

# Über die Enzyme von *Monilia candida* und einer Milchzuckerhefe.

Von

**Eduard Buchner und Jakob Meisenheimer.**

(Aus dem chem. Laboratorium der landwirtschaftlichen Hochschule zu Berlin.)

(Der Redaktion zugegangen am 24. Oktober 1903.)

Schon in der ersten Mitteilung über alkoholische Gärung ohne Hefezellen hat der eine von uns darauf hingewiesen,<sup>1)</sup> daß die Zymase in mancher Hinsicht ähnliche Eigenschaften zeigt mit der Invertase von *Monilia candida*, deren Kenntniss wir Emil Fischer und P. Lindner<sup>2)</sup> verdanken. Wie die Zymase ist auch die *Monilia*-Invertase weder aus der frischen, noch aus der getrockneten Hefe auszuziehen und der Nachweis in den frischen Zellen gelingt erst, nachdem sie mit Glaspulver zerrieben sind. Diese Analogie gab uns Veranlassung, die Enzyme der *Monilia* mit Hilfe der neuen Methoden zu studieren, einerseits Preßsaft daraus darzustellen, andererseits die Organismen durch Behandlung mit Aceton zu töten,<sup>3)</sup> um dann die reinen Enzymwirkungen untersuchen zu können.

<sup>1)</sup> Berichte d. d. chem. Ges., Bd. 30, S. 121 (1897).

<sup>2)</sup> Ebenda, Bd. 28, S. 3037 (1895).

<sup>3)</sup> Herr R. O. Herzog (Diese Zeitschr., Bd. XXXVII, S. 381, Ann. 1 [1903]) meint, das Verfahren, niedere Organismen durch Mittel wie Alkohol und Ather, Aceton usw. zu töten, unter Erhaltung ihrer enzymatischen Kräfte, sei bereits von Hoppe-Seyler, sowie von Lea benützt worden. Ich halte diese Ansicht nicht für gerechtfertigt. Man hat allerdings schon früher Enzyme aus wässriger Lösung mit größerem oder geringerem Erfolg durch Alkohol gefällt, aber die Vervollkommnung der Methode, welche allein gestattet, Hefe zu töten unter Konservierung der Zymase, ist zuerst in meinem Laboratorium durch R. Albert (Berichte d. d. chem. Ges., Bd. 33, S. 3775 (1900)) und durch Albert, Buchner und Rapp (ebenda, Bd. 35, S. 2376 (1902)) aufgefunden worden.

E. Buchner.

Unsere Ergebnisse sind folgende:

1. Der auf gewöhnlichem Wege durch Zerreiben mit Quarzsand und Kieselgur und darauf folgendes Auspressen in der hydraulischen Presse ohne Wasserzusatz hergestellte Saft aus *Monilia candida* invertiert Rohrzucker sehr kräftig. Dagegen war Gärwirkung nicht immer zu bemerken und auch in den positiven Fällen nur schwach. Ähnliches gilt für das mit Hilfe von Aceton hergestellte Dauerpräparat.

Wir sehen in diesen Tatsachen eine weitere Stütze des Hauptresultates von E. Fischer und P. Lindner, daß bei der *Monilia* die Inversion des Rohrzuckers und die alkoholische Gärung getrennte Prozesse sind. Nicht bestätigt hat sich dagegen die von den genannten Forschern geäußerte, uns besonders interessierende Ansicht,<sup>1)</sup> die *Monilia*invertase scheine kein beständiges, in Wasser lösliches Enzym, sondern ein Bestandteil des lebenden Protoplasmas zu sein.<sup>2)</sup> Da der Preßsaft stark invertiert, kann es sich nicht um die Wirkung eines im gewöhnlichen Sinne unlöslichen Stoffes handeln, der im Preßkuchen zurückbleiben müßte. Da die mit Aceton getötete *Monilia* noch Rohrzucker invertiert, kommt dabei die Wirkung von lebendem Protoplasma nicht mehr in Frage. Wir haben allerdings den Nachweis, daß die mit Aceton hergestellte Dauermonilia steril ist, nicht direkt geführt; darauf ist aber mit großer Wahrscheinlichkeit zu schließen, denn nach ausführlichen Untersuchungen tötet dieselbe Behandlung sowohl Bierunterhefe als Milchsäurebazillen.

2. Die *Monilia*-Invertase geht, wie Dialyserversuche mit dem Preßsaft bewiesen, nicht durch Pergamentpapier hindurch. In Übereinstimmung damit steht, daß das Enzym nach E. Fischer und P. Lindner weder aus den frischen noch aus dem getrockneten Zellen extrahiert werden kann. Die mit Aceton hergestellte Dauermonilia und, wie Fischer und Lindner berichten,

<sup>1)</sup> Berichte d. d. chem. Ges., Bd. 28, S. 3038 (1895).

<sup>2)</sup> Einige Jahre später (Diese Zeitschr., Bd. XXVI, S. 77 [1898] hält Emil Fischer, wohl im Hinblick auf die Zymase-Entdeckung, an obiger Anschauung nicht mehr unbedingt fest, sondern erwähnt sogar die Möglichkeit, daß Versuche mit *Monilia*-Preßsaft zu einer Abtrennung des Enzymes von der lebenden Zelle führen könnten.

auch getrocknete *Monilia* invertieren aber Rohrzuckerlösung: es muß demnach der Zucker durch die Zellmembran einzudringen vermögen. Da nach Fischer und Lindner frische *Monilia*hefe Rohrzucker kaum invertiert, so verhindert entweder bei der lebenden *Monilia* eine Art von Plasmahaut das Eindringen des Rohrzuckers oder es ist beim Trocknen bzw. bei der Acetonbehandlung ein Schrumpfen der Zellmembranen unter Erweiterung der Poren anzunehmen.

3. Die *Monilia*invertase ist gegenüber verschiedenen Einflüssen ziemlich unempfindlich. Sie verträgt kurze Einwirkung von Aceton und Äther, ohne Vernichtung, wie die deutliche invertierende Kraft der durch Aceton getöteten *Monilia* beweist. Sie geht durch eintägiges Erwärmen (33°) des frischen Preßsaftes, also allerdings unter Einhaltung der natürlichen Konzentrationsbedingungen, nicht zugrunde, gleichgültig, ob Toluol dabei anwesend ist oder nicht. Hiermit scheint im ersten Augenblick eine Beobachtung von E. Fischer und Lindner im Widerspruch zu stehen, welche fanden, daß getrocknete *Monilia* durch eintägiges Digerieren (33°) mit Wasser und Toluol bei nachträglichem Rohrzuckerzusatz ihr Invertierungsvermögen eingebüßt hatte. Vielleicht aber ist der negative Ausfall dieses Versuches nicht auf die erhöhte Temperatur und das Toluol zurückzuführen, wie die Verfasser glauben, sondern auf die beträchtlichen Konzentrationsänderungen durch den Zusatz von viel Wasser, überdies ohne gleichzeitige Zugabe von Zucker. Die Zymase wird durch solche Verdünnungen wesentlich geschädigt; es scheint, daß auch die *Monilia*-Invertase dagegen empfindlich ist. In diesem Sinne sind ferner vermutlich einige Versuche mit frischer, zerriebener *Monilia* zu deuten. Schon Fischer und Lindner haben beobachtet, daß frische, mit Glaspulver zerriebene *Monilia* auf Zusatz von Wasser, Rohrzucker und Toluol zwar unverkennbare, aber nur schwache invertierende Wirkung ausübt. Wir haben diesen Versuch mit zwei verschiedenen *Monilia*kulturen mit Glaspulverzerreibung, und da eine ungünstige Beeinflussung des Resultates durch diese alkalische Substanz möglich schien, auch mit Quarzsandzerreibung wiederholt, sind aber immer zu genau dem gleichen Resultate gelangt: die In-

vertierung war in allen Fällen sehr gering. Die durch das Zerreißen der Zellmembranen und der Plasmahaut schutzlos der Einwirkung der Zuckerlösung preisgegebene Moniliainvertase scheint durch den Mangel an Elektrolyten und an Colloidstoffen geschädigt zu werden.

Außer auf *Monilia candida* haben wir unsere Versuche auch noch auf eine Milchzuckerhefe aus armenischem Mazun (Nr. 496 der Sammlung des hiesigen Institutes für Gärungsgewerbe) ausgedehnt. E. Fischer<sup>1)</sup> hat gezeigt, daß die Milchzuckerhefe No. 394 der gleichen Sammlung, von Weigmann<sup>2)</sup> in Kiel stammend, eine Milchzucker hydrolysierende Laktase enthält, die weder aus den frischen, noch aus den getrockneten Zellen, sondern erst nach dem Zerreiben der getrockneten Zellen mit Glaspulver durch Wasser ausgezogen werden konnte. Mit dem Preßsaft aus Hefe 496 konnten wir Milchzucker unter Kohlendioxydentwicklung vergären. Ferner ließ sich aus der bezeichneten Hefe durch Acetonbehandlung ein Dauerpräparat darstellen, welches aus Trauben- und Milchzucker Kohlensäurebildung bewirkte. Allerdings war die Gärwirkung so gering, daß wir uns mit einer nur annähernd genauen volumetrischen Bestimmung des entwickelten Gases begnügen mußten. Danach wurde das Mono- und das Disaccharid ungefähr gleich schnell vergoren. Da die Versuche Emil Fischers dafür sprechen, daß ganz allgemein Disaccharide erst nach der Hydrolyse vergoren werden, ist man zur Annahme einer den Milchzucker hydrolysierenden Laktase und außerdem einer Gärung bewirkenden Zymaseart in dem Preßsaft berechtigt. Rohrzucker wurde durch das Acetondauerpräparat überhaupt nicht oder wenigstens nur in so geringem Maße vergoren, daß es zu keiner Gasentwicklung kam. In der Milchzuckerhefe 496 scheinen demnach höchstens Spuren einer Invertase vorhanden zu sein. Dieses Ergebnis stimmt mit den Angaben von P. Lindner überein, welcher für die gleiche Hefe selbst auf mikroskopischem Wege nur eine geringe Vergärung von Rohrzucker konstatieren konnte.<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> Berichte d. d. chem. Ges., Bd. 27, S. 3481 (1894).

<sup>2)</sup> Vgl. Wochenschrift f. Brauerei, Bd. 17, S. 715 (1900).

<sup>3)</sup> Wochenschrift f. Brauerei, Bd. 17, S. 714 (1900).

Wenn wir schließlich noch die Beziehungen der Monilia-Invertase und der Hefenlaktase zur Zymase der untergärigen Bierhefe kurz zusammenstellen, so ergibt sich, daß alle diese Enzyme nur im Innern der Zellen zu wirken bestimmt sind, also nach M. Hahn<sup>1)</sup> zu den sog. Endoenzymen gehören. Moniliainvertase und Hefenzymase dialysieren nicht durch Pergamentpapier: die Laktase wurde nicht geprüft. Alle drei Enzyme sind im Preßsaft der betreffenden Organismen wirksam vorhanden und überdauern die Tötung der Zellen durch Aceton. Gleich der Zymase scheint die Moniliainvertase gegen Konzentrationsänderungen des Preßsaftes sehr empfindlich zu sein: die Moniliainvertase wird aber bei einfüggigem Digerieren des Saftes nicht geschädigt, wogegen die Zymase des Preßsaftes aus Unterhefe bei dieser Behandlung infolge gleichzeitiger Anwesenheit der Hefenendotryptase im Preßsaft bedeutend an Wirksamkeit einbüßt.

Es ist uns Bedürfnis, Herrn Prof. Paul Lindner für die freundliche Überlassung des Aussaatmaterials zu den Kulturen bestens zu danken.

#### Versuche mit Preßsaft aus *Monilia candida*.

Die Organismen wurden in  $\frac{3}{4}$  gefüllten 5-Liter-Kolben, die mit Wattestopfen verschlossen waren, herangezüchtet. Als Nährlösung diente eine 10%ige Bierwürze: das Ganze wurde durch halbstündiges Kochen an drei aufeinanderfolgenden Tagen sterilisiert. Die innerhalb mehrerer Monate bei Zimmertemperatur in Form einer gelblich weißen Decke gewachsene reine Moniliahefe wurde durch ein Faltenfilter abfiltriert und durch Auftragen auf Ton vom größten Teil des anhaftenden Wassers befreit. Die Methode der Preßsaftbereitung war im allgemeinen die bei Bierhefe beschriebene; nur erwies sich ein größerer Kieselgurzusatz (mindestens ein Drittel des Hefegewichts) als vorteilhaft. Aus 200 g Hefe, der Ernte aus 4 bis 6 Kolben, ließen sich durchschnittlich leicht 80 ccm Saft erhalten.

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. Biologie, Bd. 40, S. 172 (1900); die Zymasegärung, München 1903, S. 42.

Der Moniliapreßsaft stellt eine rotbraune, im durchfallenden Licht klare, aber opaleszierende Flüssigkeit dar, die ganz dem gewöhnlichen Hefepreßsaft gleicht, schwach saure Reaktion besitzt und beim Erwärmen Eiweißstoffe ausscheiden läßt, ohnehin wie jener vollständig zu gerinnen. Fehlingsche Lösung wird nicht reduziert. Das spezifische Gewicht betrug in einem Falle 1,035, der Trockenrückstand 8,61%. Beide Zahlen sind etwas niedriger, als sie der Preßsaft aus Unterhefe durchschnittlich aufweist, wahrscheinlich weil die zur Darstellung des Preßsaftes verwandte Moniliahefe nicht so gründlich von außen anhängendem Wasser befreit werden konnte, wie die Unterhefe. Die Moniliahefe läßt sich nämlich in der hydraulischen Presse infolge ihres Mycelgeflechtes schwieriger abpressen.

Das Alter der verwendeten Kulturen war verschieden: es betrug 1<sup>1</sup>/<sub>2</sub> Monate (Hefe A), 7 Monate (Hefe B) und 2<sup>1</sup>/<sub>2</sub> Monate (Hefe C).

### I. Invertierung von Rohrzucker durch frischen Preßsaft.

1. 10 ccm Saft (Hefe A) lieferten aus 4 g Rohrzucker bei Gegenwart von 0,1 ccm Toluol in 4 Tagen bei 22° 2,8 g Invertzucker, gleich etwa 67% der Theorie. Die Bestimmung erfolgte durch Titration mit Fehlingscher Lösung.

2. 10 ccm Preßsaft (Hefe B), 4 g Rohrzucker, 0,2 ccm Toluol, 23°, 4 Tage. Gebildet 2,9 g Invertzucker (69%). (Der Rohrzucker war bei diesem Versuch nicht ganz in Lösung gegangen, wodurch sich die verhältnismäßig geringe Wirkung [vergleiche die übrigen Versuche mit Hefe B] erklärt).

3. 10 ccm Saft (Hefe C), 4 g Rohrzucker, 0,2 ccm Toluol, 33°, 5 Tage. Gebildet 1,1 g Invertzucker (26%). Bei diesem Versuche waren beim Umschütteln Blasen von Kohlensäure, also Gärwirkung zu bemerken, was sich bei 1. und 2. nicht konstatieren ließ.

### II. Invertierung von Rohrzucker durch dialysierten Saft.

4. 10 ccm Saft (Hefe B) wurden 24 Stunden bei 0° gegen 1 l destilliertes Wasser dialysiert, sodann 4 g Rohrzucker und 0,2 ccm Toluol zugefügt. Nach 3 Tagen bei 33° alles invertiert.

5. 10 ccm Saft (Hefe C). Anordnung genau wie bei 4. Gebildet: 1.0 g Invertzucker (24%) in 4 Tagen.

**III. Invertierung von Rohrzucker durch aufbewahrten, bzw. digerierten Saft.**

6. 10 ccm Saft (Hefe B), 24 Stunden bei 0° aufbewahrt, dann mit 4 g Rohrzucker, 0.2 ccm Toluol versetzt. Nach 3 Tagen bei 33° alles invertiert.

7. 10 ccm Saft (Hefe B) wurden ohne Toluolzusatz 24 Stunden auf 33° erwärmt, sodann mit 4 g Rohrzucker und 0.2 ccm Toluol versetzt. Nach 72 Stunden war alles invertiert.

8. 10 ccm Saft (Hefe C) wurden 24 Stunden unter Zusatz von 0.2 ccm Toluol auf 32° erwärmt, sodann 4 g Rohrzucker zugefügt und 4 Tage bei 33° erhalten. Gebildet 0.9 g Invertzucker (23%).

**Versuche mit durch Acetonbehandlung getöteter *Monilia*.**

Die Herstellung des Präparates wurde vollständig ebenso wie bei Bierunterhefe ausgeführt.<sup>1)</sup> Man erhält ein gelblich weißes staubtrockenes Pulver, welches wenige Tage nach der Herstellung zu den Versuchen verwendet wurde.

9. 1 g Dauerpräparat (Hefe B), 4 g Rohrzucker, 10 ccm Wasser, 0.2 ccm Toluol, 32°. Nach 4 Tagen gebildet 0.4 g Invertzucker, entsprechend etwa 10%.

10. 1 g Dauerpräparat (Hefe B), 10 ccm Wasser, 0.2 ccm Toluol, 24 Stunden auf 32° erwärmt, sodann 4 g Rohrzucker zugegeben. Nach 3 Tagen bei 32° gebildet 0.3 g Invertzucker (7%).

11. 2 g Dauerpräparat (Hefe C), 4 g Rohrzucker, 10 ccm Wasser, 0.2 ccm Toluol, 4 Tage bei 33°. Gebildet 0.3 Invertzucker (7%).

Bei letzterem Versuche war im Gegensatz zu 9. und 10. schwache Gärung zu bemerken.

Die Gärwirkung der mit Aceton getöteten *Monilia* wurde auch im Endiometerrohr verfolgt, 1 g lieferte jedoch in einigen

<sup>1)</sup> R. Albert, E. Buchner und R. Rapp, Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. 35, S. 2378 (1902).

Tagen bei 30° bei Gegenwart von 0,2 ccm Toluol nur 0,5 ccm Kohlensäure, also außerordentlich viel weniger als die gleiche Menge Dauerpräparat aus Bierunterhefe, was mit der geringen Gärwirkung auch der lebenden Monilia, verglichen mit der Kulturhefe, übereinstimmt.

#### Versuche mit zerriebener, frischer Moniliahefe.

12. 2 g frische Monilia (Hefe B) wurden 10 Min. mit 2 g Glaspulver zerrieben. Unterm Mikroskop erwiesen sich alle Zellen zerrissen. Dazu gegeben 2 g Rohrzucker, 12 ccm Wasser, 0,2 ccm Toluol; 33°. Nach 3 Tagen nur Spuren von Invertzucker gebildet.

13. Genau wie 12., nur an Stelle von Glaspulver mit 2 g Quarzsand verrieben. Resultat wie bei 12.

14. 2 g frische Monilia (Hefe C) mit 2 g Glaspulver zerrieben wie bei 12. 4 g Rohrzucker, 10 ccm Wasser, 0,2 ccm Toluol, 4 Tage bei 33°. Die Inversion betrug weniger als 1%.

15. Genau wie 14., nur an Stelle von Glaspulver mit 2 g Quarzsand verrieben. Auch hier Inversion weniger als 1%.

Bei sämtlichen Versuchen mit frischer Monilia war schwache Gärung zu bemerken.

#### Versuche mit Milchzuckerhefe No. 196.

Die Hefe wurde ähnlich wie die Monilia candida in 5-Liter-Kolben bei Zimmertemperatur gezüchtet, welche zu drei Vierteln mit der Nährlösung (10%iges Hefewasser und noch 10% Milchzucker) gefüllt waren. Alles wurde vor der Aussaat sorgfältig sterilisiert. Es zeigte sich nur geringes Wachstum: jeder Kolben lieferte nur etwa 6 bis 10 g Hefe in 1 bis 3 Monaten. Die Darstellung des Preßsaftes sowohl wie der Acetondauerhefe erfolgte in üblicher Weise.

I. 15 ccm Preßsaft, 5 g Milchzucker, 0,1 ccm Toluol, 32°. In 4 Tagen waren 2 ccm CO<sub>2</sub> gebildet. Die zu dem Preßsaft verarbeitete Kultur war 2 Monate alt.

#### II. Versuche mit Acetondauerpräparat.

(1 g Milchzucker-Dauerhefe, 3,4 g von dem betreffenden

Zucker, 7 ccm Wasser, 0,2 ccm Toluol, 24°. Im Eudiometerrohr über Quecksilber. Alter der Kultur: 3 Monate.)

| Nr. | Art des Zuckers | ccm Kohlensäure gebildet in Tagen |     |                          |      |      |      |
|-----|-----------------|-----------------------------------|-----|--------------------------|------|------|------|
|     |                 | 1                                 | 2   | 4                        | 6    | 8    | 12   |
| 1   | Milchzucker . . | 0,7                               | 4,3 | nach 2 Tagen abgebrochen |      |      |      |
| 2   | Traubenzucker . | 0,5                               | 4,0 | nach 2 Tagen abgebrochen |      |      |      |
| 3   | Milchzucker . . | 0,5                               | 4,0 | 9,3                      | 14,5 | 17,0 |      |
| 4   | Rohrzucker . .  | —                                 | —   | —                        | —    | —    | —    |
| 5   | Milchzucker . . | 0,75                              | 3,5 | 10,0                     | 13,3 | 15,5 | 17,5 |
| 6   | Traubenzucker . | 2,5                               | 5,3 | 10,5                     | 14,0 | 17,0 | 19,3 |

Die Kohlendioxydvolumina dieser Tabelle sind nicht auf normalen Druck und normale Temperatur reduziert, unter sich aber vergleichbar.