

Über die Geschwindigkeit der Fermentreaktionen bei Zusatz chemisch indifferenten Stoffe.

Von

Hermann Braeuning.

(Aus dem physiologischen Institut zu Kiel.)
(Der Redaktion zugegangen am 16. Mai 1904.)

Über den Einfluß der Elektrolyten auf die Geschwindigkeit der Fermentreaktionen liegen nicht wenig Versuche vor. Wahrscheinlich kommt dabei zum Teil die chemische Wirkung der Elektrolyten auf die beteiligten Stoffe in Betracht, zum Teil wohl auch die Beeinflussung der kolloidalen Enzyme durch elektrische Ladungen, und endlich mag die noch nicht näher bekannte sogenannte «Wirkung der Neutralsalze» bei der Reaktionsgeschwindigkeit eine Rolle spielen. Über den Einfluß chemisch indifferenten Stoffe scheinen dagegen wenig Untersuchungen angestellt zu sein. Und doch ist das Studium dieser Vorgänge nicht ohne Interesse. Die folgenden Versuche sollen einen Beitrag zur Kenntnis des Einflusses liefern, welchen eine Veränderung des Mediums auf den Verlauf der Enzymreaktionen ausübt.

Glyzerin.

Die meisten Versuche wurden mit Glyzerin angestellt, da es chemisch sehr indifferent ist, sich mit Wasser in allen Verhältnissen mischt und ein leidliches Lösungsmittel ist.

Daß Glyzerin die Fermente nicht schädigt, sondern ein besseres Aufbewahrungsmittel als Wasser für dieselben ist, ist bekannt (z. B. Fermi und Pernossi¹⁾); doch scheint es zum Medium für fermentative Prozesse nicht geeignet zu sein. Um dies zu zeigen, wurde eine gesättigte Lösung von Rohrzucker in Glyzerin hergestellt und zu 25 ccm derselben 2 ccm einer

¹⁾ Zeitschr. f. Hyg., Bd. XVIII, S. 96 u. f. (1894).

Lösung sehr wirksamen Invertins in Wasser zugesetzt. Dies Gemisch wurde dann mehrere Stunden im Brutschrank bei 25—30° gehalten. Nach Ablauf dieser Zeit fand sich kein Invertzucker darin. Währenddessen wurden von Zeit zu Zeit einige Kubikzentimeter der Lösung entnommen und mit Wasser verdünnt, ohne sonst einen Zusatz zu machen. In diesen Verdünnungen, die ebenfalls auf 25—30° gehalten wurden, konnte schon nach je einer halben Stunde reichlich Invertzucker nachgewiesen werden. Daraus geht hervor, daß das Ferment nicht wesentlich verändert wurde, daß es aber in Glycerin entweder gar nicht oder nur unendlich langsam wirkt.

Sobald Wasser zu dem Glycerin zugesetzt wird, geht die Reaktion vor sich, und zwar um so schneller, je mehr Glycerin durch Wasser ersetzt wird. Tabelle 1 gibt eine Bestätigung hierfür. Der Versuch wurde so angestellt, daß die Lösungen von Rohrzucker in Glycerin und Wasser in Reagensgläsern zu gleicher Zeit mit je 2 ccm einer starken Invertinlösung beschickt wurden und dann 1½ Stunden im Brutschrank bei 30° blieben. Dann wurden die Gläser 5 Minuten in kochendes Wasser gesetzt, um das Ferment zu zerstören, und polarimetrisch der Fortschritt der Inversion bestimmt. (Die Versuche in Tabelle 10 wurden zu gleicher Zeit mit demselben Invertin und in ganz gleicher Weise angestellt. Die dort verwendeten Harnstoffmengen sind den hier verwendeten Glycerinmengen äquimolekular). In allen in dieser Arbeit angegebenen Versuchen wurden die Enzymlösungen durch einige Tropfen Toluol, die Zuckerlösungen durch ½ % NaF vor der Einwirkung von Mikroorganismen geschützt.

Tabelle 1.

ca. 20%ige Rohrzuckerlösung ccm	Glycerin ccm	Wasser ccm	Invertin ccm	Drehungs- winkel
10	4.9	5.1	2	190 93
10	2.45	7.55	2	189 83
10	1.225	8.775	2	189 46
10	—	10	2	186 86

Versuche mit anderen Fermenten ergaben ähnliche Resultate. Die Versuchsanordnung mit Emulsin war der für Invertin geschilderten analog.

Tabelle 2.

Konzentrierte Salicinlösung ccm	Glyzerin ccm	Wasser ccm	Emulsin ccm	Drehungs- winkel
10	4,9	5,1	2	179 51
10	2,45	7,55	2	178 95
10	—	10	2	178 54

Die folgenden Versuche mit Lab wurden ähnlich der von Fuld¹⁾ angegebenen Methode angestellt: Die mit der zu untersuchenden Mischung beschickten Reagensgläser wurden 5 Min. im Wasserbad bei 37,8° vorgewärmt, dann bei einem Schlag (0) des Metronoms 2 ccm einer Lablösung zugesetzt und die Gläser im Takt der Schläge des Metronoms im Wasserbad geschüttelt, bis die Gerinnung eintrat. (Die Versuche der Tabellen 3, 4, 5 sind mit derselben Milch, demselben Lab, bei gleicher Temperatur und zur selben Zeit angestellt.)

Tabelle 3.

Milch ccm	Glyzerin ccm	Wasser ccm	Lab ccm	Gerinnungszeit
5	—	5	2	29,5
5	1	4	2	38
5	2	3	2	59
5	3	2	2	79,5

Tabelle 4.

Milch = V _m ccm	Glyzerin = V _g ccm	Lab = V _l ccm	$v = \frac{V_m + V_g + V_l}{V_m + V_l}$	Gerinnungs- zeit T	T V
5	0	2	1	13,5	13,5
5	1	2	1,14	27,5	24,0
5	2	2	1,29	56	43,4
5	3	2	1,43	102	70,6

¹⁾ Hofmeisters Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol., Bd. II, S. 171 (1902).

In Versuch 4 war nicht für gleiches Volumen gesorgt; um die durch Verdünnung bewirkte Änderung der Labwirkung auszuschalten, ist das absolute Volumen der jeweiligen Labmenge berechnet (Kol. 4). Käme nur die Verdünnung in Betracht, so müsste $\frac{T}{V}$ (Kol. 5) konstant sein, wenn man von der störenden Wirkung der Verdünnung der Kalksalze absieht (Fuld¹⁾). Tabelle 5 zeigt, daß die Verdünnung der Kalksalze von relativ geringem Einfluß ist. Aus dem Gang, den Kol. 5, Tab. 4, aufweist, erkennt man die verzögernde Wirkung des Glycerins.

Tabelle 5.

Milch = V_m ccm	Lab = V_l ccm	Wasser = V_w ccm	$\frac{V_m + V_l + V_w}{V_m + V_l} = V$	Gerinnungs- zeit T	T V
5	2	—	1	13,5	13,5
5	2	1	1,14	17	14,9
5	2	2	1,29	19	14,9
5	2	3	1,43	23,5	16,4
5	2	4	1,57	24,5	15,6
5	2	5	1,7	29,5	17,3

Die folgenden Versuche mit Pepsin wurden mit einer ziemlich stark verdünnten Pepsinlösung angestellt. Die «Mettischen Röhren» wurden nach den Angaben von Pawlow²⁾ hergestellt. Die Reagensgläser mit der zu prüfenden Substanz standen 24 Stunden bei Zimmertemperatur und wurden, wie auch bei den anderen Versuchen, die sich über längere Zeit erstreckten, öfters geschüttelt. Vor dem Ablesen der verdauten Eiweißzylinder wurden alle Röhren auf Filtrierpapier getrocknet und dann in Reagensgläser mit destilliertem Wasser gebracht, um die Einwirkung des Ferments gleichzeitig zu unterbrechen. (Die Mengen des verdauten Eiweißes sind in $\frac{1}{10}$ mm [Mikrometerocular O] angegeben.)

¹⁾ Hofmeisters Beiträge zur chem. Physiol. und Pathol., Bd. II, S. 186 u. f. (1902).

²⁾ Vergl. Pawlow, Arbeit der Verdauungsdrüsen (1898).

Tabelle 6.

Glyzerin = Vg ccm	Pepsin = VP ccm	$\frac{Vg + VP}{VP} = V$	Verdautes Eiweiß = k Mittel aus je 8 Versuchen	$k \times V$
—	5	1	31	31
0,5	5	1,1	26	28,6
1,0	5	1,2	22	26,4
1,5	5	1,3	18	23,4
2,0	5	1,4	15	21,0
3,0	5	1,6	11	17,6
4,0	5	1,8	6	10,8

In Versuch 6 bestand ebenfalls nicht gleiches Volumen, deshalb ist in Kol. 3 das absolute Volumen gleicher Pepsinmengen berechnet. Kol. 5 gibt die Verlangsamung der Verdauung durch Glyzerin an.

Es folgen Versuche mit Trypsinlösung. Sie wurden in gleicher Weise wie die mit Pepsin angeordnet, nur standen hier die Reagensgläser 24 Stunden im Brutschrank bei 31,6°. Die in Tabelle 7, 13, 15, 17 angeführten Versuche wurden mit dem gleichen Trypsin, zu gleicher Zeit und unter gleichen Bedingungen ausgeführt.

Tabelle 7.

Glyzerin ccm	Trypsin ccm	Wasser ccm	Verdautes Eiweiß Mittel aus je 8 Versuchen
—	3	4	50
1	3	3	28
2	3	2	11
3	3	1	7,6

Tabelle 8 gibt Zahlen für die Verlangsamung der Wirkung des Hefepreßsaftes (Zymase) durch Glyzerinzusatz, sie sind einer Arbeit von Jakob Meisenheimer¹⁾ entnommen.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXVII, S. 520.

Tabelle 8.

20 ccm Hefepress- saft verdünnt mit	Rohrzucker in g	Tymol in g	Versuchs- dauer in Stunden	CO ₂ in g nach Erwärmen und Luftdurchleiten
500 ccm Glycerin- lösung 10%	5	0.2	22	0.08
500 ccm Hühner- eiweißlösung 10%	5	0.2	24	0.27

Endlich seien noch einige Versuche mit Hefe erwähnt. Da es sich hier jedoch um lebende Zellen handelt, die in ein fremdes Medium versetzt wurden, so sind die Verhältnisse nicht ganz mit den vorhergehenden auf eine Stufe zu stellen.

Zu diesen Versuchen wurden Gärröhrchen mit der zu untersuchenden Lösung gefüllt. Die Hefe war mehrmals mit Leitungswasser gewaschen und schließlich ein größerer Teil, mit etwa der doppelten Menge Wasser versetzt, in ein Reagensrohr gegeben. Mit einer Pipette wurden jedesmal 2 ccm der Mischung, die vor jeder Entnahme kräftig geschüttelt wurde, entnommen. Aus der Pipette wurde sie ebenfalls in die Gärröhrchen gespritzt und mit der Lösung geschüttelt. Dann wurden alle Proben gleichzeitig in den Brutschrank bei 26,6° gestellt. Die Versuche in Tabelle 11 und 12 wurden in derselben Weise angeordnet, jedoch war die Konzentration der Hefe in Versuch 9I, 9II, 11 und 12 nicht die gleiche.

Tabelle 9.

	10%ige Rohr- zuckerlösung	Glycerin	Wasser	Hefe	2 ccm CO ₂ entwickelt nach Minuten	4 ccm CO ₂ entwickelt nach Minuten
I. Ver- such	3	1.5	2.5	2	—	—
	3	0.5	3.5	2	57	68
	3	—	4	2	43	59
II. Ver- such	3	1.5	2.5	2	—	—
	3	0.5	3.5	2	55	65
	3	—	4	2	45	60

Harnstoff.

Die Versuche, in denen ein Teil des Wassers durch Harnstoff ersetzt wurde, zeigten ebenfalls eine Verlangsamung der Reaktion.

Tabelle 10.

Rohrzucker- lösung ca. 20% ccm	Harnstoff- lösung 40% ccm	Invertin- lösung ccm	Wasser ccm	Drehungs- winkel
10	10	2	—	190 34
10	5	2	5	189 05
10	2,5	2	7,5	188 27
10	—	2	10	186 81

Auch über die Einwirkung von Harnstoffzusatz auf die Gärung durch lebende Hefe sei ein Versuch angeführt.

Tabelle 11.

Rohrzucker- lösung 10% ccm	Harnstoff- lösung 50% ccm	Wasser ccm	Hefe ccm	Zeit bis zur Entwicklung von 2 ccm CO ₂ in Minuten	Zeit bis zur Entwicklung von 4 ccm CO ₂ in Minuten
3	1	3	2	73	90
3	0,5	3,5	2	55	70
3	—	4	2	40	59

Tabelle 12.

Rohrzucker- lösung 10% ccm	Harnstoff- lösung 50% ccm	Wasser ccm	Hefe ccm	CO ₂ -Entwicklung
3	4	—	2	nach 18 Stunden: Spuren
3	2	2	2	• 18 • : 1 ccm
3	—	4	2	• 4 • : 5,3 •

Traubenzucker.

Es folgen analoge Versuche mit Traubenzuckerzusatz. Das Resultat ist ebenfalls eine Verlangsamung der Reaktion:

Tabelle 13.

Trypsin ccm	Traubenzucker- lösung 40% ccm	Wasser ccm	Verdautes Eiweiß Mittel aus je 8 Ver- suchen
3	—	4	50
3	1	3	36,8
3	2	2	26
3	3	1	13,4

Ferner liegen Versuche von Nirenstein und Schiff¹⁾ über die Einwirkung von Traubenzuckerzusatz zu Pepsinsalzsäurelösung auf die Verdauung in Metteschen Röhren vor:

Tabelle 14.

Traubenzucker %	Verdauung mm
0	4
1	3,65
4	3,55
8	2,70
15	2
20	1,75

Die folgenden Versuche verdanke ich der Güte Herrn Dr. R. O. Herzogs. Um zu zeigen, daß die Unterschiede nicht im Wesen der Metteschen Methode liegen, wurden Versuche angestellt, in denen die Geschwindigkeit der Proteolyse durch Viskosität nach Kossel-Spriggs²⁾ gemessen wurde. Drei

¹⁾ Archiv für Verdauungskrankheiten, Bd. XIV, S. 590. Für die Übersendung eines Sonderabdruckes der Arbeit, die mir hier unzugänglich war, spreche ich Herrn Dr. Schiff meinen aufrichtigen Dank aus.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXV, S. 466 (1902).

annähernd gleiche Ostwaldsche Viskosimeter wurden mit gleichen Mengen 4%iger Gelatine, der 0%, 14% und 28% Traubenzucker zugesetzt war, und Pepsin beschickt. Die Apparate blieben im Ostwaldschen Thermostaten bei 30°. Von Zeit zu Zeit wurde die innere Reibung gemessen. Es ergab sich, daß die Zeiten, von wann an die Viskositäten sich nicht mehr änderten, sich etwa verhielten wie 1 : 3 : 5.

Rohrzucker.

Tabelle 15.

Trypsin ccm	Rohrzuckerlösung 20% ccm	Wasser ccm	mm verdauten Eiweißes Mittel aus je 8 Versuchen
3	—	4	51
3	1	3	35
3	2	2	30
3	3	1	21

Laktose.

Über den Einfluß von Laktosezusatz auf die Invertierung einer 7%igen Rohrzuckerlösung gebe ich Zahlen, die einer Arbeit Browns¹⁾ entnommen sind.

Tabelle 16.

% Laktose	Invertzucker in g
0	2,072
5	2,052
10	2,052
20	1,893

Allen angegebenen Versuchen ist gemeinsam, daß in einer Lösung von Ferment, umsetzbarer Substanz und Wasser die Reaktion des Ferments verlangsamt wird, wenn das Wasser durch einen anderen, chemisch indifferenten Stoff ersetzt wird. Und zwar wird die Reaktion umsomehr verlangsamt, je mehr Wasser ersetzt wird, um schließlich bei Ersetzung allen Wassers

¹⁾ Journ. of the Chem. Soc., Bd. 81 (Trans.), S. 382 (1902).

unendlich langsam zu werden. In der Literatur habe ich 2 Angaben gefunden, die mit diesem Resultat nicht ganz übereinstimmen: H. R. Weiß¹⁾ konnte eine wesentliche Beeinflussung der Fibrinverdauung durch Pankreaspulver bei Zusatz von 25% Traubenzucker nicht konstatieren. Vielleicht liegt das zum Teil daran, daß bei seinen Versuchen nicht stets gleiche Acidität bestand. Tabelle 13, die bei neutraler Reaktion der Lösung gewonnen wurde, gibt eine deutliche Verzögerung der Trypsinwirkung durch Traubenzuckerzusatz. J. Arnheim²⁾ fand bei Zusatz von Dextrose, Milchzucker oder Dextrin eine Beförderung der Autolyse der Leberfermente. Es läßt sich denken, daß die Enzyme eines Organs, in dem sich stets Kohlehydrate befinden, diesen gegenüber eine Sonderstellung vor den anderen Enzymen einnehmen.

Im Vorhergehenden wurde der Zusatz derjenigen chemisch indifferenten Stoffe zum Lösungsmittel untersucht, welche in Wasser gut löslich sind. Es bleibt noch die Wirkung der sog. colloidallöslichen, chemisch indifferenten Stoffe zu betrachten übrig. Über diese Stoffe sei kurz folgendes erwähnt:

H. R. Weiß¹⁾ und J. Arnheim²⁾ fanden eine Beschleunigung der Trypsinverdauung respektive der Autolyse der Leberfermente bei Zusatz von Gummi arabicum. Bei dem Versuch von H. R. Weiß war allerdings wiederum die Acidität nicht konstant. Mugdan³⁾ fand die Pepsinverdauung durch Gummi arabicum stark verzögert. Tabelle 17 gibt ebenfalls eine Verlangsamung durch Gummi arabicum und zwar der Trypsinverdauung bei neutraler Reaktion:

Tabelle 17.

Trypsinlösung ccm	Gummi arabicum ccm	Wasser ccm	Verdautes Eiweiß Mittel aus je 8 Versuchen
3	—	4	50
3	1	3	27
3	2	2	26
3	3	1	18

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XL, S. 488.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XL, S. 238.

³⁾ Berl. klin. Wochenschr., 1891, Nr. 32.

Bei Zusatz von Eiweiß zu Enzymlösungen fanden A. Harden,¹⁾ Meisenheimer²⁾ u. a. eine Beschleunigung der Reaktion. Nirenstein und Schiff³⁾ haben dagegen einen geringen hemmenden Einfluß auf die Pepsinverdauung nach Mette gefunden.

Man sieht also, daß bei Zusatz colloidaler Substanzen die Ergebnisse nicht so einfach sind, als bei Zusatz von wasserlöslichen Stoffen. Es liegt das sicher an den Komplikationen, die das heterogene System gegenüber dem homogenen mit sich bringt.

Nach den bisher vorliegenden Versuchen kann man daher wohl den Satz aufstellen: eine Fermentreaktion geht um so langsamer vor sich, je mehr das Wasser des Mediums durch einen chemisch indifferenten, in Wasser löslichen Stoff ersetzt wird.

Kurz sei auf folgende Konsequenz dieses Satzes hingewiesen: Es kann die hemmende Wirkung der Spaltungsprodukte auf den Ablauf der Fermentreaktion nicht dadurch ganz beseitigt werden, daß die Spaltungsprodukte durch andere Fermente weiter gespalten werden, wie es z. B. bei der Eiweißverdauung der Fall ist, obgleich sie dann nach dem Massenwirkungsgesetz keinen Einfluß mehr haben.

Zum Schluß möchte ich Herrn Dr. R. O. Herzog für die Anregung und Unterstützung bei der Arbeit den herzlichsten Dank aussprechen.

¹⁾ Berl. Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. 36, S. 715 (1903).

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXVII, S. 520 (1903).

³⁾ Arch. für Verdauungskrankh., Bd. 24, S. 588.