

Über den Einfluß der Alkalien und Säuren auf die Autolyse der Hefe.

Von

E. Navassart aus Foksani (Rumänien).

(Aus der chemischen Abteilung des pathologischen Instituts der Universität zu Berlin.)
(Der Redaktion zugegangen am 10. November 1910.)

Der Einfluß der Reaktion auf die Autolyse tierischer Gewebe (es ist teils nur die Proteolyse, teils diese und die Nucleolyse in Betracht gezogen worden) ist von verschiedenen Seiten untersucht worden. Ganz allgemein ist festgestellt worden, daß alkalische Reaktion die Autolyse hemmt, bei stärkeren Graden aufhebt, Säuren sie befördern. Die hemmende Wirkung der Alkalien haben Schwiening,¹⁾ Biondi,²⁾ Baer und Loeb,³⁾ Wiener,⁴⁾ Drjewezki⁵⁾ für die Leber, Hedin⁶⁾ für die Milz, Hildebrand⁷⁾ für die Milchdrüse festgestellt: die beschleunigende Wirkung der Säuren (bis zu einem gewissen Maximum, dessen Überschreitung hemmend wirkt) hat namentlich Arinkin⁸⁾ an der Leber ausführlich untersucht, außerdem Hedin an der Milz (l. c.), Hildebrandt (l. c.) an der Milchdrüse, Lewene und Stookey⁹⁾ am Gehirn.

Dagegen liegt noch keine Angabe darüber vor, wie die Autolyse der Hefezellen, also eines Sproßpilzes, durch die Reaktion des Mediums beeinflusst wird. Auf Veranlassung und

¹⁾ Virchows Arch., Bd. CXXXVI, S. 444 (1894).

²⁾ Virchows Arch., Bd. CXLIV, S. 373 (1896).

³⁾ Arch. für exp. Pathologie u. Pharmakologie, Bd. LIII, S. 1.

⁴⁾ Zentralblatt für Physiologie, Bd. XIX, Nr. 11, 1905.

⁵⁾ Bioch. Zeitschrift, Bd. I, S. 207 (1906).

⁶⁾ Journal of Physiology, Bd. XXX, S. 155.

⁷⁾ Hofmeisters Beiträge zur chem. Physiol. u. Pathol., Bd. V, S. 463 (1904).

⁸⁾ Diese Zeitschrift, Bd. LIII, S. 192 (1907).

⁹⁾ The Journal of Medical Research, Bd. X, S. 212 (1903).

unter Leitung von Prof. E. Salkowski habe ich mich mit dieser Frage beschäftigt, indem ich mich auf die Untersuchung des proteolytischen Fermentes (vielfach Endotryptase genannt) und die nucleolytischen (Nuclease) beschränkte, dagegen die etwaige Autolyse anderer Hefebestandteile und deren Produkte außer Betracht ließ. Die Methode, welche in meinen Versuchen zur Ausführung der Autolyse benutzt wurde, ist folgende:

Die möglichst frisch angewendete Preßhefe (50 g) wurde in einer starkwandigen Glasstöpselflasche mit 500 ccm gesättigten Chloroformwassers übergossen, mit der Schüttelmaschine solange geschüttelt, bis die Hefe ganz fein in der Flüssigkeit verteilt war, dann im Thermostaten bei einer Temperatur von 39—40° gehalten und öfters geschüttelt.

Die Dauer der Autolyse variierte in meinen Versuchen von 68—69½ Stunden. Nach dieser Zeit wurden die Flaschen aus dem Thermostaten herausgenommen und die Mischungen, falls dies erforderlich war, genau neutralisiert und dann unter Zusatz von KH_2PO_4 bis zur deutlichen sauren Reaktion, zur Ausfällung des unverändert gebliebenen Eiweißes, gekocht.

Nach dem Erkalten wurden die Mischungen gemessen und die vorhandene Menge von Flüssigkeit festgestellt, sodaß in dieser Weise die Dauer des Siedens in der Probe nicht in Betracht kommt.

Hat man die Menge der Flüssigkeit bestimmt, dann wird dieselbe durch ein trockenes Filter filtriert und an abgemessenen Mengen die erforderlichen quantitativen Bestimmungen gemacht.

Zu jedem derartigen Versuch, welchen Salkowski der leichteren Verständigung halber «Hauptversuch» nannte, gehört nun ein «Kontrollversuch», mit Hilfe dessen die Veränderungen festgestellt werden, welche die Mischungen durch die Wirkung des siedenden Wassers allein unter Ausschluß jeder Fermentwirkung erfahren haben.

Zur Ausführung des Kontrollversuches wird die Hefe sofort mit Wasser erhitzt: die weitere Verarbeitung ist dann so wie beim Hauptversuch. Also Hauptversuch und Kontrollversuch sind vollkommen analog mit dem einzigen Unterschied, daß in dem «Kontrollversuch» die Kochung vor der Digestion statt-

findet zum Ausschluß der Fermentwirkung, in dem Hauptversuch, nachdem die Fermentation stattgefunden hat.

Indem man die Werte des Kontrollversuches von dem im Hauptversuch erhaltenen Wert abzieht, erhält man die Werte für die von dem Ferment bewirkten Veränderungen.

Ich habe in meinen Versuchen den Gesamtstickstoff- und den Gesamtpurinbasengehalt zu bestimmen gehabt und zwar in folgender Weise.

Der Stickstoff wurde nach Kjeldahl unter Anwendung von Quecksilberoxyd bestimmt, und zwar jedesmal in 50 ccm. Jede Bestimmung wurde doppelt ausgeführt und stets nahe übereinstimmende Zahlen erhalten.

Was die Purinbasen betrifft, möchte ich hier die von Salkowski stammenden Ausdrücke von «manifestem» und «latentem» Hypoxanthin erörtern. Die Auszüge der frischen Organe enthalten die Purinbasen, aber sie sind zum größten Teil in «latenter» Form, d. h. sie sind nicht resp. nur zum Teil durch ammoniakalische Silberlösung fällbar, und das ist deutlich merkbar in den Kontrollversuchsbestimmungen, wo die Fermente getötet sind. Dagegen im Hauptversuche, wo das autolytische Ferment wirkte, sind die Purinbasen in «manifeste» Form, d. h. sie sind durch ammoniakalische Silberlösung direkt fällbar, da die Fermente genau wie die Säuren imstande sind, die Nucleinsäure zu spalten. In meinen Versuchen ist also nur die sogenannte «manifeste» Form der Purinbasen zu berücksichtigen.

Die Bestimmung der Purinbasen geschah nach dem Vorgang von Salkowski in folgender Weise:

Aus 250 ccm der Flüssigkeit wurde die in der Lösung vorhandene Phosphorsäure mit Magnesiummischung gefällt, dann die Purinbasen mit Silbernitratlösung im Überschuß gefällt.

Nach dem Absetzen des Niederschlages wurde filtriert, der Silberniederschlag mit warmem ammoniakalischen Wasser gewaschen; man erhält in kurzer Zeit völlig Ag und Cl freie Filtrate.

Das Filter wird getrocknet, verascht, in heißer HNO_3 gelöst und das Silber nach der Volhardschen Methode mit Rhodanammioniumlösung von bekanntem Gehalt unter Anwendung von Eisenammoniakalaun als Indikator bestimmt. Die gefundene Quantität Silber wurde nicht auf Hypoxanthin, sondern auf Guanin berechnet.

1 ccm von der dargestellten Rhodanlösung entsprach 0,01168 g Ag. Da das Molekulargewicht des Guanins 151,3 ist, und da das Guaninsilber 216 g Ag enthält, darf man die folgende Gleichung anstellen:

$$\frac{216}{151,3} = \frac{0,01168}{x}$$

x ist die Quantität von Guanin, welcher 0,01168 g Ag entsprechen. Wir haben daher:

$$x = \frac{0,01168 \times 151,3}{216} = 0,00837.$$

Also 1 ccm von der angewendeten Rhodanlösung entspricht 0,00837 g Guanin. Ich habe zuerst Versuche gemacht, indem ich die Autolyse der Hefe ohne irgendwelchen Einfluß der Säure oder Alkalien ausführte. Es wurden parallel wie bei Salkowski¹⁾ ein Kontrollversuch und ein Hauptversuch ausgeführt, indem die Kochung vor Digestion bezw. nachher ausgeführt wurde.

Die Resultate sind in den unten ausgeführten Tabellen verzeichnet:

Tabelle I.

Dauer der Autolyse 68 Stunden.

Aus 100 g Hefe sind in Lösung gegangen	Im Kontroll- versuch		Im Haupt- versuch		Infolge der Wirkung des autolytischen Enzyms	
	I	II	I	II	I	II
	g	g	g	g	g	g
N in N-haltigen Sub- stanzen	0,423	0,497	1,527	1,478	1,104	0,981
Purinbasen (auf Guanin berechnet)	0,056	0,011	0,218	0,234	0,162	0,223

Es ist aus diesen zwei Versuchen zu sehen, wie beträchtliche Quantitäten stickstoffhaltiger Substanzen infolge der Digestion in Lösung gegangen sind. Es wurde nicht dieselbe Hefe in beiden Versuchen gebraucht; jedoch liegen die Wertunterschiede zwischen I. und II. Versuch in den Fehlergrenzen. Der Einfluß von Alkali auf die Autolyse wurde zuerst mit Na_2CO_3 versucht. Es wurde in den unten ausgeführten Versuchen ein Gegenexperiment angestellt, d. h. eine Probe, welche weder unter dem Einfluß der Alkalien, noch der Säuren war.

¹⁾ Zeitschrift für klinische Medizin, Supplement zu Bd. XVII, S. 77.

Tabelle II.

Einfluß von Na_2CO_3 . — Dauer der Autolyse 69 Stunden.

Versuch Nr.	Die Quantität von Na_2CO_3		A. Ohne Zusatz B. Mit sofortigem Zusatz von Na_2CO_3 C. Das Verhältnis zwischen A u. B	Gesamt-	Purinbasen
	in g pro $\frac{1}{2}$ l	in %		stickstoff auf 100 g Hefe umgerechnet g	g
I	0,5	0,1	A	1,499	0,229
			B	1,487	0,169
			C	1,00	1,386
II	0,75	0,15	A	1,422	0,237
			B	1,382	0,164
			C	1,029	1,445
III	1,0	0,2	A	1,499	0,229
			B	0,561	0,056
			C	2,672	4,185
IV	2,0	0,4	A	1,499	0,229
			B	0,501	0
			C	2,992	—

Es ist aus dieser Tabelle folgendes zu ersehen:

Bei einer Konzentration von 1,0 resp. 1,5 ‰ Na_2CO_3 bleibt der Gesamtstickstoffgehalt fast unverändert; das autolytische Ferment ist gar nicht in seiner spaltenden Wirkung beeinträchtigt; dagegen sehen wir schon bei dieser Konzentration eine erhebliche Verminderung im Purinbasengehalt und zwar ist in Versuch I die Quantität 1,386, in Versuch II 1,445 mal weniger als im Kontrollexperiment.

Weiter ist im Versuch III bei einer Konzentration von 0,2 ‰ Na_2CO_3 der Stickstoffgehalt erheblich vermindert und zwar von 1,499 zu 0,561. d. h. die Quantität des Gesamtstickstoffes ist 2,672mal weniger als im Kontrollexperiment. In diesem Versuch ist der Purinbasengehalt bedeutend niedriger, nämlich 4,185 mal weniger wie im Kontrollexperiment.

Beim Versuch IV, wo der Alkaleszenzgehalt 0,4 ‰ Na_2CO_3 beträgt, sind die Werte fast ebenso, wie es in Tabelle I beim Kontrollversuche angegeben war, wo also keine Digestion statt-

fand. Es ist daher anzunehmen, daß bei einer Konzentration von 0,2% Na_2CO_3 die Autolyse beträchtlich herabgesetzt wird, und daß bei einer Konzentration von 0,4% die Autolyse nicht mehr stattfindet.

Ich erachte es für nötig, hier zu bemerken, daß in den Versuchen I, III und IV nur ein Gegenexperiment angestellt wurde, da man es mit derselben Hefe zu tun hatte. Dagegen haben wir in Versuch II für die Kontrolle einen anderen Wert, da in diesem Versuch eine andere Hefe gebraucht wurde. Es ist jedoch aus den Resultaten zu ersehen, daß die Wertunterschiede zwischen diesen Gegenexperimenten in den Fehlergrenzen liegen.

Tabelle III.

Einfluß von K_2CO_3 . — Dauer der Autolyse $69\frac{1}{2}$ Stunden.

Versuch Nr.	Die Quantität von K_2CO_3		A. Ohne Zusatz B. Mit sofortigem Zusatz von K_2CO_3 C. Das Verhältnis zwischen A u. B	Gesamt- stickstoff	Purinbasen
	in g pro $\frac{1}{2}$ l	in %		auf 100 g Hefe umgerechnet g	g
I	0,5	0,1	A	1,495	0,241
			B	1,387	0,186
			C	1,078	1,295
II	0,75	0,15	A	1,495	0,241
			B	1,395	0,156
			C	1,072	1,545
III	1,0	0,2	A	1,495	0,241
			B	1,375	0,156
			C	1,086	1,545
IV	2,0	0,4	A	1,495	0,241
			B	0,555	0,049
			C	2,694	—

Die Alkaleszenz von K_2CO_3 übt denselben Einfluß auf die Autolyse wie Soda; jedoch ist ihre Wirkung schwächer, da wir in dieser Tabelle folgendes zu beobachten haben: Bei Versuch III, wo der Alkaleszenzgehalt 0,2% betrug, ist der Stickstoffgehalt nur 1,085mal weniger wie im Kontroll experi-

ment; dagegen haben wir bei Soda eine beträchtliche Herabsetzung der Autolyse bemerkt und der Stickstoffgehalt war 2,672 mal weniger wie im Gegenversuche. Für Purinbasen ist dasselbe zu merken. In den ersten 3 Versuchen haben wir sehr ähnliche Resultate, dagegen hört im IV. Versuch die Autolyse fast vollständig auf.

Es ist nötig, zu bemerken, daß zur Neutralisation der Flüssigkeiten, die in Tabelle II und III verarbeitet wurden, nicht die entsprechende Menge von Säuren (HCl) gebraucht ist, sondern viel weniger; das kommt davon, daß die Flüssigkeit selbst infolge der abgespaltenen Säuren sauer reagiert. Die Flüssigkeit im Gegenversuche hatte bedeutend stärkere gelbe Farbe als diejenige mit Alkaligehalt, und diese war desto heller, je höher der Alkaligehalt war.

Tabelle IV a.

Einfluß von HCl. — Dauer der Autolyse 68 Stunden.

Ver- such Nr.	Die Quantität der Salzsäure			Die ent- sprechende äquivalente Menge Na ₂ CO ₃ g	A. Ohne Zusatz B. Mit sofortigem Zusatz von HCl C. Das Verhältnis zwischen A u. B	Gesamt- stick- stoff auf 100 g Hefe umgerechnet g	Purin- basen g
	in ccm n-Lö- sung pro	HCl in g ½ l	HCl in %				
I	9,42	0,3437	0,0687	0,5	A	1,352	0,194
					B	1,072	0,209
					C	1,261	—
II	14,13	0,5155	0,1030	0,75	A	1,352	0,194
					B	1,019	0,197
					C	1,327	—
III	18,84	0,6874	0,1374	1,0	A	1,352	0,194
					B	0,699	0,021
					C	1,934	—

Die angewendete Menge von HCl wurde in obigen Versuchen der entsprechenden äquivalenten Menge Na₂CO₃ gleichgewählt. Es ist zu ersehen, daß unter dem Einfluß von HCl die Autolyse wesentlich gehemmt ist; schon bei einer Konzentration von 0,1374%, welche einer solchen von 0,2% Na₂CO₃

entspricht, hört die Autolyse fast vollständig auf, während in beiden ersten Versuchen keine wesentliche Veränderung auftrat. In den Purinbasen haben wir in den ersten zwei Versuchen statt 0,194 g 0,209 bzw. 0,197, aber diese kleinen Unterschiede liegen in den Fehlergrenzen, sodaß wir darüber kein Urteil abgeben können.

In der nächsten Tabelle sind Versuche mit geringerem Gehalt HCl gemacht, um zu sehen, ob diese die Autolyse nicht steigern würde.

Tabelle IVb.

Dauer der Autolyse 68 Stunden.

Ver- such Nr.	Die Quantität der Salzsäure			A. Ohne Zusatz B. Mit sofortigem Zusatz von HCl C. Das Verhältnis zwischen A u. B	Gesamt- stick- stoff auf 100 g Hefe ungerechnet g	Purin- basen g
	in cem 1-n- Lösung pro 1/2 l	HCl in g	HCl in %			
I	7.06	0.2577	0.0515	A	1,422	0,237
				B	1,200	0,187
				C	1,185	1,268
II	4.18	0.1525	0.0305	A	1,422	0,237
				B	1,295	0,183
				C	1,099	1,295
III	2.09	0.0762	0.0152	A	1,422	0,237
				B	1,413	0,180
				C	1,007	1,317
IV	1.04	0.0381	0.0076	A	1,422	0,237
				B	1,382	0,228
				C	1,029	1,039

Aus dieser letzten Tabelle ist zu ersehen, daß die HCl in ganz kleinen Mengen keine wesentliche Veränderung in der Autolyse verursacht; jedoch ist eine unbedeutende Herabsetzung der Autolyse zu beobachten.

Auf Grund dieser Versuche können wir behaupten, daß die Alkalien die Autolyse der Hefe herabsetzen, und daß der Einfluß derselben bemerkenswerterweise ähnlich verläuft wie

bei der Autolyse der tierischen Gewebe, und zwar wird bei 0,2% die Autolyse herabgesetzt und bei 0,4% hört dieselbe auf.

Die herabsetzende Wirkung der Alkalien ist also von ihrer Konzentration abhängig; je mehr Alkali hinzugesetzt ist, desto schwächer die Autolyse und umgekehrt.

Bei Na_2CO_3 erfolgt schon bei 0,2% eine beträchtliche Herabsetzung der Autolyse, bei K_2CO_3 jedoch erst bei 0,4%.

Die Einwirkung der Säure (HCl) steigert keineswegs die Autolyse der Hefe, wie es im tierischen Gewebe (der Leber) von so vielen Autoren gezeigt wurde; im Gegenteil, sie stört wesentlich die Autolyse. Eine Steigerung derselben erfolgte weder bei ganz minimalem Gehalt noch bei solchen Mengen HCl, die der angewendeten Quantität Alkali äquivalent waren.

Aus den Tabellen ersieht man außerdem, daß die Nuclease durch die Änderung der Reaktion stärker beeinflußt wird als das proteolytische Ferment.

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. E. Salkowski meinen verbindlichsten Dank für das vorgeschlagene Thema aussprechen, sowie für seine freundliche Unterstützung.