

Einfluß der Temperatur auf die Arbeit des proteolytischen Ferments und der Zymase in abgetöteten Hefezellen.

Von

Anna Petruschewsky.

Mit vier Kurvenzeichnungen im Text.

(Aus dem pflanzenphysiologischen Institut von Prof. W. Palladin in der St. Petersburger Universität.)

(Der Redaktion zugegangen am 17. November 1906.)

In der vorliegenden Arbeit wurde das Ziel verfolgt, zu untersuchen, in welchem Maße die Arbeit des proteolytischen Ferments in abgetöteten Hefen (Zymin), bei Abwesenheit von Nährmaterial, von der Temperatur abhängig ist, und bis zu einem gewissen Grade die Wechselbeziehungen zwischen dem proteolytischen Ferment (Endotryptase) und der Zymase aufzuklären.

Die Untersuchungen von Martin Hahn und Ludwig Geret¹⁾ zeigten, daß das proteolytische Ferment der Hefe bei der Selbstverdauung die Eiweißstoffe des Preßsaftes zerstört. Durch die Arbeit von Frl. T. Gromow²⁾ wurde ferner festgestellt, daß beim Zymin das gleiche der Fall ist; außerdem lassen ihre Untersuchungen und ebenso diejenigen von Richter-Rschewskaja³⁾ vermuten, daß das proteolytische Ferment nebenbei auch die schwächeren (weniger widerstandsfähigen) Fermente, unter diesen auch die Zymase, zerstört. Ist dieses nun der Fall, so muß unter den Bedingungen, wo das proteolytische Ferment energischer arbeitet, die Zerstörung der Zymase

¹⁾ E. Buchner, H. Buchner u. M. Hahn, Die Zymasegärung, 1903.

²⁾ Gromow u. Grigoriew, Diese Zeitschrift, Bd. XLII, 1904, S. 300.

³⁾ Richter-Rschewskaja, Arbeiten der St. Petersburger Naturforscher-Gesellschaft, Bd. XXXV, 1904.

eine vollkommeneren sein und infolge dessen die Menge der von dem Zymin ausgeschiedenen CO_2 vermindert werden.

Zur experimentellen Prüfung dieser Voraussetzungen wurden auf Veranlassung und unter der Leitung des Herrn Prof. Palladin folgende Versuche von mir ausgeführt. In der ersten Versuchreihe wurde der Einfluß der Temperatur auf die Arbeit der Endotryptase bestimmt. Zu diesem Zweck wurden Erlenmeyersche Kolben von 120 ccm Inhalt mit 30 ccm destillierten Wasser beschickt, hierauf wurden die Kolben mit einem Wattestopfen verschlossen und im Autoklaven sterilisiert. In jedem Kolben wurde eine genau gewogene Menge Zymin und 8 Tropfen Toluol hinzugefügt; die Wattestopfen wurden nun durch gewöhnliche, bei 105° sterilisierte Korkpfropfen ersetzt. Ein Teil der Kolben wurde in einen Eisschrank gebracht ($7-9^\circ \text{C.}$), der zweite Teil bei Zimmertemperatur ($15-16^\circ \text{C.}$) stehen gelassen und der dritte Teil in einen Thermostaten (32°C.) gestellt. Alle Kolben wurden von Zeit zu Zeit durchgeschüttelt. In gewissen Zwischenräumen wurde nun der Kolbeninhalt nach der Stutzerschen Methode auf Eiweißstickstoff untersucht.

Der Gesamtstickstoff des verwendeten Zymins war nach Kjeldahl bestimmt worden und betrug

$$\left. \begin{array}{l} 7,73\% \\ 7,75\% \\ 7,79\% \end{array} \right\} 7,76\% \text{ der Trockensubstanz.}$$

Der Eiweißstickstoff wurde nach Stutzer bestimmt; die Analysen ergaben

$$\left. \begin{array}{l} 5,96\% \\ 5,81\% \\ 5,71\% \\ 5,79\% \end{array} \right\} 5,82\% \text{ der Trockensubstanz.}$$

Folglich kommen 75% des Gesamtstickstoffes auf den Eiweißstickstoff.

Alle Portionen wurden vor der Analyse unter dem Mikroskop untersucht und erwiesen sich als bakterienfrei:

Die Resultate dieser Analysen sind auf Fig. 1 graphisch dargestellt.

Versuch 1.

Versuchsdauer	Temperatur	Zyminmenge	Eiweiß-N-Menge	In % der Trockensubstanz		In % der Eiweißstickstoffe
20 Stunden	32° C.	0,6413	0,011473	1,79	1,83	31,4
		0,5366	0,010579	1,97		
		0,9824	0,017135	1,74		
2 Tage	»	0,3489	0,004063	1,45	1,33	22,8
		0,4452	0,005215	1,17		
		0,4772	0,006556	1,37		
3 »	»	0,4273	0,00447	1,05	1,08	18,5
		0,3483	0,003874	1,11		
		0,6150	0,006705	1,09		
4 »	»	0,3500	0,003427	0,97	0,86	14,8
		0,6534	0,005364	0,82		
		0,7165	0,005811	0,81		
20 Stunden	15—16° C.	0,8403	0,043359	5,16	5,29	90,8
		0,2636	0,01475	5,59		
		1,1032	0,056471	5,11		
2 Tage	»	0,3106	0,013857	4,46	4,12	77,9
		0,6196	0,024883	4,01		
		0,4691	0,018327	3,9		
3 »	»	0,3901	0,014751	3,78	3,73	64,1
		0,6498	0,02384	3,69		
4 »	»	0,2245	0,007599	3,38	3,38	58,7
5 »	»	0,3200	0,01043	3,26	3,09	53,1
		0,5611	0,01639	2,92		
7 »	»	0,5931	0,01341	2,26	2,23	38,3
		0,6209	0,013708	2,21		
3 Tage	7—9° C.	0,5424	0,023244	4,28	4,42	75,9
		0,6956	0,032035	4,60		
		0,7205	0,031737	4,40		
6 »	»	0,5434	0,02086	3,84	3,80	65,3
		0,2654	0,009983	3,76		
14 »	»	0,5141	0,13559	2,64	2,96	50,8
		0,5756	0,17433	3,03		
		0,3225	0,01043	3,23		
45 »	»	0,4319	0,03024	0,70	0,69	11,8
		0,5301	0,3576	0,67		

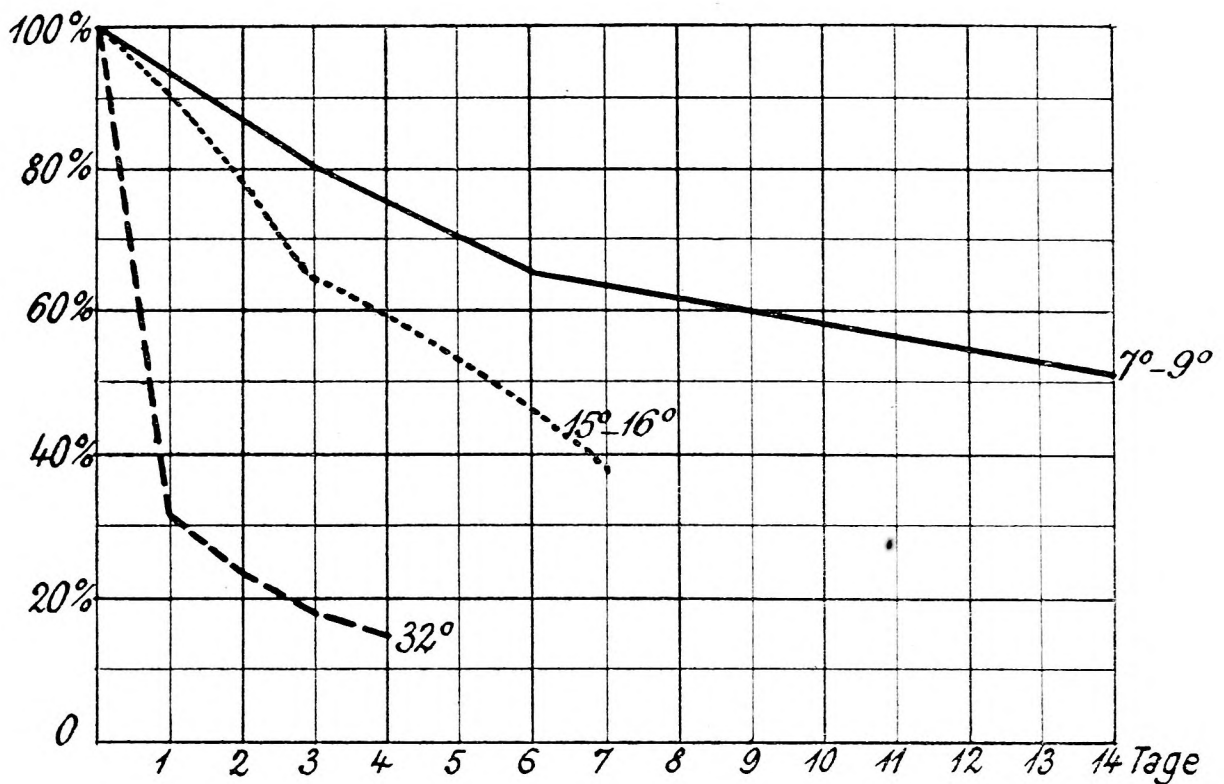


Fig. 1.

Verminderung der Menge des Eiweißstickstoffes während der Selbstverdauung des Zymins bei verschiedenen Temperaturen.

Die auf Grund obiger Analysenzahlen ausgeführten Kurven zeigen deutlich, daß die Temperaturerhöhung die Arbeit des proteolytischen Ferments beschleunigt; bei 32° wird der größte Teil des Eiweißes schon in den ersten 20 Stunden zerlegt, weiter geht die Arbeit langsamer. Bei Zimmertemperatur arbeitet das Ferment gleichmäßig und allmählich, bei 7—9° geht die Aufspaltung noch langsamer vor sich, so daß nach anderthalb Monaten noch 11,8% des Eiweißstickstoffes enthalten waren.

Versuchsdauer	32°	15—16°	7—9°
20 Stunden	68,6	9,2	—
2 Tage	77,2	22,1	—
3 »	81,5	35,9	24,1
4 »	85,2	41,3	—
5 »	—	46,9	—
6 »	—	—	—
7 »	—	61,7	—
14 »	—	—	49,2
45 »	—	—	88,2

Obenstehende Tabelle zeigt die allmähliche Anhäufung des Stickstoffes der Nichteiweißverbindungen in Prozent des Eiweißstickstoffes (100) der Kontrollportion während der Selbstverdauung des Zymins bei verschiedenen Temperaturen.

Diese Resultate sind in Fig. 2 dargestellt.

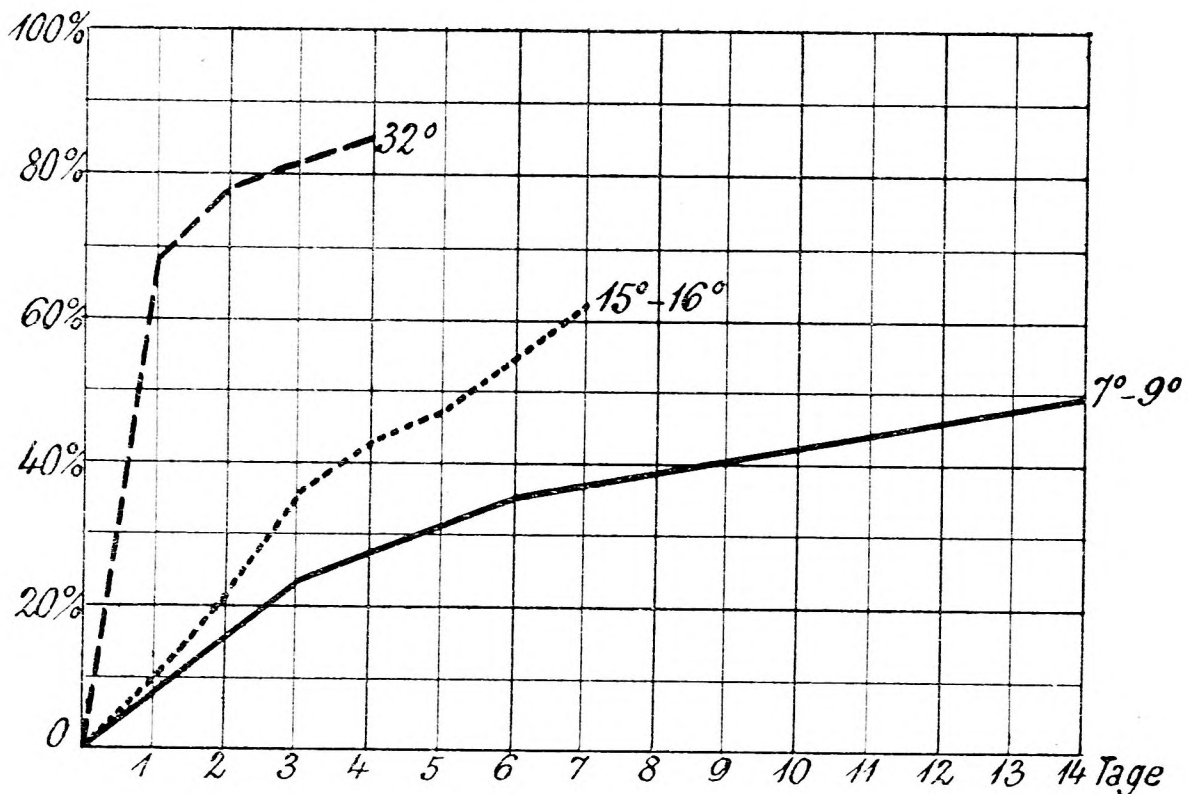


Fig. 2.

Anhäufung des Nichteiweißstickstoffes während der Selbstverdauung des Zymins bei verschiedenen Temperaturen.

Es bilden sich folglich bei der Selbstverdauung des Zymins bei verschiedenen Temperaturen folgende Mengen Nichteiweißstickstoff.

	32°	15—16°
In den ersten 20 Stunden	68,6	9,2
Am 2. Tage	8,6	12,9
» 3. »	4,3	13,8
» 4. »	3,7	5,4
» 5. »	—	5,6
Am 6. und 7. Tage	—	14,8

Gestützt auf die Untersuchungen von Martin Hahn und Ludwig Geret zeigt vorliegende Arbeit, daß mit der Tem-

peraturerhöhung die Energie des proteolytischen Ferments zunimmt.

Zugleich bemerken wir, daß mit der Anhäufung von Spaltungsprodukten die Schnelligkeit der Reaktion abgeschwächt wird. Dieser Umstand läßt die Vermutung aufkommen, daß der Zerfall der Eiweißkörper eine reversibele Reaktion ist. Man kann beobachten, daß bei mittleren Temperaturen die Schnellig-

keit der Reaktion zuerst zunimmt und dann erst zu sinken beginnt, wie dieses aus Fig. 3 ersichtlich ist.

Gleichzeitig wurden Versuche zur Bestimmung der von dem Zymen bei verschiedenen Temperaturen ausgeschiedenen Kohlensäuremenge unternommen. Da die Ausführung dieser Versuche bei niederen Temperaturen unzuweckmäßig war, wurden solche Versuche nur bei 20—22° und bei 30—34° angestellt. Gewöhnliche Kolben von 200 ccm Inhalt, mit Gummipropfen und 2 gebogenen Glasröhren zur Durchleitung von Luft, wurden mit 50 ccm destilliertem Wasser beschickt und im Autoklaven sterilisiert. Da-

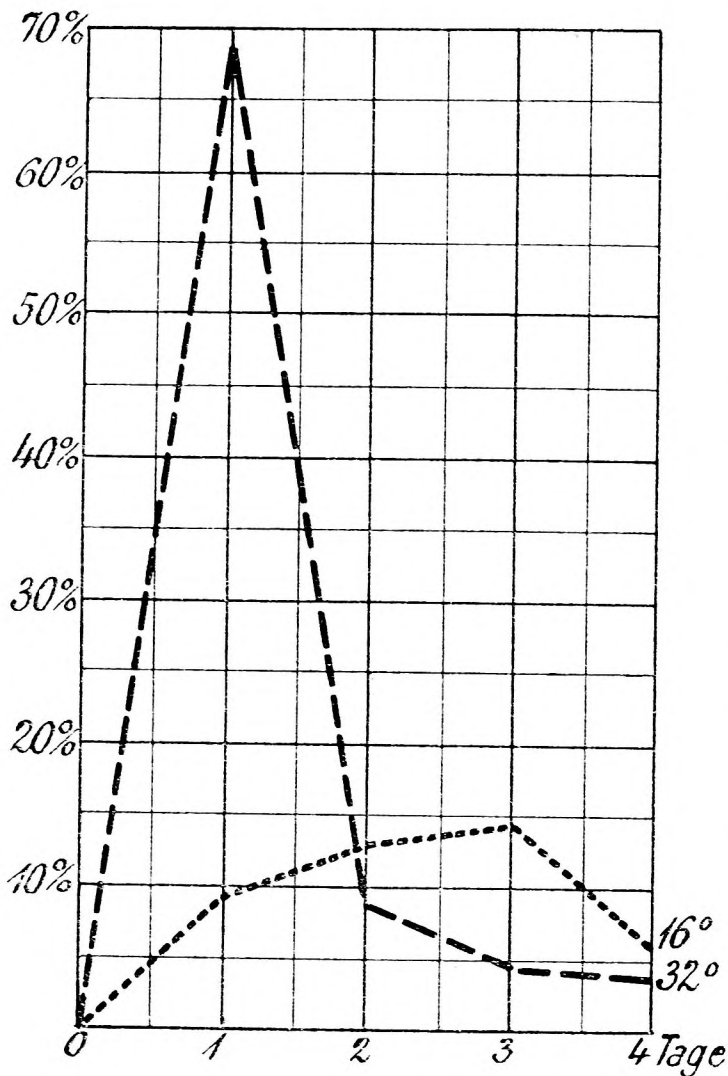


Fig. 3.

Bildung von Nichteiweißstickstoff an den verschiedenen Tagen der Versuchsdauer bei Selbstverdauung des Zymens bei verschiedenen Temperaturen.

rauf wurden unter Anwendung aller Vorsichtsmaßregeln möglichst gleiche Quantitäten Zymen (von 3—5 g) und ca. 20 Tropfen Toluol zu dem Kolbeninhalt hinzugefügt. Ein Teil der Kolben wurde in den Thermostaten, der andere Teil in ein Gefäß mit Wasser bei Zimmertemperatur gestellt. Der Luftstrom wurde mit Hilfe einer Wasserpumpe durch den Apparat gezogen. Die Luft passierte zunächst ein Gefäß mit Natronkalk, darauf ein U-Rohr mit Glasperlen, die mit Toluol befeuchtet

waren und dann im Zinkschlangenrohr, in dem sie die Temperatur, bei welcher der Versuch ausgeführt werden sollte, annahm. Aus dem Kolben mit Zymin gelangte die Luft in ein Gefäß mit Barytlösung und von dort in den Pettenkoferschen Apparat zur Absorption der Reste von Kohlensäure. In den Versuchen, bei denen es wünschenswert war, die Schwankungen der CO_2 -Ausscheidung zu verfolgen, wurde die Luft aus dem Gefäß mit dem Zymin direkt in die Pettenkoferschen Röhren geleitet, die dann in gewissen Zwischenräumen gewechselt wurden.

Diese Versuche ergaben folgende Resultate:

Versuch 2.

1. 5,3271 g Zymin, Temperatur 33—34° C.

Versuchsdauer	CO_2 -Menge	Im Mittel für 1 Stunde
7 Stunden	85,5 mg	12,21 mg CO_2
16 »	56,75 »	3,6 » »
23 »	6,75 »	0,3 » »
25 »	3,0 »	0,1 » »
In 71 Stunden	152,0 mg CO_2	

Folglich schieden 10 g Zymin 285,3 mg CO_2 aus.

2. 5,2754 g Zymin; Temperatur 22—23° C.

Versuchsdauer	CO_2 -Menge	Im Mittel für 1 Stunde
8 Stunden	100 mg	12,5 mg CO_2
15 »	136,5 »	9,1 » »
8 »	65,5 »	8,2 » »
15 »	55,0 »	3,7 » »
26 »	34,5 »	1,3 » »
20 »	5,0 »	0,25 » »
In 92 Stunden	396,5 mg CO_2	

Folglich schieden 10 g Zymin 751,6 mg CO_2 aus.

3. 5,5986 g Zymin; Temperatur 22—23° C.

Versuchsdauer	CO ₂ -Menge	Im Mittel für 1 Stunde	Im Mittel aus 2 Versuchen
In 8 Stunden	69,0 mg	8,6 mg CO ₂	10,5 mg CO ₂
» 15 »	124,0 »	8,2 » »	8,7 » »
» 8 »	64,0 »	8,0 » »	8,1 » »
» 15 »	86,0 »	5,7 » »	4,7 » »
» 26 «	22,0 »	0,8 » »	1,0 » »
» 20 »	5,25 »	0,26 » »	0,25 » »
In 92 Stunden	370,25 mg CO ₂		

10 g Zymin schieden also 661,4 mg CO₂ aus.

Das Mittel für 2 Versuche beträgt somit 706,5 mg CO₂ auf 10 g Zymin.

Die Resultate dieser Versuche sind auf Fig. 4 wieder-
gegeben.

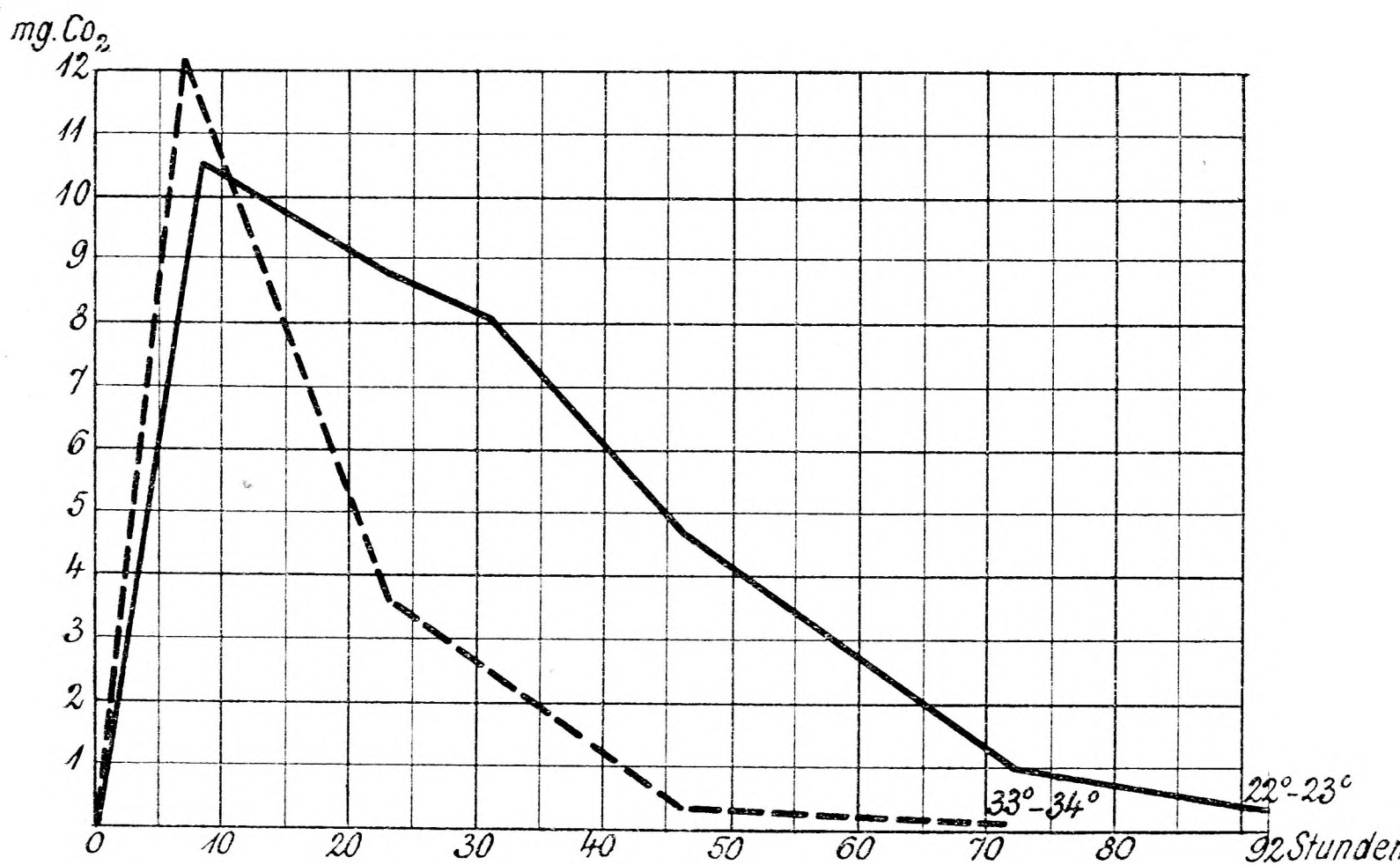


Fig. 4

Die CO₂-Menge, die bei Selbstgärung des Zymins bei verschiedenen Temperaturen
ausgeschieden wurde.

Versuch 3.

1. 3,2707 g Zymin; Temperatur 31—32° C.

Versuchsdauer	CO ₂ -Menge	Im Mittel pro Stunde
4 Stunden	18,5 mg	4,6 mg CO ₂
5 »	15,0 »	3,0 » »
15 »	5,75 »	0,38 » »
23 »	3,75 »	0,2 » »
In 48 Stunden	43,0 mg CO ₂	

Auf 10 g Zymin also 131,5 mg CO₂

2. 2,9934 g Zymin; Temperatur 20—21° C.

Versuchsdauer	CO ₂ -Menge	Im Mittel pro Stunde
4 Stunden	15,0 mg	3,75 mg CO ₂
5 »	17,0 »	3,40 » »
15 »	36,0 »	2,40 » »
23 »	35,25 »	1,5 » »
In 48 Stunden	103,25 mg CO ₂	

Auf 10 g Zymin 345,1 mg CO₂

In der folgenden Tabelle sind die Gesamtmengen CO₂, die bei der Selbstgärung von 10 g Zymin bei verschiedenen Temperaturen ausgeschieden wurden, nebeneinandergestellt.

Nr. des Versuches	Versuchsdauer	31—34°	20—23°
2	71 Stunden	285,3 mg	—
2	92 »	—	706,5 mg
3	48 »	131,5 mg	345,1 »

Wir sehen, daß bei der Berechnung auf 10 g bedeutende Schwankungen für eine und dieselbe Temperatur erhalten werden. Dieses erklärt sich dadurch, daß in der zweiten Versuchsreihe

je ca. 5 g Zymin, in der dritten Versuchsreihe hingegen je ca. 3 g verwendet worden waren. Durch die Untersuchungen von Frl. O. Grigoriew¹⁾ wurde aber nachgewiesen, daß die Kohlensäureausscheidung der verwendeten Zyminmenge nicht proportional ist.

Aus den Versuchen über die Selbstgärung des Zymins wird es ersichtlich, daß bei höheren Temperaturen während der ersten Stunden eine größere CO₂-Menge ausgeschieden wird, als bei Zimmertemperatur; darauf beginnt (bei 31—34°) die CO₂-Ausscheidung rasch zu sinken, so daß die Gesamtmenge der bei höheren Temperaturen gebildeten CO₂ um 2^{1/2} mal geringer ist als bei Zimmerwärme. Diese Versuche bestätigen somit die Voraussetzung, daß das proteolytische Ferment die Zymase zerstört und daß die Zerstörung um so vollständiger ist, je energischer das Ferment arbeitet.

Auch A. Bach²⁾ fand, daß die Peroxydase bei höheren Temperaturen schwächer arbeitet.

Um die schädliche Wirkung des proteolytischen Ferments auszuschließen, wurden noch einige Versuche unternommen, bei denen das Zymin nicht in destilliertes Wasser, sondern in 20%iger Rohrzuckerlösung gebracht wurde. Die Versuchsanordnung blieb dieselbe. Es ergaben sich hierbei folgende Resultate.

Versuch 4.

1. 3,0901 g Zymin; Temperatur 31—32°.

Versuchsdauer	Gesamt-CO ₂ -Menge	Mittel pro Stunde
18 Stunden	88,0 mg	4,9 mg CO ₂
6 »	2,0 »	0,33 » »
15 ^{1/2} »	1,0 »	—
In 39 ^{1/2} Stunden	91,0 mg CO ₂	

¹⁾ Gromow und Grigoriew, Diese Zeitschrift, Bd. XLII, 1904, S. 316.

²⁾ A. Bach, Berichte der Deutsch. chem. Ges., 1904, Bd. XXXVII, S. 3798.

2. 3,1322 g Zymin; Temperatur 20—21°.

Versuchsdauer	Gesamt-CO ₂ -Menge	Mittel pro Stunde
18 Stunden	82,5 mg	4,6 mg CO ₂
6 »	30,0 »	5,0 » »
15 ¹ / ₂ »	27,5 »	1,77 » »
24 »	12,0 »	0,5 » »
10 »	3,0 »	0,3 » »
In 73 ¹ / ₂ Stunden	155,5 mg CO ₂	

Versuch 5.

Zyminmenge	Versuchsdauer	Temperatur	Gesamtmenge CO ₂
2,8988	39 ¹ / ₂ Stunden	31—32°	76,5 mg
3,0730	73 ¹ / ₂ »	20—21°	154,5 »

Versuch 6.

1. 3,0766 g Zymin; Temperatur 31—32°.

Versuchsdauer	Gesamtmenge CO ₂	Mittel pro Stunde
4 Stunden	43,0 mg	10,7 mg CO ₂
9 »	88,0 »	9,77 » »
21 »	53,0 »	2,5 » »
In 34 Stunden	184,0 mg CO ₂	

2. 3,1988 g Zymin; Temperatur 20—21°.

Versuchsdauer	Gesamtmenge CO ₂	Mittel pro Stunde
4 Stunden	15,5 mg	3,9 mg CO ₂
9 »	47,5 »	5,3 » »
21 »	61,5 »	2,9 » »
20 »	32,0 »	1,6 » »
48 »	79,0 »	1,6 » »
48 »	27,0 »	0,59 » »
In 150 Stunden	262,5 mg CO ₂	

Wird das Zymin in eine 20%ige Rohrzuckerlösung gebracht, so ist der Unterschied zwischen der bei höheren Wärmegraden und der bei Zimmertemperatur ausgeschiedenen CO_2 -Menge weniger scharf. Auch hierbei nimmt die Arbeit der Zymase rasch ab, was ohne Zweifel eine Folge der Zerstörung der Zymase durch das proteolytische Ferment ist.

Alle angeführten Versuche zeigen, daß es zur Aufstellung physikalisch-chemischer Gesetze der Arbeit der Zymase unumgänglich ist, dieses Ferment in reinem Zustande zu verwenden. Bei Benutzung des Zymins zu diesen Zwecken ist es jedoch notwendig, die schädliche Wirkung der Endotryptase durch niedrige Temperaturen, starke Zuckerlösungen oder irgend welche andere Mittel auszuschalten.
