

Über den Temperaturkoeffizienten der Zersetzung von Invertase.¹⁾

Von

Hans Euler und Sixten Kullberg.

Mit einer Kurvenzeichnung im Text.

(Der Redaktion zugegangen am 29. Januar 1911.)

Die vorliegende Mitteilung bildet eine Ergänzung der früheren Untersuchung von H. Euler und Beth af Ugglas.²⁾ Die daselbst beschriebenen Messungen waren mit dem Extrakt getrockneter Brauereihefe ausgeführt. Die Stabilitätskonstante k_E der Formel

$$k_E = \frac{1}{t} \ln \frac{k_0}{k_1} \quad (1)$$

war in der Weise ermittelt worden, daß der wässerige, zur Entfernung der Eiweißkörper mit Kaolin behandelte Extrakt der Trockenhefe direkt auf verschiedene Temperaturen erhitzt und dann zur Inversion der Zuckerlösung verwandt wurde. Bei der Erhitzung befanden sich also gleichzeitig mit der Invertase noch Eiweißkörper, Peptone, Kohlenhydrate und Salze in Lösung, welche die Hitzebeständigkeit der Invertase beeinflussen konnten. Seit dieser Zeit ist es gelungen, aus Autolysesaft sehr wirksame Invertasepräparate darzustellen, von denen wir einen Teil zu den hier mitzuteilenden Versuchen benützt haben.

Versuchsordnung und Berechnung.

0,15 g Invertasepräparat wurden in 25 ccm 0,001 normaler Salzsäure gelöst. Diese Lösung wurde genau eine halbe Stunde bei den untersuchten Temperaturen (57,5°, 60°, 63°, 64°) gehalten, und unmittelbar darauf abgekühlt. Hierauf wurden

¹⁾ Aus Svenska Vet. Akad. Arkiv f. Kemi, Bd. IV, Nr. 9, 1911.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. LXV, S. 124, 1910.

50 ccm 20%ige Rohrzuckerlösung zugefügt, welche vorher im Bade die Temperatur 20° angenommen hatte. Die Inversion ging bei dieser Temperatur vor sich. In geeigneten Zeitintervallen wurden aus der Lösung 10 ccm genommen und sofort in 10 ccm 0,2 normaler Natronlauge einpipettiert, um die Reaktion zum Stillstand zu bringen und die Multirotation der Glukose aufzuheben. Die Untersuchung dieser Lösung im Lippichschen Polarisationsapparat geschah ebenfalls bei 20°. Der Endwert der Drehung wurde aus dem Anfangswert durch Multiplikation mit dem Faktor 0,32 berechnet. Jede Konstante bildet den Mittelwert aus 4—5 Konstanten, welche aus je 3—5 Beobachtungen berechnet sind.

Die folgende Tabelle bezieht sich also auf die Hitzeempfindlichkeit der Invertase in salzsaurer Lösung bei einer H-Ionenkonzentration von etwa $2 \cdot 10^{-4}$. Die Konstanten k sind in zwei Versuchsreihen gewonnen, welche in der 4. Spalte auf einen gemeinsamen Ausgangswert, d. h. eine Reaktionskonstante mit nicht erhitzter Invertaselösung umgerechnet sind. Hieraus ist die Stabilitätskonstante k_E nach Formel (1) ermittelt. In der darauffolgenden Spalte sind die nach der Arrhenius-schen Temperaturformel

$$k_1 = k_0 e^{\frac{A(T_1 - T_0)}{2T_1 T_0}}$$

berechneten Werte von k_E angegeben. Die Konstante beträgt 68000. Die Temperaturangabe in der letzten Zeile ist nicht ganz sicher.

Tabelle 1.

Temperatur	$10^4 k \text{ I}$	$10^4 k \text{ II}$	$10^4 k_{\text{red.}}$	$10^3 k_E$ gefunden	$10^3 k_E$ berechnet
20°	204	150	202	—	—
57,5°	—	130	175	2,1*	2,1
60°	166	—	164	3,5	4,5
63°	94	—	93	11,2*	11,2
(64,3°)	—	22	30	(27,6)	(16,5)

In den früher erwähnten Versuchen von Beth af Ugglas, welche mit Hefenextrakt angestellt worden sind, hatte sich die

Konstante $A = 72000$ ergeben; dieselben waren bei einer Wasserstoffkonzentration von ca. 10^{-6} angestellt worden. Es mag sein, daß der kleine Unterschied zwischen den beiden Werten für A auf der Ungleichheit der Wasserstoffionenkonzentration beruht; vermutlich ist die Differenz durch Versuchsfehler bedingt; kleine Temperaturfehler üben ja hier, wo 1 Grad die Konstante um etwa 50% ändert, einen großen Einfluß aus.

Diejenige Temperatur, bei welcher halbstündiges Erhitzen die Hälfte der Invertase zerstört, liegt in beiden Versuchsserien übereinstimmend bei $63 + 0,2^{\circ}$.

Es zeigt sich also, daß die im wässrigen Extrakt der Trockenhefe anwesenden Eiweißstoffe und Kohlenhydrate auf die Hitzebeständigkeit der Invertase keinen oder nur einen sehr geringen Einfluß ausüben, sofern man dafür sorgt, daß die Konzentration der Wasserstoffionen die gleiche ist. Eiweißstoffe können also sicher nicht allgemein als Schutzstoffe für Enzyme betrachtet werden. Wenn, wie z. B. nach den Befunden von Bayliss und Vernon die Hitzebeständigkeit des Trypsins durch Eiweißstoffe stark erhöht wird, so ist dies eine spezielle Eigenschaft entweder gerade dieses Fermentes oder der proteolytischen Enzyme, wo die Eiweißstoffe das Substrat bilden.

Über die schützende Wirkung der Kohlenhydrate speziell auf Invertase liegen Angaben von A. Mayer,¹⁾ Jodlbauer²⁾ und C. S. Hudson³⁾ vor, und zwar hat A. Mayer Rohrzucker untersucht, Jodlbauer und Hudson besonders Fruktose. Hudsons Arbeit entnehmen wir die Zahlen, welche sich auf die Schutzwirkung der Fruktose gegenüber der Zerstörung der Invertase in destilliertem Wasser beziehen.

Konzentration der Fruktose in Prozent	Relative Zerstörung
0,0	100
2,7	32
5,4	16
10,9	24

¹⁾ Enzymologie, Heidelberg 1882.

²⁾ Biochemische Zeitschr., Bd. III, S. 482, 1907.

³⁾ Journ. Amer. Chem. Soc., Bd. XXXII, S. 998, 1910.

Unsere Versuche beziehen sich auf Lactose.

1 g Milchzucker wurde in 25 ccm 0,001 normaler Salzsäure gelöst und zu dieser Lösung wie früher 0,15 g Invertasepräparat zugesetzt, worauf die halbstündige Erwärmung auf höhere Temperatur, 64° geschah. Nach Abkühlung wurden wie immer 50 ccm Rohrzuckerlösung zugegeben.

Wir erhielten die Konstante: $k \cdot 10^4 = 31,5$; $k \cdot 10^4 \text{ red.} = 52,59$
Der Parallelversuch ergab: $k \cdot 10^4 = 121$; $k \cdot 10^4 \text{ red.} = 202$.

Die Invertase wird also in Gegenwart von 4% Lactose durch halbstündiges Erhitzen auf 64° im Verhältnis 100 : 26 geschwächt. In Abwesenheit der Lactose tritt, wie sich aus der Figur S. 139 leicht entnehmen läßt, die gleiche Schwächung bei etwa 64,4° auf. Die Schutzwirkung der Lactose ist also sehr gering.

Die viel stärkere Schutzwirkung der Fruktose läßt sich in derselben Weise deuten wie diejenige des Rohrzuckers bzw. überhaupt eines Substrates auf das entsprechende Enzym: man nimmt an, daß dasselbe in seiner hypothetischen Verbindung mit dem Substrat weniger leicht zerstört wird als in freiem Zustand, und bei der (ebenfalls hypothetischen) Verbindung zwischen Enzym und Reaktionsprodukt kann man die gleiche erhöhte Stabilität vermuten.

Die Schutzwirkung des Rohrzuckers auf Invertin findet man in allen Lehrbüchern und sonstigen Darstellungen der Enzymologie erwähnt, und stützen sich diese Angaben darauf, daß die «Optimaltemperatur» der enzymatischen Inversion höher liegen soll, als der «Tötungstemperatur» des Enzyms in wässriger Lösung entspricht. Wie der eine von uns schon früher betont hat, sind «Optimaltemperatur» und «Tötungstemperatur» schlecht definierte Begriffe. Eine Optimaltemperatur ist ganz davon abhängig, welches Stadium der Reaktion man ins Auge faßt. Das Optimum liegt offenbar tiefer, wenn man die Zeiten vergleicht, in welcher die Inversion zur Hälfte abgelaufen ist, als wenn man nur etwa das erste Fünftel der Reaktion berücksichtigt. Als «Tötungstemperatur» möchte ich vorschlagen, diejenige anzugeben, bei welcher in 30 Minuten¹⁾ die Wirk-

¹⁾ Die Zeit 30 Minuten scheint mir geeigneter als die früher vor-

samkeit des Enzyms (gemessen durch die Reaktionskonstanten k) um die Hälfte sinkt.

Wie man nun auch die Optimaltemperatur bestimmt, so sollte man vermuten, daß dieselbe erheblich über derjenigen Temperatur liegt, bei welcher in 30 Minuten erst 1,5% des Enzyms zerstört werden. Dies trifft bei Invertase bei etwa 58° zu. Nun liegt den meisten Angaben zufolge die Optimaltemperatur bei $52-56^{\circ}$ (vgl. z. B. Lafar, Technische Mykologie IV, S. 410), und wie wir uns selbst überzeugt haben, liegt die Optimaltemperatur unter 59° .

Die Schutzwirkung Rohrzuckerinvertase ist also jedenfalls schwach. Bei anderen Enzymen scheinen die Schutzwirkungen sowohl des Substrates als anderer Kohlenhydrate, den Literaturangaben nach, stärker zu sein, so z. B. bei der kürzlich von Wohl und Glimm¹⁾ untersuchten Amylase.

Da unsere Invertasepräparate ca. 2% Asche enthielten, welche zum größten Teil aus Phosphaten bestand, so haben wir auch den Einfluß von Phosphat auf die Wärmeempfindlichkeit der gereinigten Invertase untersucht. Es erschien uns möglich, daß die Phosphorsäure, deren Zugehörigkeit zur Invertase noch zweifelhaft ist, an der Rohrzuckerspaltung in irgend einer Weise wesentlich beteiligt sei, und in diesem Falle liegt es nahe, eine Schutzwirkung von zugesetztem Phosphat gegen die Hitzezerstörung zu vermuten.

Es wurden nun jedesmal 0,15 g Invertasepräparat zu 25 ccm 0,5 molekularnormaler Lösung von NaH_2PO_4 zugegeben; diese Lösung wurde 30 Minuten auf die Versuchstemperatur erwärmt. Hierauf wurde wie S. 135 beschrieben verfahren. Konzentration der H-Ionen: 10^{-4} .

Die Resultate sind aus der folgenden Tabelle ersichtlich.

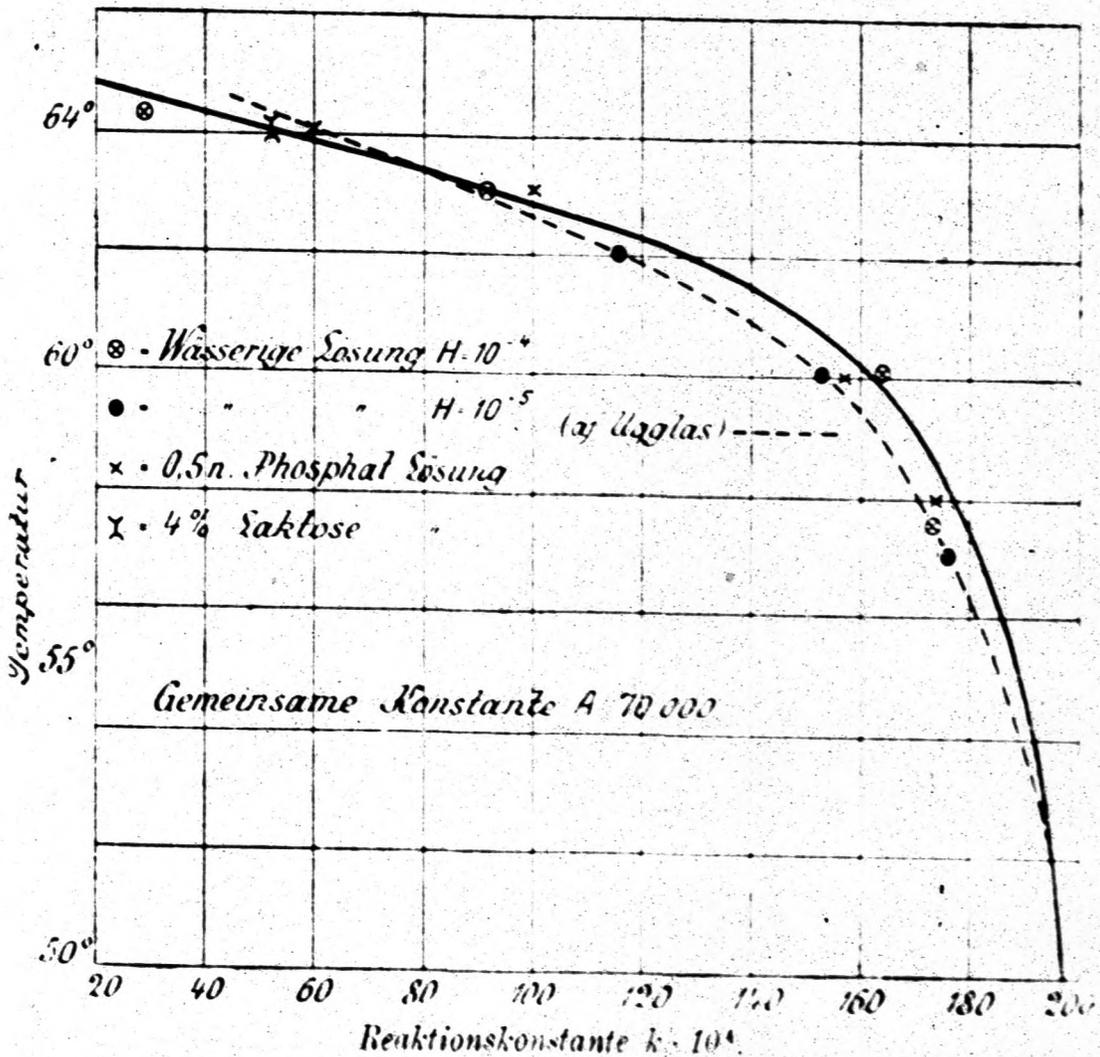
Man ersieht aus der Konstanten $A = 70310$, den Zahlen der Tabelle und aus folgender Kurve, daß der Verlauf der Hitzeinaktivierung in der phosphathaltigen Lösung fast vollständig mit demjenigen in der phosphatfreien Lösung und im geschlagene Zeit 15 Minuten, da in letzterem Falle die Fehler der Zeitmessung allzusehr ins Gewicht fallen.

¹⁾ Biochemische Zeitschrift, Bd. XXVII, S. 365, 1910.

Extrakt der Trockenhefe zusammenfällt. Wir erhielten aus den Zahlen der Tabelle 1 die Konstante $A = 68000$; in der Arbeit von Euler und af Ugglas wurde die Konstante $A = 72000$ gefunden; der Mittelwert der beiden Serien 70000 stimmt ausgezeichnet mit dem Ergebnis der Tabelle 2. 70310.

Tabelle 2.

Temperatur	$10^4 k$	$10^3 k_F$ gefunden	$10^3 k_F$ berechnet	
20	202	—	—	
54	190	0.9	0.6	
57	178	1.8	1.5	$A = 70310$
58	175*	2.1	2.1	
60	158	3.6	4.0	
63	100*	10.2	10.2	
64	60	17.6	19.9	



Wir können der Figur das Resultat entnehmen, daß die Konstante A, die Stabilitätskonstante bei bestimmter Temperatur und speziell die «Tötungstemperatur», wie sie oben definiert wurde, bei gegebenen Konzentrationsgrenzen der Wasserstoffionen (10^{-6} bis 10^{-4}) genau bestimmbare Größen sind, sehr wenig abhängig von der Anwesenheit derjenigen Stoffe, welche mit der Invertase aus der Hefe extrahiert werden.

Nach den sehr schwankenden Angaben der Literatur war dieses Ergebnis nicht zu erwarten gewesen. Als Beispiel führen wir nur die Zahlen sonst so zuverlässiger Forscher wie A. Mayer und O'Sullivan und Tompson an.

	Optimal- temperatur	Tötungs- temperatur
A. Mayer	44—48	51°
O'Sullivan u. Tompson	55—60	75°

Infolgedessen wird auch in den Lehrbüchern nunmehr meist hervorgehoben, daß auf Grund von Verschiedenheiten in der Temperaturempfindlichkeit Enzymarten sich nicht differenzieren lassen, und andererseits hat man auf Grund dieser Ergebnisse nicht gewagt, genaue Messungen des Temperatureinflusses an einem Enzymmaterial anzustellen.

In verschiedenen Kompendien der Enzymologie findet man die (offenbar unrichtige) Angabe, daß die Optimaltemperatur für die Invertase der Oberhefe um 25° höher liegt als die entsprechende Temperatur der Unterhefe. Dieser Umstand erböte, wenn er wirklich zuträfe, ein erhebliches, praktisches und theoretisches Interesse.

Zunächst würde man in diesem Fall zur Reindarstellung der Invertase von Oberhefe ausgehen, deren Invertase infolge ihrer größeren Stabilität erhebliche Vorteile gewähren würde.

Da ferner durch die vorhergehenden Messungen gezeigt ist, daß entgegen den bisherigen Annahmen die Stoffe, welche die Invertase im Hefenextrakt begleiten, höchstens einen sehr geringen Einfluß auf die Wärmeempfindlichkeit besitzen, d. h. die Inaktivierungstemperatur keinesfalls um 1 Temperaturgrad verschieben, so würde man aus der obigen Verschiedenheit der Optimaltemperaturen den Schluß ziehen können, daß in

Ober- und Unterhefe zwei verschiedene Invertasen oder wenigstens Invertase-Systeme¹⁾ vorkommen, welche sich in chemischer Hinsicht unterscheiden. In der Tat ist dieser Schluß auch gezogen worden. «Diese Verschiedenheit», schreibt Effront,²⁾ «kann man als eine Anpassung der Hefe an die Lösung, in welcher sie arbeitet, deuten, und aus dieser Anpassung ist die Bildung verschiedener Enzyme bei verschiedener Temperatur zu folgern.» Ähnlich äußert sich Oppenheimer,³⁾ nach welchem in obigem Fall eine «typische Anpassung der Enzyme vorliegt».

Wir haben die erwähnten Angaben einer Prüfung unterzogen und also an obergäriger Hefe die gleichen Messungen angestellt wie an untergäriger. Für die Überlassung der Hefe sind wir der hiesigen Bjurholms-Bryggeri sowie Grönwalls Bryggeri zu Dank verpflichtet.

Die Versuchsanordnung war durchaus die gleiche wie früher. Die Oberhefe aus Porter-Brauereien ist weniger leicht auszuwaschen wie gewöhnliche Unterhefe, wodurch die Genauigkeit der Resultate etwas beeinflußt wurde. Wir fanden, daß bei 66° die Invertase durch halbstündiges Erhitzen schon so gut wie vollständig vernichtet worden war, und ermittelten bei 60° die Konstante $k \cdot 10^4 = 100$, während der Parallelversuch mit nicht erhitzter Invertase den Wert 123 lieferte. Es berechnet sich hieraus die Stabilitätskonstante $10^3 k_F = 3.0$ für 60°: dieselbe beträgt nach den oben mitgeteilten Versuchen 3,5 und 3,6 und nach den Versuchen von B. af Ugglas 4,0. Hiernach beträgt der Unterschied der Thermostabilität zwischen Ober- und Unterhefe weniger als 1 Grad und liegt also innerhalb der hier allerdings sehr großen Versuchsfehler.⁴⁾

¹⁾ Als «Enzym-System» hat der eine von uns die Gesamtheit derjenigen Stoffe bezeichnet, welche an der Enzymwirkung wesentlich beteiligt sind, also Enzym, Aktivator, Antiaktivator usw.

²⁾ Die Diastasen. Deutsch von Bücheler. Leipzig 1900.

³⁾ Die Fermente u. ihre Wirkungen. 3. Aufl. Spezieller Teil, S. 36.

⁴⁾ Die Inversionsversuche mit dieser invertasearmen Hefe wurden bei 40° ausgeführt: die Konstanten sind dann auf 20° umgerechnet worden. Vgl. übrigens auch die Messungen von Kjeldahl (Medd. fra Carls-

Anhaltspunkte für eine chemische Veränderung der Hefeninvertase durch «Anpassung» liegen also tatsächlich bis jetzt nicht vor, und wir müssen also einstweilen annehmen, daß in *Saccharomyces Cerevisiae* nur eine, und zwar in den verschiedenen Rassen dieselbe Invertase enthalten ist.¹⁾

berg-Lab. 1881, S. 333), wonach das Optimum der Oberhefe über demjenigen der Unterhefe liegt.

¹⁾ Auch die übrigen Literaturangaben über die «Anpassungen» von Enzymen an Temperaturen scheinen uns sehr zweifelhaft, abgesehen von den Fällen, wo bei verschiedenen Temperaturen im Organismus verschiedene Substrate zu spalten sind, wie etwa durch Pepsin warmblütiger und kaltblütiger Tiere.