

Einfluß verschiedener Säuren auf die Hydrolyse der Maltose durch Maltase.¹⁾

Von

Dr. W. Kopaczewski, Paris (Institut Pasteur).

Mit einer Tafel.

(Der Redaktion zugegangen am 3. Juli 1912.)

Der Einfluß der Säuren auf die Wirkung der zucker-spaltenden Enzyme ist zuerst von Kjeldahl²⁾ bei der Inversion des Rohrzuckers durch Invertase untersucht worden. Dabei ergab sich, daß die Säuren bis zu einer gewissen Konzentration einen beschleunigenden, dann aber, wenn die Konzentration steigt, einen hemmenden Einfluß auf die Hydrolyse üben. Man kann bei der Säurewirkung vier Konzentrationen unterscheiden: eine erste, welche die Hydrolyse zu befördern beginnt; eine zweite, bei welcher die Säurewirkung ihr Optimum erreicht, eine dritte, welche für den Prozeß indifferent bleibt, und schließlich eine vierte, welche die Hydrolyse vollständig hemmt (s. Tab. I).

Die Untersuchungen über den Einfluß verschiedener chemischen Agenzien auf die Hydrolyse der Disaccharide durch Enzyme waren jedoch nicht gleichmäßig angeordnet. So ist z. B. die durch Maltase bewirkte Maltosespaltung in dieser Hinsicht bis jetzt nicht näher untersucht worden, obschon sie zu den interessantesten Prozessen gehört — da einerseits die Maltase sehr empfindlich gegen verschiedene chemische Agenzien, ander-

¹⁾ Vorliegende Arbeit stellt einen Auszug aus unserer Inaugural-Dissertation (Freiburg in der Schweiz, 1911), der durch spätere Untersuchungen etwas ergänzt ist.

²⁾ Kjeldahl, Meddelelser fra Carlsberg Lab. I., 1881, zit. nach Oppenheimer. Fermente und ihre Wirkungen. 3. Aufl., 1909, Bd. 2, S. 29—34.

seits die Maltose durch Säuren schwer hydrolysierbar ist.¹⁾ Man hat nur eine einzige Säure in ihrer Einwirkung auf die Hydrolyse der Maltose durch Maltase studiert und zwar die Schwefelsäure.²⁾ Henri und Philoche³⁾ untersuchten nur den Einfluß des Spaltungsproduktes, Lintner und Kröber⁴⁾ denjenigen der Antiseptika, Bokorny⁵⁾ und Bau⁶⁾ begnügten sich mit der Feststellung der Tatsache, daß manche Konzentrationen eines Stoffes einen gewissen Einfluß auf die Hydrolyse ausüben.

Aber auch die Arbeiten über die anderen Enzyme waren nicht genügend weit geführt worden, um etwaige allgemeine Schlüsse ziehen zu können,⁷⁾ man hatte entweder eine zu geringe Anzahl von Säuren untersucht, oder eine ganz unzuverlässige (kolorimetrische) Methode angewandt, wie es in der Arbeit Kübels⁸⁾ der Fall war. Es wurde bisher nicht versucht, bei verschiedenen Säuren den Einfluß mehrerer nahe liegenden Konzentrationen zu erforschen, oder die Abhängigkeit des Säureeinflusses von der Konstitution und Stärke der Säure festzustellen. Es wurde auch der Grad der natürlichen Reaktion des betreffenden Enzyms außer acht gelassen.

Unsere Arbeit war, soweit unsere Kenntnisse reichen, die erste in dieser Art und die erhaltenen Resultate wurden später in vollkommener Weise durch die Untersuchungen Anderer bestätigt.⁹⁾

¹⁾ Siehe unten.

²⁾ Dubourg, Ann. de l'Inst. Pasteur, Bd. 3, 1889, S. 581.

³⁾ Henri et Philoche, Influence du glucose sur l'hydrolyse de maltose. Soc. Biol., Bd. 61, 1905, S. 1005.

⁴⁾ Lintner und Kröber, Beobachtungen über die Hefeclykase. Ber. d. d. chem. Ges., Bd. 28, 1895, S. 1050.

⁵⁾ Bokorny, Beobachtungen über die Maltase in der Hefe. Chem. Ztg., Bd. 25, 1901, S. 502.

⁶⁾ Bau, Wochenschr. f. gesamt. Brauwesen, Bd. 20, 1903, zit. nach Oppenheimer, loc. cit.

⁷⁾ M. Fernbach, Sur le dosage de la sucrase. Ann. de l'Inst. Pasteur, Bd. 3, 1889, S. 473 u. 531. Rosenblatt et Rosenband, Recherches sur l'influence paralysante etc., ibid. Bd. 24, 1910, S. 196.

⁸⁾ F. Kübel, Über die Einwirkung verschiedener Stoffe auf die Tätigkeit des Mundspeichels. Pflügers Arch., Bd. 76, 1903, S. 276.

⁹⁾ Siehe unten.

Die Technik der Hydrolyse war die folgende: von einer Anzahl Reagenzgläser (Jenaer Glas) wurde eines mit 2 ccm destillierten Wassers, die übrigen mit der gleichen Menge einer verdünnten Säure gefüllt. Nun wurden alle Gläser zugepfropft und in einen Thermostaten (nach Ostwald) gestellt, dessen Temperatur konstant auf $39,5^{\circ}$ C. gehalten wurde. Diese stellt das Optimum der Maltasewirkung dar, wie aus den Arbeiten von Lintner und Kröber¹⁾ und Philoche²⁾ hervorgeht.

Als Maltase diente die von E. Merck bezogene «Taka-Diastase». Die Lösung war einprozentig (auf die Endkonzentration berechnet); sie zeigte gegen Lackmus eine schwach alkalische Reaktion und reduzierte die Fehlingsche Lösung. Das Verhältnis des Reduktionsvermögens der Maltose zur «Taka-Diastase» ist wie 100:80,75; es bleibt aber während der Versuchszeit unverändert. Die Lösung der Taka-Diastase war unfiltriert und es wurde auch keine Dialyse vorgenommen. Die Maltoselösung war 2%ig, auch unfiltriert; die Maltose von E. Merck bezogen.

Nun wurden die beiden Lösungen in den Thermostaten gestellt und dort ca. $\frac{1}{2}$ Stunde gelassen, damit sie die Temperatur $39,5^{\circ}$ C. erreichten; dann wurden sie in einem Kölbchen unter gutem Schütteln gemischt, das Kölbchen mit Baumwolle umwickelt und die Lösung gleichmäßig in Reagenzgläser verteilt (zu je 3 ccm). Die Reagenzgläser wurden geschüttelt, mit sterilisierten Propfen verstopft und wieder in den Thermostaten gestellt. Dort blieben sie $3\frac{1}{2}$ Stunden. Es zeigte sich, daß während dieser Zeit schon etwa 28% Maltose hydrolysiert wurde; andererseits aber diese so kurze Einwirkungszeit wurde gewählt, um kein Antiseptikum zu brauchen.

Nach Verlauf von $3\frac{1}{2}$ Stunden wurde der Prozeß durch Zusatz eines Tropfens 33%iger Natronlauge vollständig gehemmt; der Sicherheit wegen wurde jedesmal das Reagenzglas mit stärkster Säurekonzentration mit einem Tropfen Phenolphthalein als Indikator versetzt und in nötigem Fall die entsprechende Menge Natronlauge zugefügt.

¹⁾ Lintner und Kröber, loc. cit.

²⁾ Philoche, loc. cit.

Die gebildete Zuckermenge wurde nach der Methode von G. Bertrand¹⁾ bestimmt. Ihrer Einfachheit und Zuverlässigkeit wegen hat sich diese Methode als die beste erwiesen: der Versuchsfehler betrug nur $\pm 0,5\%$.

Der hydrolysierte Anteil der Maltose wurde nach der graphischen Methode von Porcher²⁾ berechnet. Durch den Gebrauch dieser Methode erhöhte ich den Versuchsfehler um $\pm 3\%$, andererseits aber vermied ich das mühsame Rechnen, was bei der ungeheuren Zahl der Analysen sehr wichtig war.

Es muß noch folgendes bemerkt werden:

Jeder Versuch war von der Prüfung begleitet, ob die größte Säurekonzentration allein die Maltose nicht hydrolysiere; der Titer der Maltoselösung wurde jedesmal durch Analyse festgestellt. Der Titer der gebrauchten Säuren wurde auf alkalimetrischem Wege bestimmt unter Benutzung von Phenolphthalein für schwächere und von Lackmus für stärkere Säuren. Ausnahmen bilden nur die Borsäure³⁾ und Oxybenzoesäuren, deren Gehalt durch Wägung bestimmt werden mußte. Jede Säure wurde in ihrer Wirkung in zwei bis drei Serien studiert: die erste Serie diente als Vorprüfung, und es wurden dabei möglichst voneinander abweichende Konzentrationen gewählt; die zweite hatte als Aufgabe das Optimum der Säurewirkung festzustellen; und nur für einige anorganische Säuren, die sich als sehr aktiv erwiesen, war eine dritte Serie notwendig. Jede Analyse wurde zweimal ausgeführt; in zweifelhaften Fällen wurde noch eine dritte Analyse ausgeführt und Mittelwert genommen.

Bevor der Einfluß der Säuren auf die Hydrolyse der Maltose durch Maltase geschildert wird, muß ich bemerken, daß keine von den gebrauchten Säuren in ihrer stärksten Konzentration allein die Maltose zu hydrolysieren vermochte. Diese außerordentliche Widerstandsfähigkeit der Maltose gegen die

¹⁾ G. Bertrand, Le dosage des sucres réducteurs. Bull. de la Soc. Chim., Serie III, Bd. 35, 1906, S. 1285.

²⁾ Porcher, Les calculs de la proportion hydrolysée du lactose . . . Bull. Soc. Chim., Bd. I, 1905, S. 1285.

³⁾ Gmelin-Kraut-Friedheim, Handb. der anorg. Chem., Heidelberg, 1909, 7. Aufl., Bd. II, Abt. 3, S. 584.

Säuren war der Gegenstand einer speziellen Untersuchung, die im kurzen erscheinen wird.¹⁾

Es ist uns unmöglich, alle Resultate hier wiederzugeben — es hat auch weniger Interesse, wir begnügen uns deshalb an einem Beispiele, die Arbeitsweise und die Art der Angabe der Ergebnisse zu erörtern. Wie wir schon erwähnt haben, sind für den Einfluß der Säuren auf den Fermentationsprozeß vier Säurekonzentrationen charakteristisch. Die Reihenfolge derselben ist bei allmählicher Steigerung der Säurekonzentration die folgende:

1. Die kleinste, die Maltasewirkung befördernde Säurekonzentration.
2. Die Konzentration, in der diese begünstigende Wirkung der Säure ihr Maximum erreicht (im folgendem gewöhnlich die «optimale Säurekonzentration» genannt).
3. Die Konzentration, in der die Säure die Wirkung der Maltase zu hemmen beginnt.
4. Die Konzentration, in der die Säure diese Wirkung vollständig hemmt.

Diesen Wechsel im Einfluß der Säuren auf die Enzymwirkung stellt die Kurve (Tab. I) dar.

Bei der Angabe der Resultate ist der erste und dritte Punkt mit 0,0% bezeichnet; der vierte mit —100,0% und der zweite mit entsprechenden Zahlen, welche den Grad des günstigen Einflusses der Säure bedeuten. So versteht man z. B. unter +100,0%, daß die Säure die Fermentwirkung verdoppelt hatte.

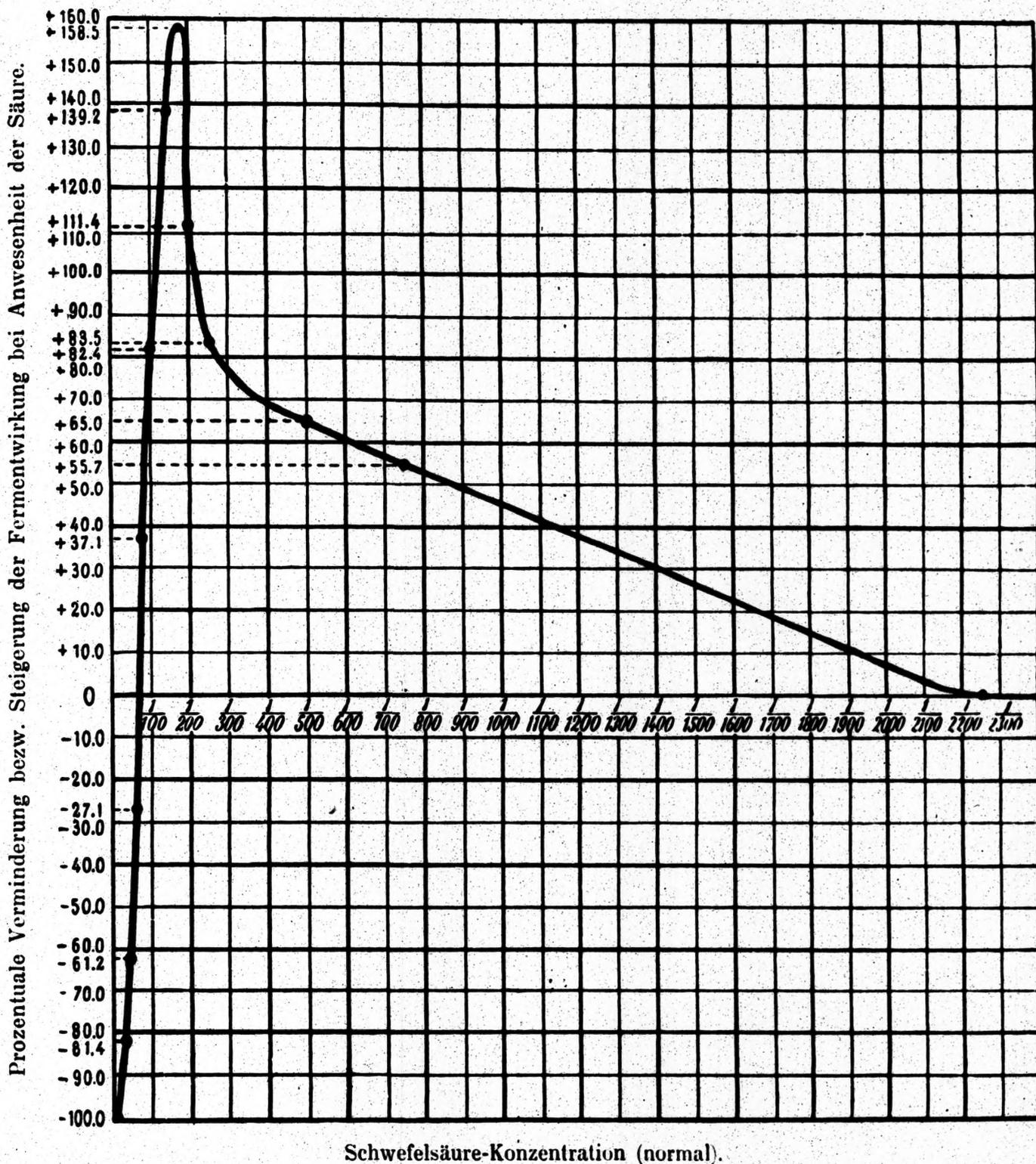
Um eine Übersicht zu erleichtern, geben wir hier die Resultate mit den anorganischen einbasischen Säuren in extenso. (Tab. II.)

Alle übrigen Resultate fassen wir in der Tabelle III zusammen, indem nur die Konzentrationen, bei welchen die Säuren ihr Optimum erreichen, berücksichtigt sind; dabei ist eine Anzahl von Säuren nicht erwähnt und in bezug auf die entsprechenden Ergebnisse müssen wir auf die oben zitierte Inaugural-Dissertation verweisen.

¹⁾ Im Bulletin de la Soc. Chimique de France 1912.

Tabelle I.

Einfluß der Schwefelsäure auf die Hydrolyse der Maltose durch Maltase.



Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie. Band LXXX, Tafel 4.

Zu «W. Kopaczewski, Einfluß verschiedener Säuren auf die Hydrolyse der Maltose durch Maltase.»

Tabelle II.

Säure- Kon- zentration N	H — Cl			HO — N $\begin{smallmatrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{O} \end{smallmatrix}$			HO — J $\begin{smallmatrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{O} \end{smallmatrix}$		
	I. Serie	II. Serie	III. Serie	I. Serie	II. Serie	III. Serie	I. Serie	II. Serie	III. Serie
0,100	— 100,0			— 100,0			— 100,0		
0,080									
0,066									
0,057									
0,050	— 100,0			— 100,0			— 81,4		
0,040									
0,033									
0,028									
0,025	— 90,5	— 90,8		— 90,8	— 90,7		— 62,1	— 63,2	
0,0166		— 27,1			— 27,1			— 17,8	
0,012		+ 46,4			+ 37,1			+ 46,4	
0,010	+ 123,3	+ 121,4		+ 111,4	+ 111,4		+ 83,5	+ 83,5	
0,0066		+ 139,2			+ 139,2			+ 139,2	
0,0062			+ 139,2			+ 139,2			+ 139,2
0,0059			+ 148,5			+ 148,5			+ 148,5
0,0056			+ 139,2			+ 139,2			+ 139,2
0,0056			+ 130,0			+ 139,2			+ 139,2
0,0053			+ 121,4			+ 134,6			+ 121,4
0,0050			+ 111,5			+ 130,0			+ 111,4
0,0040	+ 75,9	+ 111,4			+ 130,0			+ 111,4	
0,0020	+ 52,1	+ 74,2		+ 91,1	+ 92,1		+ 92,1	+ 92,1	
0,0013	+ 28,4			+ 50,7			+ 55,7		
0,00044	0			+ 27,8			+ 37,1		
				0			0		

Tabelle III.

Säuren	Molekular- gewicht	Optimal- kon- zentration	Inversion des Rohr- zuckers ¹⁾	Elektr. Leitver- mögen ²⁾
A. Anorganische Säuren.				
a) einbasische Säuren:				
1. Salzsäure	36,5	$\frac{1}{160}$ -n	100,0	100,0
2. Salpetersäure	63,0	$\frac{1}{160}$ -n	100,0	99,6
3. Jodsäure	175,9	$\frac{1}{160}$ -n	—	—
b) zweibasische Säuren:				
4. Schwefelsäure	98,0	$\frac{1}{170}$ -n	73,2	65,1
c) dreibasische Säuren:				
5. Borsäure	62,0	$< \frac{1}{2}$ -n	—	—
6. Phosphorsäure	98,0	$\frac{1}{25}$ -n	6,2	7,3
7. Arsensäure	142,0	$\frac{1}{17}$ -n	4,8	5,4
B. Organische Säuren.				
a) einbasische Säuren:				
8. Ameisensäure	46,0	$\frac{1}{60}$ -n	—	—
9. Essigsäure	60,0	$\frac{1}{25}$ -n	0,4	1,4
10. Monochloressigsäure	94,5	$\frac{1}{15}$ -n	4,8	4,9
11. Dichloressigsäure	129,0	$\frac{1}{150}$ -n	27,1	25,3
12. Trichloressigsäure	163,5	$\frac{1}{200}$ -n	75,4	62,3
13. Propionsäure	74,0	$\frac{1}{25}$ -n	—	—
14. Buttersäure (n-)	88,0	$\frac{1}{10}$ -n	—	—
15. ' (iso-)	88,0	$\frac{1}{17}$ -n	—	—
16. Valeriansäure (n-)	102,1	$\frac{1}{7}$ -n	—	—
17. ' (iso-)	102,1	$\frac{1}{20}$ -n	—	—
18. Trimethylessigsäure	102,1	$\frac{1}{20}$ -n	—	—
19. Glykolsäure	76,0	$\frac{1}{25}$ -n	—	—

¹⁾ Die Zahlen sind dem Buche V. Henri, Cours de chimie physique, Paris, Hermann, S. 108, entnommen und beziehen sich auf die $\frac{n}{2}$ -Lösungen.

²⁾ Die Zahlen sind nach den verschiedenen Arbeiten Ostwalds zusammengestellt.

Tabelle III.

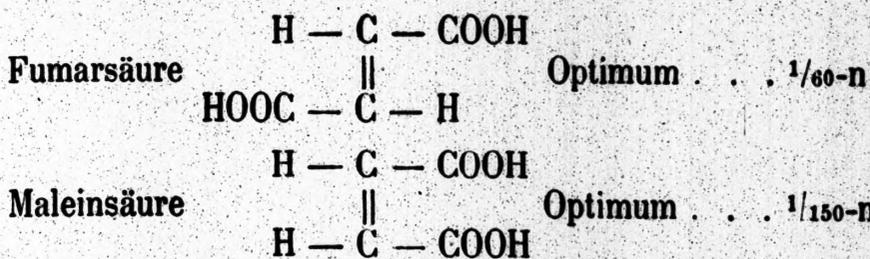
Fortsetzung.

Säuren	Molekular- gewicht	Optimal- kon- zentration	Inversion des Rohr- zuckers	Elektr. Leitver- mögen
b) zweibasische Säuren:				
20. Oxalsäure	90,0	$\frac{1}{150}$ -n	18,6	19,7
21. Malonsäure	104,0	$\frac{1}{80}$ -n	3,8	—
22. Bernsteinsäure	118,0	$\frac{1}{25}$ -n	0,55	0,58
23. Fumarsäure	134,0	$\frac{1}{80}$ -n	—	—
24. Maleinsäure	134,0	$\frac{1}{80}$ -n	3,1	3,1
25. Tartronsäure	120,0	$\frac{1}{80}$ -n	—	—
26. Äpfelsäure	134,0	$\frac{1}{80}$ -n	—	—
27. r-Weinsäure	150,0	$\frac{1}{100}$ -n	—	—
28. Traubensäure	150,0	$\frac{1}{100}$ -n	—	—
29. Zuckersäure	200,0	$\frac{1}{150}$ -n	—	—
c) dreibasische Säuren:				
30. Citronensäure	192,0	$\frac{1}{100}$ -n	1,72	—
d) aromatische Säuren:				
31. Phenylglykolsäure . . .	146,0	$\frac{1}{80}$ -n	—	—

Aus den vorstehenden Resultaten können folgende Schlüsse gezogen werden:

1. Zwischen den organischen und anorganischen Säuren ist bezüglich ihrer Einwirkung auf die Hydrolyse der Maltose kein scharfer Unterschied bemerkbar. Eine besondere Stellung nimmt hier die Borsäure ein, indem sie noch bei der stärksten Konzentration (0,4 N.) einen günstigen Einfluß auf die Hydrolyse ausübt (+ 27,8%). Das stimmt mit den Angaben von Agulhon¹⁾ vollständig überein. Dieses nahezu indifferente Verhalten der Borsäure ist leicht verständlich: sie ist außerordent-

¹⁾ Agulhon, Influence de l'acide borique sur les actions diastases. Ann. de l'Inst. Pasteur, Bd. 24, S. 495, 1910.



Dasselbe mit Isacon, Citracon und Mesaconsäuren.

7. An den zwei Weinsäuren wurde der Einfluß der optischen Isomerie auf die Hydrolyse studiert; es zeigte sich, daß sie ohne Einfluß bleibt.

8. Durch die Einführung des Chloratoms entsteht eine bedeutende Verstärkung der Säure, z. B.

- Essigsäure-Optimum $\frac{1}{35-n}$
- Monochloressigsäure-Optimum . . $\frac{1}{150-n}$
- Dichloressigsäure-Optimum . . . $\frac{1}{200-n}$
- Trichloressigsäure-Optimum . . . $< \frac{1}{200-n}$

9. Phenylgruppe ruft eine Zunahme der Aktivität hervor, z. B.

- Glykolsäure-Optimum $\frac{1}{25-n}$
- Phenylglykolsäure-Optimum . . . $\frac{1}{60-n}$

Es ist nun sehr merkwürdig, daß derselbe Zusammenhang zwischen der Konstitution der Säuren und ihrer Wirkung schon im Jahre 1884 von Ostwald¹⁾ für die Inversion des Rohrzuckers durch die Säuren festgestellt wurde. Er erklärte, daß durch den Grad der elektrischen Dissoziation die Säuren mehr oder weniger intensiv wirken. Für biochemische Reaktionen ist diese Tatsache durch systematische Untersuchungen von Senter²⁾ bestätigt worden; er hat gezeigt, daß die verzögernde Wirkung der Säuren auf Katalase des Blutes in erster Linie der H-Ionenkonzentration proportional ist.

In letzter Zeit hat Sörensen,³⁾ ausgehend von der Tatsache, daß enzymatische Prozesse von dem Aciditäts- resp. Alkalinitätsgrad abhängen, die H-Ionenkonzentrationen, bei denen

¹⁾ W. Ostwald, Die Inversion des Rohrzuckers, Journ. f. prakt. Chemie, N. F. Bd. 29, S. 385, 1884.

²⁾ Senter, Zeitschr. f. physik. Chemie, Bd. 51, S. 683, 1905.

³⁾ Sörensen, Biochem. Zeitschr., Bd. 23, 1910 (Tafel) und Trav. du Labor. Carlsberg, Bd. 8, S. 1, 1909.

diese Prozesse ihr Optimum erreichen, gemessen und die Ergebnisse in einem reichen Kurvenmaterial dargestellt. Es zeigte sich, daß der «wirkliche Säuregrad» in erster Linie von der elektrischen Dissoziation, dann von der Anwesenheit anderer Salze, Proteinstoffe usw. abhängig ist.

Vor kurzem erschien eine wertvolle Arbeit von G. Bertrand¹⁾ und seinen Schülern, in welcher wieder der enge Zusammenhang zwischen physikalischen Eigenschaften der Säuren und in erster Linie zwischen elektrischer Dissoziation und ihren Wirkungen klargelegt ist.

Diese Ergebnisse können die schon oft bestätigte Theorie der Enzymwirkung, die G. Bertrand²⁾ herausgestellt hatte, endgültig bewerten. Sie lautet, daß die Enzyme aus zwei Komponenten zusammengesetzt sind: der eine — der aktive Komplement (*le complement actif*) ist derjenige, der allein entsprechende Reaktion hervorrufen kann, z. B. Salzsäure im Falle des Pepsins, Mangansalze im Falle der Laccase usw.; der zweite — der aktivierende Komplement (*le complement activant*) ist die kolloide Substanz, welcher man bisher eine viel zu wichtige Rolle zugeschrieben hatte.

Wenn wir von diesem Standpunkte aus die Resultate betrachten, so bemerken wir, daß, obwohl die Reihenfolge der Säuren in bezug entweder auf das elektrische Leitvermögen, oder die Inversion des Rohrzuckers, oder schließlich auf die Hydrolyse der Maltose durch Maltase und andere fermentative Prozesse fast immer dieselbe bleibt, doch bedeutende quantitative Unterschiede existieren, welche weder durch Versuchsfehler, noch durch unsere physikalischen Kenntnisse erklärt werden können. So z. B. Dichloressigsäure ist aktiver als die stärkste Mineralsäure, obwohl sie viel weniger dissoziiert ist. Als weiteres Beispiel können die ersten vier Glieder der einbasischen gesättigten Fettsäuren dienen (Tab. IV).

¹⁾ G. Bertrand usw., *Recherches sur l'hydrolyse comparée du saccharose*. Ann. de l'Inst. Pasteur, 1912 (Mai), S. 321.

²⁾ Derselbe, Bull. Soc. Chim., 4^e Serie, Bd. 1, S. 1120, 1907, *ibid.* 3^e Serie, 1897, Bd. 17, S. 623. *Revue générale des sciences*, Bd. 16, S. 459, 1905; *Revue scientif.*, Bd. 47, S. 609, 1909.

Tabelle IV.

Säuren	Dissoziationskonstante k = bei 25° C.	Optimale Konzentration bei Maltose-Hydrolyse
Ameisensäure	0,02140	$\frac{1}{60}\text{-n}$
Essigsäure	0,00180	$\frac{1}{35}\text{-n}$
Propionsäure	0,00130	$\frac{1}{20}\text{-n}$
Buttersäure	0,00149	$\frac{1}{10}\text{-n}$

Diese quantitativen Unterschiede lassen sich nur dadurch erklären, daß bei den fermentativen Prozessen nicht nur die H-Ionenkonzentration das entscheidende Moment ist, sondern auch die Natur der Anionen, an welche die Säuren in den entsprechenden Enzymen gebunden sind.