

Über die Hefeoxydase.

Von

W. Issajew.

Mit einer Abbildung.

(Mitteilung aus dem Laboratorium für Technologie der Kohlehydrate des Polytechnischen Instituts zu Warschau.)

(Der Redaktion zugegangen am 27. Mai 1904.)

Mit der Frage nach der Existenz einer Oxydase in der Hefe hat man sich bisher nicht viel beschäftigt, vielleicht deshalb, weil die Hefe ja gewöhnlich bei Luftabwesenheit in einer Kohlensäureatmosphäre funktioniert, sodaß irgend einem Luftsauerstoffüberträger, d. h. einem Oxydationsenzym, kaum Gelegenheit geboten wird, seine spezifische Wirkung zu entfalten. Es ist aber bekannt, daß der Luftsauerstoff für die Lebenstätigkeit der Hefe unentbehrlich ist und zwar während der ersten Periode ihres Wachstums und ihrer Vermehrung. Es ist möglich, daß bei dieser Sauerstoffverwertung, dann aber auch während anderer Lebensperioden der Hefe, eine Oxydase mitwirkt. Auf Grund älterer und der hier mitzuteilenden Versuche muß man zur Überzeugung kommen, daß in der Hefe ein Oxydationsenzym, die Hefeoxydase, existiert.

Die ersten bestimmten Angaben über die Existenz einer Oxydase in der Hefe findet man bei Tolomei:¹⁾ er kultivierte in Weinmost den Sacch. ellips. und setzte dann den Pilz der Luft aus; ein Chloroformwasserauszug davon gab die qualitativen Laccasereaktionen (welche, wird l. c. nicht angegeben). Ähnliche Resultate haben Versuche mit der Bierhefe ergeben: dieselbe wurde in Dextroselösung mit Zusatz von Alkohol kultiviert und dann von den Hefezellen durch Porzellan abfiltriert. Das Filtrat absorbierte Sauerstoff und entwickelte Kohlensäure:

¹⁾ Real. Ac. Linc. 1896, zitiert nach Green-Windisch-Enzyme, S. 309.

durch Erhitzen verlor es diese Eigenschaften. Mittels Alkohols konnte man aus dem Filtrate einen Niederschlag erhalten, welcher, zu der erhitzten Flüssigkeit zugesetzt, die genannten Erscheinungen wieder hervorrief. Tolomei hat dies der Gegenwart einer Oxydase zugeschrieben. Gegen die Tolomeischen Versuche kann man aber einwenden, daß es bei ihnen unbewiesen bleibt, ob die Gegenwart von Mikroorganismen ausgeschlossen war. Ich habe mich überzeugt, daß es trotz aller Vorsichtsmaßregeln ungeheuer schwer ist, bei solchen Versuchen ganz aseptisch zu arbeiten. Ganz dieselben Einwendungen kann man auch gegen die Versuche Effronts¹⁾ äußern: Effront fand, daß die Hefe beträchtliche Mengen Sauerstoff zu absorbieren vermag, wobei eine Temperaturerhöhung stattfindet: weiterhin, daß man aus zerriebener Hefe einen Auszug darstellen kann, der dieselbe Erscheinung zeigt. Buchner²⁾ sieht in der allmählichen Bräunung des Hefepreßsaftes an der Luft ein Anzeichen für die Existenz einer Oxydase in der Luft.

Die neueste Arbeit über diesen Gegenstand veröffentlichte Grüss.³⁾ Zum Nachweis der Oxydase bediente er sich des sogenannten «Tetrapapiers», eines mit Tetramethyl-p-phenyldiaminchlorid⁴⁾ getränkten Reagenspapiers; er arbeitete nicht mit Auszügen, sondern mit der Hefe selbst und untersuchte die Färbeerscheinungen, welche dieselbe unter verschiedenen Bedingungen in Berührung mit dem Tetrapapier hervorruft. Er fand, daß die Hefe wirklich Oxydationserscheinungen zeigt, und schreibt diese einer Oxydase zu. Es ist aber in der Hefe auch ein «reduzierender Körper» vorhanden, welcher oft diese Erscheinungen verdeckt, indem er Sauerstoff für sich verbraucht, nach Entfernung dieses Körpers treten die früheren Erscheinungen wieder klar hervor. Das Enzym selbst zu isolieren, gelang Grüss nicht und darin liegt gerade der schwache Punkt seiner Arbeit: die von ihm beobachteten Vorgänge konnten

¹⁾ Les enzymes, S. 336.

²⁾ Zymasegärung, S. 79.

³⁾ Wochenschrift für Brauereien 1901, Nr. 24—26.

⁴⁾ von Wurster, Ber. Bd. 21, S. 1526, zum Nachweis des aktiven Sauerstoffs vorgeschlagen.

auch rein vitaler Natur sein; Grüss selbst gibt an, daß abgestorbene Hefe (l. c. S. 311) keine Oxydation des Tetrareagens hervorruft. Außerdem dürfte man wohl kaum allein auf Grund von Färbereaktionen so gewichtige Schlüsse wie die über die Existenz einer Oxydase in der Hefe ziehen.

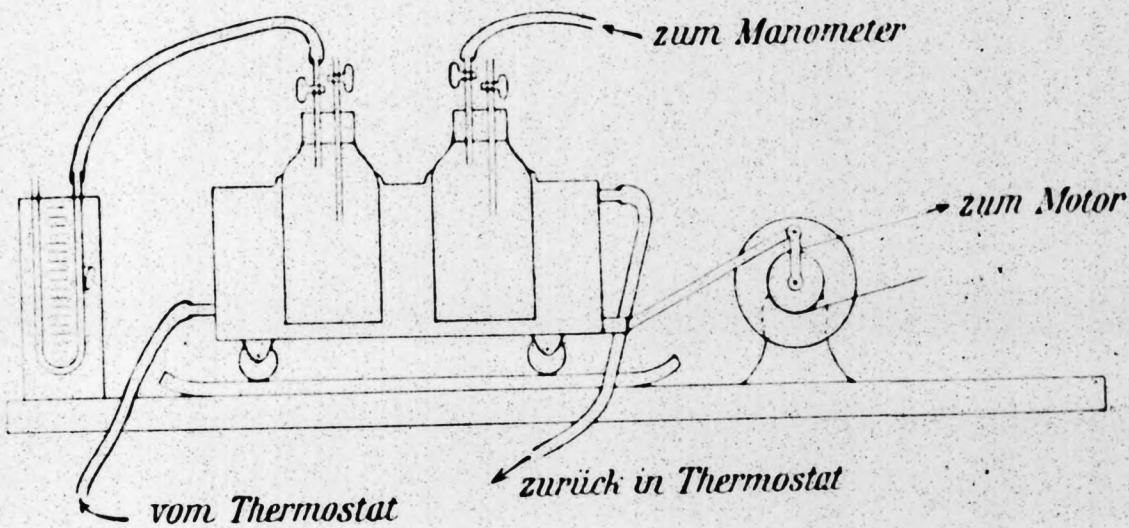
Ich habe daher diese Frage auf chemischem Wege zu lösen versucht und hoffe zeigen zu können, daß in der Hefe wirklich eine Oxydase existiert, welche aus derselben isoliert werden kann. Die Untersuchung ist lange noch nicht abgeschlossen, einige Schlüsse lassen sich jedoch aus derselben schon jetzt ziehen. Sie wurde gemeinschaftlich mit Herrn stud. S. Kaliski ausgeführt¹⁾ und da letzterer an der weiteren Ausarbeitung des Themas nicht teilnehmen wird, mache ich schon jetzt diese vorläufige Mitteilung.

Wir arbeiteten ausschließlich mit Wasser- und Glyzerinauszügen aus Unter- oder Oberhefe. Die klar filtrierten Auszüge wurden mittels Filtration durch sterilisierte Porzellankerzen keimfrei gemacht. Die Versuchsgefäße wurden stets sterilisiert, das Hineinbringen der Flüssigkeiten geschah in einem keimfreien Raume (in einem speziell dazu eingerichteten Glaskasten). Die Glyzerinkonzentration unserer Flüssigkeiten war so groß, daß Bakterien sich auch ohne diese Vorsichtsmaßregeln nicht entwickeln konnten. Als Oxydationsobjekte wählten wir solche antiseptisch wirkende Stoffe, wie Pyrogallol und Hydrochinon; außerdem untersuchten wir den Inhalt jeder Flasche nach beendeter Versuche auf Bakterien und dieser wurde mit Ausnahme der rein wässerigen Auszüge ohne Zusatz von Phenolen in allen Fällen bakterienfrei gefunden.

Die Bestimmung des absorbierten Sauerstoffs und der entwickelten Kohlensäure geschah entweder gravimetrisch oder gasanalytisch. Im ersten Falle wurden die Hefeauszüge mit den zugesetzten Stoffen in einen Glockenkaliapparat gebracht, welcher mit Chlorcalciumröhren und Kaliapparaten verbunden war. Durch dieses System wurde trockene und CO₂-freie Luft gesaugt. Man konnte aber auf diese Weise nur die entwickelte

¹⁾ S. Protokoll der Warsch. Naturf.-Gesellsch., 5. März 1904.

Kohlensäure ohne Schwierigkeit bestimmen. Wir sind daher später zu einer bequemeren Methode übergegangen.



Die Versuchsflüssigkeiten wurden in Flaschen von bekanntem Inhalte gefüllt: deren Gummistopfen waren je mit zwei Röhren versehen, von denen das eine zum Füllen diente, das andere mit einem Manometer verbunden war. Das letztere wurde stets vor und nach dem Versuche auf 0-Strich eingestellt (das andere Rohr des Manometers war beweglich); der Inhalt der Flaschen und der Verbindungsrohren bis zum 0-Strich war bekannt (etwa 500 ccm). Der Unterschied der Quecksilberhöhen unter Berücksichtigung des Barometerstandes und der Temperatur gestattete, durch Rechnung das wirkliche Volumen der Gase bei 0° und 760 mm zu bestimmen. Ihre Zusammensetzung untersuchte man mittels Gasanalyse. Es war somit möglich, die entwickelte CO₂ und den absorbierten O zu bestimmen. Die Flaschen stellte man in einen mit Filz bekleideten Blechkasten und dichtete sie mit Gummiringen ab. Der Kasten wurde an eine Schüttelmaschine angeschraubt; durch denselben trieb man mittels eines Heißluftmotors ($\frac{1}{80}$ HP) mit Pumpe das im Thermostat auf 35° erwärmte Wasser, welches dann wieder aus dem Kasten in den Thermostat zurückkehrte. Es war somit möglich, in diesem «beweglichen Thermostat» die Reaktion bei konstanter Temperatur und fortwährendem Schütteln auszuführen. Die Versuche dauerten gewöhnlich die ganze Nacht, also 12—14 Stunden.

Als qualitative Reaktionen benutzten wir das Verhalten der Auszüge gegen Guajactinktur ohne und mit H_2O_2 , dann gegen α -Naphthol mit p-Phenylendiamin (Indophenolreaktion) und gegen Tetrareagens; alle Lösungen wurden stets frisch bereitet und die Färbungen mit denen von Reagenslösungen selbst verglichen. Es sei schon jetzt erwähnt, daß die Guajacreaktion niemals (mit seltenen Ausnahmen) beobachtet wurde, wie dies auch schon andere Forscher fanden; die Wurstersche Reaktion dagegen gelingt viel leichter, aber auch nicht immer. Die Ursache davon liegt im sogenannten «Reduktionskörper», welcher die Sauerstoffverbindungen des Guajacs und des Wursterschen Reagens leicht reduziert. Dies kann durch den Versuch bewiesen werden: setzt man zur bereits an der Luft oxydierten Farbstofflösung etwas Hefeauszug hinzu, so entfärbt sich allmählich die Lösung, an der Oberfläche bleibt aber ein gefärbter Ring; beim Schütteln färbt sich die ganze Lösung, dann folgt wieder Entfärbung usw. Bei Abwesenheit dieses Körpers kann sogar Guajakreaktion beobachtet werden.

Wir haben uns überzeugt, daß sich in der Hefe tatsächlich ein Körper (vielleicht auch viele) befindet, welcher mit Wasser und Glycerin extrahiert werden kann und der durch Luft mit Kohlensäureentwicklung oxydiert wird. Schon beim Filtrieren durch Porzellankerzen färben sich die ersten Portionen bräunlich, die oxydierten Auszüge erscheinen auch dunkler gefärbt. Die Oxydation ist enzymatischer Natur, denn gekochte Auszüge oxydieren sich viel langsamer.

Untergärige Bierhefe ließ man 24 Stunden in Bierwürze gären, um kräftige, gut entwickelte Zellen zu bekommen, dann wurde sie gewaschen, auf einer starken Presse abgepreßt und mit Glycerin 20 Stunden extrahiert.

50 ccm des klaren Filtrats wurden im oben erwähnten Glockenkaliapparat mit durchgesaugter Luft 24 Stunden behandelt; zum Kontrollversuch dienten 50 ccm desselben, vorher 10 Minuten aufgekochten Filtrats. Es entwickelten sich im ersten Falle 193 mg CO_2 , der gekochte Auszug gab 112 mg CO_2 . Die Indophenolreaktion zeigte eine Reduktion der an der Luft

vorher gefärbten Flüssigkeit: Methylenblaulösung¹⁾ wurde reduziert. Den nicht gekochten Auszug hat man weiter mit Luft behandelt; während weiterer 24 Stunden entwickelten sich 53 mg CO₂. Dann oxydierte man 40 ccm dieses Auszuges weitere 10 Stunden mit Sauerstoff, es entwickelten sich noch 16 mg CO₂. Jetzt konnte man eine schöne Indophenolreaktion beobachten und sogar eine schwache Guajacbläuung: Wurstersche Reaktion war sehr stark.

Wir ersehen daraus, daß die Hefe leicht oxydable Substanzen enthält, welche schon mit Luft oxydiert werden können, dabei wirkt wahrscheinlich eine Oxydase mit, denn die nicht aufgekochten Auszüge oxydieren sich schneller; diese Substanzen können bei genügend langer Lüftung fast vollständig wegoxydiert werden. Dies wird noch durch den folgenden Versuch unterstützt.

Die Preßhefe (keine Stärke enthaltend), mit Glycerin behandelt, dann abfiltriert, mit Wasser gewaschen und an der Luft vorgetrocknet, wurde schließlich im Sauerstoffstrom bei 30° getrocknet. 50 g davon, mit Quarzsand zerrieben, wurden 48 Stunden mit 200 ccm 1%iger NaF-Lösung extrahiert.

50 ccm Auszug entwickelten während 7½ Stunden 11 mg CO₂, während weiterer 16 Stunden 1 mg CO₂.

Kontrollversuch (aufgekocht) ergab 3 mg, bzw. 1,8 mg CO₂.

Man sieht, daß es, obgleich nicht ohne Schwierigkeit, möglich ist, den Reduktionskörper wegzuoxydieren.

Es zeigte sich nun weiterhin, daß alkalische Reaktion des Mediums die Autoxydation der Auszüge begünstigt: dies läßt sich aus folgendem Versuche folgern:

50 ccm des Glycerinauszuges wurden mit Na₂CO₃ schwach alkalisch gemacht und 10 Stunden mit Luft behandelt: als Kontrollversuch dienten 50 ccm des ursprünglichen Auszuges von schwach saurer Reaktion. Im ersten Kaliapparat fand man 126 mg CO₂, im zweiten nur 16 mg; dabei färbte sich der Inhalt des ersten Absorptionsgefäßes bräunlich. Die späteren Versuche führten wir deshalb gewöhnlich in Lösungen mit sehr schwach alkalischer Reaktion aus.

¹⁾ Reaktion von Hahn. S. Zymasegärung.

Eine weitere Versuchsreihe zeigte uns, daß auch die fremden zugesetzten Stoffe von den Hefeauszügen oxydiert werden und daß diese Oxydation enzymatischer Natur ist.

180 g Preßhefe wurden 48 Stunden mit Glyzerin extrahiert, dann abgesaugt, mit Wasser gewaschen, an der Luft getrocknet, mit Quarzsand zerrieben und mit Chloroformwasser 48 Stunden bei 25° extrahiert.

25 ccm Filtrat entwickelten mit 25 ccm 8%iger Pyrogalllösung während 14 Stunden 240 mg CO₂. Kontrollversuch — 25 ccm des aufgekochten Filtrats mit 25 ccm Pyrogalllösung — ergab nur 100 mg CO₂.

Unterhefe wurde ebenso behandelt, um Reduktionskörper möglichst zu entfernen. 25 ccm des Auszuges und 25 ccm 4%iger Hydrochinonlösung füllte man in eine oben beschriebene Flasche und schüttelte sie im «beweglichen Thermostat» 12 Stunden bei 35°. Kontrollflasche enthielt 25 ccm des aufgekochten Auszuges und 25 ccm Hydrochinonlösung. Bei der Analyse des Gasinhaltes nach 12 Stunden erwies sich, daß 6,9 ccm Sauerstoff absorbiert und 1,1 ccm Kohlensäure entwickelt wurden. Kontrollversuch: 4,5 ccm, bezw. Spuren. Die Wurstersche Reaktion ergab Oxydation.

Derselbe Versuch wurde mit p-Amidophenol ausgeführt. Man fand, daß 66,8 ccm Sauerstoff absorbiert wurden, im Kontrollversuch 48,6 ccm, Kohlensäure in beiden Fällen nur Spuren.

Derselbe Versuch mit 2%igem Pyrogallol. 27,3 ccm Sauerstoff wurden verbraucht, 8 ccm Kohlensäure entwickelt. Kontrollversuch: 5,7 ccm Sauerstoff, 6,2 ccm Kohlensäure.

Es geht aus diesen und ähnlichen Versuchen zur Genüge hervor, daß in aufgekochten Auszügen die Oxydation der zugesetzten leicht oxydablen Substanzen viel schwächer vor sich geht; dieselben Resultate haben wir mit Glyzerinauszügen erhalten. Ich muß jedoch bemerken, daß es ziemlich schwer ist, den «Reduktionskörper» ganz zu entfernen: die von uns beobachteten Oxydationen rühren deshalb von zwei unabhängigen Vorgängen her: von der Autoxydation des reduzierenden Körpers der Auszüge und von der Oxydation des zugesetzten Phenols. Die Autoxydation des letzteren ist, wie folgender Versuch zeigt, meist sehr gering.

25 ccm Pyrogallollösung + 25 ccm des vorher mit Luft behandelten Glycerinauszuges absorbierten 6,2 ccm Sauerstoff und entwickelten 1,1 ccm Kohlensäure. Kontrollversuch: 25 ccm Pyrogallollösung + 25 ccm Wasser absorbierten 1,5 ccm Sauerstoff.

Wie alle enzymatischen Reaktionen, wird auch die Oxydasewirkung durch Zusatz fremder Stoffe beeinflusst. Hier sei nur ein Versuch mit Formaldehyd angeführt.

20 ccm des Auszuges aus vorher mit Glycerin extrahierter und dann getrockneter Hefe wurden mit 5 ccm Formaldehydlösung (2,5 ccm käufl. Formaldehyds in 100 ccm Wasser) und mit 25 ccm Pyrogallollösung versetzt: das Gemisch absorbierte 6,3 ccm Sauerstoff und entwickelte 1 ccm Kohlensäure: Kontrollversuch (ohne Formaldehyd): 18,2 ccm Sauerstoff und 1,5 ccm Kohlensäure.

Den Verlauf der Reaktion habe ich noch nicht näher studiert, ein Zusammenhang zwischen Sauerstoff- und Kohlensäuremengen existiert aber, wie es scheint, nicht; man müßte vor allem die Produkte der Oxydation charakterisieren, was nun wegen des stets anwesenden Reduktionskörpers nicht besonders leicht erscheint.

Schließlich haben wir einen Versuch gemacht, die Oxydase zu isolieren.

400 g Preßhefe, mit Quarzsand zerrieben, wurden mit 500 ccm Chloroformwasser extrahiert und das Filtrat (400 ccm) mit 1400 ccm 96%igen Alkohols gefällt. Einen Teil des Niederschlags hat man mit Wasser zerrieben.

1. 10 ccm der Emulsion vermischte man mit 25 ccm 2%iger Pyrogallollösung:

2. 10 ccm derselben Emulsion mit 25 ccm Wasser und

3. 25 ccm Pyrogallol mit 10 ccm Wasser dienten als Kontrollversuche.

Versuch 1: 28,9 ccm Sauerstoff absorbiert, 7,6 ccm Kohlensäure entwickelt.

Versuch 2: 1,5 ccm Sauerstoff absorbiert, Kohlensäurespuren.

Versuch 3: 14,7 ccm Sauerstoff absorbiert, 1,2 ccm

Kohlensäure entwickelt. Die Farbe der Lösung in 1 war viel dunkler als in 3.

Wir dürfen also wohl aus den oben angeführten Versuchen den Schluß ziehen, daß in der Hefe ein Oxydationsenzym vorkommt, welches aus derselben ausgezogen und gefällt werden kann. Dieses Enzym oxydiert die in der Hefe erhaltenen, leicht oxydierbaren Substanzen, sowie künstlich zugesetzte Stoffe, z. B. Polyphenole. Schließlich sei erwähnt, daß es nicht immer gelingt, starke Oxydationserscheinungen zu erhalten, da im allgemeinen der Oxydasegehalt der Hefe nicht besonders groß zu sein scheint, der Gehalt an dem Reduktionskörper hängt auch vom physiologischen Zustande der Hefe, ihrer Vorbehandlung etc. ab. Oberhefe scheint mehr Oxydase zu führen, als Unterhefe.

Die Untersuchung wird fortgesetzt.

Warschau, den 24. Mai 1904.

W. Issajew.