

Zur Kenntnis der Invertase.

Vorläufige Mitteilung.

Von

H. Euler, E. Lindberg und K. Melander.

(Aus dem bio-chemischen Laboratorium der Hochschule Stockholm.)

(Der Redaktion zugegangen am 18. September 1910.)

Invertase aus Hefe kann man nach zwei wesentlich verschiedenen Methoden darstellen. Nach der einen zerstört man die Zellwände der Hefe durch Autolyse und fällt den dabei erhaltenen Saft fraktioniert mit Alkohol. Nach der anderen werden die Hefezellen durch Trocknen bei höheren Temperaturen oder durch Behandlung mit Alkohol oder Aceton entwässert und dann mit Wasser extrahiert. Auch ohne vorhergehende Entwässerung der Hefezellen gelingt eine teilweise Extraktion der Invertase, wie E. Salkowski¹⁾ gezeigt hat.

Das Extraktionsverfahren mit der bei 105^o getrockneten Hefe ist 1877 von Salkowski und kurz darauf von seinem Schüler Barth²⁾ beschrieben und seitdem häufig angewandt worden. Zur Abtötung der Hefe mit Alkohol behandelt Osborne³⁾ Hefe mit der gleichen Gewichtsmenge Alkohol, läßt einen Tag stehen und filtriert die Hefe ab. Wroblewski⁴⁾

¹⁾ Es bleibt zu untersuchen, ob bei der Extraktion von frischer Hefe mit Chloroformwasser wirklich die lebenden Hefezellen Invertase abgeben, oder ob es nicht die bei der Digestion mit Wasser abgestorbenen Zellen sind, welche das Enzym liefern.

²⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XI, S. 474, 1878; vgl. hierzu auch Salkowski, Diese Zeitschrift, Bd. XXXI, S. 307, 1900.

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXVIII, S. 408, 1899.

⁴⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXI, S. 1135, 1898.

hatte ein Jahr früher Preßhefe mit einer kleinen Menge von 20%igem Alkohol und der doppelten Menge Seesand zerrieben; nach 24 Stunden wurde das Filtrat mit Alkohol und Äther versetzt, wobei ein stark wirksames Invertasepräparat ausfiel.

Daß sich sehr kräftige Invertasepräparate aus dem durch Autolyse der Hefe sich bildenden Saft gewinnen lassen, haben besonders O'Sullivan und Tompson¹⁾ gezeigt, kurz vorher hatte Salkowski²⁾ die Autodigestion der Hefe eingehend studiert.

Seit dieser Zeit sind die drei angegebenen Methoden zur Gewinnung der Invertase vielfach angewandt worden, ohne daß Angaben gesucht oder gefunden worden wären, nach welchen die relative Brauchbarkeit dieser Methoden beurteilt werden könnte. Da die Frage, wie die größten Ausbeuten an Invertase und die reinsten Präparate zu erhalten sind, gelöst werden muß, bevor eine rationelle Darstellung dieses Enzyms unternommen werden kann, so hat der eine von uns (Lindberg) diesbezügliche Versuche ausgeführt.

Zur Anwendung gelangte stets dieselbe Hefe, nämlich Unterhefe aus der hiesigen Hamburger Brauerei. Dieselbe wurde gesiebt, gewaschen und abgepreßt, und dann entweder entwässert oder bis zum Eintritt der Autolyse sich selbst überlassen.

Extraktion getrockneter Hefe.

Bei der Trocknung kommt es darauf an, daß die Hefe, so lange sie in größerer Menge Wasser enthält, keinen höheren Temperaturen ausgesetzt wird, und daß sich die Entwässerung so schnell als möglich vollzieht. Am geeignetsten breitet man die Hefe in dünner Schicht über den heizbaren Platten eines Passburgschen Vakuumapparates aus, dessen Temperatur man anfangs auf etwa 40° hält und später bis 100° steigen läßt. Die Entwässerung dauert ungefähr eine halbe Stunde.

¹⁾ Journ. Chem. Society, Bd. LVII, S. 834, 1890.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XIII, S. 506, 1889.

Nach dieser Behandlung bildet die Hefe ein sehr hellbraunes Pulver, das nun im Mörser weiter zerrieben werden kann.

Diese Methode liefert, wie Euler und af Ugglas¹⁾ gefunden haben, ein Präparat von ungefähr gleicher Wirksamkeit wie die Behandlung abgepreßter Hefe mit Alkohol,²⁾ und da die Trockenmethode ein sparsameres Arbeiten gestattet, so haben wir sie zur Darstellung der Dauerpräparate benutzt.

Diese Dauerpräparate wurden mit der 10fachen Menge Wasser während 20 Stunden bei Zimmertemperatur digeriert, durch einige Tropfen Toluol wurde die Mischung steril gehalten. Der so gewonnene Extrakt enthält außer Invertase reichlich Eiweißstoffe, deren Entfernung nicht ohne erheblichen Verlust an Invertase zu bewirken war. Die Reinigung geschah durch Adsorptionsmittel, welche nach Behandlung mit Salzsäure und Wasser in feuchtem Zustande dem Extrakte zugesetzt wurden. Die Extrakte wurden mit dem Adsorptionsmittel etwa $\frac{1}{2}$ Stunde in Berührung gelassen, worauf letzteres abgesogen wurde. Der Gehalt der Extrakte an gesamter Trockensubstanz, ferner an Stickstoff und an Asche und der Einfluß der Kaolinbehandlung auf diese Konzentrationen geht aus der folgenden Tabelle hervor. Der Gehalt an Trockensubstanz wurde durch Eindunsten der Lösung und Trocknen bei 105° bestimmt; der Aschengehalt durch Glühen des so gewonnenen Rückstandes und der Stickstoff wurde nach der Methode von Kjeldahl ermittelt.

In folgender Tabelle fällt das konstante Verhältnis a b auf, welches zeigt, daß durch Behandlung des Saftes mit Kaolin das Verhältnis zwischen Gesamttrockensubstanz und N nicht geändert wird. Es scheint also, daß Kaolin gleichzeitig mit Eiweiß auch N-freie Bestandteile des Hefeextraktes adsorbiert. Daß eine solche Adsorption von Stoffen wie Pektinsäure usw. eintreten kann, ist früher gezeigt worden.¹⁾

¹⁾ Arkiv för kemi etc., Bd. III, Nr. 34, 1910.

²⁾ Sofern man überschüssigen absoluten Alkohol rasch einwirken läßt; sonst wird die Invertase erheblich beeinträchtigt.

Tabelle 1.

Behandlung des Saftes	5 ccm Saft enthält g Trocken- substanz a	5 ccm Saft enthält g N b	a, b	5 ccm Saft enthält g Asche
1. 115 g Hefe, getrocknet und hierauf mit Alkohol behandelt, werden mit 1150 ccm Wasser extrahiert. Filtrat.	0,1039	0,01345	7,73	0,0244
Nach Behandlung mit Kaolin . . .	0,1019	0,01131	9,01	0,0220
Obiger Saft wird im Vakuum von 635 ccm auf 110 ccm eingedunstet; hierauf mit 50 g Kaolin behandelt .	0,1562	0,01736	8,99	0,0311
Nach einer weiteren Kaolinbehandlung	0,1206	0,01519	7,94	0,0281
2. 70 g Hefe werden mit 600 ccm Wasser extrahiert und mit Kaolin behandelt	—	0,01617	—	—
Nach Eindunsten im Vakuum von 410 auf 80 ccm und Behandlung mit 10 g Kaolin	0,2640	0,03009	8,77	0,0463
Nach weiterer Behandlung mit Kaolin und 10 g Kohle	0,1297	0,01316	9,85	0,0275
3. 600 g Trockenhefe werden mit 6 l Wasser behandelt; 250 ccm dieses Extraktes wurden mit 300 g Kaolin behandelt	0,0905	0,009993	9,06	0,0161
Nach weiterer Behandlung mit 150 g Kohle	0,0172	0,004967	3,46	0,0052
4. 650 g Hefe werden mit 500 ccm Wasser verrieben. Der durch Autolyse gebildete Saft wird mit Kaolin behandelt	0,1203	0,01402	8,58	0,0179
Nach weiterer Kaolinbehandlung (150 g Kaolin)	0,0976	0,01316	7,42	0,0166
5. 2300 g Hefe werden ohne Wasserzusatz 10 Tage bei 25° C. stehen gelassen. Autolysesaft	1,1948	0,1352	8,84	0,1131
6. 1820 g Hefe werden 14 Tage bei 25° C. stehen gelassen. Autolysesaft . (Ausbeute 300 ccm Saft, enthaltend 5 g Rohinvertase).	1,3246	—	—	0,1574

Autolyse gepreßter Hefe.

Die zu obigen Versuchen angewandte Hefe wurde auch zu Autolyseversuchen benutzt. Sie wurde zu diesem Zweck

soweit abgepreßt, daß auf 4 Teile Wasser 1 Teil Hefe kam. Die Autolyse wurde anfangs bei Zimmertemperatur durchgeführt, später in einem Luftthermostaten bei etwa 25°. Die in Glaskolben befindliche Hefe war anfangs mit Thymol versetzt worden, später beschränkten wir uns auf Anwendung von Toluol, um nicht eventuelle Zersetzungs- oder Umwandlungsprodukte auftreten zu lassen.¹⁾

Da Versuche den durch Autolyse gebildeten Saft von den nicht gelösten und schleimigen Bestandteilen der Hefe durch Zentrifugieren zu trennen wenig Erfolg hatten, so wurde der Saft durch eine große Anzahl Faltenfilter direkt abfiltriert. Der so erhaltene klare, aber dunkle Saft wurde nun nach den Angaben von O'Sullivan und Tompson behandelt. Er wird zuerst unter lebhaftem Umrühren mit so viel Alkohol versetzt, daß die Lösung in bezug auf diesen 47%ig wurde. Hierbei fallen gleichzeitig mit der Invertase noch Eiweißstoffe. Nach Abdekantieren der alkoholischen Lösung wurde diese Fällung mit etwa 250—300 ccm destillierten Wassers digeriert. Hierbei geht die Invertase in Lösung, während ein Teil der Eiweißstoffe ungelöst bleibt. Setzt man nun so viel Alkohol zu, daß die Lösung daran 28%ig wird, so fallen Eiweißstoffe, während Invertase in Lösung bleibt. Man filtriert nach einiger Zeit von diesen ab und macht nun die Lösung durch weiteren Alkoholzusatz wieder 47%ig. Die nun erhaltene schleimige, grauweiße Fällung geht durch Verreiben mit absolutem Alkohol in Pulverform über. Das Pulver wird weiter mit absolutem Alkohol gewaschen, abgesaugt und im Vakuumexsikkator verwahrt. Bei gewöhnlicher Temperatur verlieren solche Präparate ihren Alkoholgehalt, welcher bis 20% betragen kann, nur sehr langsam, und müssen deswegen vor der Analyse im Trockenschrank von Alkohol befreit werden. Ihre Wirksamkeit wird dadurch nicht wesentlich vermindert.

Die Ausbeute an Rohinvertase beträgt etwa 5 g pro 2 kg abgepreßter Hefe. Die Wirksamkeit dieses Präparates wurde nach einer Methode bestimmt, welche von O'Sullivan und

¹⁾ Herzog, Diese Zeitschrift, Bd. XXXVII, S. 396, 1903.

Tompson angewandt wurde. Wir lösten nämlich 0,05 g Invertase in 5 ccm 0,0005 n-HCl oder in 0,5 n-NaH₂PO₄-Lösung und setzten unmittelbar darauf 20 ccm einer 20%igen Rohrzuckerlösung zu und beobachteten die Zeiten, welche verstrichen, bis die Drehung der Lösung den Wert 0° erreichte. Im allgemeinen zeigte sich die Wirksamkeit der verschiedenen Präparate auffallend konstant. Diese Konzentration der Salzsäure bzw. des Phosphats entsprach der optimalen Wirkung und erzeugte eine Konzentration der H-Ionen von etwa $5 \cdot 10^{-5}$, was mit dem von Sørensen¹⁾ erhaltenen Ergebnis in bester Übereinstimmung steht.

Versuchen wir nun einen Vergleich anzustellen zwischen der Wirksamkeit der einerseits durch Extraktion der Trockenhefe, andererseits durch Autolyse gewonnenen Säfte, so ergibt sich folgendes.

Autolyse. Aus 2 kg gepreßter Hefe = 0,4 kg getrockneter Hefe wurden 300 ccm Lösung bzw. Autolysesaft erhalten. 1 ccm von diesem Saft enthielt 0,264 g Substanz. Wurde diese Menge mit so viel Rohrzuckerlösung vermischt, daß die Rohrzuckerkonzentration 20% betrug, und wurde für die optimale H-Konzentration durch Zusatz einer geringen Menge HCl gesorgt, so betrug die Wirksamkeit, ausgedrückt durch die Inversionsgeschwindigkeit der Lösung, $k \cdot 10^4 = 89$.

Extraktion. Werden 2 kg Trockenhefe in 20 l Wasser digeriert, so enthalten 6,1 ccm des Extraktes 0,145 g Substanz. Wird diese Menge, wie oben, mit so viel Rohrzucker vermischt, daß die Mischung in bezug auf Rohrzucker 20%ig war, so wurde eine Inversionskonstante = 40 gefunden.

Die Berechnung dieser Resultate geht aus der folgenden Tabelle hervor.

Dieser Tabelle kann man das bemerkenswerte Resultat entnehmen, daß aus einer gewissen Menge Trockenhefe sehr genau die gleiche Menge wirksamer Invertase erhalten wird, sei es daß man die Hefe der Autolyse unterwirft, sei es daß sie direkt mit Wasser extrahiert wird. Da aber im ersten Falle die Gesamtmenge darstellbaren Enzyms in 300 ccm ent-

¹⁾ Biochem. Zeitschrift, Bd. XXI, S. 256, 1909.

halten ist, während bei der Extraktion 20 l erforderlich waren, so verdient erstere Methode zur Darstellung von Invertase den Vorzug.

Tabelle 2.

	An- gewandte Trocken- hefe kg	Er- haltener Saft in ccm	g Sub- stanz im gesamten Saft a	Wirksam- keits- konstante	Wirksam- keit von gesamter Substanz b	Gesamter Enzym- gehalt a · b
Autolyse	0.4	300	79,2	$89 \cdot 10^4$	$337 \cdot 10^4$	—
„	2.0	1500	396,0	$89 \cdot 10^4$	$337 \cdot 10^4$	$1335 \cdot 10^8$
Extraktion	2,0	20000	482,0	$40 \cdot 10^4$	$276 \cdot 10^4$	$1330 \cdot 10^8$

Tatsächlich wurde die Gesamtmenge Rohinvertase, welche von uns zur weiteren Verarbeitung benutzt wurde, auf letzterem Wege hergestellt.

Analyse der Rohinvertase.

Präparat a.

Die Ausbeuten der einzelnen Darstellungen wurden gemischt und verrieben und betragen zusammen ungefähr 25 g. Dieses Produkt wurde in bezug auf N und Asche untersucht. Die N-Bestimmung geschah nach Kjeldahl. Die Analyse ergab als Resultat 3,06% N und 8,04% Asche.¹⁾

N-Bestimmung:

1.0050 g Substanz enthielt 3,192% N
0,9912 „ „ „ 2,932% „

Mittel 3,06% N.

Aschebestimmung:

0,4999 g Substanz gaben 0,0392 g = 7,842% Asche
0,5012 „ „ „ 0,0413 „ = 8,241% „

Mittel 8,04% Asche.

Ähnlich wie Präparat a wurden die Präparate b und c dargestellt. Ihre Analyse gab in bezug auf Stickstoff und Asche folgende Werte.

¹⁾ Nach Hafner (Diese Zeitschrift, Bd. XLII, S. 19, 1904) besteht die Asche hauptsächlich aus Phosphorsäure und enthält daneben etwas Schwefelsäure, Magnesium und Kalium.

Präparat b.

0,2493 g Substanz enthielten 3,76% N
 0,1960 „ „ „ 5,10% Asche.
 Aktivität: $\pm 0^\circ = 27$ Min.

Präparat c.

0,3402 g Substanz enthielten 3,40% N
 0,4218 „ „ „ 7,25% Asche.
 Aktivität: $\pm 0^\circ = 25$ Min.

Untersuchung des gereinigten Materiales.

Präparat A.

20 g dieses Ausgangsmateriales wurden nun in 175 ccm destillierten Wassers gelöst und zunächst einmal mit 75 g Kaolin und sodann zweimal mit 50 g Kaolin behandelt. Nach der Filtrierung wurde die Invertase mit überschüssigem absolutem Alkohol gefällt. Das erhaltene Präparat A war nun vollständig farblos und wurde nun zunächst auf seine Wirksamkeit untersucht. Die Aktivität bzw. katalytische Wirksamkeit der Invertase wird am besten durch die Reaktionskonstante ausgedrückt, welche sich bei Anwendung einer bestimmten Konzentration des Enzyms und Rohrzuckers ergibt. Dies soll natürlich auch bei den definitiven Messungen geschehen. Vollkommen einwandfrei ist es auch, die Aktivität des Enzyms durch die Zeiten anzugeben, welche zum Umsatz von gewissen Bruchteilen des Substrates erforderlich sind, wie dies O'Sullivan und Tompson getan haben. Für jeden Grad Rechtsdrehung der ursprünglichen Zuckerlösung tritt bei 20° schließlich eine Linksdrehung von $0,32^\circ$ auf. Wird also während der ganzen Reaktion die Drehung $1 + 0,32^\circ$ durchlaufen, so ist, wenn die Drehung 0° beträgt, der umgesetzte Teil $1 : 1,32 = 0,7575$.

Man bestimmt also in dieser Weise die Zeit, welche zum Umsatz von nahezu $\frac{3}{4}$ der Reaktion erforderlich ist. Aus dieser Zeit ergibt sich die Reaktionskonstante nach der Gleichung

$$k = \frac{0,1206}{t}$$

Fehlerhaft ist hingegen, zur Vergleichung der Aktivität, wie es oft geschieht, die Drehungen anzugeben, welche nach

gleichen Zeiten erreicht werden, resp. die Zuckermengen, welche nach gleichen Zeitintervallen gebildet werden. Bekanntlich ist

$$t = \frac{1}{k} \ln \frac{a}{a-x};$$

also ist t nicht direkt proportional der umgesetzten Menge.

Wie O'Sullivan und Tompson haben wir die Wirksamkeit stets unter folgenden Bedingungen bestimmt:

0,05 g Invertase wurden in 5 ccm 0,5 n-NaH₂PO₄ gelöst und zu 20 ccm 20% iger Rohrzuckerlösung gegeben. Die Zeit, welche verging, bis (nach Aufhebung der Multirotation durch Soda) die Drehung 0° betrug, wird durch $\pm 0^\circ$ ausgedrückt.

Präparat A: $\pm 0^\circ = 23$ Min.

Optische Drehung. 0,5 g Substanz wurden in 10 ccm Wasser gelöst und bei Na-Licht im 50 mm-Rohr beobachtet. $\alpha = 2,01^\circ$. Hieraus berechnet sich $[\alpha]_D^{20} = 80^\circ$. Diese Zahl stellt natürlich nur einen annähernden Wert dar. Einerseits kann, wie unten gezeigt wird, das Präparat noch weiter gereinigt werden, anderseits ist keine Garantie dafür vorhanden, daß die gesamte Invertase sich in ihrem aktiven Zustande befand und die entsprechende Drehung besaß. Es ist nämlich nicht unwahrscheinlich, daß die Inaktivierung der Invertase von einer Drehungsänderung begleitet ist. Durch Zusatz von Alkali ging die oben angegebene Drehung allerdings nur wenig zurück.

Mit Molischs Reagens (α -Naphthol und konzentrierter Schwefelsäure) lieferten auch unsere besten Präparate deutliche Zuckerreaktion. Indessen enthielten diese Präparate keine Aldosen oder Ketosen. Als nämlich 0,5 g Invertasepräparat mit 1 g Phenylhydrazin gekocht wurde, konnte keine Andeutung von Osazonbildung erhalten werden.

Gummi, auf welchen wir in Rücksicht auf die Arbeiten von Salkowski¹⁾ unsere besondere Aufmerksamkeit lenkten, kann sich in unseren Präparaten nur in Spuren gefunden haben; jedenfalls konnte mit Fehlingscher Lösung nach Salkowskis Vorschrift keine Fällung erzeugt werden. Um so auffallender war, daß unsere besten Präparate trotzdem beim Kochen mit

¹⁾ l. c. und Diese Zeitschrift, Bd. LXI, S. 124. 1909.

Salzsäure Mannosehydrazon lieferten. Leider wurde infolge eines Versehens das Hydrazon nicht zur Wägung gebracht. Das Auftreten desselben wird sofort weiter quantitativ verfolgt.

1 g Invertasepräparat wurde mit 300 ccm 5%iger Schwefelsäure in einem Kolben 6 Stunden im Wasserbade erhitzt. Die Flüssigkeit wurde dann mit heißer Barytlösung und schließlich mit Baryumcarbonat neutralisiert, abfiltriert und eingedampft. Nach Zusatz von in Eisessig gelöstem Phenylhydrazin zur abgekühlten Lösung erstarrte die Flüssigkeit bald zu einem dünnen Krystallbrei von Mannosehydrazon.

Im folgenden stellen wir nun die Analysen der rohen und gereinigten Präparate zusammen.¹⁾

N-Bestimmungen nach Dumas.

Präparat A.

0,2415 g Substanz	gaben	3,0 ccm N (18,3° und 746,5 mm Hg)
0,1575 »	»	0,2584 g CO ₂ und 0,1504 g H ₂ O
0,4182 »	»	0,0076 » Asche
0,4723 »	»	0,0083 »

Also gefunden: ²⁾

$$N = 1,4\%$$

$$C = 44,7\%$$

$$H = 10,7\%$$

$$\text{Asche} = 1,82 \text{ und } 1,76\%.$$

Präparat B.

25 g der nach obigen Angaben hergestellten Rohinvertase wurden in 300 ccm destillierten Wassers gelöst. Die Lösung ist etwas gelblich, trüb und ein wenig schleimig. Sie wurde mit 50 g gereinigter Tierkohle während 2 Stunden stehen gelassen und dann abfiltriert. Das Filtrat wurde zweimal mit je 50 g Kaolin behandelt. Das Filtrat wurde hierauf mit viel (etwa 4 Liter) 95%igem Alkohol gefällt. Es entstand ein rein weißer, flockiger Niederschlag; Ausbeute 10 g; dies scheinbar trockene Präparat enthält noch reichlich Alkohol, welcher im Trockenschrank bei 70° vertrieben wird.

¹⁾ Die Analysen beziehen sich auf Substanz, welche bei 70° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet wurde. Die Präparate waren hygroskopisch und hielten auch sehr energisch Alkohol zurück.

²⁾ Der Wasserstoffgehalt ist vielleicht infolge eines Analysenfehlers zu hoch gefunden worden.

B_I.

0,2991 g Substanz gaben 5,6 ccm N (18° und 742 mm Hg)
 0,2021 „ „ „ 0,0059 g Asche.

Also gefunden:

$$N = 2,1\%$$

$$\text{Asche} = 2,9\%$$

$$\text{Aktivität: } \pm 0^\circ = 23 \text{ Min.}$$

B_{II}.

7 g des Präparates B_I wurden in 50 ccm Wasser gelöst
 und mit 15 g Kohle behandelt. Ausbeute 3,8 g.

0,1540 g Substanz gaben 2,15 ccm N (19° und 752 mm Hg)
 0,2565 „ „ „ 0,0054 g Asche.

Also gefunden:

$$N = 1,6\%$$

$$\text{Asche} = 2,1\%$$

$$\text{Aktivität: } \pm 0^\circ = 20 \text{ Min.}$$

B_{III}.

2 g des Präparates B_{II} wurden in 50 ccm Wasser gelöst
 und mit 5 g Kohle und hierauf mit 20 g Kaolin behandelt.
 Ausbeute 1 g.

0,2479 g Substanz gaben 0,8 ccm N (17,5° und 746 mm Hg)
 0,1447 „ „ „ 0,0030 g Asche
 0,2042 „ „ „ 0,3206 „ CO₂ und 0,1130 g H₂O
 0,2070 „ „ „ 0,3195 „ „ „ 0,1112 „ „

Also gefunden:

$$N = 0,36\%$$

$$C = 42,8 \text{ und } 42,1\%$$

$$H = 6,2 \text{ „ } 6,0\%$$

$$\text{Asche} = 2,07\%$$

$$\text{Aktivität: } \pm 0^\circ = 14 \text{ Min.}$$

Präparat C.

(Aus neuem Ausgangsmaterial.)

20 g der Rohinvertase wurden in 300 ccm Wasser gelöst
 und zuerst mit 100 g, dann mit 50 g gereinigter Tierkohle
 behandelt. Das Filtrat wird mit 95%igem Alkohol gefällt.
 Ausbeute 3,5 g rein weiße Substanz.

0,2800 g Substanz gaben 2,0 ccm N (20° und 748 mm Hg)
 0,3481 „ „ „ 0,0090 g Asche.

Also gefunden:

$$N = 0,8\%$$

$$\text{Asche} = 2,6\%$$

$$\text{Aktivität: } + 0^\circ = 17 \text{ Min.}$$

Folgende Tabelle erleichtert die Übersicht über die Resultate.¹⁾

Tabelle 3.

	Rohinvertase			Präparate					O'Sullivan und Tompson
	a	b	c	A	B _I	B _{II}	B _{III}	C	
% N . .	3,1	3,8	3,4	1,4	2,1	1,6	0,36	0,8	4,2 (Mittel)
% Asche	8,0	5,1	7,3	1,8	2,9	2,1	2,07	2,6	—
+ 0° . .	—	27	25	23	23	20	14	17	25,1 Minuten

Was sofort auffällt, ist der außerordentlich niedrige Stickstoffgehalt unserer wirksamsten Präparate, welcher zeigt, daß eine weitergehende Reinigung gelungen ist, als dies bei früheren Arbeiten über Invertase der Fall war. Immerhin ist noch keine Garantie gegeben, daß die vollständige Reinigung der Invertase erreicht worden ist, und wir betrachten die hier angegebenen Versuche nur als eine Vorarbeit.²⁾ Von weitgehenden Schlüssen über die Natur dieses Enzyms wollen wir uns um so mehr enthalten, als solche bereits in allzu großer Zahl vorliegen und meist auf ein außerordentlich unzureichendes experimentelles Material aufgebaut worden sind. Besonders wollen wir auch die lange und viel diskutierte Frage, ob die Invertase ein Eiweißkörper ist oder nicht, verschieben, bis wir eine konstante Zusammensetzung des Enzyms angeben können. O'Sullivan und Tompson, welchen wir die eingehendste und gründlichste Untersuchung über die Invertase verdanken, waren der Ansicht, daß ihr Präparat, das die Wirksamkeit $+ 0^\circ = 25$ Minuten zeigte

¹⁾ Die Berechnungen des Prozentgehaltes N, sowie C und H. gelten durchweg für die aschehaltige Substanz.

²⁾ Dies gilt auch hinsichtlich der hier befolgten Methodik. Wir haben 1 g unseres besten Präparates aus etwa 50 kg Hefe unter Verbrauch von etwa 50 l Alkohol erhalten; wir sind damit beschäftigt, ein einfacheres und wenig kostspieliges Verfahren zur Reindarstellung der Invertase auszuarbeiten.

und einen N-Gehalt von 4,2% aufwies, nicht weit von der Reinheit entfernt sei, und haben diese Ansicht begründet. Wenn sich nun hier zeigte, daß das Präparat der englischen Forscher noch in bezug auf Wirksamkeit übertroffen werden kann, so kann ja behauptet werden, daß auch unsere Invertasepräparate nur einen kleinen Teil an Enzym, und im übrigen unwirksame Substanzen enthält: dieser kleine Teil könnte dann ein Eiweißkörper sein.¹⁾ Unser Präparat BII wäre dann allerdings vom Zustand der Reinheit noch außerordentlich weit entfernt und dürfte nur 2% Invertase enthalten. Es ist dies nicht ganz ausgeschlossen, aber gar nicht wahrscheinlich, wenn man die

¹⁾ In einem Referat in den Ergebnissen der Physiologie, Bd. IX, S. 227, äußert sich H. M. Vernon folgendermaßen:

«Die chemische Natur der Enzyme ist von Euler (Erg. d. Physiol., Bd. VI und IX) erörtert worden; er schloß, daß die beigebrachten Beweise auf den nicht eiweißartigen Charakter der Enzyme hinweisen. Mit dieser Anschauung stimme ich nicht überein. Sie stützt sich hauptsächlich auf die Behauptung vieler Forscher, die aktive Präparate von verschiedenen Enzymen erhielten, welche nicht die gewöhnliche Eiweißreaktion gaben. Darauf ist einzuwenden, daß die Enzymwirkung sehr viel feiner sein kann, als irgend eine bekannte Eiweißreaktion.»

Was die beiden letzten Sätze betrifft, so können wir Herrn Vernon ohne weiteres recht geben; sie decken sich auch vollkommen mit der Auffassung, welche der eine von uns (E.) in seiner «Allgemeine Chemie der Enzyme» (Wiesbaden, Januar 1910) so formuliert hat:

«Was zunächst die chemische Natur der Enzyme betrifft, so ist das Ergebnis unserer Übersicht nur ein negatives, insofern wir aus den vorliegenden Analysen der verschiedenen Enzympräparate und aus ihren chemischen Reaktionen nur feststellen können, daß für die in der Literatur oft vertretene Annahme, die Enzyme seien Eiweißkörper, keine Anhaltspunkte vorliegen; auch spricht nichts dafür, daß die Enzyme einer einzigen Körperklasse angehören. Andererseits existiert keine Tatsache, welche bestimmt den Eiweißcharakter eines der hydrolysierenden Enzyme ausschliesse, denn die Angaben über ausgebliebene Eiweißreaktionen von Enzymlösungen sind nicht von Konzentrationsangaben und genügenden Parallelversuchen mit ebenso verdünnten Lösungen unzweifelhafter Eiweißkörper begleitet.»

Vernon hätte also mit einer kleinen, aber wesentlichen Änderung seines ersten Satzes so referieren sollen:

«Euler schloß, daß die beigebrachten Beweise nicht auf den eiweißartigen Charakter der Enzyme hinweisen.»

Serie A—C in obiger Tabelle betrachtet. Je mehr der Stickstoffgehalt abnimmt, je mehr Eiweißkörper durch Adsorption entfernt werden, um so wirksamer werden die Präparate.

Salkowski¹⁾ und sein Schüler Niro Masuda²⁾ haben mit gummifreien Invertaselösungen gearbeitet, welche keine Eiweißreaktionen zeigten. Da der Stickstoffgehalt nicht untersucht und die Wirksamkeit in einer anderen Weise gemessen wurde als von uns, lassen sich unsere Ergebnisse leider nicht ohne weiteres vergleichen. Immerhin haben wir an unserem Präparate BIII festgestellt, daß es in einer Stunde bei 25° das 400fache seines Gewichtes an Rohrzucker invertiert, während der immerhin auffallend kräftige Hefenextrakt von Salkowski 160mal mehr Zucker spaltete, als der organischen Trockensubstanz des Extraktes entsprach.

Unsere Ergebnisse fassen wir folgendermaßen zusammen:

1. Aus einer gewissen Menge Hefe kann man die gleiche Menge Invertase darstellen, sei es, daß man die getrocknete Hefe mit Wasser extrahiert, oder sie der Autolyse überläßt.

2. Aus dem durch Autolyse der Hefe sich bildenden Saft wird ein Invertasepräparat gewonnen, welches 0,36% N, 42,3% C und 2,07% Asche enthält. Es ist das wirksamste bis jetzt beschriebene Präparat. Löst man 0,05 g der Substanz in 5 ccm 0,5 n-NaH₂PO₄ und setzt 20 ccm 20%ige Rohrzuckerlösung zu, so wird die Drehung 0° bei Zimmertemperatur (20°) in 14 Minuten erreicht.

Nachtrag.

Schließlich seien noch Versuche erwähnt, welche bezweckten, den gewonnenen Autolysesaft mit Kohle und Kaolin direkt zu reinigen. Wir erhielten folgende Resultate:

110 ccm Autolysesaft wurden mit 80 g wasserhaltigem Kaolin und das Filtrat mit 15 g Kohle behandelt. Aus dem neuen Filtrate wurde die Invertase mit absolutem Alkohol im

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. LXI, S. 124, 1909.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. LXVI, S. 145, 1910.

Überschuß gefällt. Das Präparat wurde mit absolutem Alkohol und Äther gewaschen und im Vakuumexsikkator verwahrt.

Die Wirksamkeit wurde bestimmt: 0,0493 g Invertase, 5 ccm 0,0005 n-HCl, 20 ccm 20%ige Rohrzuckerlösung. Nach 23 Minuten war die Drehung = 0°.

Es zeigt sich also, daß man, um ein wirksames Präparat zu erhalten, den Saft mit Kohle und Kaolin direkt behandeln kann. Die Reaktionsgeschwindigkeit des reinsten Präparates war ja ebenfalls $\pm 0^\circ$ nach 23 Minuten; dagegen war sein N-Gehalt 1,40%, während die neue Substanz 2,86% N hält.

0,3964 g Substanz gaben 10,0 ccm N (18,5° und 750 mm Hg)

0,1626 „ „ „ 0,0053 g Asche.

Also gefunden:

$$N = 2,86\%$$

$$\text{Asche} = 3,26\%.$$

Koaguliert man Autolysesaft oder Lösungen von Rohinvertase auf dem Wasserbade und fällt das Filtrat mit Alkohol, so enthält der Niederschlag immerhin noch erhebliche Mengen Stickstoff.

Präparat D.

0,2543 g Substanz gaben 5,5 ccm N (17° und 753 mm Hg).

Also gefunden:

$$N = 2,47\%.$$

Über die Untersuchung der in diesem Filtrat vorhandenen Stoffe wird der eine von uns später berichten.