

# Über die Darstellung des polypeptolytischen Ferments der Hefe.

Von

A. H. Koelker.

Mit einer Kurvenzeichnung im Text.

Aus dem physiologisch-chemischen Laboratorium der Johns Hopkins Universität.)

(Der Redaktion zugegangen am 31. Mai 1910.)

In einer früheren Mitteilung<sup>1)</sup> wurde hervorgehoben, daß das racemische Alanylglycin zum Studium des polypeptolytischen Ferments mit großer Genauigkeit verwendet werden kann. In derselben Mitteilung wurde festgestellt, daß man das polypeptidspaltende Ferment auch durch Autolyse der Hefe darstellen kann, aber daß die Wirksamkeit einer so dargestellten Enzymlösung sehr gering ist im Vergleich zu der Wirksamkeit des Hefepreßsafts. Da aber die Bereitung des letzteren sehr zeitraubend und mühevoll ist, so wurden Untersuchungen unternommen, das Enzym auf einem andern, leichteren Wege zu bereiten.

Es ist bekannt, daß die Hefe durch Chloroformieren in einigen Stunden zu einem Brei zerfließt und daß ein so dargestellter und filtrierter Saft eine sehr rasche Hydrolyse des Rohrzuckers verursacht.<sup>2)</sup> Nun wurde versucht, ob ein so dargestellter Saft der Bäckerhefe eine rasche Hydrolyse des Alanylglycins zustande bringen würde. Jedoch zeigt das Experiment, daß die Hydrolyse sehr langsam erfolgte. Die Reaktion des Saftes war deutlich sauer. In der Meinung, daß diese Acidität eventuell die Zerstörung des Ferments verursachte, wurde der Versuch wiederholt bei gleichzeitigem Zusatz von einem unlöslichen Carbonat (Calciumcarbonat) während des Chloroformierens. Es bildete sich eine reichliche Menge Kohlensäure,

<sup>1)</sup> A. H. Koelker, The Journal of Biological Chemistry, Bd. VIII, Nr. 1 (1910).

<sup>2)</sup> C. S. Hudson, The quantitative Determination of Cane-sugar by the use of Invertase. United States Depart. of Chemistry, Bureau of Chemistry, Circular Nr. 50.

welche das Schäumen des Breies verursachte. Dieser Saft zeigte eine außerordentlich hydrolytische Wirksamkeit, welche manchmal größer war als die eines frisch bereiteten Hefepreßsafts. Der Versuch wurde fünfmal wiederholt mit verschiedenen Proben Hefe aus derselben Fabrik<sup>1)</sup> mit dem gleichen Resultat. Für das Studium des polypeptidspaltenden Ferments und für seine Verwendung zur Identifikation der Abbauprodukte der Proteine ist dieses Material sehr geeignet, denn die Lösung ist nur wenig gefärbt und die Bildung eines Niederschlags beim Stehen und bei Zusätzen ist nur selten. Untersuchungen sind augenblicklich im Gange, näheres zu erfahren über die Rolle, welche das Calciumcarbonat ausübt in der Produktion dieses sehr aktiven Saftes.

**Bereitung des Saftes.** Aus den neueren Erfahrungen wird ein sehr aktiver Saft wie folgt dargestellt: 500 g beste Bäckerhefe werden mit 30 g gefällttem Calciumcarbonat innig geknetet und dann mit 30 ccm Chloroform übergossen. Binnen 1 bis 3 Stunden zerfließt die Hefe vollkommen. Man läßt noch 3 bis 4 Tage bei gewöhnlicher Temperatur stehen und filtriert auf der Nutsche. Dann wird die Flüssigkeit, nach Zusatz von Toluol, bei 38° der Selbstverdauung überlassen, bis die optische Drehung derselben konstant wird, welches 10—40 Stunden dauert. Die Lösung wird nun mit Infusorienerde filtriert und direkt verwendet. Sie ist vollkommen klar und etwas gelb gefärbt.

Zur Prüfung der hydrolytischen Wirksamkeit wurde racemisches Alanyl-glycin benutzt unter Anwendung der optischen Methode.<sup>2)</sup> Das Prinzip dieser Methode, sehr kurz angegeben, ist das folgende:  $\frac{1}{400}$ -Mol. dieses Dipeptides (365 mg) in einer halbnormalen Lösung wird der Wirkung des Enzyms ausgesetzt. Die Änderung in der Ablenkung der Ebene des polarisierten Lichtes ist ein Maß für die Menge des gespaltenen Dipeptides. Das racemische Dipeptid wird nach dem folgenden Schema gespalten:<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> Die Bäckerhefe wurde bezogen aus der Fabrik The Corby Co., Langdon, D. C.

<sup>2)</sup> Journal of Biological Chemistry, Bd. VIII, Nr. 1 (1910).

<sup>3)</sup> Die optischen Werte repräsentieren  $\frac{1}{100}$  des molekularen Drehungsvermögens, berechnet aus dem spezifischen Drehungsvermögen der 10% igen Lösungen.

$$\begin{array}{c}
 + 2,1^{\circ} \quad 0^{\circ} \\
 \underbrace{\hspace{1.5cm}} \\
 0^{\circ} \left( \begin{array}{l} \text{d-Alanyl-glycin} \\ \text{l-Alanyl-glycin} \end{array} \right) \\
 \underbrace{\hspace{1.5cm}} \\
 - 73,3^{\circ}
 \end{array}$$

Bei der Bildung des d-Alanins und des l-Alanyl-glycins ändert sich die optische Drehung der Flüssigkeit. Die Ablesungen werden unter genau denselben Bedingungen ausgeführt, nämlich im 1 dem-Rohr bei  $37^{\circ}$  mit weißem Licht. Die Drehung vor der Spaltung ist  $0^{\circ}$  und bei quantitativer Umsetzung  $-1,51^{\circ}$ .<sup>1)</sup> Also ist die Größe der optischen Drehung ein Maß für die Menge des gespaltenen Dipeptids. Da die Bereitungen der Säfte bei den ersten Versuchen etwas verschieden sind, so werden sie im einzelnen angegeben.

**A.** 150 g Bäckerhefe (Marke Corby) werden mit 10 g Calciumcarbonat innig geknetet und mit 10 ccm Chloroform 6 Stunden lang digestiert, filtriert und 14 Stunden lang bei  $38^{\circ}$  verdaut und wieder filtriert. Hefesaft I  $\text{CaCO}_3$ .

**B.** Genau ausgeführt wie unter A, aber ohne Calciumcarbonat. Hefesaft I.

Serie I.		
A.		B.
2,50 ccm norm. Lösung des Dipeptids,		2,50 ccm norm. Lösung,
1,50 » physiol. NaCl,		1,50 » physiol. NaCl,
1,00 » Hefesaft I, $\text{CaCO}_3$ .		1,00 » Hefesaft I.
Zeit	Korr. Winkel	Korr. Winkel
0 Minuten	$0,00^{\circ}$	$0,00^{\circ}$
10 »	$- 0,11^{\circ}$	—
27 »	$- 0,46^{\circ}$	—
42 »	$- 0,73^{\circ}$	$- 0,05^{\circ}$
60 »	$- 1,00^{\circ}$	—
73 »	$- 1,14^{\circ}$	—
86 »	$- 1,26^{\circ}$	$- 0,12^{\circ}$
120 »	$- 1,46^{\circ}$	—
465 »	—	$- 0,74^{\circ}$
10 Tage	$- 1,51^{\circ}$	$- 1,36^{\circ}$

Der Versuch zeigt deutlich, daß der Saft, welcher unter Zusatz von Calciumcarbonat dargestellt wurde, viel aktiver ist

<sup>1)</sup> loc. cit.



als derjenige ohne diesen Zusatz. Daß die Calciumsalze, welche dabei in Lösung gehen, nicht die Ursache dieser Aktivierung waren, zeigt der folgende Versuch: 20 ccm desselben Saftes, welcher in B, Serie I untersucht wurde, wurde mit 2,0 g Calciumcarbonat 16 Stunden lang stehen gelassen und filtriert. Serie II gibt an die hydrolytische Wirksamkeit dieses Safts unter B im Vergleich zur ursprünglichen Enzymlösung unter A.

## Serie II.

A.		B.	
2,50 ccm der norm. Lösung,		2,50 ccm der norm. Lösung,	
1,50 > physiol. NaCl,		1,50 > physiol. NaCl,	
1,00 > Hefesaft I.		1,00 > Hefesaft I,	
		welcher mit $\text{CaCO}_3$ stehen blieb.	
Zeit	Korr. Winkel		Korr. Winkel
0 Minuten	0,00°		0,00°
105 >	— 0,09°		— 0,18°
220 >	— 0,22°		— 0,37°
375 >	— 0,32°		— 0,51°
22 Stunden	— 0,86°		— 1,40°

Der Versuch zeigt, daß die Aktivität des auf diese Weise neutralisierten Saftes etwas größer ist als die des ursprünglichen Safts. Aber der Unterschied ist so gering, daß er kaum auf eine spezifische Wirkung des Calciums zurückzuführen ist, sondern eher auf die Abstumpfung der Säure, welche zugegen war. In einer früheren Mitteilung<sup>1)</sup> wurde gezeigt, daß der Hefepreßsaft eine raschere Hydrolyse verursachte, wenn man ihn vorher neutralisierte.

Nun wurde dieser Versuch mit einer anderen Portion Hefe wiederholt. Die Darstellung der Säfte war dieselbe wie auf Seite 299, nur war die Digestion mit Chloroform  $5\frac{1}{2}$  Stunden und die Selbstverdauung 18 Stunden bei 38°. Die beiden Säfte werden bezeichnet als Hefepreßsaft II,  $\text{CaCO}_3$  und Hefesaft II. Hier wurde aber ein Teil des Hefesafts II, bevor er der Selbstverdauung bei 38° überlassen wurde, mit einer reichlichen Menge  $\text{CaCO}_3$  versetzt und dann 18 Stunden lang bei 38° verdaut. Bezeichnung «Hefesaft II,  $\text{CaCO}_3$  nachher». Die folgende Serie III gibt die hydrolytische Wirksamkeit der drei Säfte an.

<sup>1)</sup> loc. cit.

Serie III.

Hefesaft II CaCO <sub>3</sub> .		Hefesaft II.		Hefesaft II, CaCO <sub>3</sub> nachher.	
2,50 ccm norm. Lösung,		2,50 ccm norm. Lösung,		2,50 ccm norm. Lösung,	
1,50 » physiol. NaCl,		1,50 » physiol. NaCl,		1,50 » physiol. NaCl,	
1,00 » Saft.		1,00 » Saft.		1,00 » Saft.	
Zeit	Korr. Winkel	Korr. Winkel		Korr. Winkel	
0 Minuten	0,00°	0,00°		0,00°	
16 »	- 0,18°	—		—	
51 »	- 0,64°	—		—	
65 »	- 0,81°	—		—	
84 »	- 0,98°	—		—	
115 »	- 1,24°	—		—	
152 »	- 1,41°	—		—	
8 Stunden	- 1,50°	- 0,01°		- 0,04°	
24 »	—	- 0,10°		- 0,14°	
50 »	—	- 0,18°		- 0,22°	
96 »	—	- 0,37°		- 0,43°	
10 Tage	—	- 0,77°		- 0,97°	

Der Versuch stimmt vollkommen mit dem vorigen überein. Hier ist der Einfluß des nachträglichen Zusatzes von CaCO<sub>3</sub> noch geringer.

Nun wurde versucht, ob der Zusatz eines löslichen Calciumsalzes zum Hefesaft II eine Aktivierung desselben zustande bringen würde. 1 ccm Hefesaft II wurde mit 0,84 ccm einer 6%igen Calciumchloridlösung versetzt und 3 Tage bei 15° stehen gelassen, dann unter B die hydrolytische Wirksamkeit geprüft.

Serie IV.

A.		B.	
2,50 ccm norm. Lösung,		2,50 ccm norm. Lösung,	
1,50 » Wasser,		0,66 » Wasser,	
1,00 » Hefesaft II.		1,00 » Hefesaft II.	
		welcher mit 0,84 ccm einer 6%igen CaCl <sub>2</sub> -Lösung stehen blieb.	
Zeit	Korr. Winkel	Korr. Winkel	
0 Stunden	0,00°	0,00°	
23 »	- 0,03°	- 0,04°	
46 »	- 0,08°	- 0,09°	
10 Tage	- 0,40°	- 0,39°	

Hier ist überhaupt kein Einfluß des Calciumchlorids zu bemerken. Calciumsalze üben also keine Aktivierung des bereitlebenden Saftes aus.

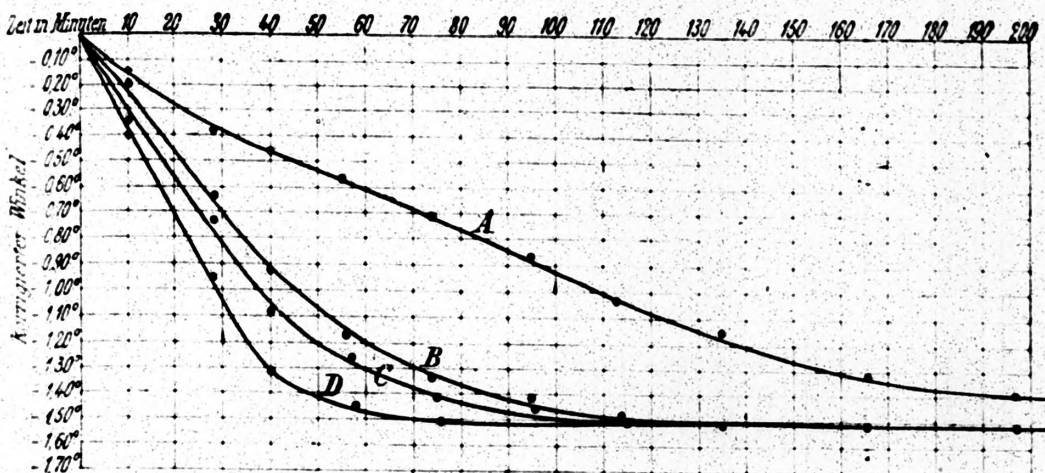
Nun wurde versucht, ob die Zeit der Digestion der Hefe mit Calciumcarbonat und Chloroform einen Einfluß auf die Aktivität des Saftes ausüben könnte. 150 g Hefe (Marke Corby) wurden mit 10 g Calciumcarbonat innig geknetet und in 4 gleiche Portionen geteilt. Die erste Portion wurde nur 4 Stunden mit der gewöhnlichen Menge Chloroform digeriert, die zweite 24 Stunden, die dritte 48 Stunden und die vierte 72 Stunden. Nach den angegebenen Zeiten wurden die Lösungen filtriert und 40 Stunden lang bei 38° der Selbstverdauung überlassen. Die 4 Säfte werden entsprechend bezeichnet als Hefesaft IIIa, IIIb, IIIc und IIId. Ihre hydrolytische Wirksamkeit wird durch die folgende Serie V ausgedrückt.

## Serie V.

A.		B.		C.		D.	
Hefesaft IIIa.		Hefesaft IIIb.		Hefesaft IIIc.		Hefesaft IIId.	
2,50 ccm norm.		2,50 ccm norm.		2,50 ccm norm.		2,50 ccm norm.	
Lösung,		Lösung,		Lösung,		Lösung,	
1,50 » physiol.		1,50 » physiol.		1,50 » physiol.		1,50 » physiol.	
NaCl,		NaCl,		NaCl,		NaCl,	
1,00 » Hefe-		1,00 » Hefe-		1,00 » Hefe-		1,00 » Hefe-	
saft IIIa.		saft IIIb.		saft IIIc.		saft IIId.	
Korr.		Korr.		Korr.		Korr.	
Zeit	Winkel	Zeit	Winkel	Zeit	Winkel	Zeit	Winkel
0 Min.	0,00°	0 Min.	0,00°	0 Min.	0,00°	0 Min.	0,00°
10 »	-0,15°	10 »	-0,19°	10 »	-0,34°	10 »	-0,40°
28 »	-0,28°	28 »	-0,63°	28 »	-0,73°	28 »	-0,95°
40 »	-0,46°	40 »	-0,92°	40 »	-1,08°	40 »	-1,31°
55 »	-0,57°	56 »	-1,17°	57 »	-1,26°	58 »	-1,45°
74 »	-0,71°	74 »	-1,33°	75 »	-1,41°	76 »	-1,51°
95 »	-0,86°	95 »	-1,41°	96 »	-1,46°	270 »	-1,50°
113 »	-1,03°	114 »	-1,49°	115 »	-1,51°		
135 »	-1,15°	135 »	-1,51°	197 »	-1,52°		
166 »	-1,32°	166 »	-1,51°				
197 »	-1,39°						
270 »	-1,52°						

Die graphische Darstellung der Wirksamkeit dieser 4 Säfte gibt eine leichtere Übersicht.





Der Versuch zeigt, daß eine längere Digestion der Hefe mit Calciumcarbonat und Chloroform einen sehr aktiven Saft liefert. Die Aktivität nach 72 stündiger Digestion ist sehr stark, sogar stärker als die Aktivität des Hefepreßsafts. Eine 3- bis 4 tägige Digestion wäre also für die Bereitung zu empfehlen. Es ist möglich, daß der Zusatz von Chloroform die Zellwand der Hefe so verändert, daß sie die Diffusion des Enzyms gestattet. Es ist vor kurzem gezeigt worden, daß dieses Enzym durch Pergamentpapier dialysiert.<sup>1)</sup> Es ist wahrscheinlich, daß man auf diese Weise eine Trennung dieses Enzyms von den verschiedenen Fermenten, welche in der Hefe enthalten sind, ermöglichen kann. Der folgende Versuch zeigt, daß die Lösung keine Zymase enthielt. 150 g Hefe (Corbys) wurden mit 10 g Calciumcarbonat innig geknetet und mit 10 ccm Chloroform übergossen. Nach sechsständigem Stehen wurde filtriert und 2,0 ccm dieses Safts sofort mit 25 ccm einer 10%igen Rohrzuckerlösung versetzt. Nach 14 Stunden Stehen bei 38° war keine Bildung von CO<sub>2</sub> zu bemerken, während ein Hefepreßsaft aus derselben Hefe unter den gleichen Bedingungen 6,0 ccm CO<sub>2</sub> lieferte. Die polypeptolytische Wirksamkeit wurde unter Serie I, A, Seite 299 angegeben.

Über die Rolle, welche das Calciumcarbonat bei der Bereitung spielt, hoffe ich, in kurzer Zeit berichten zu können.

<sup>1)</sup> A. H. Koelker, The Study of Enzymes by means of the Polypeptids. The Journal of Biological Chemistry, Bd. VIII, Nr. 1 (1910).