen Resultate den Inhalt weiterer Publikationen bilden.

Paris, Institut Pasteur,  
im November 1907.

---

<sup>1)</sup> Brown und Morris, A contribution to the chemistry and physiologie of foliage leaves. (Journal Chem. Soc. Trans. 1893. 604.)

<sup>2)</sup> Kosmann, Recherches chimiques sur les ferments contenus dans les végétaux. (Bull. de la Soc. chim. de Paris. XXVII. 1877. 257.)

# ZOBODAT - [www.zobodat.at](http://www.zobodat.at)

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Botanisches Centralblatt](#)

Jahr/Year: 1908

Band/Volume: [BH\\_23\\_1](#)

Autor(en)/Author(s): Kohl Friedrich Georg

Artikel/Article: [Über die Reversibilität der Enzymwirkungen etc. 64-64](#)