

# Untersuchungen über die chemische Zusammensetzung und Bildung der Enzyme.

## III. Mitteilung.

Von

Hans Euler und Sixten Kullberg.

(Der Redaktion zugegangen am 30. Dezember 1910.)

### A. Über den Einfluß von Phosphaten auf das Invertase- und Zymasesystem<sup>1)</sup> der lebenden Hefezellen.

Gelegentlich einer Untersuchung über Enzyymbildung hatte es sich in 3 Versuchsreihen gezeigt, daß Hefe, welche mit Mononatriumphosphat behandelt worden war, nach der Entwässerung durch Alkohol eine stärkere Invertasewirkung besaß als Hefe, welche während derselben Zeit unter Wasser gelegen hatte. Indessen waren die Resultate wechselnd gewesen, und es erwies sich deshalb notwendig, die Versuche in größerem Umfange zu wiederholen, vor allem um über die Grenzen der Versuchsfehler und die Sicherheit der Resultate Klarheit zu gewinnen.

#### 1. Inversion des Rohrzuckers.

Die Versuche wurden folgendermaßen ausgeführt:

Die gewaschene und abgepreßte Hefe wurde eine gewisse Zeit teils mit Wasser, teils mit den in den Tabellen angegebenen Lösungen bei Zimmertemperatur (ca. 17°) stehen gelassen. Dabei kamen stets 200 g abgepreßte Hefe auf 600 ccm Flüssigkeit. Die Konzentration dieser Lösungen ist in den Tabellen 1—3 in Prozenten angegeben. In den meisten Fällen

<sup>1)</sup> Die Bezeichnung «Enzym-System» ist in der vorhergehenden Mitteilung (Diese Zeitschrift, Bd. LXX, S. 279, 1911) vorgeschlagen worden für ein Enzym mit dem gesamten System seines Koenzyms und der die Enzymwirkung beeinflussenden Aktivatoren und Hemmungskörper.

kamen die chemisch reinen Monophosphate zur Verwendung, welche der Lösung also eine saure Reaktion (H-Konzentration =  $10^{-5}$ ) erteilten.

Bei einigen Versuchen (Tab. 1 letzte und vorletzte Zeile) wurde die Phosphatlösung mit KOH fast vollständig neutralisiert unter Anwendung von Lackmus als Indikator.

Nach dem Stehen der Hefe wurde dieselbe wieder abgepreßt und im Vakuumtrockenapparat getrocknet, wobei alle Parallelversuche gleichzeitig eingeführt und entnommen wurden. Legt man die Hefe in den vorgewärmten Apparat, so geht der Wasserverlust in wenigen (2—4) Minuten zum größten Teil vor sich. Die Hefe verweilt dann noch 2 Stunden im warmen Vakuumapparat.

Vor der Extraktion wurde das so erhaltene Dauerpräparat fein verrieben. Der invertasehaltige Extrakt wurde hergestellt durch 12stündiges Digerieren dieser Dauerhefe mit ihrem 10fachen Gewicht an 0,05%iger Essigsäurelösung, welche mit Thymol versetzt war. Nach dieser Zeit wurden 5 ccm des filtrierten Extraktes mit 5 ccm 5%iger Lösung von  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  und 20 ccm einer 20%igen Rohrzuckerlösung gemischt. Die in der Mischung vor sich gehende Inversion des Rohrzuckers wurde in gewöhnlicher Weise polarimetrisch verfolgt.

Zur Ermittlung der relativen Geschwindigkeiten wurde aus den einzelnen Ablesungen eine Kurve entworfen, aus welcher die Zeiten entnommen wurden, nach welchen die Lösungen die Drehungen  $+4^\circ$  resp.  $+2^\circ$  erreicht hatten. Man erhält auf diese Weise ein ebenso einwandfreies<sup>1)</sup> Maß der relativen Geschwindigkeiten wie durch die Reaktionskonstanten

$$k = \frac{1}{t} \cdot \ln \frac{A}{A-x}$$

<sup>1)</sup> Vgl. Diese Zeitschrift. Bd. LXIX, S. 159, 1910.

Wir benützen die Gelegenheit, um ein Versehen auf S. 159 der zitierten Arbeit zu berichtigen. Auf der dritten Zeile von unten muß es heißen (wenn mit dekadischen Logarithmen gerechnet wird)

$$k = \frac{0,6153}{t}$$

Aus jeder dieser beiden Zeiten wurde das Größenverhältnis berechnet, dessen arithmetisches Mittel in den Tabellen unter der Rubrik «Relative Schwächung der Reaktionsgeschwindigkeit» angegeben ist.

Z. B. besagt die erste Zeile der Tabelle 1. daß, wenn Hefe einerseits  $2\frac{1}{2}$  Stunden mit Wasser, andererseits mit  $\frac{2}{3}\%$ iger  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Lösung behandelt wird, dann die Extrakte der vollkommen gleichmäßig hergestellten Dauerpräparate eine Wirksamkeit gegen Rohrzucker (also Invertasegehalt) zeigen, welcher sich wie 1 : 0,96 verhält; durch Stehen unter Wasser wurde also die Hefe invertaseärmer als durch Stehen unter der Phosphatlösung.

Tabelle 1.

Behandlung mit $\text{KH}_2\text{PO}_4$	Zeit der Behandlung in Stunden	Relative Schwächung der Reaktionsgeschwindigkeit
$\frac{2}{3}$	$2\frac{1}{2}$	0,96
$\frac{2}{3}$	2—3	0,92
$\frac{1}{5}$	3	1,04
$\frac{1}{5}$	$2\frac{1}{2}$	1,11
$\frac{2}{3}$	15	1,03
0,2	16	1,02
$\frac{1}{5}$	16	1,09
$\frac{1}{5}$	16	1,02
$\frac{1}{5}$	16	1,30
$\frac{3}{5}$	16	1,16
$\frac{1}{5}$	16	0,75
2	24	1,22
Neutralisiertes $\text{KH}_2\text{PO}_4$		
$\frac{2}{3}$	2—3	0,96
$\frac{2}{3}$	15	1,00
$\frac{3}{5}$	16	1,00

Tabelle 2.

Behandlung mit $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ %	Zeit der Behandlung in Stunden	Relative Schwächung der Reaktionsgeschwindigkeit
10	3 $\frac{1}{2}$	1,29
10	3 $\frac{1}{2}$	1,18
10	16	1,09
10	16	1,40
10	16	1,83
$\frac{1}{10}$	3 $\frac{1}{2}$	0,84
$\frac{1}{5}$	16	1,05

Den obigen Zahlen zufolge ergibt sich kein wesentlicher Unterschied, wenn Hefe während mehrerer (2—24) Stunden einerseits mit Wasser, andererseits mit verdünnter ( $\frac{1}{10}$ — $\frac{1}{5}$ iger reiner oder neutralisierter) Monophosphatlösung behandelt und dann nach dem Abpressen im Vakuum getrocknet wird, und zwar gilt dies sowohl für Monokaliumphosphat (Tab. 1) als für Mononatriumphosphat (die letzten Zeilen der Tab. 2). Vgl. aber hierzu Tabelle 5.

Wird Hefe mit stärkeren Lösungen von Monophosphat behandelt und dann nach Abpressen getrocknet, so ergibt sich eine deutliche Schwächung, die um so stärker wird, je länger die Phosphatbehandlung gedauert hat. (Tab. 2.)

In folgenden Versuchsreihen wurde die Hefe nicht nur mit Phosphat, sondern gleichzeitig mit anderen Stoffen behandelt, nämlich mit Pepton (Witte-Pepton), Ammoniumsalzen, Zinksulfat und Rohrzucker. In den letzten Spalten der Tabelle 3 findet man die Berechnung des «Invertasegehaltes» der entsprechenden Dauerpräparate teils, wie in den vorigen Tabellen, im Verhältnis zu Wasser-behandelten, teils im Verhältnis zu nur Phosphat-behandelten Hefe.

Die Berechnung der letzten 3 Versuche bezieht sich nicht auf Parallelversuche mit Wasser, sondern auf solche mit Lösungen von Ammoniumtartrat.

Tabelle 3.

Behandlung mit $\text{KH}_2\text{PO}_4$ %	Behandlung mit Pepton %	Behandlung mit $\text{H}_4\text{N-Salz}$ %	Behandlung mit Rohrzucker %	Zeit der Behandlung Stunden	Schwächung der Reaktionsgeschwindigkeit im Verhältnis auf $\text{H}_2\text{O}$ -behandelte Hefe	Schwächung der Reaktionsgeschwindigkeit im Verhältnis auf nur Phosphat-behandelte Hefe
$\frac{2}{3}$	—	1 Acetat	—	$2\frac{1}{2}$	1,13	—
$\frac{2}{3}$	—	—	1	$2\frac{1}{2}$	0,85	0,75
$\frac{2}{3}$	—	—	1	3	0,84	0,93
—	—	—	5	14	1,00	—
0,1	—	—	5	14	0,83	—
$\frac{3}{5}$	0,5	—	—	16	1,24	0,95
2	—	—	1	24	1,06	0,87
					Schwächung der Reaktionsgeschwindigkeit im Verhältnis auf $\text{H}_2\text{O}$ - und weinsaures $\text{H}_4\text{N}$ (0,4%) behandelte Hefe	Schwächung der Reaktionsgeschwindigkeit im Verhältnis auf Phosphat- und weinsaures $\text{H}_4\text{N}$ (0,4%) behandelte Hefe
2	—	0,4 weinsaures $\text{H}_4\text{N}$	—	144	1,28	—
2	—	0,4 »	1	144	1,42	1,12
2	—	0,4 » + 0,02 $\text{ZnSO}_4$	—	144	1,17	0,91

## 2. Gärung des Rohrzuckers.

Die Behandlung der Hefe geschah in derselben Weise wie oben (S. 14) angegeben. Von den getrockneten Hefepreparaten und (in Parallelversuchen) von der lebenden Hefe wurde 1 g in 20 ccm 10%iger Rohrzuckerlösung in Erlenmeyer-Kolben aufgeschlämmt, welche mit Meissl-Ventilen verschlossen waren. Die Kolben befanden sich im Wasserbade bei 30°. Der Reaktionsverlauf wurde durch Wägen der nach gewissen Zeiten (2—3 Stunden) entwichenen Kohlensäure verfolgt.

Aus der folgenden Tabelle geht die Art und Dauer der Behandlung der Hefe hervor. Spalte e und f beziehen sich auf ein und dasselbe Hefepreparat, e auf das Vakuumgetrocknete, f auf die entsprechende frische Hefe. Die Werte der Spalten

e und f sind folgendermaßen berechnet: Die einerseits mit Wasser und andererseits mit anderen Lösungen vorbehandelte Hefe lieferte in 2 Stunden bestimmte Mengen, x und y Gramm Kohlensäure. Das Verhältnis  $y : x$  ist in den Spalten e und f angegeben.

Tabelle 4. — Gärungsversuche.

Behandlung mit $\text{KH}_2\text{PO}_4$	Behandlung mit $\text{NaH}_2\text{PO}_4$	Behandlung mit anderen Stoffen	Zeit der Behandlung Stunden	Rel. Schwächung der Gärungsintensität, berechn. auf $\text{H}_2\text{O}$ -behandelte Hefe. Im Vakuum getrocknete Hefe	Rel. Schwächung der Gärungsintensität, berechn. auf $\text{H}_2\text{O}$ -behandelte Hefe. Frische Hefe
a	b	c	d	e	f
$\frac{2}{3}$	—	—	2—3	0,6449	1,182 M.
$\frac{2}{3}$	—	1 Rohr- zucker	2—3	0,6504	1,119 M.
$\frac{2}{3}$	—	1 $\text{H}_4\text{N}$ - Acetat	2—3	0,5991	1,358 M.
—	—	5 Rohr- zucker	14	0,5288	1,047
0,1	—	5 „	14	0,4032	1,050
$\frac{2}{3}$	—	—	15	—	1,041
—	$\frac{3}{5}$	—	16	0,8576	— M.
—	10	—	16	0,6139	— M.
Neutralisiertes $\text{KH}_2\text{PO}_4$					
$\frac{2}{3}$	—	—	2—3	1,097	1,193 M.
$\frac{2}{3}$	—	—	15	1,128	1,060

Es zeigt sich bei Behandlung mit nicht neutralisiertem Monophosphat ein durchgehender, wesentlicher Unterschied in der Phosphatwirkung: Untersucht man die getrocknete Hefe, so erweist sich die Phosphat-behandelte Hefe weniger gärkräftig als die Wasser-behandelte. Dagegen zeigt sich ein günstiger Einfluß der Phosphatbehandlung, wenn die entsprechende frische Hefe zur Anwendung kommt.

Bei Behandlung mit neutralisiertem Phosphat ergibt sich ein solcher Unterschied nicht.

Dieses Ergebnis steht, soweit es Trockenhefe betrifft, mit einem früheren Versuch<sup>1)</sup> gut in Übereinstimmung, und es zeigt sich also, daß die Eigenschaften von Dauerpräparaten nicht immer mit den Eigenschaften der entsprechenden lebenden Hefe parallel gehen.

### B. Zur Dynamik der Enzymreaktionen mittels Hefezellen.

Nachdem es sich herausgestellt hatte, daß Variationen im Enzymgehalt der Hefe vermittelt Vakuum-Dauerpräparaten nicht immer mit genügender Sicherheit und Genauigkeit untersucht werden können, haben wir versucht, den Enzymgehalt der Hefe, teils an lebenden Zellen, teils an den mit Protoplasmagiften behandelten Zellen zu studieren.

Zunächst wurde untersucht, ob sich die Invertasewirkung der lebenden Hefe durch eine monomolekulare Reaktionskonstante charakterisieren läßt. Dabei wurde in folgender Weise verfahren:

In 3 Kolben wurden je 0,25 g frische Hefe in 20 ccm 20% iger Rohrzuckerlösung und 5 ccm Wasser + 1 ccm Chloroform aufgeschlämmt. Nach verschiedenen Zeiten wurde die Reaktion durch 5 ccm 0,4-normale Natronlauge unterbrochen. Die Kolben wurden dann 1—2 Minuten in das kochende Wasserbad gestellt, um die Hefe leicht abfiltrieren zu können und gleichzeitig das Chloroform zu entfernen. Nach Abkühlung wurden die Proben im Polarisationsapparat beobachtet.

Tabelle 5.

Vorbehandlung	Zeit (Min.)	Drehung	A — x	k · 10 <sup>4</sup>
200 g frische Hefe wurden mit 600 ccm H <sub>2</sub> O während 15 Stunden behandelt	0	7,55	9,97	—
	15	5,60	8,02	63
	24	4,75	7,17	60
	37	3,25	5,67	66
	∞	— 2,42	—	—

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift. Bd. LXX, S. 279, 1910.

Tabelle 5. — Fortsetzung.

Vorbehandlung	Zeit (Min.)	Drehung	A — x	k · 10 <sup>4</sup>
200 g frische Hefe	0	7,55	9,97	—
wurden mit 600 ccm	15	5,28	7,70	75
3%iger KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -	24	4,20	6,62	74
Lösung	35	3,00	5,42	75
während 15 Stunden	∞	— 2,42	—	—
behandelt				
200 g frische Hefe	0	7,55	9,97	—
wurden mit 600 ccm	13	5,72	8,14	68
3%iger (mit KOH	24	4,46	6,88	67
neutralisierter)	34	3,80	6,22	60
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -Lösung	∞	— 2,42	—	—
während 15 Stunden				
behandelt				

In Anbetracht der sich notwendig ergebenden Versuchsfehler muß man sagen, daß die Werte der Konstanten k in der obigen Tabelle 5, sowie auch in der folgenden Tabelle 6 sehr gut übereinstimmen, und zwar in einem ziemlich großen Bereich der Reaktion.

Tabelle 6.

Zeit (Min.)	Drehung	A — x	k · 10 <sup>4</sup>
0	7,55	9,97	—
15	6,02	8,44	48
26	5,10	7,52	47
37	4,26	6,68	47
∞	— 2,42	—	—

Auch in Anbetracht dessen, daß wir hier ein heterogenes System haben, konnte ein so befriedigendes Resultat von vornherein nicht erwartet werden. Jedenfalls wird es möglich, die Dynamik der Inversion in der lebenden Hefe in weitem Umfange festzustellen, was im hiesigen Laboratorium geschehen soll. Die folgenden Versuche zeigen den Einfluß der Konzentration des Zuckers und der zugesetzten Hefemenge.

Tabelle 7 (Einfluß der Konzentration des Rohrzuckers).  
(0,25 g Hefe in 25 ccm Rohrzuckerlösung.)

Gehalt der Rohrzuckerlösung	Zeit (Min.)	Drehung	A - x	k · 10 <sup>4</sup>
8 %	0	3,75	4,95	—
	19	1,00	2,20	185
	30	0,20	1,40	183
	40	-0,28	0,92	183
	∞	-1,20	—	—
16 %	0	7,55	9,97	—
	16	5,26	7,68	71
	25	4,12	6,54	73
	36	3,10	5,52	71
	∞	-2,42	—	—

Das Verhältnis zwischen den Konstanten der 8%igen und der 16%igen Lösung ist  $184 : 72 = 2,55$ .

Es ist von Interesse, hiermit den Einfluß der Zuckerkonzentration zu vergleichen, welchen Hudson<sup>1)</sup> mit einem Invertase-Präparat gefunden hat. Berechnet man aus seinen Zahlen die entsprechenden Inversionskonstanten und interpoliert für unsere Zuckerkonzentrationen (8 und 16%), so erhält man

$$\begin{aligned}
 k \text{ bei } 16\% \text{ Zucker} &= 4 \\
 k \text{ » } 8\% \text{ »} &= 10,5 \\
 \text{Verhältnis:} & \quad 2,6
 \end{aligned}$$

Bei der Unsicherheit der Interpolation kann man die Übereinstimmung dieses Quotienten mit dem von uns erhaltenen 2,55 als vollständig ansehen.

Dieser Einfluß der Konzentration des Substrates, welcher scheinbar den Forderungen der chemischen Dynamik widerspricht, ist bekanntlich so gedeutet worden, daß das Enzym durch das Substrat gebunden wird und mit ihm die aktiven Moleküle bildet. Es scheint nach obigen Versuchen, daß die Invertase der lebenden Hefe in gleichem Maße vom Rohrzucker gebunden wird wie das isolierte Enzym.

<sup>1)</sup> General Amer. Chem. Soc., Bd. XXX. S. 1160 und 1564, 1908

Zum Vergleich geben wir die Gärungsgeschwindigkeiten an, welche wir unter gleichen Bedingungen in den entsprechenden Rohrzuckerlösungen gefunden haben:

0,25 g Hefe	+ 25 ccm	16%	ige Rohrzuckerlösung	gaben in 168 Min.	0,0723 g CO <sub>2</sub>
0,25 „	+ 25 „	16 „	„ „ „	351 „	0,1391 „
0,25 „	+ 25 „	8 „	„ „ „	166 „	0,0726 „
0,25 „	+ 25 „	8 „	„ „ „	345 „	0,1410 „

Berechnet man hiernach die Gärung als eine Reaktion erster Ordnung, so erhält man für die beiden Konzentrationen Konstanten, welche sich sehr angenähert wie 1 : 2 verhalten.

Die durch lebende Hefe hervorgerufene Gärungsgeschwindigkeit nimmt also innerhalb des untersuchten Konzentrationsgebietes mit steigender Konzentration des Rohrzuckers langsamer ab als die Inversionsgeschwindigkeit.

### Einfluß der Hefemenge auf die Inversionsgeschwindigkeit.

Tabelle 8.

In der Tabelle angegebene Gramm Hefe in 25 ccm 16% iger Rohrzuckerlösung.

Gramm Hefe	Zeit (Min.)	Drehung	A - x	k · 10 <sup>4</sup>
0,12	0	7,55	9,97	—
	30	5,72	8,14	29
	45	4,86	7,28	30
	58	4,24	6,66	30
	∞	— 2,42	—	—
0,5	0	7,55	9,97	—
	10	4,80	7,22	(140)
	19	2,70	5,12	152
	30	1,12	3,54	150
	∞	— 2,42	—	—

Es liegen bis jetzt nur die beiden angegebenen Versuchsreihen vor, welche darauf hin zu deuten scheinen, daß in einer gegebenen Zuckerlösung die Inversionsgeschwindigkeit schneller wächst, als die Menge der katalysierenden Hefe. Dieses Ergebnis soll doch durch weitere Versuche geprüft werden. Es

entspricht nicht der Beziehung zwischen Gärungsgeschwindigkeit und Hefemenge, wo J. H. Aberson<sup>1)</sup> eine direkte Proportionalität gefunden hat.

### Einfluß der Temperatur auf die Inversionsgeschwindigkeit durch lebende Hefe.

Tabelle 9.

(0,25 g Hefe in 25 ccm 16%iger Rohrzuckerlösung.)

Temperatur bei der Reaktion	Zeit (Min.)	Drehung	A — x	k · 10 <sup>3</sup>
20°	0	7,54	9,95	—
	25	4,54	6,95	62
	35	3,66	6,07	61
	∞	— 2,41	—	—
30,6°	0	7,54	9,95	—
	20	3,17	5,58	126
	31	1,68	4,09	125
	∞	— 2,41	—	—

Das Verhältnis der Konstanten für 20° und 30,6° ist 2,04 und man findet somit mit sehr großer Annäherung den gleichen Temperaturkoeffizienten,<sup>2)</sup> welcher für Invertasepräparate ermittelt wurde.<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> Rec. Trav. Chim. Pays-Bas., Bd. XXII, S. 78, 1903.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. LXV, S. 124, 1910.

<sup>3)</sup> Die Inversionsgeschwindigkeit wurde außerdem noch unter den gleichen Versuchsbedingungen wie oben und mit der gleichen Hefe bei 8,6° gemessen.

Temperatur bei der Reaktion	Zeit (Min.)	Drehung	A — x	k · 10 <sup>3</sup>
8,6°	0	7,54	9,95	—
	35	5,00	7,41	37
	50	4,22	6,63	35
	∞	— 2,41	—	—

Die Konstante hat hier einen auffallend großen bzw. der Temperaturkoeffizient zwischen 8,6° und 20° einen auffallend kleinen Wert, welcher noch durch weitere Versuche kontrolliert werden soll.

## Einfluß von Protoplasmagiften auf die Inversionsgeschwindigkeit der Hefezellen.

Tabelle 10.

Mischung bei der Invertierung	Zeit (Min.)	Drehung	A — x	k · 10 <sup>4</sup>
1a) 0,25 g frischer Brennerihefe + 20 ccm 20%ige Rohrzucker- lösung + 5 ccm H <sub>2</sub> O + 1 ccm Chloroform. Die Reaktion wurde mit 5 ccm 0,4-n-NaOH abgebrochen	0	7,15	9,44	—
	17	6,25	8,54	26
	25	5,80	8,09	27
	34	5,25	7,54	29
	∞	— 2,29	—	—
1b) Das Gleiche wie oben, aber ohne Zusatz von Chloroform	0	7,15	9,44	—
	17	6,20	8,49	27
	25	5,84	8,13	26
	36	5,30	7,59	26
	∞	— 2,29	—	—
2a) 0,25 g frischer Brennerihefe + 20 ccm 20%iger Rohrzucker- lösung + 5 ccm mit NaOH neutrali- sierter NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -Lösung (5%) + 1 ccm Chloroform. Die Reaktion wurde mit 5 ccm 0,4-n-NaOH ab- gebrochen.	0	7,15	9,44	—
	25	6,02	8,31	22
	35	5,80	8,09	19
	∞	— 2,29	—	—
2b) Das Gleiche wie die letzte, aber ohne Zusatz von Chloroform	0	7,15	9,44	—
	26	6,20	8,49	18
	35	5,76	8,05	20
	∞	— 2,29	—	—

Wie die zwei Paare von Parallelversuchen zeigen, wird die Invertasewirkung der Hefezellen durch Chloroform nicht oder nur unwesentlich geschwächt.<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Wie wir gefunden haben, wird die Gärkraft der Hefe auch durch Saponine — wir haben Cyklamin untersucht — unterdrückt und schließlich aufgehoben. Die Vergiftung der Hefe durch eine solche Substanz fordert, wenn kleine Mengen zur Anwendung kommen, eine gewisse Zeit; die Gärung verschwindet also nicht augenblicklich. Über den Verlauf der Cyklaminwirkung können die folgenden Versuche einen gewissen Anhaltspunkt liefern. (Fortsetzung der Anmerkung s. folg. Seite.)

Auf Grund der erhaltenen Versuchsergebnisse können wir nun folgende Überlegung anstellen.

## I.

In einer vorhergehenden Mitteilung von Euler und af Ugglas<sup>1)</sup> wurde aus dem Umstand, daß Chloroform und Toluol die Gärung der lebenden Hefe sofort hemmen, der Schluß gezogen, daß die Zymase (zum größten Teil wenigstens) mit dem Protoplasma verbunden ist. Im Gegensatz hierzu scheint die Invertase (zum größten Teil) vom Protoplasma unabhängig zu sein.

## II.

Wird Rohrzucker mit Hefe vergoren, so wird nach allgemeiner Annahme der Rohrzucker zunächst invertiert und dann der Invertzucker vergoren. Aus dem Umstand, daß die Gärung des Rohrzuckers ebenso schnell erfolgt, wie diejenige der Glykose und Fruktose, konnte man bereits schließen, daß die Inversion stets erheblich schneller erfolgen muß als die Gärung, da der Zymase immer ein Überschuß von Hexose zur Verfügung zu stehen scheint.

Das Verhältnis zwischen der Wirksamkeit der Zymase und der Invertase wird natürlich je nach der Heferasse, dem Alter und der Vorbehandlung der Hefe innerhalb recht weiter

Gramme CO<sub>2</sub>.

Zeit (Stunden)	I.		Zeit (Stunden)	II.	
	Mit Saponin	Ohne Saponin		Mit Saponin	Ohne Saponin
4	0,0200	0,0520	3	0,0422	0,1155
23	0,0235	0,2454	4,5	0,0480	0,1688
			7	0,0492	0,2405
			20	0,0852	0,6240

In Versuch I betrug die Hefemenge 0,25 g auf 25 ccm Rohrzuckerlösung. Bei Versuch II kam die doppelte Hefemenge zur Anwendung. Die Menge zugesetzten Cyklamins betrug 0,05 g. Es bleibt zu untersuchen, ob die Giftwirkung der Saponine auf Hefen mit der hämolytischen Wirkung dieser Gifte parallel geht. Jedenfalls soll hier diese Wirkung, welche methodisch sehr einfach zu ermitteln ist, näher studiert werden.

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. LXX, S. 279.

Grenzen variieren. Wir haben hier zum erstenmal das Verhältnis der Inversions- und der Gärungsgeschwindigkeit in lebenden Hefen berechnet. Die erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten und ihr Verhältnis sind in der folgenden Tabelle angegeben:

Tabelle 11.

(0,25 g Hefe in 25 ccm Rohrzuckerlösung.)

Gehalt der Rohrzuckerlösung	Angewandte Hefe	Inversionskonstante $k \cdot 10^4$	Gärungskonstante $k \cdot 10^4$	Verhältnis der Konstanten
8	Stockholmer Brauereihefe	322	2.1	153
8	"	384	2.2	175
8	"	392	2.4	163
8	"	368	2.0	184
16	"	86	1.0	86
16	"	94	1.0	94
16	Unterhefe <sup>1)</sup>	74	0.2	370
16	Brennereihefe <sup>1)</sup>	52	0.7	74
16	Oberhefe <sup>1)</sup>	$< 10^{-6}$	0.5	—
16	0.5 g Zymin in 25 ccm Rohrzuckerlösung	180	0.05	3600

Zunächst fällt auf, daß das Verhältnis der beiden enzymatischen Geschwindigkeiten von der Konzentration des Rohrzuckers abhängt; in schwächeren Zuckerlösungen vergrößert sich das Verhältnis sehr erheblich.

Ferner ist darauf hinzuweisen, daß mit der gleichen Heferasse trotz recht verschiedener Vorbehandlung doch ein annähernd gleiches Verhältnis der beiden Geschwindigkeiten erhalten wurde, wie die vier ersten und die beiden darauffolgenden Quotienten der Tabelle 10 zeigen.

In verschiedenen Heferassen scheint sich der berechnete Quotient sehr stark zu ändern, was aus den drei letzten Ver-

<sup>1)</sup> Hefen des Berliner Institutes für Gärungsgewerbe, welche als Preshefen versendet worden waren. Unter- und Oberhefe ohne Bezeichnung. Brennereihefe R XII.



vertase aus frischen Hefezellen und in sehr geringem Grade durch Wasser aufgenommen wird. Immerhin bliebe die Möglichkeit, daß Rohrzuckerlösungen die Invertase zu extrahieren vermöchten. Wir haben deshalb folgenden Versuch angestellt.

0,25 g Hefe werden in 20 ccm 16%iger Rohrzuckerlösung aufgeschlemmt. Nach 15 Minuten wird rasch von der Hefe abfiltriert und der weitere Reaktionsverlauf der klaren Lösung beobachtet. Wäre nun Invertase in der Lösung gewesen, so müßte die Inversion weiter geschritten sein. Das war nicht der Fall. Die optische Drehung der Zuckerlösung betrug:

nach der Filtration:	7,02°
weiteren 20 Minuten:	7,00°

#### IV.

In einer früheren Arbeit wurden Invertasepräparate beschrieben, deren Stickstoffgehalt erheblich geringer war als derjenige zuvor erhaltener Produkte, und deren Wirksamkeit diejenige älterer Präparate bedeutend übertraf. Löste man 0,05 g des Invertasepräparates in 5 ccm 0,5-normaler  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Lösung und setzte 20 ccm 20%ige Rohrzuckerlösung zu, so stellte sich die Drehung 0° bei Zimmertemperatur (20°) in 14 Minuten ein.

Es wurde hieraus der Schluß gezogen, daß in diesem Präparat bereits ein sehr erheblicher Grad der Reinheit erreicht worden sei. Indessen zeigt folgende kleine Rechnung, daß auch dieses Präparat von der absoluten Reinheit noch weit entfernt ist.

Eine mittulgute Hefe invertiert eine 20%ige Rohrzuckerlösung, welcher 0,25 g der wasserhaltigen Hefezellen = 0,10 g trockener Hefe zugesetzt wurden, innerhalb 70 Minuten bis auf die Drehung 0°. Es hatten also 0,10 g Hefe (wasserfreie) eine fünfmal schwächere Wirkung, als 0,05 g unseres Invertasepräparates. Daraus würde sich, unter der Annahme, daß dieses Präparat rein und vollständig aktiv war, ergeben, daß die Hefezellen etwa 10% Invertase enthalten.

Da man aber nicht wohl annehmen kann, daß die Hefe

mehr als höchstens einige Prozente Invertase enthält, so muß es nach dem augenblicklichen Stand der Versuchsergebnisse als wahrscheinlich bezeichnet werden, daß nur ein Bruchteil des früher gewonnenen besten Invertasepräparates aus wirklicher, aktiver Invertase besteht.

## V.

Aus den drei in Tabelle 5 enthaltenen Versuchsreihen geht hervor, daß die Invertasewirkung in lebender Hefe durch eine 15stündige Vorbehandlung mit einer verdünnten Monokaliumphosphatlösung etwa im Verhältnis 6 : 7 gesteigert wird. Dieses Ergebnis steht nicht in Übereinstimmung mit den Zahlen der Tabelle 1, welche mit ähnlich vorbehandelter Hefe erhalten worden waren, die aber nicht frisch zur Anwendung kam, sondern nach Trocknung durch Extraktion untersucht worden war. In diesen Fällen hatte sich nämlich keine Begünstigung, sondern vielmehr eine Schwächung der Invertasewirkung durch die Phosphatbehandlung ergeben. Sowohl hieraus als auch aus den Resultaten der Tabelle 4 muß man den für die Methodik der Enzymuntersuchungen nicht unwesentlichen Schluß ziehen, daß ein durch Trocknung hergestelltes Dauerpräparat zwar qualitativen, aber nicht immer quantitativen Aufschluß über den Enzymgehalt der lebenden Zellen gibt.

Die Hefe wurde uns zu diesen Versuchen von der hiesigen Brauerei St. Erik zur Verfügung gestellt; wir sprechen Herrn Direktor Sven Hydén sowie Herrn Ingenieur F. Hildebrandt unsern Dank aus.