

STUDIEN ÜBER DIE ENZYMATISCHEN SPALTUNG VON GALAKTOSIDEN (III)*

Von

Kazutosi NISIZAWA. D. Sc.**

Mit 42 Figuren und 155 Tabellen

Inhaltsübersicht

Vorbemerkung	Seite 1 (213)
I. Weiteres über das Verhalten von β -Galaktosidasen verschiedener Herkunft gegenüber den β -d-Galaktosiden mit verschiedenen Aglykonen.	2 (214)
II. Hemmungsversuche mit Zuckern und ihren Derivaten.	13 (225)
III. Fraktionierungsversuche an einigen β -Galaktosidasepräparaten verschiedener Herkunft. Ein Beitrag zur Frage der Glykosi- dase-typen.	19 (231)
IV. Spezifität der β -Galaktosidasen von Hepatopankreas der Schnecke, <i>Eulota peliomphala</i>	39 (249)
V. Affinität der β -Galaktosidasen verschiedener Herkunft zu einigen β -Galaktosiden mit verschiedenen Aglykonen.	48 (260)
Literaturen	73 (285)

Vorbemerkung

Die vorliegenden Mitteilungen stellen im wesentlichen eine Fortsetzung derjenigen dar, welche im Jahre 1942 in "Science Reports of Tokyo Bunrika Daigaku" als I und II Mitteilung¹⁵⁾¹⁶⁾ veröffentlicht wurden. Die Versuchsergebnisse, die damals wegen Weltkriegs II noch unveröffentlicht blieben, liegen zusammen mit den danach erhaltenen in diesen Mitteilungen vor. Sie wurden an "Symposia on Enzyme Chemistry" in Tokyo am 30. Oktober, 1948 vortragen.

An dieser Stelle erlaube ich mir, meinem verehrten Lehrer Herrn Prof. Dr.

* Aus dem Chemischen Laboratorium der Textil- und Seidenbauwissenschaftlichen Fakultät an der Universität Shinshu.

** Professor an der Universität Shinshu.

T. Miwa an der Tokyo Universität für Literatur und Wissenschaft (Tokyo Bunrika Daigaku), für die freundliche Leitung und eifrige Anteilnahme zu dieser Arbeit meinen herzlichsten Dank auszusprechen. Auch der Textil-Fakultät zu Ueda und besonders dem Institut für Textilchemie derselben bin ich für die gütige Unterstützung zu Dank verbunden.

I. Weiteres über das Verhalten von β -Galaktosidasen verschiedener Herkunft gegenüber den β -d-Galaktosiden mit verschiedenen Aglykonen.

Es ist von T. Miwa⁸⁾⁹⁾ und Mitarbeitern gezeigt worden, dass das Aktivitätsverhältnis, das die aus verschiedener Quellen gewonnenen Fermentpräparate gegenüber den β -d-Glucosiden mit verschiedenen Aglykonen ergeben, je nach der Fermentherkunft mehr oder weniger stark schwankt. Als Ursache hierfür ist in erster Linie die Verschiedenheit in der Struktur jeder β -Glucosidase in Betracht gezogen worden.

Bezüglich der β -Galaktosidase¹⁵⁾ verschiedener Herkunft erwies sich das Aktivitätsverhältnis jeden präparates gegenüber β -d-Galaktosiden von Phenol, o- und p-kresol sowie Vanillin zumeist als nicht so erheblich schwankend wie bei der β -Glucosidase, wobei die Fermentpräparate aus *Prunus*- und *Cycas*-Samen die Ausnahme darstellten.

In der vorliegenden Arbeit, wurde nun versucht, zu prüfen, ob derselbe Sachverhalt auch bei den anderen β -d-Galaktosiden mit verschiedenen Aglykonen ebenfalls vorliegt oder nicht.

Zur Ermittlung des Aktivitätsverhältnisses, wurden insgesamt 15 verschiedene β -Galaktoside herangezogen, von denen 12 das phenolische Aglykon und 3 das alkoholische führten. Vergleichsweise wurde auch die β -glucosidatische Aktivität mit Phenol- β -d-glucosid als Substrat ermittelt. Die Enzymlösungen wurden aus 16 verschiedenen Quellen bereitet, die die Samen von höheren Pflanzen, Pilzen und Bakterien sowie auch tierische Gewebe umfassten.

Die Bedingungen der enzymatischen Reaktionen und die Bestimmungsmethode sind ganz dieselben wie bei der ersten Mitteilung. Zwei β -d-Galaktoside von Salicylaldehyd und Isoeugenol wurden, wegen geringer Löslichkeit, in Form einer Suspension zur Reaktion verwendet.

Tabelle 1.

Aktivitätsverhältnis von β -Galaktosidasen verschiedener Herkunft gegenüber 15 β -Galaktosiden.

(Die Aktivität für Phenol- β -d-galaktosid ist als 1 gesetzt.)

Nr.	Herkunft des Enzyms	β -d-Galaktosid von															β -Glucosid von
		Phenol	o-Kresol	p-Kresol	m-Kresol	Guajakol	* Salicylaldehyd	Methylsalicylat	p-Oxyacetophenon	Vanillin	* Isoeugenol	1,3,5-Xylenol	p-Nitrophenol	Methanol	Propanol	n-Butanol	Phenol
1	<i>Prunus armeniaca</i>	1	16.0	0.60	3.61	2.16	8.04	0.36	2.21	46.3	0.39	6.73	25.0	0.06	0.70	0.55	7.40
2	<i>Cycas revoluta</i>	1	9.00	0.85	1.64	2.00	5.10	0.18	3.05	20.0	0.34	2.30	—	0.51	3.64	1.24	4.20
3	<i>Sesamum indicum</i>	1	0.84	0.92	0.88	0.56	0.75	0.24	0.81	0.73	0.41	0.94	1.03	—	—	—	0.16
4	<i>Glycine hispida</i>	1	0.80	1.10	0.89	0.56	0.94	0.31	1.10	1.11	0.94	1.04	1.26	—	—	—	—
5	<i>Zea mays</i>	1	0.98	1.13	1.21	0.58	0.93	0.46	1.04	1.05	0.96	1.30	1.31	—	—	—	—
6	Takadiastase	1	0.99	1.22	1.39	0.79	0.65	0.17	1.02	0.83	0.74	1.45	1.22	0.09	0.42	0.28	0.55
7	<i>Aspergillus niger</i>	1	1.24	0.92	1.66	0.93	0.95	0.22	1.35	0.99	1.10	2.30	1.83	0.12	0.43	0.24	25.4
8	Mutterkorn	1	0.99	0.86	1.37	0.98	—	—	0.64	—	—	—	—	0.07	0.15	0.10	16.6
9	<i>Polyporus sulphureus</i>	1	1.23	0.80	1.36	1.03	1.20	0.60	—	1.35	1.10	1.30	—	0.045	0.19	0.16	1.20
10	<i>Irpex lacteus</i>	1	1.22	1.38	2.17	1.42	1.12	0.46	1.38	0.99	1.67	2.72	1.07	0.11	0.50	0.53	1.71
11	<i>Coremiella sp.</i>	1	0.73	1.15	2.20	0.80	0.52	0.21	0.58	0.46	1.30	3.00	—	0.075	0.31	0.30	14.0
12	<i>Bac. coli</i>	** 1	1.24	0.41	—	1.93	—	0.24	3.26	11.4	4.00	3.78	2.24	0.71	—	—	—
13	Schneckenhepatopankreas	1	1.18	1.18	—	0.62	1.42	0.62	1.36	1.45	0.54	0.72	—	0.03	0.12	0.08	2.30
14	Schweinleber	1	1.62	1.52	1.70	0.19	—	—	5.65	—	—	—	—	?	?	0.09	8.34
15	Ochsenleber	1	1.14	1.31	1.15	0.10	3.91	0.05	3.91	4.87	0.46	1.00	2.51	—	—	—	4.55
16	Kulturlösung von <i>Corticium centrifugum</i>	1	1.64	1.04	1.33	1.60	—	—	1.05	1.13	1.65	1.52	—	—	—	—	8.65

* Als Suspension.

**Die Verhältniswerte wurden von M.Hashimoto beobachtet.

In diesen Resultaten fällt es uns zunächst auf, dass eine weitgehende Parallelität in dem Aktivitätsverhältnis zwischen Aprikosen und *Cycas*-enzym besteht, nämlich bleibt die relative Spaltungsgeschwindigkeit von jedem phenolischen β -Galaktoside bei beiden Fermentarten fast gleich gross. Es ist jedoch wohl nicht ohne weiteres möglich, über die Identität beider β -Galaktosidasen etwas sicheres aussagen, denn es gibt auch ein deutlicher Unterschied zwischen beiden Fermenten in Bezug auf das Aktivitätsverhältnis der alkoholischen beiden Fermenten in Bezug auf das Aktivitätsverhältnis der alkoholischen β -Galaktoside. So wird z. B. Methanol- β -d-galaktosid durch das Aprikoseferment etwa $1/20$ so langsam gespalten wie Phenol- β -d-galaktosid, während das *Cycas*ferment dasselbe Substrat verhältnismässig schneller, wie etwa mit einer Geschwindigkeit von $1/2$ zum Phenol- β -d-galaktosid, spaltet. Hierbei erscheint es uns besonders bemerkenswert, dass Aktivitätsverhältnis gegenüber verschiedenen β -Galaktosiden von Aprikose- und *Cycas*-ferment, mit einigen Ausnahmen wie Salicylaldehyd-, Methylsalicylat- und Isoeugenol- β -galaktosid, in grossen Zügen dasselbe ist wie der Wirkungsquotient gegenüber entsprechenden β -Glucosiden. Bezüglich des Aktivitätsverhältnisses der β -Glucosidase von Aprikose- und *Cycas*-ferment sei es auf die von T. Miwa¹⁰⁾ und Mitarbeitern ausgeführten Arbeiten verwiesen. Allerdings erscheint diese Tatsache insofern beachtenswert als wir uns der Schlussfolgerung von B. Helferich⁵⁾ erinnern, dass β -Glucosidase und β -Galaktosidase von Süssmandelemulsin ein und dasselbe Enzym darstellen.

Bei den Fermentpräparaten aus den Samen anderer höherer Pflanzen (Nr. 3, 4, 5,), den Pilzen (Nr. 6, 7, 8, 9, 10, 11, 16) sowie auch dem Hepatopankreas der Schnecke (Nr. 13) erscheint der Sachverhalt etwas anders, indem das Aktivitätsverhältnis gegenüber den phenolischen β -Galaktosiden nur wenig schwankt. Nämlich scheint die chemische Natur des Aglykons bei diesen Fermentpräparaten auf die Spaltungsgeschwindigkeit keinen wesentlichen Einfluss auszuüben.

Die Enzyme aus *Bac. Coli communis* (Nr. 12) und Ochsenleber (Nr. 15) sind auf Grund der Hemmungsversuchen sowie des Verhaltens gegenüber phenolischen β -Galaktosiden von Akamatsu und Mitarbeitern⁶⁾⁷⁾ dem Emulsip-

Typ zugeteilt worden. Bezüglich des Verhaltens gegenüber dem Vanillin- β -galaktosid scheinen diese beiden Enzyme wohl dem *Prunus*-emulsin (Nr. 1) nahezustehen, verhalten sie sich jedoch ganz anders gegen den Isoeugenol- oder Guajakol- β -Galaktosid. Demnach erscheint es nicht statthaft, diese Fermente ohne weiteres mit dem *Prunus*-emulsin zu identifizieren. Das Ferment aus Schweinleber scheint, solange es aus unsern Versuchsergebnissen hervorgeht, sich von demjenigen der Ochsenleber kaum zu unterscheiden.

Versuche

A. Substrat.

Synthese einiger neuen β -Galaktoside, die in dieser Arbeit verwendet wurden, wurden, war an andere Stelle beschrieben.¹⁴⁾

B. Fermentpräparate.

Präparate Nr. 1-Nr. 11 wurden ganz in derselben Weise wie bei der I Mitteilung bereitet.

Nr. 12. *Bac. Coli communis*. "Nomura"-Stamm, geliefert von Prof. Yasaki an der Jikeikwai medizinischen Akademie. Fermentlösung wurde von M. Hashimoto nach Vorschrift von K. Horikoshi⁵⁾ hergestellt.

Nr. 13. Schneckenhepatopankreas (*Eulota peliomphala pheiffer*).

Nr. 14. Schweinleber.

Aus dem Acetonpulver, wurden die Fermentlösungen in derselben Weise wie aus dem Samenpulver hergestellt.

Nr. 15. Ochsenleber. Die an der Fleischhackmaschine zerriebene frische Ochsenleber wurde unter Zusatz der doppelten Menge von Wasser und etwas Toluol bei 30° der Autolyse unterworfen. Nach etwa 3 Tagen kolierte man das Autolysat durch Tuch, die erhaltene trübe Lösung durch Zentrifugieren geklärt und im Cellophanschlauch dialysiert.

Nr. 16. Die Kulturlösung von *Corticium centrifugum*.

Der Pilz wurde 7 tagelang in dem Malzextrakt bei 30° kultiviert. Die von der Pilzdecke abgetrennte Lösung wurde unter vermindertem Druck bei 30-33° konzentriert und dann im Cellophanschlauch dialysiert.

Protokolle

Tabelle 2.

Versuch mit dem Fermentpräparat Nr. 1, (Aprikose-emulsin).

Substrat: β -Galaktosid von	t Min.	Spaltung %	³ 10. K	Mittel	Verhältnis
Phenol	66	28.8	2.235	2.28	1
	80	36.3	2.440		
	130	49.7	2.295		
	180	59.0	2.151		
m-Kresol	25	41.3	9.254	8.26	3.61
	50	61.1	8.020		
	82	75.7	7.492		
p-Oxyacetophenon	17	18.9	5.35	5.05	2.21
	34	33.0	5.11		
	54	44.2	4.70		
Guajakol	20	23.5	5.82	4.94	2.16
	60	46.2	4.50		
	110	68.0	4.50		
Methanol	440	15.9	0.173	0.136	0.059
	1650	37.2	0.123		
	3050	54.3	0.111		
Propanol	47	14.8	1.48	1.59	0.70
	175	47.4	1.59		
	295	68.5	1.70		
n-Butanol	109	27.0	1.25	1.24	0.55
	169	38.8	1.26		
	222	46.5	1.23		
	279	54.0	1.21		

Tabelle 3.

Versuch mit dem Fermentpräparat Nr. 1 (Aprikose-emulsin).

Substrat: β -Galaktosid von	t Min.	Spaltung %	³ 10. k	Mittel	Verhältnis
Phenol	105	23.8	1.12	1.12	1
	181	38.1	1.15		
	325	55.8	1.10		
Isoeugenol	176	21.3	0.593	0.434	0.388
	368	29.4	0.589		
	1215	56.1	0.294		
	1798	66.0	0.261		
1,3,5-Xylenol	20	27.6	7.013	7.640	6.73
	36	47.1	7.680		
	68	68.3	7.327		

Salicylaldehyd	20	31.7	8.28	9.01	8.04
	41	58.7	9.36		
	63	74.4	9.40		
Methylsalicylat	343	30.0	0.451	0.403	0.36
	1183	66.9	0.406		
	1758	76.0	0.353		

Tabelle 4.

Versuch mit dem Fermentpräparat Nr. 1, (Aprikose-emulsin).

Substrat: β -Galaktosid von	t Min.	Spaltung %	³ 10. k	Mittel	Verhältnis
Phenol	1570	43.2	0.156	0.149	1
	2710	59.0	0.142		
p-Nitrophenol	45	35.1	4.17	3.72	25.0
	117	58.4	3.26		

Tabelle 5.

Versuch mit dem Fermentpräparat Nr. 2, (*Cycas revolta*).

Substrat: β -Galaktosid von	t Min.	Spaltung %	³ 10. k	Mittel	Verhältnis
Phenol	1035	36.0	0.187	0.187	1
	2270	62.3	0.187		
m-Kresol	428	31.4	0.382	0.309	1.64
	1540	58.1	0.245		
p-Oxyacetophenon	200	30.6	0.786	0.537	3.05
	415	42.0	0.570		
	1530	71.3	0.355		
Guajakol	200	17.4	0.415	0.372	2.00
	415	29.7	0.369		
	1530	69.0	0.332		
Methanol	1430	29.1	0.104	0.095	0.51
	2260	41.5	0.103		
	2860	42.9	0.085		
	3895	54.3	0.087		
Propanol	232	29.7	0.651	0.681	3.64
	425	50.0	0.709		
	690	66.2	0.683		
n-Butanol	425	26.1	0.309	0.232	1.24
	690	34.8	0.270		
	1540	49.1	0.190		
	2560	61.1	0.160		

Tabelle 6.

Versuch mit dem Fermentpräparat
Nr. 2, (*Cycas revolta*).

Substrat: β -Galaktosid von	t Min.	Spaltung %	10^3 k	Mittel	Verhältnis
Phenol	855 1615 2385	27.6 47.1 62.3	0.164 0.172 0.177	0.171	1
Isoeugenol	3271 4776 7346	36.60 43.70 64.00	0.0604 0.0535 0.0604	0.581	0.34
1,3,5-Xylenol	525 663 1435	38.1 46.2 69.5	0.397 0.406 0.354	0.386	2.26
Salicylaldehyd	145 305 469	25.5 46.5 59.0	0.882 0.891 0.826	0.867	5.10
Methylsalicylat	3455 4965 10585	24.90 30.30 45.80	0.0360 0.0315 0.0252	0.031	0.18

Tabelle 7.

Versuch mit dem Fermentpräparat Nr. 3, (*Sesamum indicum*).

Substrat: β -Galaktosid von	t Min.	Spaltung %	10^3 k	Mittel	Verhältnis
Phenol	1200 2830	33.4 57.3	0.147 0.131	0.139	1
o-Kresol	1200 2830	29.4 50.1	0.126 0.107	0.117	0.84
p-Kresol	2200 2830	30.3 56.1	0.130 0.126	0.128	0.92
m-Kresol	1235 4210	30.6 67.8	0.127 0.117	0.122	0.88
Guajakol	1235 4210	22.10 44.90	0.0878 0.0669	0.077	0.56
Salicylaldehyd	1235 4210	27.3 60.2	0.112 0.095	0.104	0.75
Methylsalicylat	1235 4210	10.60 27.00	0.0394 0.0325	0.033	0.24
p-Oxyacetophenon	1235 4210	32.7 60.5	0.139 0.096	0.113	0.81
Vanillin	1235 4210	26.7 59.9	0.109 0.094	0.102	0.73

Isoeugenol	1235 4210	19.50 44.90	0.0763 0.0615	0.0689	0.41
1,3,5-Xylenol	1200 2830	33.0 50.4	0.145 0.117	0.131	0.94
p-Nitrophenol	1200 2830	35.4 56.7	0.158 0.128	0.143	1.03
β -Glucosid von Phenol	2830 8380 12899	14.50 36.90 45.50	0.0240 0.0238 0.0205	0.0228	0.164

Tabelle 8.

Versuch mit dem Fermentpräparat
Nr. 4 (*Glycine hispida*).

Substrat: β -Galaktosid von	t Min.	Spaltung %	10^3 k	Mittel	Verhältnis
Phenol	5670 13095	20.1 46.8	0.0172 0.0209	0.019	1
o-Kresol	5670 13095 17345	16.2 38.4 46.5	0.0135 0.0161 0.0157	0.015	0.80
p-Kresol	5670 13095 17345	18.3 51.3 60.5	0.0155 0.0239 0.0232	0.0209	1.10
m-Kresol	5840 11715	20.4 36.6	0.0169 0.0169	0.017	0.89
Guajakol	11710 17415	23.5 36.6	0.0993 0.01134	0.011	0.56
Salicylaldehyd	5840 11715	23.8 33.8	0.0202 0.0153	0.018	0.94
Methylsalicylat	17520 27510	22.1 29.4	0.00619 0.00550	0.0059	0.31
p-Oxyacetophenon	5840 11715	24.1 43.5	0.0205 0.0212	0.021	1.10
Vanillin	5840 11715	28.8 41.1	0.0253 0.0169	0.021	1.11
Isoeugenol	5840 11715	23.8 32.7	0.0202 0.0147	0.018	0.94
1,3,5-Xylenol	5670 13095	20.4 48.3	0.0175 0.0219	0.02	1.04
p-Nitrophenol	4215 11700	38.3 51.7	0.0208 0.0270	0.024	1.26

Tabelle 9.

Versuch mit dem Fermentpräparat Nr. 5, (*Zea mays*).

Substrat: β -Galaktosid von	t Min.	Spaltung %	10 ³ , k	Mittel	Verhältnis
Phenol	274 1594	20.6 71.9	0.366 0.346	0.356	1
o-Kresol	134 394 1594	9.7 30.0 71.6	0.311 0.393 0.343	0.349	0.98
p-Kresol	134 394 1594	10.6 33.4 76.3	0.365 0.448 0.392	0.401	1.13
m-Kresol	385 1400	31.7 75.5	0.430 0.436	0.433	1.21
Guajakol	264 394 1594	11.8 18.3 50.4	0.208 0.223 0.191	0.207	0.58
Salicylaldehyd	385 935	25.8 50.1	0.337 0.322	0.330	0.93
Methylsalicylat	394 1594	15.9 37.5	0.191 0.135	0.163	0.46
p-Oxyacetophenon	385 1400	25.8 72.4	0.337 0.399	0.368	1.04
Vanillin	385 1400	29.1 67.8	0.388 0.351	0.370	1.05
Isoeugenol	385 935	26.4 52.0	0.346 0.341	0.343	0.96
1,3,5-Xylenol	134 393 1594	12.2 38.8 79.0	0.425 0.541 0.425	0.464	1.30
p-Nitrophenol	134 394 1594	15.9 36.0 71.9	0.561 0.491 0.346	0.466	1.31

Tabelle 10.

Versuch mit dem Fermentpräparat Nr. 6, (Takadiastase).

Substrat: β -Galaktosid	t Min.	Spaltung %	10 ³ , k	Mittel	Verhältnis
Phenol	40 65 99	33.8 45.5 63.3	4.48 4.06 4.40	4.31	1
m-Kresol	29 60 112	36.7 60.2 77.8	6.80 6.65 5.84	6.43	1.39
Guajakol	25 53 90	20.1 34.5 53.7	3.898 3.467 3.715	3.69	0.79

p-Oxyacetophenon	25 53 90	22.8 45.5 62.7	4.495 4.973 4.760	4.74	1.02
Methanol	200 375 655	16.8 28.8 47.7	0.399 0.393 0.429	0.407	0.088
Propanol	35 100 210	13.6 35.7 62.4	1.814 1.917 2.020	1.92	0.415
n-Butanol	66 157 248	18.3 35.7 53.0	1.330 1.221 1.322	1.29	0.279

Tabelle 11.

Versuch mit dem Fermentpräparat Nr. 6, (Takadiastase).

Substrat: β -Galaktosid	t Min.	Spaltung %	10 ³ , k	Mittel	Verhältnis
Phenol	15 30 48	24.4 42.6 60.8	8.08 8.02 8.47	8.29	1
Salicylaldehyd	15 32 56	17.4 32.2 47.4	5.53 5.30 4.98	5.27	0.65
Methylsalicylat	80 145 240 345	24.1 37.5 53.4 66.9	1.49 1.41 1.40 1.39	1.42	0.17
Isoeugenol	15 32 56	18.6 36.9 56.7	5.75 6.24 6.49	6.16	0.74
1,3,5-Xylenol	10 20 30 50	23.1 37.5 60.5 77.8	11.4 10.2 13.5 13.1	12.05	1.45

Tabelle 12.

Versuch mit dem Fermentpräparat Nr. 6, (Takadiastase).

Substrat: β -Galaktosid	t Min.	Spaltung %	10 ³ , k	Mittel	Verhältnis
Phenol	57 148	26.4 56.7	2.35 2.45	2.40	1
p-Kresol	45 140	24.6 54.3	2.72 2.43	2.58	1.08
p-Nitrophenol	43 138	28.2 54.9	3.35 2.51	2.93	1.22

Tabelle 13.

Versuch mit dem Fermentpräparat

Nr. 7, (*Aspergillus niger*).

Substrat: β -Galakt- osid von	t Min.	Spalt- ung %	10 ³ , k	Mitt- el	Ver- hättn- is
Phenol	1138	22.4	0.097	0.103	1
	2720	48.2	0.105		
	4160	65.0	0.109		
m-Kresol	1138	34.8	0.163	0.171	1.66
	2720	67.2	0.181		
	4160	80.7	0.171		
Guajakol	1138	20.9	0.090	0.096	0.93
	2720	48.2	0.105		
	4160	59.0	0.093		
p-Oxyace- tophenon	1138	30.8	0.140	0.140	1.35
	2720	60.5	0.148		
	4160	71.3	0.131		
Methanol	6940	21.7	0.0153	0.0142	0.12
	12690	34.5	0.0145		
	16910	39.4	0.0130		
Propanol	3855	30.8	0.0414	0.0436	0.43
	6940	52.0	0.0459		
n-Butanol	3855	19.2	0.0240	0.0249	0.24
	6943	33.4	0.0254		
	9770	43.5	0.0254		

Tabelle 14.

Versuch mit dem Fermentpräparat
Nr. 7, (*Aspergillus niger*).

Substrat: β -Galakt- osid von	t Min.	Spalt- ung %	10 ³ , k	Mitt- el	Ver- hättn- is
Phenol	1290	24.6	0.0951	0.0801	1
	2745	35.7	0.0651		
p-Nitro- phenol	1290	35.7	0.149	0.147	1.83
	2745	59.6	0.144		

Tabelle 15.

Versuch mit dem Fermentpräparat
Nr. 7, (*Aspergillus niger*).

Substrat: β -Galakt- osid von	t Min.	Spalt- ung %	10 ³ , k	Mitt- el	Ver- hättn- is
Phenol	1100	48.0	0.258	0.237	1
	1540	57.8	0.237		
	2780	75.2	0.217		
Salicyl- aldehyd	735	31.7	0.220	0.226	0.95
	1285	46.5	0.211		
	2275	72.6	0.247		

Methyl- salicylat	739	10.2	0.0629	0.0538	0.22
	3905	48.0	0.0429		
	6730	57.8	0.0556		
Iso- eugenol	738	38.8	0.288	0.271	1.1
	1282	53.7	0.261		
	2275	75.0	0.264		
1,3,5- Xylenol	290	30.9	0.550	0.569	2.3
	455	44.0	0.568		
	740	65.3	0.621		
	1445	83.3	0.538		

Tabelle 16.

Versuch mit dem Fermentpräparat
Nr. 8, (Mutterkprn).

Substrat: β -Galakt- osid von	t Min.	Spalt- ung %	10 ³ , k	Mitt- el	Ver- hättn- is
Phenol	2880	35.4	0.0655	0.0736	1
	4130	51.3	0.0757		
	5525	63.6	0.0795		
m-Kresol	1680	30.0	0.092	0.101	1.37
	3075	52.6	0.105		
	5980	77.2	0.106		
Guajakol	1680	25.2	0.075	0.072	0.98
	3075	38.6	0.069		
	5980	62.0	0.070		
p-Oxyace- tophenon	1605	16.2	0.047	0.047	0.64
	3000	28.2	0.048		
	5905	46.8	0.046		
Methanol	20590	24.9	0.0060	0.0053	0.072
	30480	32.0	0.0047		
Propanol	25700	45.2	0.0101	0.0102	0.150
	30420	51.7	0.0103		
n-Butanol	18900	28.5	0.0077	0.0077	0.104
	25700	35.4	0.0073		
	30420	42.9	0.0080		

Tabelle 17.

Versuch mit dem Fermentpräparat
Nr. 9, (*Polyporus sulphureus*).

Substrat: β -Galakt- osid von	t Min.	Spalt- ung %	10 ³ , k	Mitt- el	Ver- hättn- is
Pphenol	350	27.6	0.400	0.430	1
	1090	69.3	0.470		
o-Kresol	345	34.1	0.526	0.531	1.23
	627	54.0	0.537		

p-Kresol	350	23.1	0.326	0.332	0.80
	1485	68.5	0.338		
m-Kresol	345	33.0	0.504	0.552	1.36
	627	56.4	0.575		
	1370	88.9	0.698		
Guajakol	350	28.5	0.416	0.438	1.03
	1485	79.3	0.460		
Salicyl- aldehyd	380	34.5	0.484	0.508	1.20
	1383	81.6	0.532		
Methyl- salicylat	610	32.0	0.275	0.266	0.60
	1387	65.1	0.258		
Vanillin	380	39.4	0.572	0.580	1.35
	1383	84.6	0.587		
Iso- eugenol	380	37.8	0.542	0.488	1.10
	1380	74.7	0.433		
1,3,5- Xylenol	345	36.3	0.566	0.561	1.30
	610	56.4	0.496		
	1370	85.9	0.621		
Methanol	5695	22.1	0.0191	0.0194	0.045
	10414	37.5	0.0196		
Propanol	1395	25.5	0.0916	0.0798	0.19
	5695	59.5	0.0680		
n-Butanol	1395	22.1	0.0778	0.0713	0.16
	5695	57.3	0.0649		
β -Glucos- id von Pheol	345	33.4	0.510	0.532	1.20
	625	54.3	0.544		
	1370	82.0	0.543		

Tabelle 18.

Versuch mit dem Fermentpräparat
Nr. 10, (*Irpex lacteus*).

Substrat: β -Galakt- osid von	t Min.	Spalt- ung %	10 ³ , k	Mitt- el	Ver- hltn- is
Phenol	137	34.8	1.35	1.27	1
	207	43.5	1.20		
	257	51.0	1.21		
	347	65.3	1.32		
o-Kresol	167	45.5	1.58	1.55	1.22
	347	70.1	1.51		
p-Kresol	60	23.8	1.97	1.76	1.38
	125	36.6	1.60		
	250	62.3	1.70		
m-Kresol	60	30.6	2.62	2.76	2.17
	180	70.1	2.91		
Guajakol	60	23.8	1.97	1.81	1.42
	125	40.2	1.79		
	250	62.0	1.68		
Salicyl- aldehyd	90	27.9	1.58	1.43	1.12
	245	51.7	1.29		

Methyl- salicyat	105	15.9	0.726	0.587	0.46
	230	27.0	0.594		
	1143	68.7	0.442		
p-Oxyace- tophenon	60	18.3	1.46	1.76	1.38
	122	32.0	1.37		
	219	51.3	1.43		
Vanillin	200	42.2	1.19	1.25	0.99
	280	57.3	1.32		
1,3,5- Xylenol	54	37.2	3.74	3.45	2.72
	109	58.4	3.50		
	177	71.6	3.10		
Iso- eugenol	45	23.1	2.54	2.12	1.67
	105	41.8	2.24		
	230	57.0	1.60		
Methanol	1400	39.8	0.157	0.146	0.11
	2740	57.5	0.135		
Propanol	150	19.2	0.639	0.644	0.50
	440	48.3	0.650		
n-Butan- ol	150	20.6	0.666	0.678	0.53
	440	50.4	0.691		
β -Glucos- id von Phenol	37	16.5	2.12	2.18	1.71
	70	29.7	2.19		
	160	56.1	2.23		

Tabelle 19.

Versuch mit dem Fermentpräparat
Nr. 10, (*Irpex lacteus*)

Substrat: β -Galakt- osid von	t Min.	Spalt- ung %	10 ³ , k	Mitt- el	Verh- ltnis
Phenol	1210	23.1	0.0945	0.0866	1
	2765	39.4	0.0787		
p-Nitro- phenol	1210	24.1	0.0990	0.0923	1.07
	2765	42.0	0.0856		

Tabelle 20.

Versuch mit dem Fermentpräparat
Nr. 11, (*Coremiella sp.*).

Substrat: β -Galakt- osid von	t Min.	Spalt- ung %	10 ³ , k	Mitt- el	Verh- ltnis
Phenol	1540	46.2	0.175	0.178	1
	2690	67.8	0.182		
o-Kresol	1135	29.1	0.131	0.130	0.73
	2520	53.0	0.130		
p-Kresol	1135	41.5	0.206	0.205	1.15
	2520	69.5	0.205		
Vanillin	1100	18.9	0.0829	0.0824	0.46
	2820	41.3	0.0820		

Iso-eugenol	1100	45.5	0.239	0.232	1.30
	1540	49.1	0.190		
	2780	82.0	0.268		
Methyl-salicylat	1100	9.7	0.0403	0.0368	0.21
	9655	52.3	0.0333		
Methanol	9655	26.4	0.0137	0.0134	0.075
	15415	37.5	0.0132		
Propanol	2575	27.0	0.0531	0.0552	0.31
	9655	72.1	0.0574		
n-Butanol	2575	28.2	0.0559	0.0536	0.30
	9655	68.0	0.0513		

Tabelle 21.

Versuch mit dem Fermentpräparat

Nr. 11, (*Coremiella* sp.).

Substrat: β-Galakt- osid von	t Min.	Spal- tung %	10 ³ , k	Mitt- el	Ver- hättn- is
Phenol	804	24.9	0.154	0.145	1
	2230	49.4	0.132		
	3675	71.8	0.149		
m-Kresol	515	33.8	0.348	0.325	2.2
	1660	68.5	0.302		
1,3,5-Xylenol	250	22.1	0.402	0.428	3.0
	515	41.1	0.455		
	1660	80.0	0.430		
p-Oxyace- tophenon	1355	22.5	0.0814	0.0837	0.58
	2650	40.8	0.0859		
Guajakol	1355	28.8	0.109	0.111	0.80
	2655	50.1	0.113		
Salicyl- aldehyd	1355	22.8	0.0829	0.0860	0.52
	2650	42.0	0.0892		
β-Glucos- id von Phenol	120	41.3	1.928	2.02	14.0
	252	70.6	2.109		

Tabelle 22.

Versuch mit dem Fermentpräparat

Nr. 13, (Schneckenhepatopankreas).

Substrat: β-Galakt- osid von	t Min.	Spal- tung %	10 ³ , k	Mitt- el	Ver- hättn- is
Phenol	30	23.5	3.55	3.29	1
	60	34.5	3.06		
	98	52.0	3.25		
o-Kresol	30	25.8	4.32	3.87	1.18
	60	38.8	3.56		
	99	57.3	3.73		

p-Kresol	30	25.8	4.32	3.90	1.18
	60	38.8	3.56		
	99	58.1	3.82		
p-Oxyace- phenon	30	27.0	4.62	4.47	1.36
	62	45.5	4.25		
	93	61.4	4.55		
Guajakol	34	15.9	2.21	2.03	0.62
	90	36.9	2.22		
	180	50.4	1.67		
Salicyl- aldehyd	30	33.4	6.05	4.67	1.42
	62	44.2	4.09		
	93	56.4	3.89		
Methyl- salicylat	34	15.9	2.21	2.03	0.62
	90	34.5	2.04		
	180	52.7	1.80		
Vanillin	30	30.6	5.25	4.79	1.45
	82	55.8	4.32		
Iso-eugenol	35	15.9	2.15	1.79	0.54
	93	26.4	1.42		
1,3,5-Xylenol	60	31.4	2.69	2.38	0.72
	110	46.5	2.47		
	165	53.0	1.99		
Methanol	1155	21.3	0.0902	0.0872	0.0265
	1642	28.2	0.0877		
	2415	36.9	0.0828		
	3790	53.7	0.0882		
Propanol	437	32.0	0.383	0.391	0.119
	1642	78.4	0.400		
n-Butanol	437	28.8	0.337	0.277	0.0843
	1642	65.0	0.217		
β-Glucos- id von Phenol	11	15.9	6.84	7.61	2.3
	38	46.8	7.21		
	54	66.4	8.77		

Tabelle 23.

Versuch mit dem Fermentpräparat

Nr. 14, (Schweinleber).

Substrat: β-Galakt- osid von	t Min.	Spal- tung %	10 ³ , k	Mitt- el	Ver- hättn- is
Phenol	14630	30.6	0.0107	0.0078	1
	26210	33.4	0.0067		
	30140	34.8	0.0060		
o-Kresol	4771	15.1	0.0149	0.0126	1.62
	14895	30.0	0.0104		
p-Kresol	7011	20.1	0.0139	0.119	1.52
	15208	28.2	0.0097		

m-kresol	10190	31.7	0.0162	0.0132	1.70
	21770	45.5	0.0121		
	25700	49.1	0.0114		
Guajakol	19910	4.9	0.00105	0.00147	0.19
	25700	10.6	0.00189		
p-Oxyacetophenon	2650	28.5	0.0550	0.0441	5.65
	5670	45.8	0.0470		
	11130	60.8	0.0365		
	12590	66.9	0.0381		
Methanol	26210	Spur	—	—	—
	30140	Spur	—		
Propanol	21770	Spur	—	—	—
	25700	Spur	—		
n-Butanol	21770	3.1	0.00063	0.00072	0.69
	25700	4.9	0.00081		
β -Glucosid von Phenol	208	30.3	0.751	0.651	8.34
	574	51.7	0.551		

Tabelle 24.

Versuch mit dem Fermentpräparat

Nr. 15, (Ochsenleber).

Substrat: β -Galaktosid	t Min.	Spaltung %	10 ³ . k	Mittel	Verhältnis
Phenol	868 1947	30.0 56.4	0.178 0.185	0.181	1
o-Kresol	868 1330	33.4 47.1	0.204 0.208	0.206	1.14
p-Kresol	868 1947	42.2 59.0	0.275 0.199	0.237	1.31
m-Kresol	440 1505 1943	20.6 52.7 55.5	0.227 0.215 0.181	0.208	1.15
Guajakol	5568 11391	26.2 31.1	0.0236 0.0142	0.0189	0.104
Salicylaldehyd	197 417	29.7 45.8	0.777 0.639	0.708	3.91
Methylsalicylat	5568 14288	12.9 19.2	0.0108 0.0067	0.00875	0.048
p-Oxyacetophenon	197 417	29.7 45.8	0.777 0.639	0.708	3.91
Vanillin	67 193 325	12.2 31.7 51.0	0.843 0.848 0.953	0.881	4.87
Isoeugenol	868 1947 4632	21.0 31.1 41.8	0.1176 0.0831 0.0508	0.0838	0.46

1,3,5-Xylenol	868	30.3	0.180	0.182	1.00
	1947	55.8	0.183		
p-Nitrophenol	145	15.9	0.519	0.455	2.51
	325	28.2	0.443		
	465	35.1	0.404		
β -Glucosid von Phenol	70	15.4	1.038	0.821	4.55
	113	18.9	0.820		
	1070	77.5	0.606		

Tabelle 25.

Versuch mit dem Fermentpräparat

Nr. 16, (Kulturlösung von *Corticium centrifugum*).

Substrat: β -Galaktosid von	t Min.	Spaltung %	10 ³ . k	Mittel	Verhältnis
Phenol	9833 12843	12.9 15.9	0.00610 0.00586	0.006	1
o-Kresol	9833 12843	21.0 23.8	0.01040 0.00919	0.0096	1.64
p-Kresol	9833 12843	13.3 16.5	0.00628 0.00610	0.0062	1.04
m-Kresol	9833 12843	16.5 21.0	0.00797 0.00795	0.008	1.33
Guajakol	9833 12843	20.1 23.8	0.00991 0.00919	0.0096	1.60
p-Oxyacetophenon	9833 12843	12.9 17.4	0.00610 0.00647	0.0063	1.05
Vanillin	9833 12843	14.5 17.7	0.00691 0.00659	0.0068	1.13
Isoeugenol	9833 12843	20.1 25.2	0.00991 0.00982	0.0099	1.65
1,3,5-Xylenol	9833 12843	18.6 23.5	0.00909 0.00906	0.0091	1.52
β -Glucosid von Phenol	3564 8404	35.4 62.0	0.0533 0.0500	0.0052	8.65

II. Hemmungsversuche mit Zuckern und ihren Derivaten.

Aus dem Laboratorium von Akamatsu¹⁶⁾ in der medizinischen Fakultät Chiba ist neuerdings eine Theorie über die Spezifität der β -Glucosidase und β -Galaktosidase vorgeschlagen, wonach die β -Glucosidasen und β -Galaktosidasen auf Grund der spezifischen Hemmung durch Zucker und ihre Derivate sowie des Verhaltens gegenüber den β -Glucosiden bzw. β -Galaktosiden mit verschiedenen Aglykonen in Emulsin- und Taka-typ eingeteilt werden.

Die β -Glucosidasen bzw. β -Galaktosidasen von Emulsin-typ weisen nach diesen Autoren dieselbe Reihenfolge der Reaktionsgeschwindigkeit gegenüber β -Glucosiden bzw. β -Galaktosiden von Phenol-, o-, m- und p-Kresol auf wie Mandelemulsin und sie werden durch Phenol- β -glucosid und β -galaktosid und noch stärker durch Gluconsäure- und Galaktonsäure- γ -lacton gehemmt, während sie durch Glucose, Gluconsäure, Galaktose und Galaktonsäure keine Hemmung erleiden.

Die Theorie besagt ferner, dass bei den β -Glucosidasen des Taka-typs die Reihenfolge der Spaltungsgeschwindigkeit gegenüber den oben genannten Substraten mit derjenigen der Takadiastase übereinstimmt. Weiterhin werden sie durch Phenol- β -glucosid, Glucose, Gluconsäure und Gluconsäure- γ -lacton nicht aber durch entsprechende Verbindungen der Galaktosereihe gehemmt. Bei den β -Galaktosidasen des Taka-typs liegen analoge Verhältnisse vor wie bei der β -Glucosidase desselben Typs; nämlich findet man eine gleiche Reihenfolge der Spaltungsgeschwindigkeit von Phenol-, o-, m- und p-Kresol- β -galaktosid wie bei der β -Galaktosidase von Takadiastase. Sie werden durch Galaktose, Galaktonsäure- γ -lacton und Phenol- β -galaktosid spezifisch gehemmt, dagegen sind sie ganz refraktär gegen Verbindungen der Glucosereihe. Nach der Akamatsuschen Ansicht kommen in der Natur beide Typen der β -Glucosidasen bzw. der β -Galaktosidasen öfters in wechselndem Mengenverhältnis gemischt vor, was für die Mannigfaltigkeit des Aktivitätsverhältnisses verschiedener Enzymherkunft verantwortlich gemacht werden sollte.

Im vorigen Kapitel dieser Mitteilungen habe ich eine Reihe von Aktivitätsverhältnissen gegenüber den verschiedenen β -Galaktosiden angegeben, wobei diejenigen Werte, die weder mit dem des Emulsin noch mit dem der Takadiastase übereinstimmen, nicht selten angetroffen worden sind. Demnach erscheint es mir wünschenswert, zu prüfen, ob derartige Sachverhalte durch gemischtes Vorkommen der β -Galaktosidase von Emulsin- und Takatyp zustande kommt oder nicht.

In Anschluss an die schöne Methode von Akamatsu wurde das Enzym-typ

durch Hemmungsversuche mit Glucose, Gluconsäure (Ca-salz), Phenol- oder o-Kresol- β -glucosid, Galaktose, Galaktonsäure (Ca-salz) und Phenol- oder o-Kresol- β -galaktosid mit p-Nitrophenol- β -galaktosid als Substrat bestimmt. Die Konzentration sowohl der Hemmstoffe als auch der Substrate waren etwas höher als bei den Versuchen von Akamatsuschen Schule, nämlich Hemmstoffe mit einer Konzentration von m/15 und Substrat mit m/833. Die an 11 verschiedenen Fermentpräparaten ermittelten Hemmungstypen und die dazu gehörigen Aktivitätsverhältnisse gegenüber einigen β -Galaktosiden werden in Tabelle 1 zusammengestellt.

Tabelle 1

Hemmungstyp nebst dem dazu gehörigen Aktivitätsverhältnis von β -Galaktosidasen verschiedener Herkunft.

E: Emulsin-typ; T: Taka-typ.

Die Zahlen des Aktivitätsverhältnisses ausser der von Nr. 11 sind der Tabelle 1 im Kapitel I entnommen.

Nr.	Herkunft des Enzyme	Hem- mung- styp	Aktivitätsverhältnis gegenüber β -Galaktosid von									
			Phe- nol	o-Kre- sol	p-Kre- sol	m-Kre- sol	Guaj- akol	Sali- cylal- dehyd	Meth- ylsa- licyl- at	p-Oxy- aceto- phen- on	Iso- euge- nol	m,m'- Xyle- nol
1	<i>Prunus armen- iaca</i> (Aprikose)	E	1	16.0	0.6	3.6	2.2	8.0	0.36	2.2	0.39	6.7
2	Ochsenleber	E	1	1.1	1.3	1.2	0.1	3.9	0.05	3.9	0.25	1.0
3	<i>Corticium centrifugum</i> (Kulturlösung)	T+E?	1	1.6	1.0	1.3	1.6	—	—	1.1	1.7	1.5
4	Schneckenhep- atopankreas	T+E	1	1.2	1.2	—	0.6	1.4	0.6	1.4	0.5	0.7
5	Takadiastase	T	1	0.99	1.22	1.4	0.79	0.65	0.17	1.0	0.74	1.5
6	<i>Aspergillus niger</i>	T	1	1.2	0.92	1.7	0.93	0.95	0.22	1.4	1.1	2.3
7	<i>Sesamum indicum</i>	T	1	0.84	0.92	0.88	0.56	0.75	0.26	0.81	0.41	0.94
8	<i>Glycine hispida</i>	T	1	0.80	1.1	0.89	0.56	0.94	0.31	1.1	0.94	1.0
9	<i>Zea mays</i>	T	1	0.98	1.1	1.2	0.58	0.93	0.46	1.0	0.96	1.3
10	<i>Irpex lacteus</i>	T	1	1.2	1.4	2.2	1.4	1.1	0.46	1.4	1.7	2.7
11	<i>Corticium centrifugum</i> (Myzel)	T	*	1.6	1.0	1.3	1.6	—	—	1.1	1.1	1.7

* Die Protokolle dieser Verhältnisswerte werden an anderer Stelle beschrieben werden.

Wie aus der Tabelle ersichtlich, zeigten die meisten Fermentpräparate ein scharf definiertes Hemmungstyp, entweder Emulsin- oder Taka-typ, ausgenommen dass die Enzympräparate aus dem Schneckenhepatopankreas und der Kulturlösung von *Corticium* das Gemisch der β -Galaktosidasen von beiden Typen darstellen. Obwohl die Fermentpräparate aus Aprikose und Ochsenleber in bezug auf spezifische Hemmung in dasselbe und zwar das Emulsintyp fallen, so ist jedoch die Reihenfolge der Spaltungsgeschwindigkeit für verschiedene β -Galaktoside voneinander sehr verschieden. Die Angabe von K. Kobayashi, wonach die Reihenfolge der Spaltungsgeschwindigkeit von β -Galaktosidase des Emulsintyps

β -Galaktosid von o-Kresol > m-Kresol > Phenol \geq P-Kresol

ist, konnte bei dem Fermentpräparat von Ochsenleber nicht gezeigt werden. Besonders deutlich tritt der Unterschied zwischen den beiden Fermentpräparaten in dem Verhalten gegenüber Guajakol-, o-Kresol- Methylsilylat- und m,m'-Xylenol- β -galaktosid zutage. Demnach erscheint es mir nicht berechtigt, beide β -Galaktosidasen ohne weiteres als identisch zu betrachten.

Die Tatsache, dass es Enzyme gibt, die in ihrem Hemmungsverhalten zwar dasselbe, dennoch in dem Aktivitätsverhältnis voneinander verschieden sind, lässt uns daran, denken dass die aktiven Stellen in dem Enzymmolekül, die, einerseits das Hemmungstyp bedingen und andererseits das Aktivitätsverhältnis bestimmen, voneinander verschieden sind. Der von Miwa¹¹⁾ betreffs der β -Glucosidase erhobene, sowie auch der eigene, über β -Galaktosidase erhaltene Befund, dass die Spaltungsgeschwindigkeit in keiner direkten Beziehung zur Affinitätsgrösse des Enzyms zum Substrat steht, kann als Stütze für obige Ansicht betrachten. Mit anderen Worten, gibt es keinen Grund dafür, anzunehmen, dass die Grösse der affinitätsmässigen Hemmung mit der Spaltungsgeschwindigkeit in irgendeinem bestimmten Zusammenhang stehen sollte.

Bei den Enzympräparaten, die die Hemmung von Takatyp aufweisen, bleibt der Unterschied in dem Aktivitätsverhältnis nur gering. Fernerhin bemerkt man, dass die Aktivität all diesen Fermentpräparate durch die chemische Natur des Aglykons nur wenig beeinflusst wird. Obzwar die Reihenfolge der Spaltungsgeschwindigkeit für verschiedene β -Galaktoside miteinander nicht immer übereinstimmt, bleibt die Differenz untereinander so gering, dass es schwer erscheint, dieser grosses Gewicht zuzuteilen. Es wäre daher auch möglich, solche β -Galaktosidasen zu einem Fermenttyp zusammenzufassen. Das bedeutet jedoch nicht, dass diese β -Galaktosidasen in allen Einzelheiten in ihrer Struktur miteinander identisch sind, vielmehr kann man

mit wahrscheinlichkeit annehmen, dass nur diejenige Gruppen in Fermentmolekül von Enzym zu Enzym gleichartig gebaut sind, die die Hemmung bzw. das Aktivitätsverhältnis bedingen.

Versuche

A. Hemmungskörper.

Als Hemmstoff in der Galaktosidspaltung wurden die folgenden verwendet:

- 1). Phenol- β -d-glucosid (Schmp. 173-174°) oder o-Kresol- β -d-glucosid (Schmp. 163-164°).
- 2). Phenol- β -d-galaktosid (Schmp. 143-144°) oder o-Kresol- β -d-galaktosid (Schmp. 193-194°).
- 3). Glucose.
- 4). Galaktose.
- 5). Calciumgluconat.

Das Calciumsalz, das Herr Dr. M. Fujisaki mir freundlicherweise geliefert hat, wurde aus verdünntem Alkohol umkristallisiert und zuerst im Vakuumexsikator, dann bei 110° im Vakuum über phosphorpentoxyd getrocknet.

Spezifische Drehung: (1). Freie Säure, Ca-salz gelöst in 7-Proz. HCL und berechnet für freie Säure, $[\alpha]_D^{26} = +0.27^\circ \times 100 / 2.61 \times 1 = +10.3^\circ$,

unmittelbar nach Auflösen; sie steigt beim Erwärmen auf $[\alpha]_D^{26} = +0.62^\circ \times 100 / 2.61 \times 1 = +23.8^\circ$ an. Nach Tollens¹⁹⁾ sind die entsprechenden Zahlen $+10.0^\circ$ bzw. $+23.4^\circ$. (2). Ca-Salz, in Wasser, $[\alpha]_D^{26} = +0.32^\circ \times 100 / 5.36 \times 1 = +5.97^\circ$; E. Fischer²⁾ ergab den Wert, $+6.7^\circ$.

Ca-gehalt: Gefunden 9.30, berechnet für $(C_6H_{11}O_7)_2Ca$, 9.32% Ca.

6). Calciumgalaktonat.

0.7120g Subst. 0.0886g H₂O (100°, im Vakuum über P₂O₅). Gefunden 17.3, berechnet für $(C_6H_{11}O_7)_2Ca \cdot 5H_2O$ 17.3% H₂O.

Spezifische Drehung: Alle Zahlen beziehen sich auf Hydrat. (1). Freie Säure, Ca-salz gelöst in 7-Proz. HCL und berechnet für freie Säure, $[\alpha]_D^{26} = -0.40^\circ \times 100 / 3.22 \times 1 = -12.4^\circ$, unmittelbar nach Auflösen; sie steigt beim Erwärmen auf $[\alpha]_D^{26} = -1.89^\circ \times 100 / 3.22 \times 1 = -58.7^\circ$ an.

Diese Konstanten stimmen mit den Angaben von Ruff und Franz, $17-10.6^\circ$ bzw. -59.7° gut überein. (2). Ca-salz, in Wasser, $[\alpha]_D^{26} = +0.12^\circ \times 100 / 5.36 \times 1 = +2.24^\circ$. Von Schnell und Tollens¹⁸⁾ ist der Wert, $+2.85^\circ$ gegeben.

Ca-gehalt: Gefunden 7.68, berechnet für $(C_6H_{11}O_7)_2Ca \cdot 5H_2O$, 7.70% Ca.

B. Fermentpräparate.

Alle Fermentpräparate wurden in gleicher Weise wie in der vorangeh-

enden Mitteilung hergestellt.

C. Reaktionsbedingungen und Bestimmungsmethode.

Das Reaktionsgemisch der Hemmungsversuche besteht aus:

Substrat, 0.0048 mol p-Nitrophenol- β -D-galaktosid 1 ccm,

Pufferlösung, 0.1 mol Acetatgemisch von pH 4.8, enthaltend

Hemmstoff in einer Konzentration von 0.1333 Mol 2 ccm,

Enzymlösung 1 ccm.

Versuchstemperatur: $30 \pm 0.5^\circ$.

Die in dieser Pufferlösung etwas schwer löslichen Ca-salze der Glucon- und Galaktonsäure werden unter schwachem Erwärmen in Lösung gebracht. Dass es dabei keine Laktonisierung stattfindet, lässt sich aus dem unveränderten Drehungsvermögen erkennen.

Daraus wird 1.0 ccm Probe entnommen und in 9 ccm 10-Proz. Sodalösung hineinpipettiert. Die hierauf entstandene gelbe Färbung wird mit der Standardlösung verglichen, woraus sich der Hemmungsgrad berechnet.

Protokolle

Tabelle 2.

Versuch mit dem Fermentpräparat
aus *Prunus armeniaca*.

Hemmungskörper	Spaltung nach 40 Min.	Spaltungs % nach 120 Min.
Ohne	30	43
o-Kresol- β -D-galaktosid	25	40
o-Kresol- β -D-glucosid	23	35
Galaktose	30	43
Glucose	30	43
Ca-galaktonat	30	43
Ca-gluconat	10	20

Tabelle 4.

Versuch mit dem Fermentpräparat
aus *Glycine hispida*.

Hemmungskörper	Spaltungs % nach 253 Min.	Spaltungs % nach 1415 Min.
Ohne	5	20

Tabelle 3.

Versuch mit dem Fermentpräparat
aus *Sesamum indicum*.

Hemmungskörper	Spaltungs % nach 350 Min.	Spaltungs % nach 1785 Min.
Ohne	20	50
o-Kresol- β -D-galaktosid	10	23
o-Kresol- β -D-glucosid	20	50
Galaktose	5	18
Glucose	20	50
Ca-galaktonat	5	10
Ca-gluconat	20	50

Tabelle 5.

Versuch mit dem Fermentpräparat
aus *Zea mays*.

Hemmungskörper	Spaltungs % nach 95 Min.	Spaltungs % nach 260 Min.
Ohne	30	50

Phenol- β -d-galaktosid	0	3
Phenol- β -d-glucosid	5	20
Galaktose	0	4
Glucose	5	23
Ca-galaktonat	0	2
Ca-gluconat	5	20

Tabelle 6.

Versuch mit dem Fermentpräparat
aus Takadiastase.

Hemmungs- körper	Spaltungs % nach 83 Min.	Spaltungs % nach 200 Min.
Ohne	30	50
o-Kresol- β -d-galaktosid	10	20
o-Kresol- β -d-glucosid	30	50
Galaktose	10	20
Glucose	30	50
Ca-galaktonat	10	18
Ca-gluconat	30	50

Tabelle 8.

Versuch mit dem Fermentpräparat
aus *Irpex lacteus*.

Hemmungs- körper	Spaltungs % nach 1060 Min.	Spaltungs % nach 8770 Min.
Ohne	43	65
o-Kresol- β -d-galaktosid	20	40
o-Kresol- β -d-glucosid	43	65
Galaktose	15	30
Glucose	43	65
Ca-galaktonat	20	40

o-Kresol- β -d-galaktosid	10	20
o-Kresol- β -d-glucosid	30	50
Galaktose	10	20
Glucose	30	50
Ca-galaktonat	8	15
Ca-gluconat	30	50

Tabelle 7.

Versuch mit dem Fermentpräparat
aus *Aspergillus niger*.

Hemmungs- körper	Spaltungs % nach 360 Min.	Spaltungs % nach 870 Min.
Ohne	20	40
o-Kresol- β -d-galaktosid	8	15
o-Kresol- β -d-glucosid	20	40
Galaktose	8	16
Glucose	20	40
Ca-galaktonat	5	10
Ca-gluconat	20	40

Tabelle 9.

Versuch mit dem Fermentpräparat
aus *Corticium centrifugum* (Myzel).

Hemmungs- körper	Spaltungs % nach 2325 Min.	Spaltungs % nach 6945 Min.
Ohne	7	15
o-Kresol- β -d-galaktosid	3	6
o-Kresol- β -d-glucosid	7	15
Galaktose	3	6
Glucose	7	15
Ca-galaktonat	3	6

Ca-gluconat	43	65
-------------	----	----

Tabelle 10.

Versuch mit dem Fermentpräparat aus der Kulturlösung von *Corticium centrifugum*.

Hemmungskörper	Spaltungs % nach 120 Min.	Spaltungs % nach 320 Min.
Ohne	18	31
o-Kresol- β -d-galaktosid	8	15
o-Kresol- β -d-glucosid	16	31
Galaktose	12	18
Glucose	18	31
Ca-galaktonat	10	18
Ca-gluconat	15	31

Tabelle 12.

Versuch mit dem Fermentpräparat aus der Ochsenleber.

Hemmungskörper	Spaltungs % nach 197 Min.	Spaltungs % nach 432 Min.
Ohne	30	50
o-Kresol- β -d-galaktosid	20	52
o-Kresol- β -d-glucosid	20	30
Galaktose	30	50
Glucose	30	50
Ca-galaktonat	30	50
Ca-glucona	10	17

in seinem Hemmungsverhalten dem Emulsin-typ, während sich das Aktivitätsverhältnis in der Spaltung einiger β -Galaktoside, namentlich des o-Kresol, Guajakol-, Methylsalicylat-, m, m'-Xylenol- β -galaktosids, als ganz verschieden von Mandel- bzw. Aprikose-emulsin erweist. Hierbei kann es auch möglich sein, wie von Akamatsuschen Schülern angenommen⁷⁾, dass derartige neue

Ca-gluconat	7	15
-------------	---	----

Tabelle 11.

Versuch mit dem Fermentpräparat aus dem Schneckenhepatopankreas.

Hemmungskörper	Spaltungs % nach 120 Min.	Spaltungs % nach 320 Min.
Ohne	50	80
o-Kresol- β -d-galaktosid	30	52
o-Kresol- β -d-glucosid	30	52
Galaktose	50	80
Glucose	50	80
Ca-galaktonat	32	54
Ca-gluconat	28	54

III. Fraktionierungsversuche an einigen β -Galaktosidasepräparaten Verschiedener Herkunft. Ein Beitrag zur Frage der Glykosidasetyphen.

Im zweiten Kapitel dieser mitteilungen habe ich hervorgehoben, dass es nicht selten solche β -Galaktosidasen gibt, die in ihrem Hemmungstyp zwar dasselbe, jedoch in dem Aktivitätsverhältnis voneinander verschieden sind. So gehört z.B. das Enzym aus Ochsenleber

Aktivitätsverhältnis durch Mischung zweier β -Galaktosidasen von Emulsin- und Taka-typ zustande kommt, wobei die letztere wegen geringeres Gehaltes dem Nachweis durch hemmung entgangen worden war. Zur Entscheidung dieser Frage habe ich die Fraktionierung der Enzympräparate unternommen, um zu sehen, ob eine teilweise Trennung beider β -Galaktosidase-typen stattfinden würde, falls das Enzympräparat wirklich ein Gemisch darstellt. Solche Versuche habe ich schon an der β -Galaktosidase von Takadiastase ausgeführt und festgestellt, dass nur einzige β -Galaktosidase darin vorkommt. In der vorliegenden Arbeit wurde an Fermentpräparaten aus Aprikose-emulsin, *Sesamum*-Samen und Ochsenleber versucht, zu prüfen, ob das Aktivitätsverhältnis gegenüber verschiedenen β -Galaktosiden sowie auch das Verhalten gegen Hemmungskörper bei der Fraktionierung sich ändern oder nicht.

Zur Bestimmung des Aktivitätsverhältnisses dienten als Substrat bei Aprikosen-ferment Phenol- und o-Kresol- β -galaktosid und bei den Fermenten aus *Sesamum*-Samen sowie Ochsenleber zwölf β -Galaktoside mit verschiedenen phenolischen Aglykonen. Ausserdem wurde die β -glucosidatische Wirkung jeder Fermentfraktion mit Phenol- und o-Kresol- oder p-Nitrophenol- β -glucosid als Substrat ermittelt.

Das Hemmungstyp wurde, nach der schönen Methode von Akamatsu, mit p-Nitrophenol- β -galaktosid als Substrat und mit Phenol- oder o-Kresol- β -galaktosid und entsprechenden β -Glucosiden, Galaktose, Glucose Ca-galaktonat und -gluconat als Hemmungskörper bestimmt. Die erhaltenen Resultate sind in folgenden Tabellen 1—3 zusammengestellt.

Tabelle 1.

Fraktionierung des Aprikose-emulsins.
Aktivitätsverhältnis und Hemmungstyp.

Fermentfraktionen: Dazu wurde die Fermentlösung durch stufenweise Fällung mit Methanol fraktioniert.

- Nr. 1. Ausgangslösung A, 1.7—proz. Lösung von nach B. Helferich und Mitarbeitern¹⁾ mit Tanninverfahren hergestelltem Präparat.
- Nr. 2. Ausgangslösung A, gefällt mit 15-proz. Methanol, Niederschlag in Wasser gelöst.
- Nr. 3. Filtrat aus Nr. 2, gefällt mit 25-proz. Methanol, Niederschlag in Wasser gelöst.
- Nr. 4. Filtrat aus Nr. 3, gefällt mit 40-proz. Methanol, Niederschlag in Wasser gelöst.
- Nr. 5. Filtrat aus Nr. 4, gefällt mit 60-proz. Methanol, Niederschlag in Wasser gelöst.

Nr. 6. Filtrat aus Nr. 5, gefällt mit 80-proz. Methanol, Niederschlag in Wasser gelöst.

Nr. 7. Ausgangslösung B, eine andere Sorte des Tanninpräparats, 1.7 proz. Lösung.

Nr. 8. Ausgangslösung B, gefällt mit 50-proz. Methanol, Niederschlag in Wasser gelöst.

Nr.	Hemmungs- typ	Aktivitätsverhältnis*			
		β -Galaktosid		β -Glucosid	
		Phenol	o-Kresol	Phenol	o-Kresol
1.	E**	1	16.3	6.95 (1)	161.1 (23.2)
2.	E	1	12.6	5.7 (1)	176.6 (30.8)
3.	—	1	20.2	8.6 (1)	179.0 (21.0)
4.	—	1	17.3	13.9 (1)	378.0 (27.2)
5.	E	1	17.8	1.28 (1)	28.2 (22.0)
6.	E	1	18.8	4.74 (1)	110.5 (23.3)
7.	—	1	14.5	6.1 (1)	143.3 (23.6)
8.	— Hg	1	18.4	8.8 (1)	229.4 (26.1)

* Aktivitätswert für Phenol- β -galaktosid ist als 1 gesetzt. Eingeklammerte Zahlen zeigen das Aktivitätsverhältnis zwischen Phenol- und o-Kresol- β -glucosid.

** E bedeutet die Hemmung von Emulsin-typ, d.h. die Fermentwirkung wird durch β -Glucosid, β -Galaktosid und Ca-gluconat, nicht aber durch Glucose, Galaktose und Ca-galaktonat gehemmt.

Daraus ist zu ersehen, dass das Verhältnis der Fermentaktivität gegenüber beiden β -Galaktosiden bei der Fraktionierung fast unverändert bleibt. Dies deutet mit Wahrscheinlichkeit darauf hin, dass die β -Galaktosidase des Aprikose-emulsins einheitlich ist. Derselbe Sachverhalt kann auch von der β -Glucosidase des Emulsins gelten.

Bezüglich des Zusammenhanges der β -Glucosidase mit der β -Galaktosidase in Emulsin ist schon von B. Helferich und Mitarbeitern⁵⁾ eine Ansicht hervorgehoben worden, wonach sowohl β -Glucoside als auch β -Galaktoside durch ein und dasselbe Enzym das Süssmandelemulsins gespalten werden. Gegen diese Auffassung spricht jedoch der Befund von Miwa und Mitarbeitern²⁾, dass das Aktivitätsverhältnis des Aprikose-emulsins gegenüber Phenol- β -glucosid und β -galaktosid bei der Fraktionierung mittels Tonerde-B-Adsorption sowie auch mit Methanolfällung Veränderung erfährt, die sicher ausserhalb der Fehlergrenzen liegt. Solche Resultate können wohl

am leichtesten mit der Annahme erklärt werden, dass die Spaltung der β -Glucoside und der β -Galaktoside durch verschiedene Fermente des Emulsins bewirkt wird. Auf ganz anderen Gründen stellte Akamatsusche Schule (196) eine Spezifitätstheorie auf, wonach β -Glucosidase und β -Galaktosidase des Emulsins verschiedene Enzyme darstellen. Auch meine Versuche haben ergeben, dass der Wirkungsquotient, β -Glucosidase : β -Galaktosidase, durch Fraktionierung mit Methanol oft beträchtliche Schwankung aufweist, was ebenfalls die Annahme der Sonderexistenz zweier, verschiedener Enzyme nahelegt.

Tabelle 2.

Fraktionierung der Fermente von *Sesamum indicum*.

Aktivitätsverhalthis und Hemmungstyp.

Fermentfraktionen :

- Nr. 1. Ausgangslösung, Auszug mit 0.05n-Ammoniak aus Acetonpulver der Samen von *Sesamum indicum*, neutralisiert, von entstandenem Niederschlag befreit, dialysiert.
- Nr. 2. Niederschlag, der beim Neutralisieren des ammoniakalischen Extrakts gebildet wurde, in Wenig Wasser suspendiert.
- Nr. 3. Fermentlösung Nr. 1, adsorbiert an Tonerde B bei pH 5.6, gewaschen mit 0.05m Acetatgemisch von pH 4.8, eluiert mit 0.05n-NH₃, neutralisiert.
- Nr. 4. Fermentlösung Nr.1, mit Essigsäure zu pH 4.8 angesäuert, von entstandenem Niederschlag befreit, dialysiert.
- Nr. 5. Fermentlösung Nr.4, eingeeengt bei 30-33° unter vermindertem Druck.

Nr.	Hemmungstyp	Aktivitätsverhältnis *													
		β -Galaktosid vor												β -Glucosid vor	
		Phenol	o-Kresol	p-Kresol	m-Kresol	Guajakol	Salicyl-aldehyd	Methylsalicylat	p-Oxyacetophenon	Vanillin	Isoeugenol	1,3,5-Xylenol	p-Nitrophenol	Phenol	o-Kresol
1.	T**	1	0.84	0.92	0.88	0.56	0.75	0.24	0.81	0.73	0.41	0.94	1.03	0.16	0.26
2.	T	1	1	1.07	1	0.56	0.92	0.23	1.07	1	0.50	1	1.24	0.21	0.88
3.	T	1	0.82	1.01	1	0.56	0.82	0.25	1.02	0.88	0.53	1.05	0.94	0.92	0.40
4.	T	1	0.80	0.87	1.04	0.64	0.89	0.27	0.90	0.75	0.50	1.03	1.02	0.12	0
5.	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1.01	0.17	0.02

* Die Aktivität für Phenol- β -galaktosid ist als 1 gesetzt.** T : Hemmung von Taka-typ, d. h. β -Galaktosidasewirkung wird durch β -

Galaktoside, Galaktose und Ca-galaktonat gehemmt, nicht aber durch Verbindungen der Glucosereihe.

Die Ergebnisse in Tabelle 2. zeigen, dass das Aktivitätsverhältnis der β -Galaktosidase von *Sesamum*-samen gegenüber zwölf β -Galaktosiden bei der Fermentfraktionierung fast unverändert bleibt. Auch das Hemmungstyp jeder Fermentfraktion bleibt dasselbe. Daraus kann man mit wahrscheinlichkeit schliessen, dass im Samen von *Sesamum* nur einzige β -Galaktosidase im Spiel ist.

Hingegen verhielt sich die β -Glucosidatische Aktivität des *Sesamum*-enzym unabhängig von der β -Galaktosidasewirkung bei der Fermentfraktionierung, was man als Beweis dafür betrachten darf, dass beide Glykosidasen von *Sesamum*-samen voneinander verschieden sind. Weiterhin stösst man bei der β -Glucosidase von *Sesamum*-samen auf einen merkwürdigen Tatbestand, dass das Verhältnis der Wirkung gegen Phenol- β -glucosid : o-Kresol- β -glucosid, eine so erhebliche Schwankung aufweis, dass sie schwer für experimentellen Fehler gehalten werden kann. Solche Ergebnisse lassen uns vielmehr daran denken, dass die *Sesamum*- β -Glucosidase ein Gemisch von mehr als zwei Enzymen mit verschiedener relativer Spezifität darstellt. Näheres darüber soll an anderer Stelle berichtet werden.

Tabelle 3.

Fraktionierung der Fermente von Ochsenleber.
Aktivitätsverhältnis und Hemmungstyp.

Fermentfraktionen :

- Nr. 1. Ausgangslösung A, Ochsenleberautolysat, klar zentrifugiert und dialysiert.
- Nr. 2. Fermentlösung Nr. 1, 28 Tage bei 25-27° stehen gelassen.
- Nr. 3. Ausgangslösung B, Autolysat anderer Sorte, dialysiert.
- Nr. 4. Fermentlösung Nr. 3, adsorbiert an Tonerde B bei pH 5.5, eluiert bei pH 4.8, dialysiert.
- Nr. 5. Tonerde B-Adsorbat, nach Vorelution bei pH 4.8, eluiert mit 0.05n-NH₃, dialysiert.
- Nr. 6. Restlösung der Tonerde B-Adsorption, dialysiert.
- Nr. 7. Dieselbe Fermentlösung wie Nr. 6, Aktivitätsbestimmung derselben aber erfolgte bei pH 7.0 im gegensatz zu pH 4.8 bei Nr. 6.
- Nr. 8. Acetonpräparat der Ochsenleber, mit 0.05n-NH₃ ausgezogen, neutralisiert, dialysiert.
- Nr. 9. Rückstand aus Nr. 8, unter Zusatz von Wasser, 74 Std., bei 30° autolysiert, dialysiert.

Nr.10. Niederschlag, der beim Zentrifugieren der Ausgangslösung B gebildet wurde, in wenig Wasser suspendiert.

Nr.	Hemmungstyp	Aktivitätsverhältnis *														β-Glucosid von	
		β-Galaktosid von															
		Phenol	o-Kresol	p-Kresol	m-Kresol	Guajakol	Salicyl- aldehyd	Methyl- salicylat	p-Oxyacet- ophenon	Vanillin	Isoeugenol	1,3,5-Xy- enol	p-Nitro- phenol				
1.	E**	1	1.14	1.31	1.15	0.104	3.91	0.048	3.91	4.87	0.46	1	2.51	4.55	2.63		
2.	E	1	—	1.42	—	—	—	—	4.13	4.25	—	1.02	3.44	1.60	3.74		
3.	E	1	1	1.39	1.25	0.12	—	0.048	5.23	5.84	0.44	1.16	3.16	12.4	12.6		
4.	E	1	0.93	1.46	1.25	—	—	—	2.84	4.05	0.39	1.01	2.28	12.6	22.3		
5.	E	1	1.02	1.53	1.38	—	—	—	4.90	4.92	0.51	1.13	3.00	15.3	13.1		
6.	E	1	1.02	1.50	1.28	0.10	—	0.054	4.44	4.93	0.51	1.20	3.81	10.1	11.2		
7.	—	1	1.03	1.46	1.44	0.12	—	0.050	5.74	6.11	0.42	1.03	4.30	—	—		
8.	E	1	1.07	1.37	1.30	—	6.17	—	6.11	6.00	—	1.07	4.56	5.56	3.84		
9.	E	1	1.11	2.02	1.64	—	—	—	6.20	6.86	—	—	5.30	—	—		
10.	E	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		

* Die Aktivität für Phenol-β-galaktosid ist als 1 gesetzt.

** E bedeutet die Hemmung von Emulsin-typ.

Aus dieser Tabelle ist zu ersehen, dass sowohl das Aktivitätsverhältnis gegenüber angegebenen β-Galaktosiden wie auch das Hemmungstyp bei der Fraktionierung des Fermentpräparates fast unverändert bleiben. Demnach erscheint es uns möglich, anzunehmen, dass die β-Galaktosidase der Ochsenleber vielleicht einheitlich sei. Nach ihrer Wirkungsreihenfolge in der Spaltung von Phenol-, o-, m- und p-Kresol-β-galaktosid sowie ihrem Verhalten gegenüber Hemmungskörpern, ist die β-Galaktosidase der Ochsenleber von Kobayashi ⁷⁾ dem Emulsin-typ zugeteilt worden. Es ist insofern wohl möglich, das Ochsenleber-ferment in Emulsin-typ einzureihen, als man das Verhalten dieses Enzyms gegenüber den geprüften Hemmungskörpern als wichtiges Merkmal in Betracht zieht. Jedoch lässt die Tatsache, dass das Aktivitätsverhältnis dieses Fermentes gegenüber verschiedenen β-Galaktosiden von demjenigen des Mandelemulsins mehr oder weniger stark abweicht, mit Wahrscheinlichkeit vermuten, dass beide β-Galaktosidasen in allen Einzelheiten miteinander nicht identisch sind. Hierzu erscheint uns die Annahme vielmehr naheliegend, dass die Struktur des Enzyms, die das

Verhalten gegenüber Hemmungskörpern bestimmt, bei beiden Fermenten dieselbe und diejenige, die für das Aktivitätsverhältnis verantwortlich ist, voneinander verschieden ist.

Für solche Auffassung spricht ferner auch der Unterschied in der pH-Abhängigkeit zwischen den beiden β -Galaktosidasen. Wie Abbildung 1 zeigt, weist die Aktivitäts-pH-Kurve der β -Galaktosidase der Ochsenleber eine ziemlich breite pH-Optimumzone auf, was auch von Kobayashi beobachtet worden ist. Sie weicht von derjenigen des Mandel-emulsins stark ab.

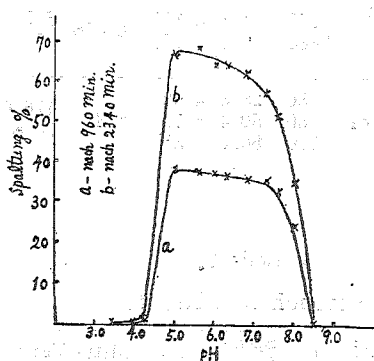


Fig. 1.

Aktivitäts-pH-Kurve der β -Galaktosidase der Ochsenleber.

Da sie nicht etwa durch Begleitstoffe zustande kommt, sondern der β -Galaktosidase der Ochsenleber eigen ist, kann man auch aus dem Umstande ersehen, dass die Kurve bei der Fraktionierung des Enzyms unverändert bleibt. Der von etwa pH 5 an nach saurer Seite steil absteigende Verlauf der Kurve findet seinen Grund vielleicht darin, dass die β -Galaktosidase der Ochsenleber gegen H-Ionen ungemein empfindlich ist. So ist z. B. beobachtet worden, dass eine Fermentlösung aus Ochsenleber durch 3-minütiges Aussetzen zu pH 4.4 etwa 70-proz. ihrer β -galaktosidatischen Aktivität einbüßte.

Aus den obigen Ergebnissen möchte ich folgendes erwähnen: es ist möglich, auf Grund des Verhaltens gegenüber Hemmungskörpern, β -Galaktosidase in zwei Typen, Emulsin- und Taka-typ, einzuteilen, jedoch bedeutet die Identität in dem Hemmungstyp nicht immer die der Gesamtstruktur des Fermentmoleküls.

Versuche.

Die Bedingungen der enzymatischen Reaktion sowie der Hemmungsversuche habe ich in einer früheren Mitteilung¹⁵⁾ und im zweiten Kapitel dieser Berichte beschrieben. Zur Ermittlung des pH-Optimums an verschiedenen Fermentfraktionen der Ochsenleber, mit Ausnahme von Nr. 1, diente die p-Nitrophenolmethode, die bei den Hemmungsversuchen immer angewendet wurde.

Protokolle.

A: Bestimmung des Aktivitätsverhältnisses an Fermentfraktionen (Nr. 1-8) aus den Samen von *Prunus armeniaca*.

Tabelle 4.

Versuch mit Nr. 1

Substrat: β -Galakt- osid von	t Min.	Spal- tung %	10 ³ . k	Mitt- el	Ver- h ³ ltn- is
Phenol	30	21.3	3.47	2.95	1
	45	25.8	2.88		
	70	36.2	2.79		
	80	40.8	2.85		
o-Kresol*	120	53.1	2.74	8.17	16.3
	15	23.7	7.83		
	30	41.9	7.86		
β -Glucos- id von Phenol	45	57.8	8.83	20.50	6.95 (1)
	10	38.3	20.97		
	15	49.1	19.55		
o-Kresol*	20	60.7	20.98	23.93	161.1 (23.2)
	5	22.1	21.7		
	10	42.9	24.3		
o-Kresol*	15	59.0	25.8		

* Enzymmenge: 1/6. ** Enzymmenge: 1/20.

Tabelle 5.

Versuch mit Nr. 2.

Substrat: β -Galakt- osid von	t Min.	Spal- tung %	10 ³ . k	Mitt- el	Ver- h ³ ltn- is
Phenol	3880	23.2	0.0295	0.0308	1
	8730	44.2	0.0290		
	10930	57.3	0.0338		
o-Kresol	330	24.1	0.363	0.389	12.6
	630	44.9	0.407		
	1440	73.2	0.388		
β -Glucos- id von Phenol	970	24.5	0.177	0.176	5.7 (1)
	3880	79.0	0.175		
o-Kresol	30	28.8	4.92	5.44	176.6 (30.8)
	60	50.4	5.16		
	110	80.0	6.35		

Tabelle 6.

Versuch mit Nr. 3.

Substrat: β -Galakt- osid von	t Min.	Spal- tung %	10 ³ . k	Mitt- el	Verh- ältnis
Phenol	520	24.6	0.236	0.218	1
	1280	44.5	0.200		
	1810	59.6	0.217		
o-Kresol	20	18.9	4.55	4.39	20.2
	55	41.9	4.29		
	85	57.9	4.41		
β -Glucos- id von Phenol	60	22.8	1.87	1.88	8.6 (1)
	120	40.2	1.86		
	180	54.4	1.89		
o-Kresol*	10	23.1	11.41	13.01	179.0 (21.0)
	20	47.4	13.95		
	30	61.1	13.67		

* Enzymmenge=1/3

Tabelle 7.

Versuch mit Nr. 4.

Substrat: β -Galakt- osid von	t Min.	Spal- tung %	10 ³ . k	Mitt- el	Verh- ältnis
Phenol	180	22.1	0.603	0.655	1
	260	32.0	0.644		
	515	54.9	0.671		
o-Kresol*	15	16.5	5.22	5.67	17.3
	30	31.7	5.52		
	45	42.9	5.57		
	60	58.4	6.34		
β -Glucosid von Phenol*	15	17.2	5.47	6.05	13.90 (1)
	30	35.1	6.26		
	45	46.8	6.09		
	60	56.9	6.09		
o-Kresol*	85	70.6	6.26	24.76	378.0 (27.2)
	5	22.8	22.48		
	10	44.2	25.34		
	15	59.0	25.81		
o-Kresol*	20	69.0	25.43		

*Enzymmenge=1/2 **=1/1.5 ***=1/10

Tabelle 8.

Versuch mit Nr. 5.

Substrat: β -Galakt- osid von	t Min.	Spal- tung %	10 ³ . k	Mitt- el	Verh- ältnis
Phenol	* 520	17.1	0.157	0.166	1
	1440	43.5	0.177		
	2155	55.8	0.165		

Tabelle 9.

Versuch mit Nr. 6.

Substrat: β -Galakt- osid von	t Min.	Spal- tung %	10 ³ . k	Mitt- el	Verh- ältnis
Phenol	3350	14.8	0.0210	0.0230	1
	5290	24.6	0.0230		
	12310	51.3	0.0250		

o-Kresol*	75	23.5	1.55	1.48	17.8
	135	35.7	1.41		
	150	38.0	1.39		
	225	54.9	1.53		
β -Glucosid von Phenol	265	23.5	0.439	0.425	1.28 (1)
	525	40.2	0.425		
	725	54.9	0.435		
	1365	71.6	0.401		
o-Kresol	15	28.2	9.59	9.36	28.2 (22.0)
	30	47.4	9.30		
	50	65.3	9.19		

* Enzymmenge=1/2 ** =1/4

Tabelle 10.

Versuch mit Nr. 7.

Substrat: β -Galaktosid von	t Min.	Spaltung %	10 ³ .k	Mittel	Verhältnis
Phenol	60	12.2	0.941	0.905	1
	120	24.1	0.959		
	240	38.8	0.889		
	360	46.8	0.762		
	420	59.6	0.937		
o-Kresol*	12	16.5	6.53	6.57	14.5
	20	25.2	6.31		
	40	46.8	6.60		
	60	61.1	6.84		
β -Glucosid von Phenol	20	22.1	5.43	5.50	6.1 (1)
	40	41.3	5.79		
	60	51.7	5.32		
	80	66.4	5.72		
	100	70.6	5.32		
o-Kresol*	10	25.2	12.61	12.97	143.3 (23.6)
	15	35.1	12.50		
	20	43.5	12.40		
	30	63.0	14.39		

* Enzymmenge=1/2 ** =1/10

B: Hemmungsversuche mit den Fermentfraktionen (Nr. 1-8) aus den Samen von *Prunus armeniaca*.

Tabelle 12.

Versuch mit Nr. 1.

(Enzymmenge 1/25)

Hemmungskörper	Spaltung% nach	
	20 Min.	65 Min.
Ohne	15	25
Phenol- β -d-galaktosid	10	15
Phenol- β -d-glucosid	10	15
Galaktose	15	25

o-Koesol*	480	23.6	0.242	0.216	18.8
	1140	42.2	0.208		
	1770	56.7	0.205		
	2630	71.6	0.207		
β -Glucosid von Phenol	745	17.7	0.114	0.109	4.74 (1)
	2350	45.5	0.112		
	4740	66.4	0.100		
o-Kresol	30	16.5	2.61	2.54	110.5 (23.3)
	60	30.0	2.58		
	120	49.7	2.42		

* Enzymmenge=1/2

Tabelle 11.

Versuch mit Nr. 8.

Substrat: β -Galaktosid von	t Min.	Spaltung %	10 ³ .k	Mittel	Verhältnis
Phenol	1410	16.5	0.0556	0.0558	1
	4430	43.5	0.0560		
o-Kresol	150	27.6	0.94	1.03	18.4
	225	41.8	1.05		
	300	53.0	1.09		
β -Glucosid von Phenol	265	28.2	0.543	0.491	8.8 (1)
	525	43.5	0.472		
	795	56.7	0.457		
o-Kresol*	10	25.2	12.6	12.8	229.4 (26.1)
	30	59.0	12.9		

* Enzymmenge=1/10

Tabelle 13.

Versuch mit Nr. 2.

Hemmungskörper	Spaltung% nach	
	190 Min.	550 Min.
Ohne	20	35
Phenol- β -d-galaktosid	15	25
Phenol- β -d-glucosid	14	23
Galaktose	20	35

Glucose	15	25
Ca-galaktonat	15	25
Ga-gluconat	5	10

Tabelle 14.

Versuch mit Nr. 5.
(Enzymmenge 1/20)

Hemmungs- körper	Spaltung % nach	
	260 Min.	720 Min.
Ohne	22	35
Phenol- β -d- galaktosid	16	26
Phenol- β -d- glucosid	15	21
Galaktose	22	35
Glucose	22	35
Ca-galaktonat	22	35
Ca-gluconat	7	12

Glucose	20	35
Ca-galaktonat	20	35
Ca-gluconat	6	13

Tabelle 15.

Versuch mit Nr. 6.

Hemmungs- körper	Spaltung % nach	
	240 Min.	620 Min.
Ohne	23	36
Phenol- β -d- galaktosid	17	26
Phenol- β -d- glucosid	14	23
Galaktose	23	36
Glucose	23	36
Ga-galaktonat	23	36
Ca-gluconat	6	12

C: Bestimmung des Aktivitätsverhältnisses an Fermentfraktionen
(Nr. 1- 5) aus den Samen von *Sesamum indicum*.

Tabelle 16.

Versuch mit Nr. 1.

Substrat: β -Galakt- osid von	t Min.	Spal- tung %	10% k	Mitt- el	Verh- ältnis
Phenol	1200 2830	33.4 57.3	0.147 0.131	0.139	1
o-Kresol	1200 2830	29.4 50.1	0.126 0.107	0.117	0.84
p-Kresol	1200 2830	30.3 56.1	0.130 0.126	0.128	0.92
m-Kresol	1235 4210	30.6 67.8	0.127 0.117	0.122	0.88
Guajakol	1235 4210	22.1 47.7	0.0878 0.0669	0.0774	0.56
Salicyl- aldehyd	1235 4210	27.3 60.2	0.112 0.095	0.104	0.75
Methylsa- licylat	1235 4210 10080	10.6 27.0 46.8	0.0594 0.0325 0.0274	0.0331	0.24

p-Oxyace- tophenon	1235 4210	32.7 60.5	0.139 0.096	0.113	0.81
Vanillin	1235 4210	26.7 59.9	0.109 0.094	0.102	0.73
Isoeugen- ol	1235 4210	19.5 44.9	0.0763 0.0615	0.0699	0.41
1,3,5- Xylenol	1200 2830	33.0 53.4	0.145 0.117	0.131	0.94
p-Nitro- phenol	1200 2830	35.4 56.7	0.158 0.128	0.143	1.03
β -Glucos- id von Phenol	2830 8380 12899	14.5 36.9 45.5	0.0240 0.0238 0.0205	0.0228	0.164 (1)
o-Kresol	1420 4190 8645	11.8 28.8 51.3	0.0384 0.0352 0.0362	0.0366	0.26 (1.6)

Tabelle 17.

Versuch mit Nr. 2.

Substrat: β -Galakt- osid von	t Min.	Spal- tung %	10% k	Mitt- el	Verh- ältnis
Phenol	1435 2890	37.2 60.8	0.141 0.141	0.141	1
o-Kresol	1065 2535	33.4 50.1	0.166 0.119	0.143	1.01
p-Kresol	1065 2535	22.8 57.3	0.155 0.146	0.151	1.07
m-Kresol	1200 2600	34.1 54.0	0.151 0.130	0.141	1.00
Guajakol	1065 2535	18.9 34.5	0.0854 0.0725	0.0790	0.56
Salicyl- aldehyd	1200 2600	32.7 50.4	0.143 0.117	0.130	0.92
Methylsa- licylat	1065 5335 7589	9.3 28.2 40.8	0.0596 0.0270 0.0300	0.0522	0.23
p-Oxyace- tophenon	1200 2600	33.0 60.5	0.145 0.155	0.150	1.07
Vanillin	1200 2600	32.7 57.0	0.143 0.141	0.142	1.00
Iso- eugenol	1200 2920	20.6 32.0	0.0835 0.0574	0.0705	0.50
1, 3, 5- Xylenol	1065 2535	31.7 51.7	0.155 0.125	0.140	1.00
p-Nitro- phenol	1065 2535	39.8 57.0	0.207 0.144	0.176	1.24
β -Glucos- id von Phenol	1080 4160 8260	5.3 23.5 36.6	0.0217 0.0280 0.0239	0.0245	0.21 (1)
o-Kresol	1080 4160	22.1 42.7	0.104 0.103	0.1035	0.88 (4.22)

Tabelle 18.

Versuch mit Nr. 3.

Substrat: β -Galakt- osid von	t Min.	Spal- tung %	10% k	Mitt- el	Verh- ältnis
Phenol	1305 2755	36.3 54.3	0.149 0.127	0.138	1
o-Kresol	1155 2600	27.0 47.4	0.118 0.107	0.113	0.82
p-Kresol	1155 2600	32.0 55.5	0.145 0.135	0.140	1.01
m-Kresol	1155 2600	32.0 54.9	0.145 0.133	0.139	1.00

Guajakol	1155 4030	19.2 48.3	0.0830 0.0710	0.0770	0.56
Salicyl- aldehyd	1155 2600	27.0 47.4	0.118 0.107	0.113	0.82
Methyl- salicylat	2600 6878	20.4 38.8	0.0380 0.0310	0.0345	0.25
p-Oxyace- tophenon	1155 2600	33.0 54.3	0.151 0.131	0.141	1.02
Vanillin	1155 2600	25.2 49.4	0.129 0.114	0.122	0.88
Iso- eugenol	1155 4030	18.9 46.8	0.0788 0.0680	0.0734	0.53
1, 3, 5- Xylenol	1155 2600	32.0 57.3	0.145 0.143	0.144	1.05
p-Nitro- phenol	1305 2755	36.6 49.4	0.151 0.118	0.130	0.94
β -Glucos- id von Phenol	1085 5450 8260	9.3 40.2 54.9	0.0388 0.0409 0.0418	0.0401	0.29 (1)
o-Kresol	1085 5450 8260	12.6 54.6 59.3	0.0540 0.0629 0.0473	0.0547	0.40 (1.36)

Tabelle 19.

Versuch mit Nr. 4.

Substrat: β -Galakt- osid von	t Min.	Spal- tung %	10% k	Mitt- el	Verh- ältnis
Phenol	1130 3940	17.1 49.7	0.0721 0.0757	0.0740	1
o-Kresol	2665 6910	29.7 62.0	0.0574 0.0608	0.0591	0.80
p-Kresol	2665 6910	31.7 65.3	0.0621 0.0665	0.0643	0.87
m-Kresol	2665 6910	37.8 70.1	0.0774 0.0760	0.0767	1.04
Guajakol	2630 5518	27.6 41.3	0.0533 0.0419	0.0476	0.64
Salicyl- aldehyd	3129 6163	35.1 64.0	0.0600 0.0720	0.0660	0.89
Methylsa- licylat	2665 7000 9808	12.2 25.8 35.1	0.0212 0.0185 0.0192	0.0196	0.27
p-Oxyace- tophenon	2665 6910	35.1 66.4	0.0705 0.0685	0.0695	0.90
Vanillin	2665 6910	29.1 58.1	0.0560 0.0547	0.0554	0.75

Iso-eugenol	2350	17.7	0.0360	0.0370	0.50
	4028	29.7	0.0380		
1,3,5-Xylenol	2665	39.4	0.0820	0.0761	1.03
	6910	67.2	0.0701		
p-Nitro-Phenol	1130	18.3	0.0777	0.0752	1.02
	3940	48.3	0.0726		
β -Glucosid von Phenol	7000	10.6	0.00695	0.00888	0.12
	12647	27.0	0.01080		
o-Kresol	7000	0	—	—	—
	12647	Spur	—		

Tabelle 20.

Versuch mit Nr. 5

D: Hemmungsversuche mit den Fermentfraktionen (Nr. 1-4) aus den Samen von *Sesamum indicum*.

Tabelle 21.

Versuch mit Nr. 1.

Hemmungskörper	Spaltung % nach	
	350 Min.	1785 Min.
Ohne	20	50
o-Kresol- β -d-galaktosid	10	23
o-Kresol- β -d-glucosid	20	50
Galaktose	5	18
Glucose	20	50
Ca-galaktonat	5	10
Ca-gluconat	20	50

Tabelle 23.

Versuch mit Nr. 3.

Hemmungskörper	Spaltung % nach	
	420 Min.	1620 Min.
Ohne	26	52
Phenol- β -d-galaktosid	10	21
phenol- β -d-glucosid	26	52
Galaktose	10	21
Glucose	26	52

Substrat: β -Galaktosid von	t Min.	Spaltung %	10 ³ . k	Mittel	Verhältnis
p-Nitro-Phenol	327	11.0	0.155	0.149	1.01
	1447	38.8	0.148		
	2887	61.7	0.144		
Phenol	1065	27.9	0.134	0.147	1
	2479	59.6	0.159		
β -Glucosid von Phenol	2670	15.9	0.0282	0.0246	0.17
	8345	37.5	0.0244		
	15537	53.0	0.0211		
o-Kresol	8345	5.3	0.00281	0.0027	0.02
	18405	10.6	0.00264		

Tabelle 22.

Versuch mit Nr. 2.

Hemmungskörper	Spaltung % nach	
	310 Min.	1487 Min.
Ohne	25	50
Phenol- β -d-galaktosid	17	20
Phenol- β -d-glucosid	25	50
Galaktose	10	20
Glucose	25	50
Ca-galaktonat	5	10
Ca-gluconat	25	50

Tabelle 24.

Versuch mit Nr. 4.

Hemmungskörper	Spaltung % nach	
	1160 Min.	2640 Min.
Ohne	20	40
Phenol- β -d-galaktosid	5	10
Phenol- β -d-glucosid	20	40
Galaktose	5	10
Glucose	20	40

Ca-galaktonat	7	10
Ca-gluconat	26	52

Ca-galaktonat	2	6
Ca-gluconat	20	40

E: Bestimmung des Aktivitätsverhältnisses an Fermentfraktionen
(Nr. 1- 9) aus Ochsenleber.

Tabelle 25.
Versuch mit Nr. 1.

Substrat: β -Galakt- osid von	t Min.	Spal- tung %	10 ³ . k	Mitt- el	Ver- hältnis
Phenol	868 1947	30.0 56.4	0.178 0.185	0.181	1
o-Kresol	868 1330	33.4 47.1	0.204 0.208	0.206	1.14
p-Kresol	868 1947	42.2 59.0	0.275 0.199	0.237	1.31
m-Kresol	440 1505 1943	20.6 52.7 55.5	0.227 0.215 0.181	0.208	1.15
Guajakol	5568 11391	26.2 31.1	0.0236 0.0142	0.0189	0.104
Salicyl- aldehyd	197 417	29.7 45.8	0.777 0.639	0.708	3.91
Methyl- salicylat	5568 14288	12.9 19.2	0.0108 0.0067	0.00875	0.048
p-Oxyace- tophenon	197 417	29.7 45.8	0.777 0.639	0.708	3.91
Vanillin	67 193 325	12.2 31.7 51.0	0.843 0.848 0.953	0.881	4.87
Iso- eugenol	868 1947 4632	21.0 31.1 41.8	0.1176 0.0836 0.0508	0.0838	0.46
1,3,5- Xylenol	868 1947	30.3 55.8	0.180 0.183	0.182	1.00
p-Nito- phenol	145 325 465	15.9 28.2 35.1	0.519 0.443 0.404	0.455	2.51
β -Glucos- id von Phenol	70 113 1070	15.4 18.9 77.5	1.038 0.820 0.606	0.821	4.55
p-Nitro- phenol	210 1070	23.5 62.0	0.554 0.393	0.477	2.63

Tabelle 26.
Versuch mit Nr. 2.

Substrat: β -Galakt- osid von	t Min.	Spal- tung %	10 ³ . k	Mitt- el	Verh- hältnis
Phenol	3057 10010	15.4 26.7	0.0238 0.0135	0.0187	1
p-Kresol	3057 10010	17.7 44.2	0.0277 0.0253	0.0265	1.42
p-Oxyace- tophenon	1430 3130	23.8 40.5	0.0826 0.0720	0.0773	4.13
Vanillin	1430 3130	24.1 41.8	0.0838 0.0751	0.0795	4.25
1,3,5- Xylenol	3057 10010	15.9 26.4	0.0246 0.0133	0.0190	1.02
p-Nitro- phenol	1430 3130	20.6 34.5	0.0701 0.0587	0.0644	3.44
β -Glucos- id von Phenol	1430 3130	9.7 18.9	0.0310 0.0290	0.0300	1.60
p-Nitro- phenol	1430 3130	21.3 38.4	0.0727 0.0673	0.0700	3.74

Tabelle 27.
Versuch mit Nr. 3.

Substrat: β -Galakt- osid von	t Min.	Spal- tung %	10 ³ . k	Mitt- el	Verh- hältnis
Phenol	105 355 1420	11.0 32.3 72.9	0.500 0.477 0.400	0.459	1
o-Kresol	105 355 1420	11.0 32.0 73.5	0.500 0.472 0.406	0.459	1.00
p-Kresol	105 355 720	14.2 41.3 66.4	0.633 0.625 0.658	0.639	1.39
m-Kresol	105 355 720	12.9 38.1 60.2	0.571 0.587 0.556	0.571	1.25
Guajakol	1010 2580	12.9 25.8	0.0594 0.0502	0.0548	0.12
Methylsal- icylat	2580 4550	12.9 19.5	0.0233 0.0207	0.0220	0.048

p-Oxyacetophenon	52	28.2	2.77	2.40	5.23
	110	40.2	2.03		
	202	60.8	2.01		
Vanillin	52	29.4	2.91	2.68	5.84
	202	68.0	2.45		
Iso-eugenol	410	25.2	0.301	0.202	0.44
	2150	42.9	0.113		
1,3,5-Xylenol	105	14.2	0.633	0.535	1.16
	355	36.3	0.550		
	1420	75.0	0.424		
p-Nitrophenol	105	29.4	1.44	1.45	3.16
	202	49.1	1.45		
β -Glucosid von Phenol	37	37.8	5.57	5.69	12.4
	105	75.5	5.81		
p-Nitrophenol	37	40.8	6.15	5.78	12.6
	105	72.9	5.40		

Tabelle 28.

Versuch mit Nr. 4.

Substrat: β -Galaktosid von	t Min.	Spaltung %	10 ³ .k	Mittel	Verhältnis
Phenol	10050	14.8	0.00692	0.00659	1
	15565	20.1	0.00626		
o-Kresol	10050	14.2	0.00620	0.00613	0.93
	15565	18.3	0.00564		
p-Kresol	10050	20.6	0.00997	0.00961	1.46
	15565	28.2	0.00924		
m-Kresol	10050	17.7	0.00842	0.00826	1.25
	15565	25.2	0.00810		
p-Oxyacetophenon	7560	30.6	0.0208	0.0187	2.84
	15565	44.9	0.0166		
Vanillin	7560	35.7	0.0254	0.0227	4.05
	15565	51.0	0.0200		
Iso-eugenol	15565	8.8	0.00257		0.39
1,3,5-Xylenol	10050	15.1	0.00707	0.00667	1.01
	15565	20.1	0.00626		
p-Nitrophenol	7560	27.6	0.0186	0.0150	2.28
	15565	32.3	0.0109		
β -Glucosid von Phenol	1420	25.2	0.0888	0.0829	12.6
	3425	45.5	0.0770		
p-Nitrophenol	1420	42.9	0.171	0.147	22.3
	3425	62.0	0.123		

Tabelle 29.

Versuch mit Nr. 5.

Substrat: β -Galaktosid von	t Min.	Spaltung %	10 ³ .k	Mittel	Verhältnis
Phenol	1175	15.9	0.0640	0.0689	1
	2660	36.6	0.0737		
o-Kresol	1175	16.5	0.0667	0.0702	1.02
	2660	36.6	0.0737		
p-Kresol	1175	24.1	0.102	0.105	1.53
	2660	48.0	0.107		
m-Kresol	1175	22.1	0.0923	0.0948	1.38
	2660	44.9	0.0973		
p-Oxyacetophenon	210	18.9	0.433	0.341	4.90
	1175	49.1	0.250		
Vanillin	210	18.9	0.433	0.343	4.92
	1175	49.7	0.254		
Iso-eugenol	2660	22.1	0.0408	0.354	0.51
	4820	28.8	0.0299		
1,3,5-Xylenol	1175	18.9	0.0774	0.0779	1.13
	2660	38.1	0.0783		
p-Nitrophenol	550	22.1	0.241	0.193	3.00
	1175	32.3	0.144		
β -Glucosid von Phenol	155	30.9	1.03	1.05	15.3
	310	53.7	1.08		
p-Nitrophenol	195	33.8	0.919	0.903	13.1
	410	56.7	0.887		

Tabelle 30.

Versuch mit Nr. 6.

Substrat: β -Galaktosid von	t Min.	Spaltung %	10 ³ .k	Mittel	Verhältnis
Phenol	295	25.5	0.434	0.381	1
	1070	55.5	0.329		
o-Kresol	295	25.2	0.428	0.395	1.02
	1070	59.0	0.362		
p-Kresol	295	35.4	0.644	0.572	1.50
	1070	70.9	0.500		
m-Kresol	295	31.1	0.548	0.489	1.28
	1070	65.3	0.430		
Guajakol	2420	20.6	0.0414	0.0392	0.10
	3210	24.1	0.0370		
Methylalicylat	2420	12.9	0.0248	0.0206	0.054
	4210	14.8	0.0165		

p-Oxyacetophenon	90	31.1	1.77	1.69	4.44
	220	55.5	1.60		
Vanillin	90	34.5	2.04	1.88	4.93
	220	58.1	1.71		
Iso-eugenol	295	16.2	0.260	0.195	0.51
	1600	38.1	0.130		
1,3,5-Xylenol	295	29.7	0.519	0.456	1.20
	1070	62.0	0.393		
p-Nitrophenol	90	28.2	1.60	1.45	3.81
	220	48.0	1.30		
β -Glucosid von Phenol	40	30.0	3.87	3.85	10.1
	92	55.5	3.82		
p-Nitrophenol	40	32.3	4.21	4.28	11.2
	92	60.2	4.35		

Tabelle 31.

Versuch mit Nr 7; ausgeführt
bei pH 7.0 anstatt 4.8.

Substrat: β -Galaktosid von	t Min.	Spaltung %	10 ³ . k	Mittel	Verhältnis
Phenol	290	15.9	0.260	0.244	1
	1270	48.5	0.227		
o-Kresol	290	13.6	0.260	0.250	1.03
	1270	50.4	0.240		
p-Kresol	290	23.8	0.407	0.355	1.46
	1070	52.0	0.298		
m-Kresol	290	23.5	0.401	0.350	1.44
	1070	51.0	0.300		
Guajakol	2420	15.9	0.0311	0.0294	0.12
	321.	18.6	0.0278		
Methylsalicylat	2420	8.0	0.0150	0.0122	0.05
	4210	8.8	0.0095		
p-Oxyacetophenon	90	27.0	1.52	1.40	5.74
	220	47.4	1.27		
Vanillin	90	28.2	1.60	1.49	6.11
	220	50.4	1.38		
Iso-eugenol	295	8.8	0.136	0.102	0.42
	1600	22.1	0.068		
1,3,5-Xylenol	290	17.4	0.286	0.251	1.03
	1270	46.8	0.216		
p-Nitrophenol	90	22.1	1.21	1.05	4.30
	220	35.7	0.89		

Tabelle 32.

Versuch mit Nr. 8.

Substrat: β -Galaktosid von	t Min.	Spaltung %	10 ³ . k	Mittel	Verhältnis
Phenol	14070	6.60	0.00211	0.00175	1
	28830	8.80	0.00139		
o-Kresol	14070	7.30	0.00234	0.00187	1.07
	28830	8.80	0.00139		
p-Kresol	14070	8.80	0.00284	0.00240	1.37
	28830	12.20	0.00196		
m-Kresol	14070	8.80	0.00284	0.00227	1.30
	28830	10.60	0.00169		
Salicylaldehyd	10055	26.4	0.0132	0.0108	6.17
	24215	36.9	0.0083		
p-Oxyacetophenon	10055	26.20	0.01310	0.0107	6.11
	24215	36.60	0.00816		
Vanillin	10055	25.20	0.01250	0.0105	6.00
	24215	37.50	0.00843		
1,3,5-Xylenol	14070	7.30	0.00234	0.00187	1.07
	28830	8.30	0.00139		
p-Nitrophenol	10055	20.60	0.0100	0.00798	4.56
	24215	28.20	0.00595		
β -Glucosid von Phenol	14070	31.10	0.0115	0.00973	5.56
	28830	41.10	0.00196		
p-Nitrophenol	14070	22.80	0.00799	0.00671	3.84
	28830	30.30	0.00542		

Tabelle 33.

Versuch mit Nr. 9.

Substrat: β -Galaktosid von	t Min.	Spaltung %	10 ³ . k	Mittel	Verhältnis
Phenol	28850	6.60	0.00103		1
	28850	7.30	0.00114		
o-Kresol	28850	12.90	0.00208		2.02
	28850	10.60	0.00169		
m-Kresol	28850	14.80	0.00828	0.00638	6.20
	24250	22.10	0.00447		
p-Oxyacetophenon	8400	15.90	0.00695	0.00707	6.86
	24250	25.20	0.00520		
Vanillin	8400	12.90	0.00714	0.00545	5.3
	24250	18.90	0.00375		

F : Hemmungsversuche mit
jeder Fermentfraktionen
(Nr. 1-10) aus Ochsenleber.

Tabelle 34.

Versuch mit Nr. 1.

Hemmungskör- per	Spaltung % nach	
	197 Min.	432 Min.
Ohne	30	50
o-Kresol- β -d- galaktosid	20	27
o-Kresol- β -d- glucosid	20	30
Galaktose	30	50
Glucose	30	50
Ca-galaktonat	30	50
Ca-gluconat	10	17

Tabelle 35.

Versuch mit Nr. 3.

Hemmungskör- per	Spaltung % nach	
	50 Min.	122 Min.
Ohne	30	50
o-Kresol- β -d- galaktosid	22	35
o-Kresol- β -d- glucosid	20	30
Galaktose	30	50
Glucose	30	50
Ca-galaktonat	30	50
Ca-gluconat	10	18

Tabelle 36.

Versuch mit Nr. 4.

Hemmungskör- per	Spaltung % nach	
	1405 Min.	3845 Min.
Ohne	25	35
o-Kresol- β -d- galaktosid	18	25

o-Kresol- β -d- glucosid	15	22
Galaktose	25	35
Glucose	25	35
Ca-galaktonat	25	35
Ca-gluconat	8	14

Tabelle 37.

Versuch mit Nr. 5.

Hemmungskör- per	Spaltung % nach	
	260 Min.	1325 Min.
Ohne	25	45
o-Kresol- β -d- galaktosid	20	35
o-Kresol- β -d- glucosid	17	30
Galaktose	25	45
Glucose	25	45
Ca-galaktonat	25	45
Ca-gluconat	8	15

Tabelle 38.

Versuch mit Nr. 6.

Hemmungskör- per	Spaltung % nach	
	40 Min.	135 Min.
Ohne	20	40
o-Kresol- β -d- galaktosid	15	25
o-Kresol- β -d- glucosid	13	20
Galaktose	20	40
Glucose	20	40
Ca-galaktonat	20	40
Ca-gluconat	7	10

Tabelle 39.

Versuch mit Nr. 8.

Hemmungskörper	Spaltung % nach	
	2560 Min.	5455 Min.
Ohne	27	35
o-Kresol- β -d-galaktosid	15	20
o-Kresol- β -d-glucosid	10	15
Galaktose	27	35
Glucose	27	35
Ca-galaktonat	27	35
Ca-gluconat	5	8

Tabelle 40.

Versuch mit Nr. 8; ausgeführt bei pH 7.6 anstatt 4.8.

Hemmungskörper	Spaltung % nach	
	2605 Min.	5455 Min.
Ohne	15	24
o-Kresol- β -d-galaktosid	8	14
o-Kresol- β -d-glucosid	5	10
Galaktose	15	24
Glucose	15	24
Ca-galaktonat	15	24
Ca-gluconat	15	24

Tabelle 41.

Versuch mit Nr. 9.

Hemmungskörper	Spaltung % nach	
	3995 Min.	8640 Min.
Ohne	20	30
o-Kresol- β -d-galaktosid	15	20
o-Kresol- β -d-glucosid	8	15
Galaktose	20	30
Glucose	20	30

Ca-galaktonat	20	30
Ca-gluconat	5	8

Tabelle 42.

Versuch mit Nr. 10; ausgeführt bei pH 6.8 anstatt 4.8.

Hemmungskörper	Spaltung % nach	
	890 Min.	2100 Min.
Ohne	25	40
o-Kresol- β -d-galaktosid	15	25
o-Kresol- β -d-glucosid	13	20
Galaktose	25	40
Glucose	25	40
Ca-galaktonat	25	40
Ca-gluconat	25	40

G: Bestimmung des pH-Optimums an Fermentfraktionen (Nr. 1-6) aus Ochsenleder.

Tabelle 43.

Versuch mit Nr. 1. Substrat: 0.012 m. o-Kresol- β -d-galaktosid.

pH		Spaltung % nach	
Anfang	Ende	960 Min.	2340 Min.
4.0	3.8	0	0
4.4	4.3	1.0	2.0
5.0	5.0	38.1	66.7
5.6	5.6	37.5	68.0
6.0	6.0	37.5	64.0
6.4	6.4	36.9	64.0
6.8	6.8	36.3	61.7
7.3	7.2	36.0	56.7
7.6	7.6	33.4	52.3

8.0	7.9	24.4	35.4
8.7	8.4	0	0

Tabelle 44.

Versuch mit Nr. 2. Substrat:
0.0024 m. p-Nitrophenol- β -d-
galaktosid.

pH		Spaltung % nach	
Anfang	Ende	520 Min.	2240 Min.
4.4	4.5	4	7
5.0	5.0	15	28
6.2	6.2	14	28
6.8	6.8	13	35
7.4	7.4	12	23
8.2	8.0	11	20

Tabelle 45.

Versuch mit Nr. 3. Substrat:
0.0024 m. p-Nitrophenol- β -d-
galaktosid.

pH		Spaltung % nach	
Anfang	Ende	52 Min.	128 Min.
4.6	4.6	20	30
5.0	5.0	32	53
6.2	6.2	30	50
7.2	7.2	30	48
8.2	8.0	25	40

Tabelle 46.

Versuch mit Nr. 4. Substrat:
0.0024 m. p-Nitrophenol- β -d-
galaktosid.

pH		Spaltung % nach	
Anfang	Ende	605 Min.	3845 Min.
4.2	4.5	20	28

4.8	5.0	30	35
6.0	6.0	28	35
7.0	7.0	28	35
8.2	8.0	25	33

Tabelle 47.

Versuch mit Nr. 5. Substrat:
0.0024 m. p-Nitrophenol- β -d-
galaktosid.

pH		Spaltung % nach	
Anfang	Ende	257 Min.	1325 Min.
4.0	4.3	2	2
4.2	4.6	10	15
5.0	5.0	23	45
6.2	6.2	25	45
7.2	7.0	25	45
8.2	8.0	20	30

Tabelle 48.

Versuch mit Nr. 6. Substrat:
0.0024 m. p-Nitrophenol- β -d-
galaktosid.

pH		Spaltung % nach	
Anfang	Ende	40 Min.	135 Min.
4.2	4.4	12	18
4.4	4.6	20	30
5.0	5.0	22	40
6.0	6.0	20	40
6.8	6.8	20	40
7.2	7.0	18	38
8.2	8.0	15	30

Tabelle 49.

Versuch mit Nr. 8. Substrat:

0.0024 m. p-Nitrophenol- β -d-galaktosid.

pH		Spaltung % nach	
Anfang	Ende	2565 Min.	5455 Min.
4.2	4.4	7	12
5.2	5.2	18	25
6.4	6.4	17	24
7.0	7.0	15	24
7.4	7.2	15	24
8.2	8.0	10	18

Tabelle 50.

Versuch mit Nr. 9. Substrat:
0.0024 m. p-Nitrophenol- β -d-galaktosid.

pH		Spaltung % nach	
Anfang	Ende	3775 Min.	12795 Min.
4.4	4.4	7	12

5.2	5.2	17	30
6.4	6.4	15	30
7.0	7.0	13	30
7.4	7.4	12	25
8.2	8.0	6	20

H: Inaktivierungsversuche durch
H-Ionen mit Fermentfraktion
Nr. 3 aus Ochsenleber.

Tabelle 51.

Substrat: 0.012 m. p-Kresol- β -d-galaktosid.

Fermentlösung	t Min.	Spalt- ung %	10 ³ . k	Verh- ältnis
Ohne Behandeln.	1363	86.2	0.632	1
Bei 27°, pH 4.4*, 3 Min. aufbewahrt.	1363	45.5	0.194	0.307

* Mit 0.1 Mol Acetatpuffer ang-
essäuert.

IV. Spezifität der β -Galaktosidasen von Hepatopankreas der Schnecke, *Eulota peliomphala*.

In den Hemmungsversuchen, die im zweiten Kaptel dieser Mitteilungen beschrieben sind, hat der Verfasser beobachtet, dass die Wirkung eines β -Galaktosidasepräparates aus der Schnecke, *Eulota peliomphala*, nicht nur durch Verbindungen der Galaktosereihe sondern auch durch o-Kresol- β -glucosid sowie Ca-gluconat deutlich gehemmt wird. Fernerhin erwies sich das Aktivitätsverhältnis dieses Fermentpräparates gegenüber einigen β -Galaktosiden, wie Salicylaldehyd-, Vanillin-, p-Nitrophenol- β -galaktosid, als ganz verschieden sowohl von demjenigen des Aprikose-emulsins und der Takadiastase. Ohne experimentelle Begründung zu geben, wurde damals eine Vermutung geäußert, dass das Präparat ein Gemisch der β -Galaktosidasen Emulsin- und Taka-typs im Sinne der Akamatsuschen Schule, ^{6) 7)} darstellen könnte. In Anbetracht der Befunde, dass es aber auch andere, bezüglich des Hemmungsverhaltens *) sowie des Aktivitätsverhältnisses **) weder

*) T. Miwa, K. Nisizawa u. K. Tanaka, unveröffentlicht.

**) Das Aktivitätsverhältnis der β -Galaktosidase von Ochsenleber; siehe das Kapitel III.

Emulsin- noch Taka-typ angehörende Enzymtypen gibt, scheint es uns nicht ausgeschlossen zu sein, dass die Schnecken- β -galaktosidase auch ein einheitliches, neues Ferment-typ darstellt.

Bei der vorliegenden Arbeit hofften wir durch Fraktionierungsversuche festzustellen, ob in dem Schneckenhepatopankreas mehr als zweielei β -Galaktosidasen verschiedenen Hemmungsverhaltens und Aktivitätsverhältnisses enthalten sind oder nicht. Die Resultate werden in Tabelle 1 zusammengestellt.

Tabelle 1.

Fraktionierung der β -Galaktosidase von Schneckenhepatopankreas.

Fermentfraktion:

- Nr. 1. Aus dem Acetonpräparat des Hepatopankreas wurde die Enzymlösung durch Extrahieren mit 20 facher Menge 0.05n-NH₃ erhalten, die, nach Neutralisieren und Dialyse, von entstandenem Niederschlag befreit wurde.
- Nr. 2. Der Niederschlag, der sich bei der Herstellung von Nr. 1 bildete, wurde in wenig Wasser suspendiert.
- Nr. 3. Fermentlösung Nr. 1 wurde bei pH 4.5 an Tonerde B adsorbiert, daraus mit Phosphatgemisch von pH 5.5 eluiert und wiederum auf pH 4.8 umgestellt.
- Nr. 4. Fermentlösung Nr. 1 wurde bei pH 5.5 an Tonerde B adsorbiert, daraus mit Acetatgemisch von pH 4.8 eluiert.
- Nr. 5. Fermentlösung Nr. 4 wurde etwa 10 fach verdünnt, Aktivität derselben wurde bei pH 2.8 (Citrat-HCl-Gemisch) anstatt bei pH 4.8 bestimmt.
- Nr. 6. Restlösung der Tonerde B-Adsorption bei pH 5.5 (Nr. 4), dialysiert und konzentriert.
- Nr. 7. Fermentlösung Nr. 1 wurde bei pH 5.5 an Tonerde B adsorbiert, nach vorelution mit Acetatgemisch von pH 4.5, mit Phosphatgemisch von pH 7.2 eluiert und auf pH 4.8 umgestellt.
- Nr. 8. Fermentlösung Nr. 6 wurde nach Voradsorption bei pH 6.8 mit Tonerde B, bei pH 4.5 an Tonerde adsorbiert, mit 0.05 n-NH₃ eluiert und zu pH 4.8 gebracht.
- Nr. 9. Fermentlösung Nr. 6 wurde bei pH 2.4 an Tonerde B adsorbiert, Restlösung daraus 2 Tage bei pH 2.4 bei Zimmertemperatur stehen gelassen, neutralisiert, dialysiert, konzentriert und vom entstandenen Niederschlag abfiltriert.

Hemmungstyp (siehe das Kapitel II):

E..... Emulsin-typ;

T..... Taka-typ.

Nr. der Fermentlösung	Hemmungstyp	β -Galaktosid von													β -Glucosid von	
		Phenol	o-Kresol	p-Kresol	m-Kresol	Guajakol	Salicylaldehyd	Methylsalicylat	p-Oxyacetophenon	Vanillin	Isoeugenol	1,3,5-Xylenol	p-Nitrophenol	Phenol	p-Nitrophenol	
1	E+T	1	1.39	1.07	1.17	0.59	2.43	0.89	2.45	3.30	0.67	1.04	5.30	4.90	13.9	
2	E+T	1	1.23	1.23	1.23	0.79	2.27	0.93	1.52	3.11	0.54	1.16	3.37	15.0	22.5	
3	E+T	1	0.98	0.92	1.05	0.55	1.89	0.77	2.10	3.10	0.48	1.08	4.03	22.8	21.9	
4	T	1	1.10	1.00	0.97	0.54	0.67	0.60	0.88	0.87	0.32	0.74	1.03	—	0.13	
5	—	1	1.17	1.13	0.85	0.57	0.45	0.64	0.86	0.86	0.40	0.73	1.09	—	—	
6	E+T	1	1.30	0.97	1.32	0.82	3.20	0.92	4.20	6.50	0.58	0.90	6.17	22.0	28.8	
7	—	1	1.10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2.46	2.24	8.58	
8	E	1	1.12	0.80	0.92	0.69	4.60	0.71	4.30	5.20	0.73	0.81	7.50	—	36.2	
9	T	1	1.02	1.00	0.99	0.63	0.84	0.70	0.97	1.09	0.48	0.86	1.10	7.83	7.24	

Daraus ist zu ersehen, dass die in Schneckenhepatopankreas enthaltene β -Galaktosidase ein Gemisch der Enzyme von Emulsin- und Taka-typ darstellt, das sich durch geeignetes Verfahren in einzelne Komponente von je bestimmtem Hemmungsverhalten trennen lässt. Solche dualistische Natur der Schnecken- β -galaktosidase kann man auch in ihrer pH-Abhängigkeit erkennen. Wie aus Abbildung 1 ersichtlich, weist die Aktivitäts-pH-Kurve der

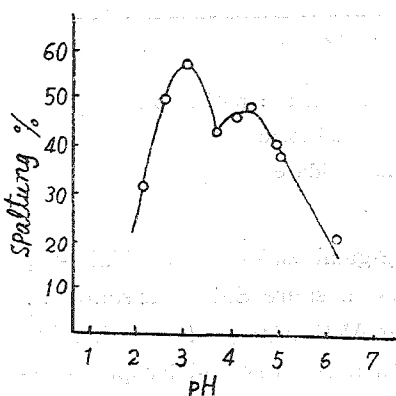


Fig. 1.

Aktivitäts-pH-Kurve der Fermentlösung Nr. 1. Substrat: p-Nitrophenol- β -galaktosid.

Ausgangsfermentlösung zweigipfligen Verlauf auf, was man als Beweis dafür betrachten darf, dass darin ein Gemisch zweier Enzyme mit verschiedenen pH-Optima vorliegt. Die Spaltung des p-Nitrophenol- β -galaktosids durch Fermentfraktion Nr. 4 wurde durch Verbindungen der Galaktosereihe spezifisch gehemmt, während Glucose, Gluconsäure sowie β -Glucosid gar keinen Einfluss darauf ausüben.

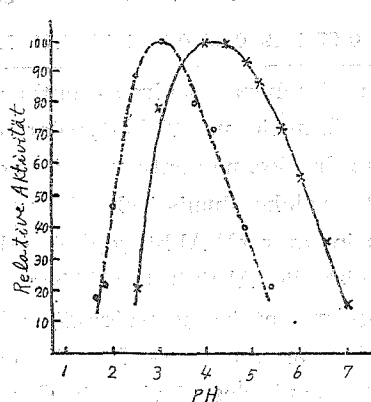
Zieht man das Hemmungsverhalten in Betracht, so scheinen diese Fermentfraktionen nur die β -Galaktosidase von Taka-typ zu enthalten und die Beimengung

des Enzyms von Emulsin-typ ist keineswegs wahrzunehmen. Hingegen weicht das Aktivitätsverhältnis in der Spaltung einiger β -Galaktoside durch dieser Fermentfraktionen von demjenigen der Takadiastase ab, wie folgende Zusammenstellung ergibt.

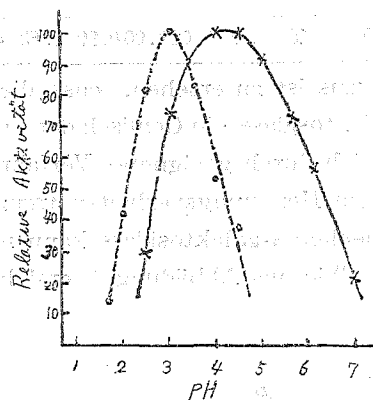
Enzym	Substrat: β -Galaktosid von			
	m-Kresol	Methylsalicylat	Isoeugenol	1, 3, 5-Xylenol
Fraktion Nr. 5	0.85	0.64	0.40	0.73
Takadiastase	1.39	0.17	0.74	1.45

(Aktivität gegen Phenol- β -galaktosid als 1 gesetzt.)

Diese Ergebnisse lassen uns notwendigerweise annehmen, dass die β -Galaktosidase des Schneckenhepatopankreas, die das Hemmungsverhalten von Taka-typ erweist, von derjenigen der Takadiastase verschieden sei. Weiterhin tritt die Verschiedenheit auch in der pH-Abhängigkeit dieser beiden Enzyme deutlich hervor, wie Abbildung 2 zeigt.



(a). Substrat: Phenol- β -galaktosid



(b). Substrat: p-Nitrophenol- β -galaktosid

Fig. 2.

Aktivitäts-pH-Kurven der Schnecken- β galaktosidase (.....) und β -Galaktosidase der Takadiastase (—).

Also ist das pH-Optimum der Schnecken- β -galaktosidase von Taka-typ gegenüber dem der Takadiastase etwa pH 1.25 an saure Seite verschoben. Hierzu ist noch zu bemerken, dass die Form der Aktivitäts-pH-Kurve dieselbe bleibt, falls man als Substrat entweder Phenol- oder p-Nitrophenol- β -galaktosid anwendet.

Vergleicht man das Aktivitätsverhältnis der Enzymfraktion Nr. 8, die das Hemmungsverhalten des Emulsin-typs—obgleich es nicht vollkommen—aufzeigt, mit dem der β -Galaktosidase von Aprikose-emulsin, so ergibt sich

auch ein ausgeprägter Unterschied, wie folgt.

Enzym	Substrat: β -Galaktosid von				
	o-Kresol	m-Kresol	p-Oxyaceto-phenon	Isoeugenol	1,3,5-Xylenol
Fraktion Nr. 8	1.12	0.92	4.30	0.73	0.81
Aprikose-emulsin	16.0	3.61	2.21	0.39	6.73

(Aktivität gegen Phenol- β -galaktosid als 1 gesetzt.)

Daher erscheint es mir nicht berechtigt, diese beiden Fermente miteinander als identisch zu betrachten, wenn auch das Verhalten gegenüber den Hemmungskörpern gleichartig ist.

Der Verlauf der Aktivitäts-pH-Kurve beider β -Galaktosidasen ist im grossen und ganzen derselbe, wie aus Abbildung 3 ersichtlich.

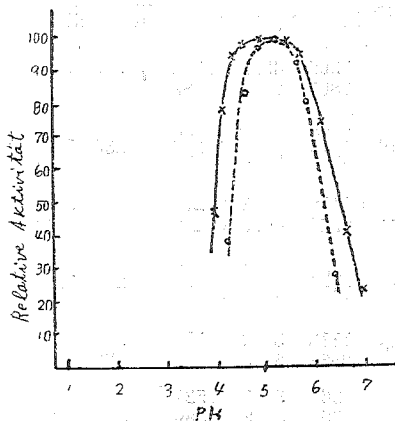


Fig. 3

Aktivitäts-pH-Kurve der β -Galaktosidase von Aprikose-emulsin (—) und Schnecken-ferment des Emulsin-typs (.....). Substrat: p-Nitro-Phenol- β -galaktosid.

Alle dieser Resultaten deuten somit darauf hin, dass das Hepatopankreas dieser Schnecke wenigstens zwei, voneinander verschiedene β -Galaktosidasen enthält. Jedes Ferment weist dasselbe Hemmungsverhalten wie je Aprikose-emulsin bzw. Takadiastase auf, woraus man mit Wahrscheinlichkeit annehmen kann, dass derjenige Anteil im Molekül jeder Schnecken- β -galaktosidase, der für das Hemmungsverhalten verantwortlich ist, gleich oder wenigstens ähnlich gebaut sein sollte mit dem entsprechenden Molekülanteil von Aprikose-emulsin bzw. Takadiastase.

Bei der das Hemmungsverhalten von Taka-typ aufzeigende β -Galaktosidase der Schnecke, sind sowohl das Aktivitätsverhältnis gegenüber verschiedenen β -Galaktosiden als auch die Aktivitäts-pH-Kurve, von den entsprechenden Eigenschaften der β -Galaktosidase der Takadiastase verschieden. Demnach können diejenigen Anteile im Bau der Enzymmolekül, die diese Eigenschaften bedingen, bei beiden β -Galaktosidasen miteinander nicht identisch sein.

Der Unterschied in dem Aktivitätsverhältnis zwischen der β -Galaktosidase des Aprikose-emulsins und der Schnecken-ferment des Emulsin-typs, lässt uns auch annehmen, dass diejenige Struktur im Enzymmolekül, die das Aktivitätsverhältnis bestimmt, bei beiden β -Galaktosidasen voneinander

verschieden sei.

Versuche.

Die Versuchsmethoden sind dieselbe wie im dritten Kapitel beschriebenen.

Protokolle.

A: Bestimmung des Aktivitätsverhältnisses von Fermentfraktionen, Nr.

1—9.

Tabelle 2.

Versuch mit dem Ferment-
präparat Nr. 1.

Substrat: β -Galakt- osid von	t Min.	Spal- tung %	10 ³ . k	Mit- tel	Verh- ältnis
Phenol	425	15.6	0.174	0.153	1
	1445	42.9	0.169		
	2877	62.0	0.146		
	4612	75.7	0.133		
o-Kresol	1144	47.1	0.191	0.212	1.39
	2877	78.7	0.233		
p-Kresol	1449	44.2	0.175	0.163	1.07
	2877	63.0	0.150		
m-Kresol	1451	43.9	0.173	0.180	1.17
	1635	50.7	0.187		
	2900	70.1	0.180		
Guajakol	1457	25.2	0.0865	0.0896	0.59
	1430	24.9	0.0869		
	2900	71.0	0.0953		
Salicyl- aldehyd	340	33.4	0.519	0.371	2.43
	1328	60.2	0.301		
	1431	62.0	0.294		
Methyl- salicylat	1330	35.1	0.141	0.136	0.89
	1423	35.4	0.133		
	2910	39.6	0.135		
p-Oxyace- tophenon	340	27.3	0.407	0.375	2.45
	1332	65.0	0.342		
Vanillin	312	37.2	0.647	0.499	3.3
	1453	68.7	0.348		
Iso- eugenol	1325	26.7	0.102	0.103	0.67
	1431	29.1	0.104		
	2910	50.4	0.104		
1,3,5- Xylenol	1424	39.4	0.153	0.160	1.04
	1455	39.8	0.151		
	2900	69.5	0.178		
p-Nitro- phenol	192	29.4	0.787	0.821	5.3
	445	58.4	0.856		
β -Glucos- id von Phenol	136	21.7	0.781	0.753	4.9
	357	44.9	0.725		

p-Nitro- phenol	167 440	53.7 89.9	2.003 2.262	2.132	13.9
--------------------	------------	--------------	----------------	-------	------

Tabelle 3.

Versuch mit dem Fermentpräpa-
rat Nr. 2.

Substrat: β -Galakt- osid von	t Min.	Spal- tung %	10 ³ . k	Mit- tel	Verh- ältnis
Phenol	1365 2805	45.5 70.4	0.193 0.188	0.191	1
o-Kresol	1110 2555	49.7 69.5	0.269 0.202	0.235	1.23
p-Kresol	1115 2557	50.1 69.5	0.270 0.202	0.236	1.23
m-Kresol	560 1110	28.5 41.5	0.261 0.210	0.235	1.23
Guajakol	1112 2554	35.4 53.4	0.171 0.128	0.150	0.79
Salicyl- aldehyd	360 560 1110	35.1 46.8 53.0	0.521 0.489 0.295	0.435	2.27
Methyl- salicylat	1115 2557	39.8 60.8	0.198 0.158	0.178	0.93
p-Oxyace- tophenon	360 560 1110	17.7 35.1 54.0	0.235 0.335 0.304	0.291	1.52
Vanillin	445 1457	53.4 77.5	0.744 0.445	0.595	3.11
Iso- eugenol	1397 2792	30.9 45.2	0.114 0.0936	0.104	0.54
1,3,5- Xylenol	1112 2554	52.0 68.0	0.287 0.155	0.221	1.16
p-Nitro- phenol	174 299 1105	26.4 38.4 72.9	0.765 0.705 0.513	0.661	3.46
β -Glucos- id von Phenol	46 138	23.1 64.4	2.48 3.24	2.86	15.0
p-Nitro- phenol	33 78	27.6 54.3	4.25 4.36	4.30	22.5

Tabelle 4.

Versuch mit dem Fermentpräparat

Nr. 3.

Substrat: β -Galakt- osid von	t Min.	Spal- tung %	10 ³ .k	Mitt- el	Verh- ältnis
Phenol	2713 5370	29.7 57.0	0.0564 0.0682	0.0623	1
o-Kresol	3965 5450	42.6 53.7	0.0607 0.0614	0.0611	0.98
p-Kresol	2505 5370	26.7 56.7	0.0539 0.0607	0.0573	0.92
m-Kresol	2560 5370	32.7 54.0	0.0677 0.0628	0.0652	1.05
Guajakol	2505 8425	15.9 52.0	0.0300 0.0378	0.0339	0.55
Salicyl- aldehyd	1120 2560	25.8 50.4	0.116 0.119	0.118	1.89
Methyl- salicylat	2713 5370	23.1 48.8	0.0421 0.0541	0.0481	0.77
p-Oxyace- tophenon	1120 2560	32.3 50.7	0.151 0.120	0.131	2.10
Vanillin	1120 2560	46.2 57.5	0.240 0.145	0.193	3.10
Iso- eugenol	2560 4720	17.7 25.5	0.0330 0.0271	0.0301	0.48
1,3,5- Xlenol	2505 5370	28.5 61.4	0.0581 0.0770	0.0675	1.08
p-Nitro- phenol	268 1070 3105	22.1 40.5 62.7	0.405 0.211 0.138	0.251	4.03
β -Glucos- id von Phenol	125 262	25.5 58.4	1.02 1.45	1.42	22.8
p-Nitro- phenol	142 260	33.0 58.4	1.22 1.46	1.34	21.9

Tabelle 5.

Versuch mit dem Fermentpräparat

Nr. 4.

Substrat: β -Galakt- osid von	t Min.	Spal- tung %	10 ³ .k	Mit- tel	Verh- ältnis
Phenol	1100 1555	63.0 72.6	0.393 0.362	0.377	1

o-Kresol	400 1425	33.0 72.6	0.439 0.395	0.417	1.1
p-Kresol	1100 1555	62.7 72.6	0.389 0.362	0.376	1.0
m-Kresol	400 1425	28.8 69.5	0.369 0.362	0.365	0.97
Guajakol	400 1050	17.1 38.4	0.204 0.201	0.203	0.54
Salicyl- aldehyd	400 1425	24.6 47.6	0.307 0.196	0.251	0.67
Methyl- salicylat	400 1530	20.1 51.7	0.244 0.207	0.226	0.60
p-Oxyace- tophenon	400 1425	25.5 65.3	0.340 0.322	0.331	0.88
Vanillin	300 1050	23.5 43.0	0.342 0.312	0.327	0.87
Iso- eugenol	400 4420	9.7 74.2	0.111 0.133	0.122	0.32
1,3,5- Xylenol	400 1530	24.6 59.9	0.37 0.253	0.280	0.74
p-Nitro- phenol	1100 1555	64.0 73.5	0.403 0.370	0.387	1.03
β -Glucos- id von p- Nitro- phenol	1100 2580	12.9 24.1	0.0545 0.0464	0.0505	0.13

Tabelle 6.

Versuch mit dem Fermentpräparat

Nr. 5.

Substrat: β -Galakt- osid von	t Min.	Spal- tung %	10 ³ .k	Mit- tel	Verh- ältnis
Phenol	1380 1737	56.1 64.0	0.251 0.255	0.253	1
o-Kresol	1377 1741	59.6 69.0	0.293 0.298	0.295	1.17
p-Kresol	1377 1741	58.4 68.5	0.276 0.290	0.286	1.13
m-Kresol	1377 1741	48.0 50.6	0.206 0.226	0.216	0.85
Guajakol	1545 1748 2825	41.3 43.2 61.1	0.150 0.141 0.145	0.144	0.57
Salicyl- aldehyd	1487 2825	32.3 53.0	0.114 0.116	0.115	0.45

Methylsalicylat	1487	42.2	0.160	0.162	0.64
	1750	47.1	0.158		
	2825	66.4	0.168		
p-Oxyacetophenon	1378	47.4	0.202	0.217	0.86
	1737	60.5	0.232		
Vanillin	1378	49.1	0.213	0.218	0.86
	1741	59.0	0.222		
Isoeugenol	1545	30.0	0.100	0.100	0.40
	2825	48.0	0.101		
1,3,5-Xylenol	1487	48.0	0.191	0.184	0.73
	1748	54.0	0.193		
	2825	66.4	0.168		
p-Nitrophenol	419	26.4	0.318	0.275	1.09
	1380	58.4	0.277		
	1722	59.6	0.229		

Tabelle 7.

Versuch mit dem Fermentpräparat
Nr. 6.

Substrat: β-Galaktosid von	t Min.	Spaltung %	10 ³ . k	Mittel	Verhältnis
Phenol	2742	25.8	0.0472	0.0472	1
	5575	47.1	0.0496		
o-Kresol	1080	14.8	0.0644	0.0621	1.30
	7130	62.0	0.0598		
p-Kresol	2590	25.8	0.0500	0.0456	0.97
	5520	40.8	0.0412		
m-Kresol	1015	14.8	0.0685	0.0622	1.32
	3925	43.2	0.0626		
	6075	54.0	0.0555		
Guajakol	5520	36.0	0.0351	0.0387	0.82
	10120	62.7	0.0423		
Salicylaldehyd	1015	31.4	0.161	0.152	3.20
	2470	55.8	0.144		
Methylsalicylat	1405	12.6	0.0415	0.0432	0.92
	5520	43.5	0.0449		
p-Oxyacetophenon	1015	41.0	0.226	0.200	4.2
	2470	62.7	0.173		
Vanillin	975	59.0	0.397	0.310	6.5
	2470	72.1	0.224		
Isoeugenol	3925	22.5	0.281	0.275	0.58
	6075	31.4	0.269		
1,3,5-Xylenol	2590	23.1	0.0403	0.0426	0.90
	5520	43.5	0.0449		
p-Nitrophenol	214	19.5	0.440	0.292	6.17
	1430	55.5	0.246		
	2590	67.5	0.189		

β-Glucosid von Phenol	209	50.1	1.44	1.07	22.7
	1080	87.9	0.85		
	1185	91.9	0.92		
p-Nitrophenol	70	19.2	1.32	1.36	28.8
	209	58.4	1.87		
	1185	91.0	0.88		

Tabelle 8.

Versuch mit dem Fermentpräparat
Nr. 7.

Substrat: β-Galaktosid von	t Min.	Spaltung %	10 ³ . k	Mittel	Verhältnis
Phenol	1125	20.4	0.0878	0.113	1
	2560	55.8	0.1385		
o-Kresol	980	20.4	0.101	0.124	1.1
	3980	74.0	0.147		
p-Nitrophenol	1125	59.9	0.353	0.278	2.46
	2560	69.5	0.202		
β-Glucosid von Phenol	980	39.4	0.222	0.253	2.24
	1125	44.9	0.230		
	2560	83.0	0.295		
	3980	91.3	0.260		
p-Nitrophenol	249	45.2	1.05	0.970	8.58
	1125	89.9	0.885		

Tabelle 9.

Versuch mit dem Fermentpräparat
Nr. 8.

Substrat: β-Galaktosid von	t Min.	Spaltung %	10 ³ . k	Mittel	Verhältnis
Phenol	7080	24.9	0.0176	0.0183	1
	11120	38.4	0.0190		
o-Kresol	7080	28.5	0.0206	0.0206	1.12
	11120	40.8	0.0205		
p-Kresol	7080	21.3	0.0147	0.0147	0.80
	11120	31.1	0.0146		
m-Kresol	7080	23.5	0.0164	0.0168	0.92
	11120	35.7	0.0172		
Guajakol	7080	18.3	0.0124	0.0127	0.69
	11120	28.2	0.0129		
Salicylaldehyd	1307	22.5	0.0845	0.0849	4.6
	2560	37.2	0.0789		
	3920	56.1	0.0912		
Methylsalicylat	7080	18.9	0.0129	0.0129	0.71
	11120	28.2	0.0129		

p-Oxyacetophenon	720	13.3	0.0858	0.0783	4.3
	2320	31.1	0.0697		
	4100	52.7	0.0792		
Vanillin	1307	28.8	0.113	0.095	5.2
	2560	43.2	0.096		
	3920	49.1	0.076		
Iso-eugenol	7080	19.2	0.0135	0.0133	0.73
	11120	28.5	0.0131		
1,3,5-Xylenol	7080	21.7	0.0150	0.0148	0.81
	11120	31.1	0.0146		
p-Nitrophenol	606	18.9	0.150	0.137	7.50
	1250	30.0	0.124		
β -Glucosid von p-Nitrophenol	155	20.1	0.629	0.662	36.2
	210	30.6	0.750		
	1250	82.6	0.607		

Tabelle 10.

Versuch mit dem Fermentpräparat
Nr. 9.

Substrat: β -Galaktosid von	t Min.	Spaltung %	10% k	Mittel	Verhältnis
Phenol	1210	46.8	0.226	0.203	1
	2710	67.8	0.181		
o-Kresol	1210	48.3	0.236	0.209	1.02
	2710	67.8	0.181		
p-Kresol	1210	48.5	0.221	0.202	1.0
	2710	68.3	0.181		
m-Kresol	456	21.3	0.228	0.200	0.99
	1466	51.3	0.214		
	3026	66.4	0.157		
Guajakol	1210	30.0	0.128	0.127	0.63
	2710	52.3	0.126		
Salicylaldehyd	456	17.1	0.179	0.170	0.84
	1466	42.2	0.162		
Methylsalicylat	1205	34.5	0.153	0.143	0.70
	2710	56.1	0.132		
p-Oxyacetophenon	456	19.5	0.207	0.196	0.97
	1466	51.7	0.215		
	3026	68.7	0.167		
Vanillin	456	26.2	0.288	0.222	1.09
	1466	51.0	0.211		
	3026	68.7	0.167		
Iso-eugenol	456	12.9	0.132	0.098	0.48
	1466	27.0	0.093		
	3026	38.1	0.069		
1,3,5-Xylenol	1210	42.9	0.201	0.175	0.86
	2710	60.2	0.148		

p-Nitrophenol	1210	52.3	0.266	0.223	1.1
	2710	67.5	0.180		
β -Glucosid von Phenol	85	22.1	1.28	1.59	7.83
	277	70.4	1.90		
p-Nitrophenol	90	29.4	1.70	1.47	7.24
	240	66.0	1.94		
	1210	88.6	0.78		

B:Hemmungsversuche an Fermentfraktionen, Nr. 1-9. Substrat:
p-Nitrophenol- β -d-galaktosid.

Tabelle 11.

Versuch mit dem Fermentpräparat Nr. 1.

Hemmungskörper	Spaltung % nach	
	120 Min.	320 Min.
Ohne	50	80
o-Kresol- β -d-galaktosid	30	52
o-Kresol- β -d-glucosid	30	52
Galaktose	50	80
Glucose	50	80
Ca-galaktonat	32	54
Ca-gluconat	28	54

Tabelle 12.

Versuch mit dem Fermentpräparat Nr. 2.

Hemmungskörper	Spaltung % nach	
	180 Min.	300 Min.
Ohne	40	70
o-kresol- β -d-galaktosid	25	50
o-Kresol- β -d-glucosid	27	52
Galaktose	40	70
Glucose	40	70
Ca-galaktonat	25	50
Ca-gluconat	20	48

Tabelle 13.

Versuch mit dem Fermentpräparat
Nr. 3.

Hemmungs- körper	Spaltung % nach	
	400 Min.	1080 Min.
Ohne	32	50
o-Kresol- β -d-glucosid	20	30
o-Kresol- β -d-glucosid	20	30
Galaktose	27	50
Glucose	32	50
Ca-galaktonat	15	20
Ca-gluconat	13	20

Tabelle 14.

Versuch mit dem Fermentpräparat
Nr. 4.

Hemmungs- körper	Spaltung % nach	
	315 Min.	1770 Min.
Ohne	30	60
o-Kresol- β -d-galaktosid	2	15
o-Kresol- β -d-glucosid	30	60
Galaktose	5	15
Glucose	30	60
Ca-galaktonat	2	10
Ca-gluconat	30	60

Tabelle 15.

Versuch mit dem Fermentpräparat
Nr. 6.

Hemmungs- körper	Spaltung % nach	
	215 Min.	1440 Min.
Ohne	32	60
o-Kresol- β -d-galaktosid	20	46

o-Kresol- β -d-glucosid	15	40
Galaktose	30	60
Glucose	30	60
Ca-galaktonat	15	38
Ca-gluconat	6	15

Tabelle 16.

Versuch mit dem Fermentpräparat
Nr. 8.

Hemmungs- körper	Spaltung % nach	
	1320 Min.	2775 Min.
Ohne	40	55
o-Kresol- β -d-galaktosid	25	50
o-Kresol- β -d-glucosid	25	50
Galaktose	40	55
Glucose	40	55
Ca-galaktonat	35	50
Ca-gluconat	15	30

Tabelle 17.

Versuch mit dem Fermentpräparat
Nr. 9.

Hemmungs- körper	Spaltung % nach	
	295 Min.	1545 Min.
Ohne	23	50
o-Kresol- β -d-galaktosid	2	15
o-Kresol- β -d-glucosid	23	50
Galaktose	2	15
Glucose	23	50
Ca-galaktonat	3	15
Ca-gluconat	20	50

C: Bestimmungen der optimalen
Wasserstoffzahl von Ferment-

fraktionen Nr. 1, 4, 8, Takadiastase und Aprikose-emulsin.

Tabelle 18.

Versuch mit dem Fermentpräparat
Nr. 1. Substrat: p-Nitrophenol- β -d-galaktosid.

pH	Spaltung % nach 150 Min.
2.2	31.7
2.5	50.0
3.0	57.0
3.7	42.6
4.0	46.2
4.2	48.0
4.8	41.8
5.0	38.8
6.2	21.3

Tabelle 19.

Versuch mit Takadiastase. 4%
Lösung, dialysiert. Substrat:
Phenol- β -d-galaktosid.

pH	Spaltung % nach 30 Min.	Relative Aktivität
2.0	0	0
2.5	8.0	20.4
3.0	30.3	76.9
3.4	36.9	93.7
3.6	37.4	94.9
4.0	39.4	100
4.4	39.4	100
4.8	36.9	93.7
5.2	34.1	86.6
5.6	28.5	72.3

6.0	22.8	57.9
6.6	14.1	35.8
7.0	6.2	15.7

Tabelle 20.

Versuch mit Takadiastase. 4%
Lösung, dialysiert. Substrat:
p-Nitrophenol- β -d-galaktosid.

pH	Spaltung % nach 27 Min.	Relative Aktivität
2.5	12.6	30.1
3.0	31.1	74.2
3.5	38.1	91.1
4.0	41.8	100
4.5	41.5	99.3
5.0	38.4	91.9
5.6	30.0	71.8
6.2	23.5	56.2
7.0	9.7	23.2

Tabelle 21.

Versuch mit dem Fermentpräparat
Nr. 4. Substrat: Phenol- β -d-galaktosid.

pH	Spaltung % nach 1440 Min.	Relative Aktivität
1.7	14.5	18.1
1.8	17.4	21.8
2.0	36.3	45.4
2.5	71.1	88.9
3.0	80.0	100
3.8	63.7	79.6
4.2	58.7	73.4
4.8	32.0	40.0
5.4	19.5	21.9

Tabelle 22.

Versuch mit dem Fermentpräparat
Nr. 4. Substrat: p-Nitrophenol-
 β -d-galaktosid.

pH	Spaltung% nach 1005 Min.	Relative Aktivität
1.7	8.8	14.4
2.0	24.9	40.8
2.5	48.8	80.0
3.0	61.1	100
3.5	50.4	82.5
4.0	32.0	52.4
4.5	22.5	36.8
5.7	0	0

Tabelle 23.

Versuch mit dem Fermentpräparat
Nr. 8. Substrat: p-Nitrophenol-
 β -d-galaktosid.

pH	Spaltung% nach 1470 Min.	Relative Aktivität
3.4	0	0
4.2	13.6	36.6
4.7	30.3	81.4
5.0	35.7	96.0

5.3	37.2	100
5.7	34.1	91.7
5.9	29.7	80.0
6.4	9.7	26.1

Tabelle 24.

Versuch mit Aprikose-emulsin.
Aus dem Acetonpräparat mit 0.05-
n NH_3 extrahierte Lösung, neutr-
alisiert und dialysiert. Substrat:
p-Nitrophenol- β -d-galaktosid.

pH	Spaltung% nach 115 Min.	Relative Aktivität
3.5	0	0
4.0	22.1	48.3
4.2	35.7	78.0
4.4	42.9	93.7
4.7	44.6	97.4
5.0	45.8	100
5.5	45.2	98.7
5.8	43.5	95.0
6.2	33.8	73.8
6.6	18.3	40.0
7.0	10.6	23.1

V. Affinität der β -Galaktosidasen verschiedener Herkunft zu einigen β -d-Galaktosiden mit verschiedenen Aglyk- onen.

Wie in der ersten Arbeit¹⁵⁾ dieser Untersuchungsreihe und im ersten Kapitel dieser mitteilungen wiederholt erwähnt, schwankt das Aktivitätsverhältnis der β -Galaktosidasepräparate gegenüber β -Galektosiden mit verschiedenen Aglykonen mehr oder weniger nach Herkunft der Fermentpräparate. Solche Tatsache kann man auch einfach mit der Annahme erklären, dass jedes Fermentpräparat mehrere β -Galaktosidasen von verschiedenem

Aktivitätsverhältnis in wechselndene Mengenverhältnis enthält. Tatsächlich findet man diesen Sachverhalt an den β -Galaktosidasen tierischer Herkunft⁶⁾ (Tabelle 1 im Kapitel IV) sowie auch an den β -Glucosidasen einigen pflanzlichen Fermentpräparaten (Tabelle 2 im Kapitel III). Bei solchen Fällen kann das Fermentgemisch durch geeignetes Fraktionierungsverfahren zu einheitlichem Enzym getrennt werden. Aber bei den meisten anderen Fällen kann die β -Galaktosidase jeder bestimmter Herkunft als einheitlich aufgefasst werden, und zwar deshalb, weil das Aktivitätsverhältnis durch Fraktionierung der Fermentpräparate fast unverändert bleibt. Demnach sollte die Mannigfaltigkeit im Aktivitätsverhältnis, die die Fermentpräparate je nach ihrer Herkunft aufweisen, anders gedeutet werden, als dass jedes Präparat mehr als zwei Galaktosidasen mit eigenem, charakteristischem Aktivitätsverhältnis in wechselndem Mengenverhältnis enthält.

Schon früher haben R. Willstätter und R. Kuhn²⁰⁾ als Folge der Untersuchungen über Saccharase, Maltase und β -Glucosidase eine Theorie zur Erklärung der relativen Spezifität aufgestellt, wonach die Mannigfaltigkeit im Aktivitätsverhältnis jedes Fermentpräparates so zu verstehen ist, dass die Affinität des Enzyms zu Substrat, von Präparat zu Präparat wechselt, trotzdem das Wesen der Fermente, unabhängig von ihrer Herkunft, dasselbe ist. Diesem Gedanken liegt die Beobachtung zugrunde, dass das Aktivitätsverhältnis unter denjenigen Bedingungen der Reaktion, wo die Substratkonzentration genügend gross ist um alles vorhandenes Ferment zu binden, unabhängig von der Herkunft des Präparates konstant bleibt. Das Aktivitätsverhältnis unter diesen Reaktionsbedingungen (Q_{∞}) stellt somit das der Zerfallsgeschwindigkeit der Enzym-Substrat-Verbindung dar. Hierbei soll darauf aufmerksam gemacht werden, dass die Fermentpräparate, die die genannten Autoren angewendet hatten, miteinander sehr nahe verwandt waren. So stammten z.B. alle ihrer Maltasepräparate den Hefearten und alle β -Glucosidasepräparate dem Samenkern von der Gattung, *Prunus*, indem nur die Rassen bzw. die Arten voneinander verschieden waren. Es wäre möglich, dass die Theorie nur bei den nahe verwandten Fermentpräparaten ihre Gültigkeit finden, jedoch erscheint es mir noch weiterer Prüfung zu bedürfen, ob sich die Theorie auch auf Enzympräparate weit verschiedenen Ursprungs ohne weiteres übertragen lassen darf.

Bei den β -Glucosidasepräparaten verschiedener Herkunft haben T. Miwa und Mitarbeiter¹¹⁾ gefunden, dass das Verhältnis der Spaltungsgeschwindigkeit sogar bei der maximalen Konzentration der Enzym-Substrat-Verbindung keine konstante Zahlen aufweist. Also erscheint die Anwendbarkeit der

Willstätter-Kuhnschen Theorie nur auf β -Glucosidasen sehr nahe verwandter Herkunft beschränkt zu sein.

Bei der vorliegenden Arbeit wurde versucht, klarzulegen, ob das mannigfaltige Aktivitätsverhältnis in der Wirkung von β -Galaktosidasepräparaten verschiedener Herkunft wirklich nur auf die von Präparat zu Präparat wechselnde Affinität beruht, oder ob es mehrere, je nach Herkunft, eigene, in ihrer Struktur wechselnde β -Galaktosidasen gibt.

Zu diesem Zwecke wurden die Affinität einiger β -Galaktosidasepräparate zu verschiedenen phenolischen β -Galaktosiden sowie auch das Verhältnis der Wirkung bei der maximalen Konzentration der Enzym-Substrat-Verbindung bestimmt. Die beiden Werten wurden gewöhnlicherweise nach der Methode von Michaelis und Menten¹³⁾ graphisch ermittelt. Dabei ergaben sich bei

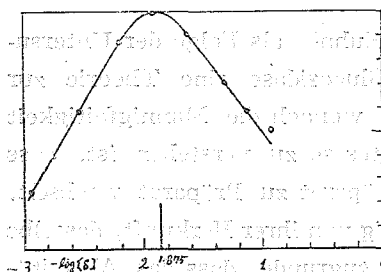


Fig. 1.
Aktivitäts-pS-Kurve der β -Galaktosidase von Takadiastase. Substrat: Phenol- β -d-galaktosid.

einigen Fermentpräparaten merkwürdige Erscheinungen. Nämlich bei der β -Galaktosidasen von Takadiastase, *Aspergillus niger* und einer Enzymfraktion von Schneckenhepatopankreas, die dasselbe Hemmungsverhalten wie Takadiastase aufweist, nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit mit Zunahme der Substratkonzentration anfangs zu, dann jedoch, nachdem sie ein Maximum erreicht hat, rasch ab. Also stellt die Aktivitäts-pS-Kurve dabei einen glockenförmigen Verlauf dar (Fig. 1.)

Derartige Erscheinungen sind schon bei den β -Glucosidasen von Takadiastase, *Aspergillus niger* u. a. beobachtet¹¹⁾ und nach der Anschauung von J. B. S. Haldane¹²⁾ folgendermassen gedeutet worden: Je ein Molekül von Enzym verbindet sich mit einem Substratmolekül und die gebildete Enzym-Substrat-Verbindung zerfällt dann zu Hydrolyseprodukt. Aber mit der Erhöhung der Substratkonzentration addiert sich noch ein weiterer Substratmolekül an diese Verbindung, wobei sich die gebildete neue Verbindung nicht zu Hydrolyseprodukt führt. Die Folge davon ist die Herabsetzung der Hydrolysegeschwindigkeit. Diese Verhältnisse lassen sich folgendermassen schematisch veranschaulicht:



ES, ESS: Enzym-Substrat-Verbindung; E: Enzym; S: Substrat; ESS: Enzym-Substrat-Verbindung; S: Substrat.

ultate in Tabelle 2 zusammengestellt sind, ist insofern eigenartig als sie, unter den bisjetzt untersuchten β -Galaktosidasen, in ihrem Aktivitätsverhältnis derjenigen des *Prunus*-emulsins äusserst nahe steht (Tabelle 1 im Kapitel I). Um klarzulegen, worauf solche Gleichartigkeit beruht, wurden die Affinität und die Zerfallsgeschwindigkeit, zum Vergleich mit Aprikose-emulsin, ermittelt.

Tabelle 2 (Enzym von *Cycas revoluta*).

	β -Galaktosid von		
	Phenol	o-Kresol	p-Kresol
$Q_{0.012}$	1	10.6	0.75
Q_{∞}	1	22	0.61
KM	34	18	46.7

Daraus ist ersichtlich, dass sowohl die Affinität zu drei Substraten wie auch das Verhältnis der Zerfallsgeschwindigkeit mit den entsprechenden Werten des Aprikose-emulsins gut übereinstimmen. Dies, mit der weitgehenden Ähnlichkeit im Aktivitätsverhältnis zu den umfangreichen Substratreihen, deutet darauf hin, dass es zwischen den β -Galaktosidasen von *Prunus* und *Cycas* eine wesentliche Gleichartigkeit im Enzymbau besteht.

Wie im vorangehenden Kapitel dieser Mitteilungen angegeben, enthält das Hepatopankreas einer Schnecke, *Eulota peliomphala*, zwei Arten der β -Galaktosidase, die durch geeignetes Verfahren voneinander getrennt werden können. In ihrem Verhalten gegenüber einigen Hemmungskörpern steht die eine mit der β -Galaktosidase des Aprikose-emulsins und die andere mit der der Takadiastase in Übereinstimmung. In Tabelle 3 zeigen sich die Versuchsergebnisse mit der Enzymfraktion, die das Hemmungsverhalten von Emulsin-typ aufweist.

Tabelle 3 (Enzym von Schneckenhepatopankreas, Emulsin-typ).

	β -Galaktosid von						
	Phenol *	o-Kresol	p-Kresol	p-Nitro-phenol	*P-oxyacetophenon	Guajakol	Vanillin *
$Q_{0.012}$	1	0.89	0.82	5.97	2.30	0.75	3.32
Q_{∞}	1	0.90	0.63	30	2.80	0.65	27
KM ₁	132	112	422	9.6	38	282	8.7
KM ₂	—	11	1.3	—	24	8.9	—

* Aktivitäts-pS-Kurve ist normal, mithin fehlt KM₂.

Diese Resultate, verglichen mit denjenigen der Tabelle 1, lassen uns

erkennen dass zwischen dieser Fermentfraktion und Aprikose-emulsin ein deutlicher Unterschied in der Affinität zu Phenol-, o-Kresol-, p-Kresol- und Guajakol- β -galaktosid besteht, während diejenige zu p-Nitrophenol-, p-Oxyacetophenon- und Vanillin- β -galaktosid in beiden Fermentpräparaten etwa gleich gross ist. Immerhin kann man jedoch derart nahe Verwandtschaft, wie sie zwischen *Prunus*- und *Cycas*-enzym vorhanden ist, hierbei nicht wahrnehmen. Auch bezüglich des Verhältnisses der Zerfallsgeschwindigkeit besteht dazwischen eine nicht geringe Differenz, wenigstens in bezug auf o-Kresol- und Guajakol- β -galaktosid. Alle dieser Resultaten bestätigen wiederholt die Ansicht des vorangehenden Kapitels, dass die β -Galaktosidase der Schnecke mit dem Hemmungsverhalten von Emulsin-typ von der des Aprikose-emulsins verschieden sei.

Die in Takadiastase enthaltene β -Galaktosidase ist einheitlich, die sich von Aprikose-emulsin sowohl in bezug auf Aktivitätsverhältnis wie auch Verhalten gegen Hemmungskörper scharf unterscheiden lässt (Kapitel I und II). Tabelle 4 zeigt die Versuchsergebnisse mit diesem Fermentpräparat.

Tabelle 4 (Takadiastase).

	β -Galaktosid von						
	Phenol	o-Kresol	p-Kresol	p-Nitrophenol	p-Oxyacetophenon	Guajakol	Vanillin
$Q_{0.012}$	1	0.82	0.90	0.92	1.0	0.53	0.99
Q_{∞}	1	0.81	0.53	0.55	2.8	0.28	0.99
KM ₁	75	76	159	235	38	185	60
KM ₂	75	68	20	30	376	8.6	53

Daraus ersicht man dass die Affinitätskonstanten sowie das Verhältnis der Zerfallsgeschwindigkeit von den entsprechenden Werten sowohl des Aprikose-emulsins wie der meisten anderen β -Galaktosidasepräparate verschieden sind. Fernerhin möchte ich daraus noch einen merkwürdigen Tatbestand entnehmen, dass die Schwankung des Aktivitätsverhältnisses bei maximaler Substratkonzentration (Q_{∞}) etwas grösser ist als bei Substratkonzentration von 0.012 Mol ($Q_{0.012}$). Daraus erhellt sich dass die Gleichmässigkeit in dem Aktivitätsverhältnis von Taka- β -galaktosidase nur eine scheinbare ist und dass es durch Kombination der Zerfallsgeschwindigkeit und der Affinität zustande kommt.

Wie oben erwähnt, enthält das Schneckenhepatopankreas zwei Arten der β -Galaktosidase, von denen die eine dasselbe Verhalten gegenüber Hemmungskörpern wie die β -Galaktosidase der Takadiastase. Versuche mit diesem Ferment ergaben folgende Resultate:

Tabelle 5 (Enzym von Schneckenhepatopankreas, Taka-typ).

	β -Galaktosid von						
	Phenol	o-Kresol	p-Kresol	p-Nitrophenol	p-Oxyacetophenon	Guajakol	Vanillin
$Q_{0.012}$	1	1.05	1.25	1.22	0.95	0.085	0.87
Q_{∞}	1	1.0	2.2	6.6	0.33	0.32	0.67
KM_1	23	25	11	3.6	68.4	7.5	25
KM_2	108	115	233	813	6.8	750	25

Vergleicht man diese Ergebnisse mit denen der Takadiastase, so erkennt man sofort einen nicht unbeträchtlichen Unterschied. Die Unstimmigkeit, die dazwischen in bezug auf Aktivitätsverhältnis bei Substratkonzentration von 0.012 Mol vorhanden ist, tritt bezüglich Q_{∞} -Werte noch deutlicher zutage, was gegen die Theorie von Willstätter und Kuhn spricht.

Die β -Galaktosidase von *Aspergillus niger* steht insofern der der Takadiastase nahe, als sie gleiches Hemmungsverhalten und ähnliches Aktivitätsverhältnis gegenüber mehreren Substraten aufweist (Kapitel I und II). Es erscheint uns daher auch wünschenswert, sicher zustellen, ob diese scheinbare Gleichartigkeit auf die wesentliche Struktur der beiden Fermente beruht oder nicht. Um einer Erklärung dieser Frage näher zu kommen, wurde die Bestimmung der Affinitätskonstante und des Aktivitätsverhältnisses der Zerfallsgeschwindigkeit ausgeführt.

Tabelle 6 (Enzym von *Aspergillus niger*).

	β -Galaktosid von		
	Phenol	o-Kresol	p-Kresol
$Q_{0.012}$	1	1.18	0.88
Q_{∞}	1	0.87	0.70
KM_1	22	168	452
KM_2	219	5.3	8.0

Wie daraus hervorgeht, ist das Verhältnis der Zerfallsgeschwindigkeit im grossen und ganzen dasselbe wie das der Takadiastase, während es bezüglich der Affinitätskonstante eine unverkennbare Diskrepanz besteht. Daher ist man ohne weiteres nicht imstande, die β -Galaktosidasen beider *Aspergillus*-arten als identisch zu betrachten, solange ein sicherer Beweis nicht erbracht werden könnte, dass die Affinität durch die von Enzymmolekül unabhängigen Begleitstoffe beeinflusst wird.

Die wichtigen Punkte der in Tabelle 1-6 angegebenen Resultate lassen

sich folgendermassen zusammenfassen:

1). Das Verhältnis der Zerfallsgeschwindigkeit von Enzym-Substrat-Verbindung, d. h. das Wirkungsverhältnis bei der maximalen Substratkonzentration, Q_{∞} , schwankt je nach der Fermentprovenienz ganz unregelmässig, was mit aller Wahrscheinlichkeit darauf hindeutet, dass die unitarische Theorie von Willstätter und Kuhn, soweit es sich um β -Galaktosidase handelt, nicht aufrechtzuhalten ist.

2). Zwischen dem Hemmungstyp der β -Galaktosidase und den Werten von Q_{∞} und KM oder KM_1 und KM_2 , scheint keine korrelative Beziehung zu bestehen.

3). Die Spaltungsgeschwindigkeit verschiedener Substrate bei Substratkonzentration von 0.012 Mol werden zumeist durch die Zerfallsgeschwindigkeit der Enzym-Substrat-Verbindung, nicht aber durch die Affinität zwischen Enzym und Substrat bedingt. In Allgemeinen bemerkt man sogar eine Tendenz, dass die Affinität bei denjenigen Substraten kleiner ist, die bei Substratkonzentration von 0.012 Mol mit grösserer Geschwindigkeit gespalten werden.

4). Alle dieser Befunde lassen uns genötigt anzunehmen, dass die β -Galaktosidasen je nach Herkunft der Fermente in ihrer Gesamtstruktur verschieden seien, nämlich sind diejenigen Anteile des Enzymmolekuls voneinander verschieden, die für die Affinität zwischen Enzym und Substrat sowie für die Zerfallsgeschwindigkeit der Enzym-Substrat-Verbindung verantwortlich zu machen sind, während die an die Spaltung der β -Galaktosidbindung unmittelbar beteiligten Gruppen dieselben sind.

Versuche.

Die Versuchsmethoden folgten den Angaben der früheren Mitteilungen.

15)11)

Protokolle.

V_{∞} : abgespaltene Galaktosemenge (mg) pro Minute, pro Enzymeinheit bei maximaler Enzym-Substrat-Konzentration; es ist graphisch erhältlich.
 Km bzw. Km_1 , Km_2 : Dissoziationskonstanten der Aktivitäts-pS-Kurven KM , bzw. KM_1 , KM_2 : Affinitätskonstanten des Enzyms, d. i. Reziproke der Dissoziationskonstanten. $10^3 \cdot k$: Reaktionskonstante erster Ordnung, bei Substratkonzentration von 0.012 Mol.

A: Versuche mit dem Aprikose-emulsin (1). Wertigkeit: $f_{Ph. \beta gal.} = 0.017$.

Tabelle 7.

Substrat: Phenol- β -d-galaktosid. Relative Enzymmenge = 1.

Substrat- konzentration Mol	-log[S]	Spaltung (Galaktose- mg/ccm Probe) nach	
		120 Min.	260 Min.
0.120	0.9208	0.565	1.116
0.096	1.0177	0.501	0.983
0.072	1.1427	0.469	0.882
0.048	1.3188	0.415	0.772
0.024	1.6198	0.281	0.548
0.012	1.9208	0.188	0.396
0.006	2.2218	0.154	0.288
0.0012	2.9208	0.086	0.140

$10^3 k = 0.329$, $Q_{0.012} = 1$, $KM = 0.0347$,

$KM = 29$, $V_{\infty} = 0.0236 \text{ mg}$, $Q_{\infty} = 1$

Tabelle 8:
Substrat: o-Kresol- β -d-galaktosid.

Relative Enzymmenge = 1/9.

Substrat- konzentration Mol	-log[S]	Spaltung (Galaktose- mg/ccm Probe) nach	
		60 Min.	180 Min.
0.219	0.65965	0.670	1.602
0.101	0.9957	0.561	1.332
0.048	1.3188	0.386	0.906
0.0275	1.5600	0.304	0.703
0.012	1.9208	0.123	0.272
0.006	2.2218	0.069	0.167
0.003	2.5229	0.035	0.088

$10^3 k = 4.17$, $Q_{0.012} = 12.7$, $Km = 0.0631$,

$KM = 16$, $V_{\infty} = 0.52 \text{ mg}$, $Q_{\infty} = 22.0$,

Tabelle 9:

Substrat: p-Kresol- β -d-galaktosid.

Relative Enzymmenge = 1.

Substrat- konzentration Mol	-log[S]	Spaltung (Galaktose- mg/ccm Probe) nach		
		157 Min.	458 Min.	1000 Min.
0.1506	0.82391	0.310	—	—
0.120	0.9208	0.364	0.902	1.600

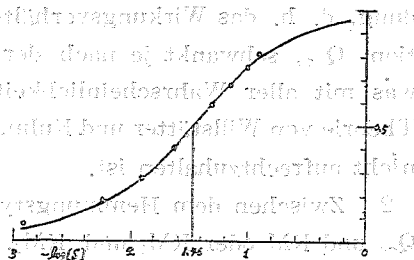


Fig. 2.

Aktivitäts-pS-Kurve (Tabelle 7).

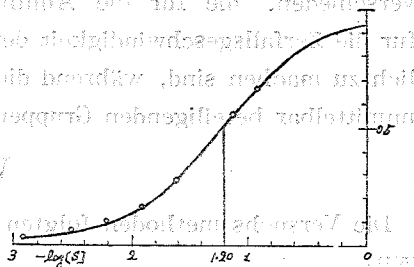


Fig. 3.

Aktivitäts-pS-Kurve (Tabelle 8).

0.096	1.0177	0.339	0.854	1.550
0.048	1.3188	0.250	0.695	1.300
0.024	1.6198	0.220	0.580	1.000
0.012	1.9208	0.194	0.480	0.705
0.006	2.2218	0.170	0.362	0.452
0.003	2.5229	0.138	0.260	0.290
0.0012	2.9208	0.108	0.168	0.185

$10^3 \cdot k = 0.172$, $Q_{0.012} = 0.52$, $K_m = 0.020$,
 $K_M = 50$, $V_{\infty} = 0.0072 \text{ mg}$, $Q_{\infty} = 0.31$

Tabelle 10.

Substrat: p-Nitrophenol- β -d-galaktosid.
 Relative Enzymmenge = 1/20.

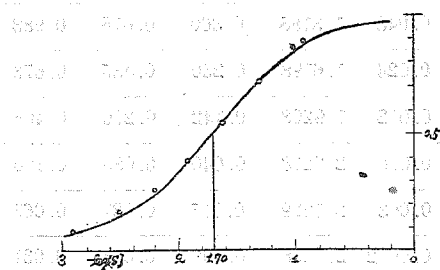
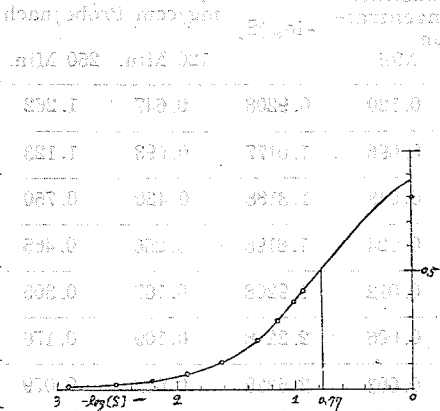
Substrat- konzentration Mol	-log[S]	Spaltung (Galaktose- mg/ccm Probe) nach		
		30 Min.	120 Min.	270 Min.
0.120	0.9208	0.570	1.256	1.684
0.096	1.0177	0.520	1.142	1.580
0.072	1.14267	0.400	0.926	1.410
0.048	1.3188	0.284	0.772	1.102
0.024	1.6198	0.166	0.514	0.778
0.012	1.9208	0.115	0.263	0.389
0.006	2.2218	0.065	0.191	0.298
0.003	2.5229	0.035	0.105	0.167
0.0012	2.9208	0.015	0.050	0.083

$10^3 \cdot k = 15.66$, $Q_{0.012} = 47.6$, $K_m = 0.170$,
 $K_M = 6.0$, $V_{\infty} = 3.792 \text{ mg}$, $Q_{\infty} = 161$.

Tabelle 11.

Substrat: p-Oxyacetophenon- β -d-galaktosid.
 Relative Enzymmenge = 1/3.

Substrat- konzentration Mol	-log[S]	Spaltung (Galaktose- mg/ccm Probe) nach		
		60 Min.	120 Min.	240 Min.
0.07 *	1.14267	0.435	0.726	1.074

Fig. 4.
Aktivitäts-pS-Kurve (Tabelle 9).Fig. 5.
Aktivitäts-pS-Kurve (Tabelle 10).

0.048	1.3188	0.360	0.618	0.983
0.024	1.6198	0.250	0.435	0.673
0.012	1.9208	0.142	0.270	0.406
0.006	2.2218	0.040	0.080	0.170
0.003	2.5229	0.015	0.031	0.065
0.0012	2.9208	0.007	0.013	0.031

$10^3 \cdot k = 1.482$, $Q_{0.012} = 4.5$, $K_m = 0.0399$,
 $KM = 25$, $V_{\infty} = 0.1344 \text{ mg}$, $Q_{\infty} = 5.8$

*Als Suspension.

Tabelle 12.

Substrat: Guajakol- β -D-galaktosid.
 Relative Enzymmenge = 1/3.

Substrat- konzentration Mol	-log[S]	Spaltung (Galaktose- mg/ccm Probe) nach	
		120 Min.	250 Min.
0.120	0.9208	0.647	1.262
0.096	1.0177	0.593	1.123
0.048	1.3188	0.420	0.750
0.024	1.6198	0.250	0.465
0.012	1.9208	0.167	0.305
0.006	2.2218	0.109	0.176
0.003	2.5229	0.062	0.079
0.0012	2.9208	0.022	0.039

$10^3 \cdot k = 0.864$, $Q_{0.012} = 2.63$, $K_m = 0.0708$,
 $KM = 12.7$, $V_{\infty} = 0.1043 \text{ mg}$, $Q_{\infty} = 4.32$.

Tabelle 13.

Substrat: Vanillin- β -D-galaktosid.
 Relative Enzymmenge = 1/45.

Substrat- konzentration Mol	-log[S]	Spaltung (Galaktose- mg/ccm Probe) nach		
		20 Min.	60 Min.	180 Min.
0.100 *	1.000	0.550	1.142	1.812
0.072 *	1.14267	0.460	0.954	1.552
0.048	1.3188	0.315	0.660	1.142
0.024	1.6198	0.125	0.270	0.461

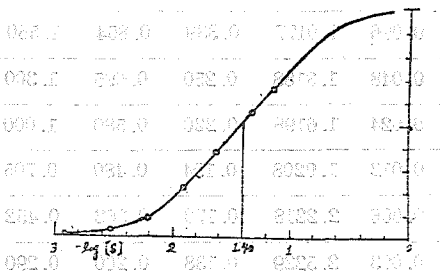


Fig. 6.

Aktivitäts-pS-Kurve (Tabelle 11).

Substrat: p-Nitrophenol- β -D-galaktosid.
 Relative Enzymmenge = 1/20.

Substrat: p-Nitrophenol- β -D-galaktosid.
 Relative Enzymmenge = 1/20.

Substrat: p-Nitrophenol- β -D-galaktosid.
 Relative Enzymmenge = 1/20.

Substrat: p-Nitrophenol- β -D-galaktosid.
 Relative Enzymmenge = 1/20.

Substrat: p-Nitrophenol- β -D-galaktosid.
 Relative Enzymmenge = 1/20.

Substrat: p-Nitrophenol- β -D-galaktosid.
 Relative Enzymmenge = 1/20.

Substrat: p-Nitrophenol- β -D-galaktosid.
 Relative Enzymmenge = 1/20.

Substrat: p-Nitrophenol- β -D-galaktosid.
 Relative Enzymmenge = 1/20.

Substrat: p-Nitrophenol- β -D-galaktosid.
 Relative Enzymmenge = 1/20.

Substrat: p-Nitrophenol- β -D-galaktosid.
 Relative Enzymmenge = 1/20.

Substrat: p-Nitrophenol- β -D-galaktosid.
 Relative Enzymmenge = 1/20.

Substrat: p-Nitrophenol- β -D-galaktosid.
 Relative Enzymmenge = 1/20.

Substrat: p-Nitrophenol- β -D-galaktosid.
 Relative Enzymmenge = 1/20.

Substrat: p-Nitrophenol- β -D-galaktosid.
 Relative Enzymmenge = 1/20.

Substrat: p-Nitrophenol- β -D-galaktosid.
 Relative Enzymmenge = 1/20.

Substrat: p-Nitrophenol- β -D-galaktosid.
 Relative Enzymmenge = 1/20.

Substrat: p-Nitrophenol- β -D-galaktosid.
 Relative Enzymmenge = 1/20.

Substrat: p-Nitrophenol- β -D-galaktosid.
 Relative Enzymmenge = 1/20.

Substrat: p-Nitrophenol- β -D-galaktosid.
 Relative Enzymmenge = 1/20.

Substrat: p-Nitrophenol- β -D-galaktosid.
 Relative Enzymmenge = 1/20.

Substrat: p-Nitrophenol- β -D-galaktosid.
 Relative Enzymmenge = 1/20.

Substrat: p-Nitrophenol- β -D-galaktosid.
 Relative Enzymmenge = 1/20.

Substrat: p-Nitrophenol- β -D-galaktosid.
 Relative Enzymmenge = 1/20.

Substrat: p-Nitrophenol- β -D-galaktosid.
 Relative Enzymmenge = 1/20.

Substrat: p-Nitrophenol- β -D-galaktosid.
 Relative Enzymmenge = 1/20.

Substrat: p-Nitrophenol- β -D-galaktosid.
 Relative Enzymmenge = 1/20.

Substrat: p-Nitrophenol- β -D-galaktosid.
 Relative Enzymmenge = 1/20.

Substrat: p-Nitrophenol- β -D-galaktosid.
 Relative Enzymmenge = 1/20.

Substrat: p-Nitrophenol- β -D-galaktosid.
 Relative Enzymmenge = 1/20.

Substrat: p-Nitrophenol- β -D-galaktosid.
 Relative Enzymmenge = 1/20.

Substrat: p-Nitrophenol- β -D-galaktosid.
 Relative Enzymmenge = 1/20.

Substrat: p-Nitrophenol- β -D-galaktosid.
 Relative Enzymmenge = 1/20.

Substrat: p-Nitrophenol- β -D-galaktosid.
 Relative Enzymmenge = 1/20.

Substrat: p-Nitrophenol- β -D-galaktosid.
 Relative Enzymmenge = 1/20.

Substrat: p-Nitrophenol- β -D-galaktosid.
 Relative Enzymmenge = 1/20.

Substrat: p-Nitrophenol- β -D-galaktosid.
 Relative Enzymmenge = 1/20.

Substrat: p-Nitrophenol- β -D-galaktosid.
 Relative Enzymmenge = 1/20.

Substrat: p-Nitrophenol- β -D-galaktosid.
 Relative Enzymmenge = 1/20.

Substrat: p-Nitrophenol- β -D-galaktosid.
 Relative Enzymmenge = 1/20.

Substrat: p-Nitrophenol- β -D-galaktosid.
 Relative Enzymmenge = 1/20.

Substrat: p-Nitrophenol- β -D-galaktosid.
 Relative Enzymmenge = 1/20.

Substrat: p-Nitrophenol- β -D-galaktosid.
 Relative Enzymmenge = 1/20.

Substrat: p-Nitrophenol- β -D-galaktosid.
 Relative Enzymmenge = 1/20.

0.012	1.9208	0.050	0.067	0.117
0.006	2.2218	0.016	0.031	0.064
0.003	2.5229	0.008	0.010	0.015
0.0012	2.9208	0	0	0

$10^3 \cdot k = 10.26$, $Q_{0.05} = 31.2$, $K_m = 0.118$,
 $K_m = 8.5$, $V_{\infty} = 10.539 \text{ mg}$ $Q_{\infty} = 447$.

* Als Suspension.

B: Versuche mit dem Aprikose-emulsin (2). Wertigkeit: $\text{fph} \cdot \beta\text{-gal} = 0.53$.

Tabelle 14.

Substrat: Phenol- β -d-galaktosid.
 Relative Enzymmenge=1.

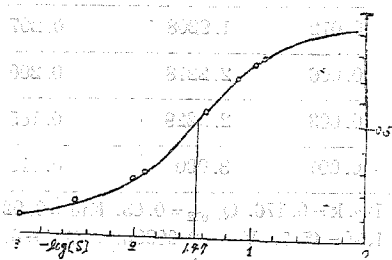
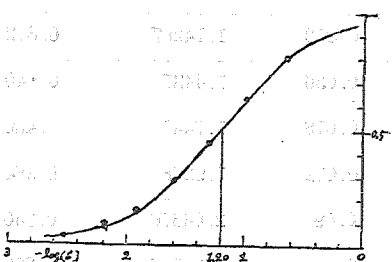
Substratkonzentration Mol	$-\log[S]$	Spaltung (Galaktose-mg/ccm Probe) nach 146 Min.
0.108	0.9657	0.520
0.090	1.0458	0.500
0.072	1.1427	0.450
0.036	1.4437	0.330
0.012	1.9208	0.190
0.009	2.046	0.175
0.003	2.523	0.125
0.001	3.000	0.104

$10^3 \cdot k = 0.281$, $Q_{0.05} = 1$ $K_m = 0.0339$,
 $K_m = 29.5$, $V_{\infty} = 0.01828 \text{ m, g}$ $Q_{\infty} = 1$.

Tabelle 15.

Substrat: o-Kresol- β -d-galaktosid.
 Relative Enzymmenge=1/10.

Substratkonzentration Mol	$-\log[S]$	Spaltung (Galaktose-mg/ccm Probe) nach 247 Min
0.120	0.9208	1.885
0.072	1.1427	1.575
0.024	1.6198	0.709
0.012	1.9208	0.463
0.006	2.2218	0.266
0.003	2.5229	0.151

Fig. 9.
Aktivitäts-pS-Kurve (Tabelle 14).Fig 10.
Aktivitäts-pS-Kurve (Tabelle 15).

0.0012	2.9208	0.050
--------	--------	-------

$10^3 \cdot k = 4.21$, $Q_{0.012} = 15.0$, $K_m = 0.0631$,
 $K_M = 16$, $V_{\infty} = 0.434 \text{ mg}$, $Q_{\infty} = 23.7$.

Tabelle 16

Substrat: p-Kresol- β -d-galaktosid.

Relative Enzymmenge=1

Substratkonzentration Mol	$-\log[S]$	Spaltung (Galaktose-mg/ccm Probe) nach 245 Min.
0.144	0.842	0.446
0.120	0.922	0.435
0.096	1.0177	0.425
0.048	1.3188	0.370
0.024	1.6198	0.285
0.012	1.9208	0.207
0.006	2.2218	0.200
0.003	2.5229	0.165
0.001	3.000	0.110

$10^3 \cdot k = 0.176$, $Q_{0.012} = 0.63$, $K_m = 0.0219$,
 $K_M = 45.7$, $V_{\infty} = 0.0090 \text{ mg}$, $Q_{\infty} = 0.49$.

C: Versuche mit dem Fermentpräparate aus *Cycas revoluta*.

Tabelle 17.

Substrat: Phenol- β -d-galaktosid.

Relative Enzymmenge=1.

Substratkonzentration Mol	$-\log[S]$	Spaltung (Galaktose-mg/ccm Probe) nach 895 Min.
0.108	0.96658	0.900
0.072	1.14267	0.812
0.036	1.4437	0.640
0.018	1.7447	0.430
0.012	1.9208	0.364
0.09	2.04576	0.340
0.06	2.22185	0.280
0.03	2.52287	0.203

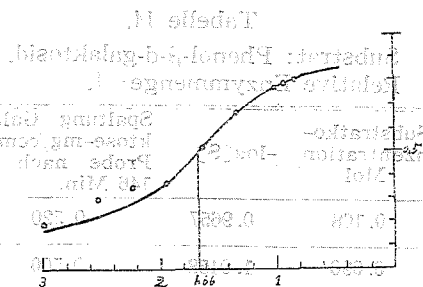


Fig. 11. Aktivitäts-pS-Kurve (Tabelle 16).

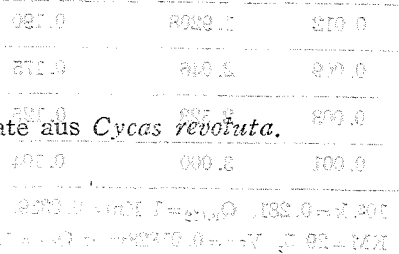


Fig. 12. Aktivitäts-pS-Kurve (Tabelle 17).

0.15	2.82391	0.174
------	---------	-------

$10^3 \cdot k = 0.0892$, $Q_{0.012} = 1$, $K_m = 0.0295$,
 $KM = 33.9$, $V_{\infty} = 0.0052 \text{mg}$, $Q_{\infty} = 1$.

Tabelle 81.

Substrat: o-Kresol- β -d-galaktosid.

Relative Enzymmenge=1.

Substratkonzentration Mol	$-\log[S]$	Spaltung (Galaktose-mg/ccm Probe) nach 80 Min.
0.120	0.9208	1.600
0.072	1.14267	1.326
0.048	1.3188	1.050
0.024	1.6198	0.684
0.012	1.9208	0.347
0.006	2.2218	0.194
0.003	2.5229	0.115
0.0012	2.9208	0.052

$10^3 \cdot k = 0.950$, $Q_{0.012} = 10.6$, $K_m = 0.055$,
 $KM = 18$, $V_{\infty} = 0.1152 \text{mg}$, $Q_{\infty} = 22$.

Tabelle 19.

Substrat: p-Kresol- β -d-galaktosid.

Relative Enzymmenge=1.

Substratkonzentration Mol.	$-\log[S]$	Spaltung (Galaktose-mg/ccm Probe) nach 1450 Min.
0.144	0.842	0.940
0.096	0.922	0.920
0.048	1.3188	0.777
0.024	1.6198	0.604
0.012	1.9208	0.434
0.006	2.2218	0.345
0.003	2.5229	0.230
0.0015	2.8239	0.173

$10^3 \cdot k = 0.0672$, $Q_{0.012} = 0.75$, $K_m = 0.0214$
 $KM = 46.7$, $V_{\infty} = 0.003172 \text{mg}$, $Q_{\infty} = 0.61$.

D: Versuche mit dem Fermentpräparat von Emulsin-typ aus Schnecken-

Aktivitäts-pS-Kurve (Tabelle 18).
 Aktivitäts-pS-Kurve (Tabelle 19).

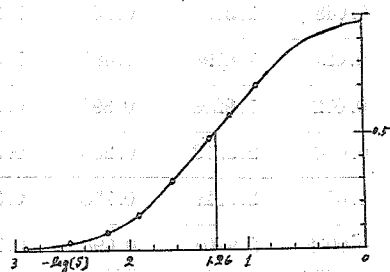


Fig. 13.

Aktivitäts-pS-Kurve (Tabelle 18).

Aktivitäts-pS-Kurve (Tabelle 19).
 Aktivitäts-pS-Kurve (Tabelle 19).

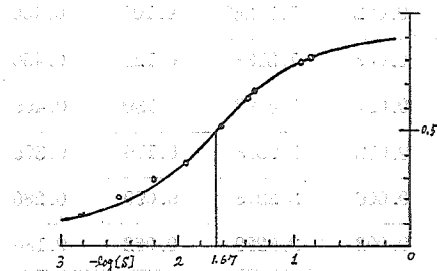


Fig. 14.

Aktivitäts-pS-Kurve (Tabelle 19).

hepatopankreas.

Tabelle 20.

Substrat: Phenol- β -d-galaktosid.

Relative Enzymmenge=1.

Substrat- konzentration Mol	-log[S]	Spaltung (Galaktose- mg/ccm Probe) nach	
		1050 Min.	2585 Min.
0.120	0.9208	0.590	1.368
0.072	1.14267	0.576	1.319
0.048	1.3188	0.544	1.255
0.024	1.6198	0.480	1.050
0.012	1.9208	0.391	0.800
0.006	2.2218	0.285	0.561
0.003	2.5229	0.178	0.336
0.0012	2.9208	0.098	0.171

 $10^3 \cdot k = 0.0828$, $Q_{0.012} = 1$, $K_m = 0.00795$, $K_M = 132$, $V_{\infty} = 0.00248 \text{ mg}$, $Q_{\infty} = 1$.

Tabelle 21.

Substrat: o-Kresol- β -d-galaktosid.

Relative Enzymmenge=1/3.

Substrat- konzentration Mol	-log[S]	Spaltung (Gala- ktose-mg/ccm Probe) nach	
		960 Min.	2875 Min.
0.120	0.9208	0.095	0.350
0.072	1.14267	0.105	0.400
0.048	1.3188	0.123	0.450
0.024	1.6198	0.130	0.468
0.012	1.9208	0.115	0.375
0.006	2.2218	0.090	0.280
0.003	2.5229	0.062	0.180
0.0012	2.9208	0.038	0.096

 $10^3 \cdot k = 0.0735$, $Q_{0.012} = 0.89$, $K_{m1} = 0.008913$ $K_{m2} = 0.08913$, $K_{M1} = 112.2$, $K_{M2} = 11.2$, $V_{\infty} = 0.00222 \text{ mg}$, $Q_{\infty} = 0.90$

177.0 1032.2 51.0
 $Q_{0.012} = 1$, $K_m = 0.00795$
 $K_M = 132$, $V_{\infty} = 0.00248 \text{ mg}$, $Q_{\infty} = 1$

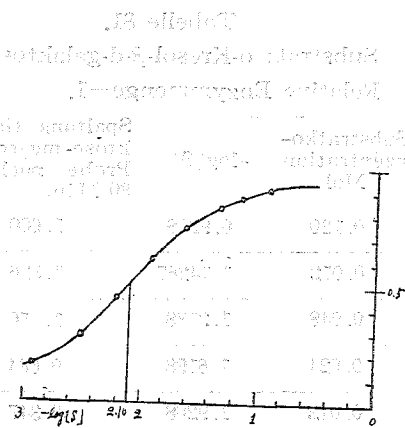


Fig. 15.

Aktivitäts-pS-Kurve (Tabelle 20).

270.0 870.0 870.0
 $Q_{0.012} = 0.89$, $K_{m1} = 0.008913$
 $K_{m2} = 0.08913$, $K_{M1} = 112.2$, $K_{M2} = 11.2$

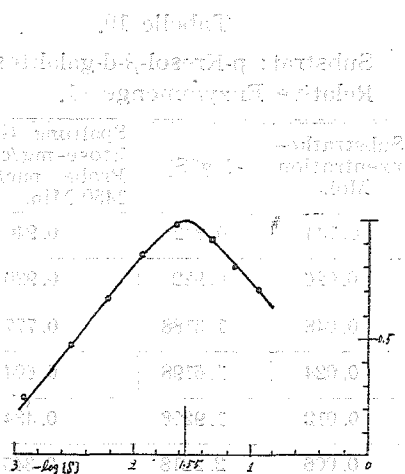


Fig. 16.

Aktivitäts-pS-Kurve (Tabelle 21).

822.0 800.0
 $Q_{0.012} = 0.89$, $K_{m1} = 0.008913$
 $K_{m2} = 0.08913$, $K_{M1} = 112.2$, $K_{M2} = 11.2$

Tabelle 22.

Substrat: p-Kresol- β -d-galaktosid.
Relative Enzymmenge=1/2.

Substrat- konzentrati- on Mol	-log[S]	Spaltung (Gala- ktose-mg/ccm Probe) nach	
		1150 Min.	2720 Min.
0.120	0.9208	0.191	0.481
0.072	1.1427	0.204	0.501
0.048	1.3188	0.207	0.522
0.024	1.6198	0.203	0.487
0.012	1.9208	0.188	0.417
0.006	2.2218	0.165	0.338
0.003	2.5229	0.118	0.231
0.0012	2.9208	0.076	0.128

$10^3 \cdot k = 0.0676$ $Q_{0.012} = 0.82$, $Km_1 = 0.00$
2372, $Km_2 = 0.7499$, $KM_1 = 421.6$, KM_2
= 1.33, $V_{\infty} = 0.001552$ mg, $Q_{\infty} = 0.63$.

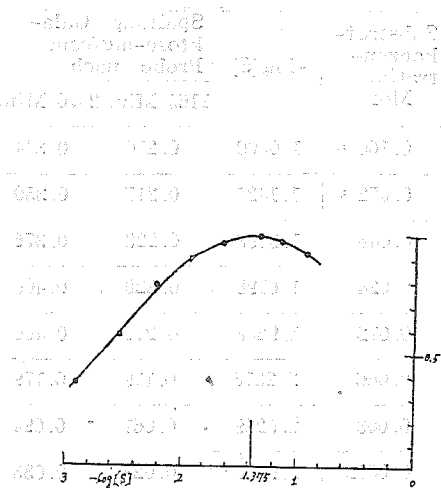
Fig. 17.
Aktivitäts-pS-Kurve (Tabelle 22).

Tabelle 23.

Substrat: p-Nitrophenol- β -d-galaktosid.
Relative Enzymmenge=1/10.

Substrat- konzentrati- on Mol	-log[S]	Spaltung (Galaktose- mg/ccm Probe) nach		
		500 Min.	970 Min.	2520 Min.
0.120	0.9208	0.510	0.784	1.102
0.072	1.1427	0.380	0.656	1.026
0.048	1.3188	0.285	0.500	0.842
0.024	1.6198	0.170	0.330	0.526
0.012	1.9208	0.120	0.220	0.376
0.006	2.2218	0.090	0.164	0.271
0.003	2.5229	0.075	0.131	0.200
0.0012	2.9208	0.05	0.073	0.120

$10^3 \cdot k = 0.494$, $Q_{0.012} = 5.97$, $Km = 0.104$
7, $KM = 9.6$, $V_{\infty} = 0.0752$, $Q_{\infty} = 30.3$.

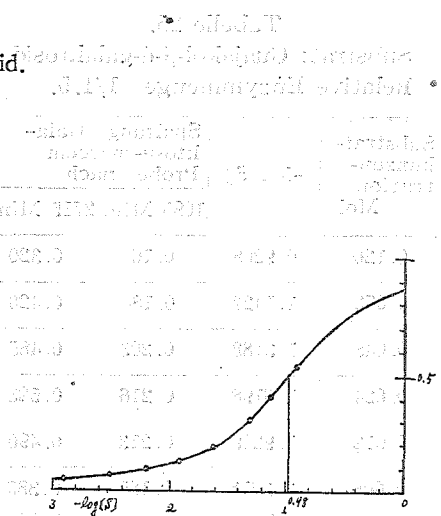
Fig. 18.
Aktivitäts-pS-Kurve (Tabelle 23).

Tabelle 24.

Substrat: p-Oxyacetophenon- β -d-galaktosid.
Relative Enzymmenge=1/5.

Substrat- konzentration Mol	$-\log[S]$	Spaltung (Gala- ktose-mg/ccm Probe) nach	
		1165 Min.	2570 Min.
0.100 *	1.0000	0.210	0.344
0.072 *	1.1427	0.217	0.350
0.048	1.3188	0.223	0.376
0.024	1.6198	0.220	0.406
0.012	1.9208	0.210	0.406
0.006	2.2218	0.119	0.179
0.003	2.5229	0.061	0.094
0.0012	2.9208	0.028	0.033

$10^3 \cdot k = 0.1900$, $Q_{0.012} = 2.30$, $K_{M1} = 0.02$
 661 , $K_{M2} = 0.04217$, $K_{M1} = 37.6$, $K_{M2} =$
 23.7 , $V_{\infty} = 0.00692\text{mg}$, $Q_{\infty} = 2.8$.

* Als Suspension.

Tabelle 25.

Substrat: Guajakol- β -d-galaktosid.

* Relative Enzymmenge = 1/1.5.

Substrat- konzentration Mol	$-\log[S]$	Spaltung (Gala- ktose-mg/ccm Probe) nach	
		1095 Min.	2715 Min.
0.120	0.9208	0.160	0.320
0.072	1.1427	0.186	0.420
0.048	1.3188	0.203	0.485
0.024	1.6198	0.216	0.523
0.012	1.9208	0.213	0.490
0.006	2.2218	0.187	0.385
0.003	2.5229	0.141	0.255
0.0012	2.9208	0.077	0.134

$10^3 \cdot k = 0.0623$, $Q_{0.012} = 0.75$, $K_{M1} = 0.00$
 3548 , $K_{M2} = 0.1122$, $K_{M1} = 282$, $K_{M2} =$
 8.9 , $V_{\infty} = 0.0016\text{mg}$, $Q_{\infty} = 0.65$

Tabelle 26.

Substrat: Vanillin- β -d-galaktosid.

Relative Enzymmenge = 1/10.

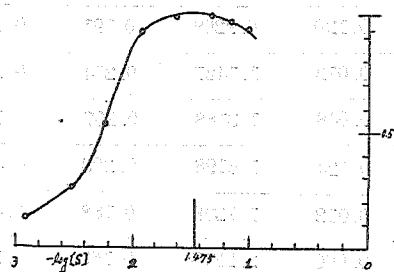


Fig. 19.

Aktivitäts-pS-Kurve (Tabelle 42).

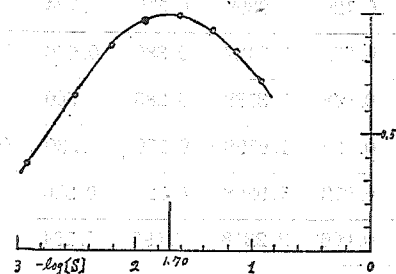


Fig. 20.

Aktivitäts-pS-Kurve (Tabelle 25).

Substrat- konzentration Mol	-log[S]	Spaltung (Gala- ktose-mg/ccm Probe nach	
		1075 Min.	2595 Min.
0.100 *	1.0000	0.822	1.980
0.072 *	1.1427	0.674	1.504
0.048	1.3188	0.455	0.922
0.024	1.6198	0.282	0.500
0.012	1.9208	0.140	0.320
0.006	2.2218	0.089	0.211
0.003	2.5229	0.046	0.080
0.0012	2.9208	0.016	0.030

$10^3 k = 0.275$, $Q_{0.012} = 3.32$, $K_m = 0.115$,
 $K_M = 8.7$, $V_{\infty} = 0.672 \text{ mg}$, $Q_{\infty} = 27.1$

* Als Suspension.

E: Versuche mit Takadiastase.

Tabelle 27.*

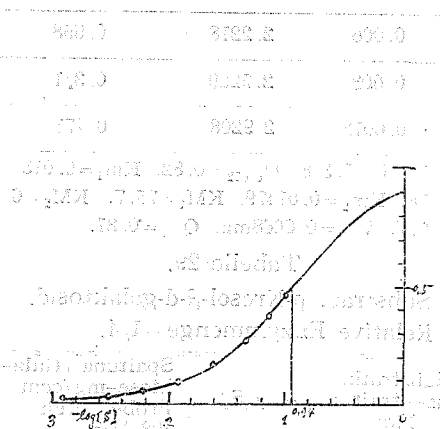
Substrat: Phenol- β -d-galaktosid.
Relative Enzymmenge = 1/4.

Substratko- nzentration Mol	-log[S]	Spaltung (Gala- ktose-mg/ccm Probe) nach
		378 Min.
0.120	0.9208	0.325
0.072	1.1427	0.374
0.048	1.3188	0.455
0.024	1.6198	0.589
0.012	1.9208	0.647

Tabelle 28.

Substrat: o-Kresol- β -d-galaktosid.
Relative Enzymmenge = 1/4.

Substratko- nzentration Mol	-log[S]	Spaltung (Gala- ktose-mg/ccm Probe) nach
		422 Min.
0.120	0.9208	0.307
0.072	1.1427	0.383
0.048	1.3188	0.427
0.024	1.6198	0.577
0.012	1.9208	0.602



Fin. 21.

Aktivitäts-pS-Kurve (Tabelle 26).

0.006	2.2218	0.579
0.003	2.5229	0.384
0.0012	2.9208	0.146

$10^3 k = 1.640$, $Q_{0.012} = 1$, $K_{m1} = K_{m2} = 0$,
 0.13335 , $K_{M1} = K_{M2} = 75$, $V_{\infty} = 0.0824 \text{ m}$
 g , $Q_{\infty} = 1$.

* Die Aktivitäts-pS-Kurve aus dieser
Tabelle ist in Fig. 1. dargestellt.

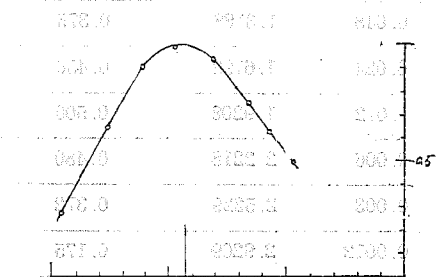


Fig. 22. Aktivitäts-pS-Kurve (Tabelle 28).

0.006	2.2218	0.558
0.003	2.5229	0.331
0.0012	2.9208	0.171

10³. $k=1.348$, $Q_{0.012}=0.82$, $K_{M1}=0.013$
 18, $K_{M2}=0.01479$, $K_{M1}=75.7$, $K_{M2}=6$
 7.7, $V_{\infty}=0.0668\text{mg}$, $Q_{\infty}=0.81$.

Tabelle 29.

Substrat: p-Kresol- β -d-galaktosid.
 Relative Enzymmenge=1/4.

Substratkonzentration Mol.	$-\log[S]$	Spaltung (Galaktose-mg/ccm Probe) nach 398 Min.
0.120	0.9208	0.393
0.072	1.1427	0.444
0.048	1.3188	0.520
0.024	1.6198	0.622
0.012	1.9208	0.628
0.006	2.2218	0.553
0.003	2.5229	0.372
0.0012	2.9208	0.159

10³. $k=1.500$, $Q_{0.012}=0.90$, $K_{M1}=0.006$
 31, $K_{M2}=0.05012$, $K_{M1}=158.5$, $K_{M2}=$
 20.0, $V_{\infty}=0.044\text{mg}$, $Q_{\infty}=0.53$

Tabelle 30.

Substrat: p-Nitrophenol- β -d-galaktosid.
 Relative Enzymmenge=1/5.

Substratkonzentration Mol.	$-\log[S]$	Spaltung (Galaktose-mg/ccm Probe) nach 380 Min.
0.048	1.3188	0.375
0.024	1.6198	0.450
0.012	1.9208	0.500
0.006	2.2218	0.480
0.003	2.5229	0.372
0.0012	2.9209	0.175

10³. $k=1.505$, $Q_{0.012}=0.92$, $K_{M1}=0.60$
 462 $K_{M2}=0.03385$, $K_{M1}=235$, $K_{M2}=3$
 0, $V_{\infty}=0.045\text{mg}$, $Q_{\infty}=0.55$.

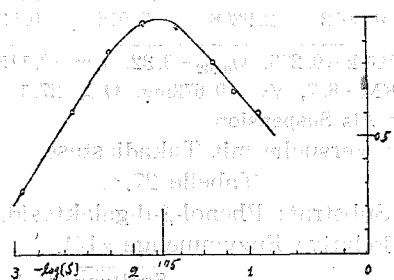


Fig. 23.

Aktivitäts-pS-Kurve (Tabelle 29).

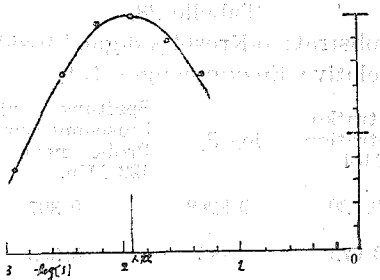


Fig. 24.

Aktivitäts-pS-Kurve (Tabelle 30).

Tabelle 31.

Substrat: p-Oxyacetophenon- β -d-galaktosid.
Relative Enzymmenge=1/5.

Substratkonzentration Mol.	$-\log[S]$	Spaltung (Galaktose-mg/ccm Probe) nach 382 Min.
0.048	1.3188	0.415
0.024	1.6198	0.431
0.012	1.9208	0.544
0.006	2.2218	0.570
0.003	2.5229	0.593
0.0012	2.9209	0.171

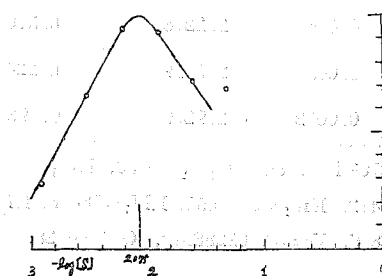


Fig. 25.

Aktivitäts-pS-Kurve (Tabelle 31).

$10^3 \cdot k = 1.65$, $Q_{0.012} = 1.00$, $K_{M1} = 0.0266$,
 $K_{M2} = 0.00266$, $K_{M1} = 37.6$, $K_{M2} = 3759$,
 $V_{\infty} = 0.230 \text{ mg}$, $Q_{\infty} = 2.8$.

Tabelle 32.

Substrat: Vanillin- β -d-galaktosid.

Relative Enzymmenge=1/4.

Substratkonzentration Mol.	$-\log[S]$	Spaltung (Galaktose-mg/ccm Probe) nach 365 Min.
0.072	1.1427	0.512
0.048	1.3188	0.560
0.024	1.6198	0.630
0.012	1.9208	0.624
0.006	2.2218	0.560
0.003	2.5229	0.336
0.0012	2.9209	0.096

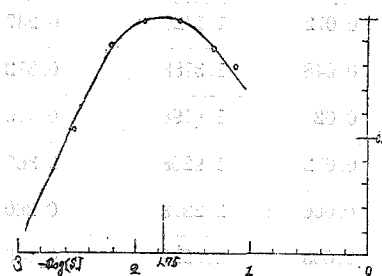


Fig. 26.

Aktivitäts-pS-Kurve (Tabelle 32).

$10^3 \cdot k = 1.628$, $Q_{0.012} = 0.99$, $K_{M1} = 0.01679$, $K_{M2} = 0.01884$, $K_{M1} = 59.6$, $K_{M2} = 53.1$, $V_{\infty} = 0.0812 \text{ mg}$, $Q_{\infty} = 0.99$.

Tabelle 33.

Substrat: Guajakol- β -d-galaktosid.

Relative Enzymmenge=1/3.5.

Substratkonzentration Mol.	$-\log[S]$	Spaltung (Galaktose-mg/ccm Probe) nach 350 Min.
0.072	1.1427	0.358

0.048	1.3188	0.384
0.024	1.6198	0.395
0.012	1.9208	0.389
0.006	2.2218	0.310
0.003	2.5229	0.224
0.0012	2.9209	0.093

10% $k = 0.861$, $Q_{0.012} = 0.53$, $Km_1 = 0.005$

412, $Km_2 = 0.11655$, $KM_1 = 184.8$, $KM_2 =$

8.6, $V_{\infty} = 0.02288 \text{ mg}$, $Q_{\infty} = 0.28$.

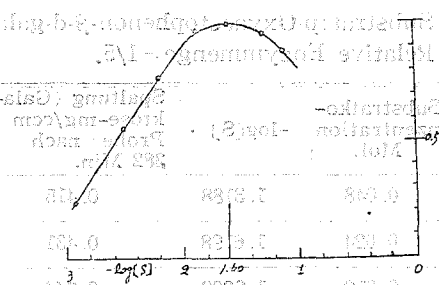


Fig. 27.

Aktivitäts-pS-Kurve (Tabelle 33).

F: Versuche mit dem Fermentpräparate von Taka-typ aus Schneckenhepatopankreas. Azidität des Reaktionsgemisches reguliert auf pH 2.8 anstatt 4.8.

Tabelle 34.

Substrat: Phenol- β -d-galaktosid.
Relative Enzymmenge=1.

Substratkonzentration Mol	$-\log[S]$	Spaltung (Galaktose-mg/ccm Probe) nach 980 Min.
0.120	0.9208	0.165
0.072	1.1427	0.247
0.048	1.3188	0.312
0.024	1.6198	0.415
0.012	1.9208	0.367
0.006	2.2218	0.260
0.003	2.5229	0.145
0.0012	2.9208	0.027

10% $k = 0.0823$, $Q_{0.012} = 1$, $Km_1 = 0.04315$,

$Km_2 = 0.009226$, $KM_1 = 23.2$, $KM_2 =$

108.4, $V_{\infty} = 0.00936 \text{ mg}$, $Q_{\infty} = 1$.

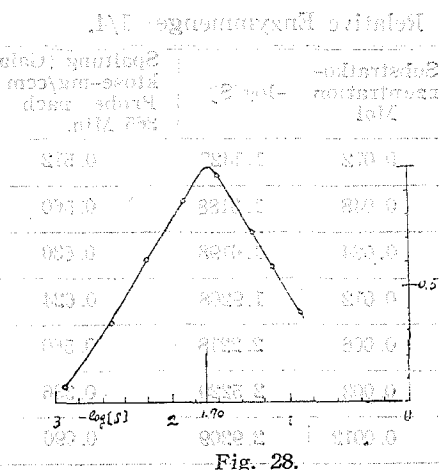


Fig. 28.

Aktivitäts-pS-Kurve (Tabelle 34).

Tabelle 35.

Substrat: o-Kresol- β -d-galaktosid.
Relative Enzymmenge=1.

Substratkonzentration Mol	$-\log[S]$	Spaltung (Galaktose-mg/ccm Probe) nach 980 Min.
0.120	0.9208	0.176

0.072	1.1427	0.250
0.048	1.3188	0.300
0.024	1.6198	0.419
0.012	1.9208	0.382
0.006	2.2218	0.260
0.003	2.5229	0.131
0.0012	2.9208	0.035

$10^3 \cdot k = 0.0863$, $Q_{0.012} = 1.05$, $Km_1 = 0.04074$,
 $Km_2 = 0.00871$, $KM_1 = 24.5$, $KM_2 = 114.8$,
 $V_{\infty} = 0.00936\text{mg}$, $Q_{\infty} = 1$.

Tabelle 36.

Substrat: p-Kresol- β -d-galaktosid.

Relative Enzymmenge = 1.

Substratkonzentration Mol.	$-\log[S]$	Spaltung (Galaktose-mg/ccm Probe) nach 1010 Min.
0.120	0.9208	0.211
0.072	1.1427	0.323
0.048	1.3188	0.395
0.024	1.6198	0.485
0.012	1.9208	0.461
0.006	2.2218	0.320
0.003	2.5229	0.209
0.0012	2.9208	0.045

$10^3 \cdot k = 0.103$, $Q_{0.012} = 1.25$, $Km_1 = 0.09268$, $Km_2 = 0.004295$, $KM_1 = 10.8$,
 $KM_2 = 233$, $V_{\infty} = 0.02036\text{mg}$, $Q_{\infty} = 2.18$.

Tabelle 37.

Substrat: p-Nitrophenol- β -d-galaktosid.

Relative Enzymmenge = 1.

Substratkonzentration Mol.	$-\log[S]$	Spaltung (Galaktose-mg/ccm Probe) nach 880 Min.
0.100	1.0000	0.150
0.072	1.1427	0.215
0.048	1.3188	0.288

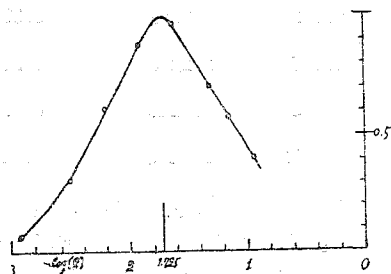


Fig. 29.

Aktivitäts-pS-Kurve (Tabelle 35).

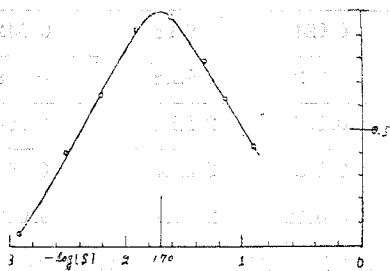


Fig. 30.

Aktivitäts-pS-Kurve (Tabelle 36).

0.024	1.6198	0.423
0.012	1.9208	0.395
0.006	2.2218	0.264
0.003	2.5229	0.125
0.0012	2.9208	0.010

$10^3 \cdot k = 0.100$, $Q_{0.012} = 1.22$, $K_{M1} = 0.2754$,

$K_{M2} = 0.00123$, $K_{M1} = 3.6$, $K_{M2} = 813$,

$V_{\infty} = 0.0620 \text{ mg}$, $Q_{\infty} = 6.6$

Tabelle 38.

Substrat: p-Oxyacetophenon- β -d-galaktosid.

Relative Enzymmenge = 1.

Substratkonzentration Mol.	$-\log[S]$	Spaltung (Galaktose-mg/ccm Probe) nach 1200 Min.
0.100 *	1.0000	0.517
0.072 *	1.1427	0.564
0.048	1.3188	0.568
0.024	1.6198	0.542
0.012	1.9208	0.418
0.006	2.2218	0.298
0.003	2.5229	0.154
0.0012	2.9209	0.052

$10^3 \cdot k = 0.0778$, $Q_{0.012} = 0.95$, $K_{M1} =$

0.01462 , $K_{M2} = 0.1462$, $K_{M1} = 68.4$,

$K_{M2} = 6.84$, $V_{\infty} = 0.0031$, $Q_{\infty} = 0.33$.

* Als Suspension.

Tabelle 39.

Substrat: Guajakol- β -d-galaktosid.

Relative Enzymmenge = 1.

Substratkonzentration Mol.	$-\log[S]$	Spaltung (Galaktose-mg/ccm Probe) nach 5210 Min.
0.0336	1.47366	0.120
0.024	1.6198	0.140
0.012	1.9208	0.170
0.006	2.2218	0.121
0.003	2.5229	0.06

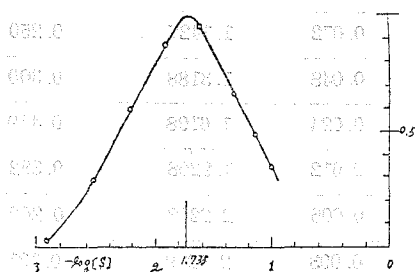


Fig. 31.

Aktivitäts pS-Kurve (Tabelle 37).

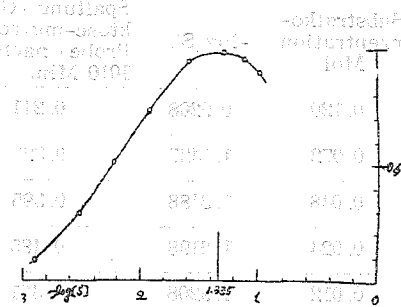


Fig. 32

Aktivitäts-pS-Kurve (Tabelle 38).

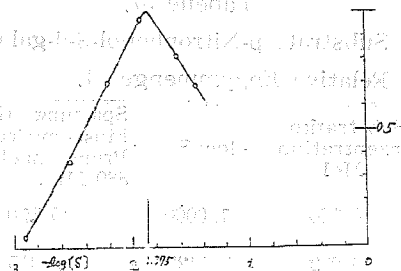


Fig. 33.

Aktivitäts-pS-Kurve (Tabelle 39).

0.0012	2.9208	0.006
--------	--------	-------

$10^3 \cdot k = 0.00695$, $Q_{0.012} = 0.085$, $Km_1 = 0$.
 1333 , $Km_2 = 0.001333$, $KM_1 = 7.5$, KM_2
 $= 750.2$, $V_{\infty} = 0.00298$, $Q_{\infty} = 0.32$.

Tabelle 40.

Substrat: Vanillin- β -d-galaktosid.
Relative Enzymmenge=1.

Substratkonzentration Mol	$-\log[S]$	Spaltung (Galaktose-mg/ccm Probe) nach 530 Min.
0.120 *	0.9208	0.190
0.072 *	1.1427	0.234
0.048	1.3188	0.266
0.024	1.6198	0.242
0.012	1.9208	0.184
0.006	2.2218	0.123
0.003	2.5229	0.070
0.0012	2.9208	0.011

$10^3 \cdot k = 0.0715$, $Q_{0.012} = 0.87$, $Km_1 = Km_2$
 $= 0.03981$, $KM_1 = KM_2 = 25.1$, $V_{\infty} = 0.0$
 0.024 mg, $Q_{\infty} = 0.67$.

* Als Suspension.

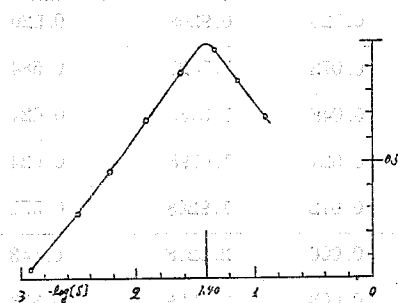


Fig. 34.

Aktivitäts-pS-Kurve (Tabelle 40).

G: Versuche mit dem Fermentpräparate aus *Aspergillus niger*.

Tabelle 41.

Substrat: Phenol- β -d-galaktosid.
Relative Enzymmenge=1.

Substratkonzentration Mol	$-\log[S]$	Spaltung (Galaktose-mg/ccm Probe) nach 1500 Min.
0.100	1.0000	0.244
0.072	1.1427	0.263
0.036	1.444	0.322
0.018	1.745	0.381
0.009	2.046	0.370
0.006	2.2218	0.320
0.003	2.5229	0.240

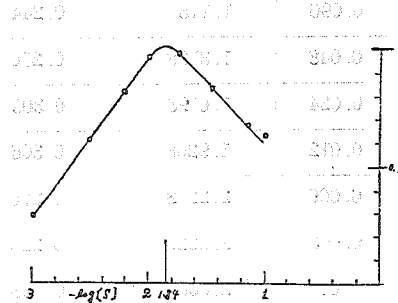


Fig. 35.

Aktivitäts-pS-Kurve (Tabelle 41).

0.001	3.0000	0.110
-------	--------	-------

103. $k=0.0564$, $Q_{0.012}=1$, $Km_1=0.04571$,
 $Km_2=0.004571$, $KM_1=21.9$, $KM_2=218$.
 8, $V_{\infty}=0.001696\text{mg}$, $Q_{\infty}=1$.

Tabelle 42.

Substrat: o-Kresol- β -d-galaktosid.
 Relative Enzymmenge. =1

Substratkonzentration Mol	$-\log[S]$	Spaltung (Galaktose-mg/ccm Probe) nach 2360 Min.
0.120	0.9208	0.520
0.072	1.1427	0.584
0.048	1.3188	0.624
0.024	1.6198	0.624
0.012	1.9208	0.571
0.006	2.2218	0.443
0.003	2.5229	0.313
0.001	3.0000	0.128

103. $k=0.0666$, $Q_{0.012}=1.18$, $Km_1=0.005957$, $Km_2=0.1884$, $KM_1=167.9$, $KM_2=5.3$, $V_{\infty}=0.001472\text{mg}$, $Q_{\infty}=0.87$.

Tabelle 43.

Substrat: p-Kresol- β -galaktosid.
 Relative Enzymmenge=1.

Substratkonzentration Mol	$-\log[S]$	Spaltung (Galaktose-mg/ccm Probe) nach 1350 Min.
0.096	1.118	0.244
0.048	1.3188	0.270
0.024	1.6198	0.305
0.012	1.9208	0.306
0.006	2.2218	0.270
0.003	2.5229	0.220
0.001	3.0000	0.138

103. $k=0.0493$, $Q_{0.012}=0.88$, $Km_1=0.002213$, $Km_2=0.1245$, $KM_1=452$, $KM_2=8.0$, $V_{\infty}=0.00118\text{mg}$, $Q_{\infty}=0.70$.

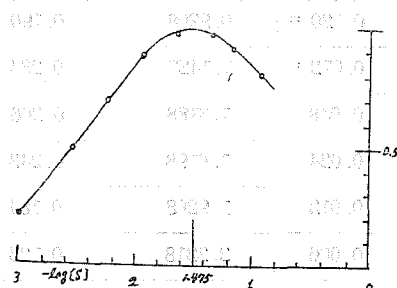


Fig. 36.

Aktivitäts-pS-Kurve (Tabelle 42).

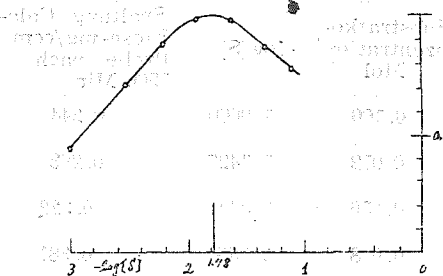


Fig. 37.

Aktivitäts-pS-Kurve (Tabelle 43).

LITERATUREN

- 1). S.Ezaki, J. Biochem. 32 (1940),91 u.107.
- 2). E. Fischer, Ber, 23 (1890), 2614.
- 3). J.B.S.Haldane u. K. G.Stern, Allgemeine Chemie der Enzyme (1932), 106.
- 4). B.Helferich u. Mitarbeitern, Zeit. Physiol. Chem., 208 (1932), 91.
- 5). B.Helferich, Ergeb. d. Enzymforsch., 2 (1933), 87; 7 (1938), 83.
- 6). K.Horikoshi, J. Biochem., 35 (1942), 39.
- 7). K.Kobayashi, J. Biochem. (Japanisch), 18 (1944),41.
- 8). T.Miwa, C.Cheng, M.Fujisaki u. A.Toishi, Acta Phytochim., 10 (1937), 155.
- 9). T.Miwa, C.Cheng, A.Miwa, M.Fujisaki u. K. Outi, Sci.Rep.Tokyo Bunrika Daigaku, B. 6(1942),11.
- 10). T.Miwa u. A.Miwa, Igaku to Seibutsugaku (Japanisch), 1(1942), 229.
- 11). T.Miwa u. A.Miwa, Ebenda, 2(1942),398 u. 401..
- 12). T.Miwa, M.Fujisaki u. K.Ishizawa, Ebenda, 5(1944),678.
- 13). L.Michaelis u. L.Menten, 49(1913),333.
- 14). K.Nisizawa, Bull. Chem. Soc. Jap., 16(1941),155.
- 15). K.Nisizawa, Sci. Rep. Tokyo Bunrika Daigaku, B. 6(1942),29.
- 16). K.Nisizawa, Ebenda,B. 6(1942,43.
- 17). Ruff u. Franz, Ber., 35(1902), 948.
- 18). Scnhell u. Tollens, Ber., 23(1890), 2990; Compt. rend. Acad. Sci., 127 (1898),728.
- 19). Tollens, Ber., 23(1890), 2990; Ann., 271(1892),74.
- 20). R. Willstätter u. R.Kuhn, Zeit. Physiol. Chem., 129(1923),33.