

## Versuche zur Reindarstellung der Invertase.

Von

Hans Euler und Sixten Kullberg.

(Aus dem biochemischen Laboratorium der Hochschule Stockholm.)

(Der Redaktion zugegangen am 24. Juni 1911.)

Bei allen im folgenden mitzuteilenden Versuchen wurde die Invertase nach dem Vorgang von O'Sullivan und Tompson<sup>1)</sup> aus autolyzierter Hefe gewonnen. Im allgemeinen überließen wir die Hefe (untergärrige Bierhefe der hiesigen St. Eriksbrauerei)<sup>2)</sup> der Autolyse während einer Zeit von 10 Tagen bis 2 Monaten und zwar stets unter Zusatz von Toluol.

Bei einer früheren im hiesigen Laboratorium ausgeführten Untersuchung<sup>3)</sup> über Hefe-Invertase war genau die Vorschrift von O'Sullivan und Tompson eingehalten worden. Die Arbeitsweise war also damals die folgende:

Der Autolysesaft wurde zuerst mit soviel 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 250—300 ccm Wasser digeriert, wobei die Invertase in Lösung geht, während ein Teil der Eiweißstoffe ungelöst bleibt. Setzt man nun soviel Alkohol zu, daß die Lösung daran 28%ig wird, so fallen Eiweißstoffe, während die Invertase in Lösung bleibt. Man filtriert nach einiger Zeit von diesen ab und macht nun die Lösung durch weiteren Alkoholzusatz wieder 47%ig, wodurch das Invertasepräparat in schleimigem Zustand erhalten wird.

Gleich zu Anfang unserer Versuche hat sich nun gezeigt, daß bei diesem Verfahren die Invertase durch die erforderliche

<sup>1)</sup> Journ. Chem. Society, Bd. 57, S. 834, 1890.

<sup>2)</sup> Herrn Direktor Sven Hydén und Herrn Ingenieur Hildebrandt sprechen wir für die Überlassung und Kontrolle der Hefe unsern besten Dank aus.

<sup>3)</sup> Euler, Lindberg u. Melander, Diese Zeitschrift, Bd. 69, S. 152, 1910.

lange Berührung mit dem Alkohol sehr erheblich geschwächt wird.<sup>1)</sup> Da sich ferner gezeigt hat, daß bei der Herstellung der 28%igen Alkohollösung nach obiger Vorschrift ein beinahe ebenso wirksames Präparat erhalten wird wie später bei der Herstellung der 47%igen Lösung, so haben wir zunächst diese Fraktionierung verlassen und statt derselben direkt die Fällung aus einer 50%igen Lösung vorgenommen. Die Methode war Mischung des Autolysesaftes mit dem gleichen Volumen Alkohol, Auflösung der Fällung in Wasser, erneute Herstellung einer etwa 50%igen Alkohollösung und möglichst beschleunigtes Verreiben des Niederschlages mit absolutem Alkohol. Vor der zweiten Alkoholfällung wurde die wässrige Lösung ein oder mehrmals mit Kaolin behandelt, um Eiweißkörper zu entfernen.

In dieser Weise ist der folgende Versuch ausgeführt, welcher ein Präparat ergab von der Aktivität:  $+ 0^{\circ} = 25$  Min.

Die Untersuchung der Wirksamkeit geschah, wie in der früher erwähnten Mitteilung (l. c., S. 160) beschrieben ist, in folgender Weise:

0,05 g Invertasepräparat wurden in 5 ccm 5%iger  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Lösung gelöst und mit 20 ccm 20%iger Rohrzuckerlösung versetzt. Nach gewissen Zeiten wurde die Reaktion mit 5 ccm ca. 2-normal-NaOH abgebrochen.

Durch besondere Versuche haben wir uns davon überzeugt, daß es nicht erforderlich ist, jedesmal die optimale Säurekonzentration besonders ausfindig zu machen, wie dies O'Sullivan und Tompson getan haben. Es hat sich nämlich die gleiche Inversionsgeschwindigkeit ergeben, unabhängig davon, ob wie im obigen Fall die Invertase in 5%iger  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Lösung oder aber in einer 1 oder 2%igen Lösung des gleichen Salzes oder endlich in einer 0,001-normal-HCl-Lösung sich befand.

Die obige Methode kann geeignet so abgeändert werden, daß der Autolysesaft direkt mehrmals mit Kaolin behandelt, und erst dann mit dem gleichen Volumen Alkohol versetzt wird. Durch ein solches Verfahren erhielten wir direkt ein Präparat von der Aktivität:  $+ 0^{\circ} = 20$  Min. Um uns davon

<sup>1)</sup> Diese Schwächung ist durch Hudson (Journ. Amer. Chem. Soc. Bd. 32, S. 1350, 1910) eingehend studiert worden.

zu überzeugen, ob Kohle zu Entfernung von Eiweißstoffen aus Autolysesaft angewendet werden kann, wurden die folgenden Versuche ausgeführt.

Durch kolloidales Eisen werden bekanntlich Eiweißkörper quantitativ aus wässrigen Lösungen entfernt (Michaelis und Rona). Werden Lösungen von Rohinvertase mit kolloidalem Eisen behandelt, so geht ein Teil der Invertase in die Fällung. Es bestand nun die Möglichkeit, in eiweißarmen Lösungen eine Abscheidung der Invertase von den übrigen Bestandteilen der Lösung in der Weise vorzunehmen, daß man den mit kolloidalem Eisen erhaltenen Niederschlag mit Wasser oder verdünnten Säuren digeriert und dadurch zu einer Lösung gelangte, welche an Invertase stark angereichert war. Wie wir gleich mitteilen wollen, hatte diese Methode nicht den gewünschten Erfolg. Es beruht dieses negative Ergebnis hauptsächlich darauf, daß das Eintreten der Fällung in hohem Grade von der Gegenwart der zufällig in der Lösung vorhandenen Stoffe, besonders Elektrolyte, abhängig ist. Wie wir später gefunden haben, geben Lösungen weitgehend gereinigter Invertasepräparate überhaupt keine Fällung mit kolloidalen Eisenlösungen.

Immerhin wurden in dieser Weise Lösungen erhalten, welche ein recht wirksames Präparat enthielten. 100 ccm Lösung, enthaltend 5 g Rohinvertase, wurden mit 15 ccm kolloidaler Eisenlösung vollständig gefällt. Diese Fällung wurde zuerst mit 100 ccm destilliertem Wasser behandelt, wobei nur wenig Invertase in Lösung ging und hierauf mit 20 ccm 0,05-n-HCl versetzt. Nach dem Abfiltrieren wurde mit Natronlauge neutralisiert und die Lösung wie üblich auf ihre Wirksamkeit geprüft.

$$+ 0^{\circ} = 20 \text{ Min.}$$

5 ccm dieser Lösung enthielten 0,0148 g organische Substanz. Hieraus berechnet sich für die übliche Konzentration von 0,05 g Substanz die Aktivität:  $+ 0^{\circ} = 5,6 \text{ Min.}$

Trotz der hohen Aktivität der so erhaltenen Präparate empfiehlt sich diese Methode zur Darstellung größerer Mengen nicht, und zwar wegen den geringen Ausbeuten an Invertase und wegen der erwähnten Empfindlichkeit der Fällung gegen gleichzeitig in Lösung befindlicher Stoffe.

Weit geeigneter zur Darstellung größerer Mengen wirksamer Invertasepräparate erwies sich eine Kombination der Enteiweißung mit Bleiacetat und mit Kaolin und darauf folgende Fällung mit Alkohol.

Wir verfahren also in folgender Weise:

Etwa 500 ccm Autolysesaft (gewonnen durch 12tägige Autolyse von 2 kg gepreßter Brauereihefe) wurden mit einer konzentrierten Lösung von 70 g Bleiacetat gefällt. Vor dem Abfiltrieren wurde die ganze Masse mit Kaolin verrieben, worauf die Mutterlauge abgesogen wurde. Dieselbe wurde nun mit Schwefelwasserstoff gesättigt, um das Blei zu entfernen. Das Absaugen des Schwefelbleis wurde durch Zusatz von Kaolin erleichtert. Das Filtrat wurde mit wenig Kohle<sup>1)</sup> und hierauf dreimal mit größeren Mengen Kaolin verrieben. Schließlich wurde mit Alkohol gefällt, wodurch 7,7 g eines reinweißen Pulvers erhalten wurden. Aktivität:  $+ 0^{\circ} = 12$  Min.

#### Untersuchung der gereinigten Invertasepräparate.

In der erwähnten vorläufigen Mitteilung («Zur Kenntnis der Invertase») wurde angegeben, daß das aktivste Präparat einen Stickstoffgehalt von 0,36% besaß. Die in der vorliegenden Untersuchung erhaltenen wirksamsten Präparate waren durchweg wirksamer als die früheren, aber enthielten bedeutend mehr Stickstoff, im Mittel 4,65%.

0,5636 g Substanz gaben 22,9 ccm N (20,1° und 753,6 mm Hg),

0,6796 g Substanz gaben 0,0190 g Asche.

Also gefunden:

$$N = 4,59\%$$

$$\text{Asche} = 2,80\%$$

$$\text{Aktivität: } + 0^{\circ} = 12 \text{ Min.}$$

0,5126 g Substanz gaben 21,7 ccm N (21,8° und 751,3 mm Hg).

Also gefunden:

$$N = 4,72\%$$

$$\text{Aktivität: } + 0^{\circ} = 12\frac{3}{4} \text{ Min.}$$

<sup>1)</sup> Durch Zusatz von mehr Kohle wird die Aktivität des Präparates erheblich verringert.

Der größere Stickstoffgehalt unserer Präparate gegenüber den in hiesigem Laboratorium früher erhaltenen beruht vermutlich darauf, daß der von uns angewandte Autolysesaft infolge von länger fortgesetzter Autolyse mehr Aminosäuren oder Polypeptide enthielt, als das frühere Ausgangsmaterial. Daß unsere Präparate vollständig eiweißfrei waren, ist schon nach der Art ihrer Darstellung sehr wahrscheinlich. Dieses Resultat ist noch dadurch sichergestellt, daß weder mit kolloidalem Eisen noch mit Bleiacetat Fällung erhalten wurde.

Wesentlich für die Beurteilung des Stickstoffgehaltes ist ferner die Tatsache, daß aus einem Invertasepräparat ein großer Teil des Stickstoffs durch Diffusion entfernt werden kann, wie der Versuch S. 343 zeigt.<sup>1)</sup>

Ein Präparat, welches die Wirksamkeit  $+ 0^{\circ} = 12,5$  Min. und den Stickstoffgehalt 4,59% N zeigte, verlor durch freie Diffusion so viel stickstoffhaltige Verunreinigung, daß die Wirksamkeit jetzt

$$+ 0^{\circ} = 10,0 \text{ Min.}$$

und der Stickstoffgehalt: 1,85% N

betrug. Damit ist aber noch nicht alles als zufällige Beimengung anwesender Stickstoff aus dem Präparate entfernt worden. Die Reinigung kann auf diesem Wege noch fortgesetzt werden, was im hiesigen Laboratorium auch geschehen soll.

Der größte Teil des vorhandenen Stickstoffs ist in unseren Präparaten in Form nicht flüchtiger Verbindungen anwesend, aus welchen der Stickstoff durch Säuren und Alkalien nur in sehr geringem Grade abgespalten werden kann.

1,3753 g Invertasepräparat (Aktivität:  $+ 0^{\circ} = 12\frac{3}{4}$  Min.) wurden in etwa 1 mm Natronlauge gelöst und destilliert. Die dabei übergegangene Menge Base entsprach 2,22 ccm 0,2015-n-Natronlauge. Unter Annahme, daß aller Stickstoff in Form von Ammoniak übergegangen war, entspricht der obige Wert einem Gehalt von 0,0063 g N. Somit enthielt das Invertase-

<sup>1)</sup> Über die Zusammensetzung und chemische Natur der Invertase Vermutungen zu äußern, halten wir noch verfrüht. Die Ergebnisse und Schlüsse von A. P. Mathews und T. H. Gleen (Journ. Biol. Chem., Bd. 9, S. 29, 1911) können wir durchaus nicht bestätigen.

präparat, dessen Gesamtstickstoffgehalt 4,72% betrug, 0,46% durch Alkali austreibbaren Stickstoff.

Durch Kochen der Substanz in 2-normaler Salzsäure konnten keine Basen in Freiheit gesetzt werden, denn bei der darauffolgenden Destillation mit Natronlauge wurde nur die gleiche Menge Ammoniak übergetrieben wie bei dem vorhergehenden Versuch. (Ein Präparat von Gesamtstickstoffgehalt 4,59% enthielt 0,5% überdestillierbaren Stickstoff.)

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß der Stickstoffgehalt unseres Präparates im wesentlichen von anwesenden Monoaminosäuren herrührt.

### Versuche zur Bestimmung des Molekulargewichts der Invertase.

Die einzige Methode, welche sich zur Bestimmung des Molekulargewichts hochmolekularer Körper eignet, beruht auf dem Zusammenhang zwischen Molekulargewicht und Diffusionsgeschwindigkeit. Nach der von dem einen von uns aufgestellten Beziehung<sup>1)</sup>

$$\sqrt{M} \cdot k = \text{konst.}$$

läßt sich M aus der Diffusionskonstante berechnen, und an hochmolekularen Stoffen sind solche Bestimmungen von Arrhenius, Öholm und Herzog ausgeführt worden. Zur Ausführung der Diffusionsbestimmungen wurden Apparate verwendet, wie sie schon früher im physikalischen Institut der hiesigen Hochschule angewandt worden waren.<sup>2)</sup>

In diesen Apparaten ruht die unterste Schicht, welche den diffundierenden Körper enthält, auf Quecksilber. Eine Unterlage aus einer mit Wasser nicht mischbaren, indifferenten Flüssigkeit ist notwendig, um der ganzen Diffusionsflüssigkeit eine rein zylindrische Form geben zu können, wie dies für die Berechnungen von Stefan vorausgesetzt wird. Dieser Umstand veranlaßte bei unseren Versuchen Störungen besonderer Art. Während sich nämlich die Lösungen unserer Invertase-

<sup>1)</sup> H. Euler, Wiedemanns Annalen, Bd. 63, S. 273, 1897. Wiedemann-Jubelband.

<sup>2)</sup> W. Öholm, Zeitschrift f. physik. Chem., Bd. 50, S. 309, 1904.

präparate in Chloroform- oder Toluolwasser innerhalb der erforderlichen Diffusionszeit von etwa 10 Tagen beinahe unverändert erhielten, werden diese Lösungen in Berührung mit einer Quecksilberschicht sehr erheblich geschwächt. 20 ccm Invertaselösung befanden sich in einem Kolben über einer Quecksilberoberfläche von ca. 8 qcm: innerhalb 4 Tagen wurde die Aktivität der Lösung im Verhältnis 360 : 160 vermindert.<sup>1)</sup>

Wir mußten deshalb eine andere Flüssigkeit wählen und ersetzen also das Quecksilber durch Chloroform. In besonderen Versuchen, bei welchen Invertaselösungen über mit Wasser gesättigten Chloroform sich befanden, wurden folgende Werte für die Aktivität der Lösungen gefunden:

Zeit:	0 Tage	4 Tage	10 Tage
Reaktionskonstante I:	370	370	315
Reaktionskonstante II:	370	—	285

Gleichzeitig mit den Chloroformversuchen wurden einige Versuche in der Weise angestellt, daß der untere nicht zylindrische Teil der Apparate mit gereinigtem Sand gefüllt wurde. In dieser Weise gelang es, während der Dauer der Diffusion eine Schwächung der Invertase auszuschließen, indessen treten bei der Entnahme der Schichten Störungen ein. Die drei wässerigen Schichten über der Lösung wurden wie diese selbst mit Chloroform gesättigt. Die Konzentration der invertasehaltigen Schichten wurde durch die Messung ihrer Aktivität (also der durch sie hervorgerufenen Inversionsgeschwindigkeiten) bestimmt. Wie besonders festgestellt wurde, ergab sich bei unseren Präparaten eine weitgehende Parallelität zwischen Konzentration und Aktivität (vgl. Seite 344).

Die einzelnen Schichten wurden in kleine Meßkölbchen abpipettiert und die Untersuchung ihres Inhalts, also die Mes-

<sup>1)</sup> Die Schwächung, welche die Invertase oder überhaupt ein Enzym in wässriger Lösung mit der Zeit erfährt, beeinflusst das Ergebnis der Diffusionsversuche natürlich in hohem Grade. Es muß, damit diese Fehlerquelle nicht zu groß wird, die Versuchsanordnung so gewählt werden, daß eine möglichst kleine Diffusionszeit erforderlich wird. Daß es bei solchen Versuchen auch auf die Reinheit des Enzympräparates ankommt, braucht kaum hervorgehoben zu werden.

sung der durch diese Lösungen hervorgerufenen Inversionsgeschwindigkeit, geschah unter Zusatz von Mononatriumphosphat in ähnlicher Weise wie die Untersuchung der festen Präparate. Aus den so erhaltenen Reaktionskonstanten wurden dann mit Hilfe der von Kawalki<sup>1)</sup> angegebenen Tabelle die Werte für  $x = h^2 : k \cdot t$  und daraus die Diffusionskonstanten ermittelt.

Von vielen ausgeführten Diffusionsversuchen führen wir den folgenden an, bei welchem Chloroform als Grundflüssigkeit angewandt worden war. Trotz der während der 10 tägigen Versuchsdauer eingetretenen Schwächung war dieser Versuch am freiesten von Störungen und dürfte also das richtigste Resultat geliefert haben.

In der folgenden Tabelle ist für jede Schicht die entsprechende direkt gemessene Reaktionskonstante angegeben. Daneben die Zahlen dieser Spalte umgerechnet unter der Voraussetzung, daß die Summe 10000 ist, ferner die Versuchszeit und die halbe Höhe  $h$  einer Schicht. Unter der Rubrik  $x$  stehen die aus Kawalkis Tabellen berechneten Werte von  $h^2 : k \cdot t$ ; daraus ist der in der nächsten Spalte verzeichnete Diffusionskoeffizient  $k$  berechnet und schließlich aus der konstanten Konstante  $= k \cdot \sqrt{M}$ , welchen der eine von uns (Euler) früher zu 6,0 (17°) bestimmt, hat das Molekulargewicht  $M = 27000$  ermittelt.

Schicht	Reaktionskonstante $= k \cdot 10^4$	$k \cdot 10^4$ red.	Zeit Tage	$h$ cm	$x$	Diffusionskoeffizient	Molekulargewicht
I	222	7663	9,92	0,731	1,44	0,037	27000
II	65	2244			1,44		
III	2,7	93			(1,51)		
IV	0	0			—		

Temperatur = 17°.

Bei diesen Versuchen erfolgte die Diffusion der Invertase in neutraler Lösung. Die Untersuchung soll durch Messung

<sup>1)</sup> Wiedemanns Ann., Bd. 52, S. 185, 1894.



der Diffusionsgeschwindigkeit der Invertase in saurer Lösung ergänzt werden.

Es soll darauf hingewiesen werden, daß in der untersten Schicht der Diffusionsapparate das Verhältnis zwischen Aktivität und Gehalt der Lösung günstiger ist als in der ursprünglichen Lösung.

Diffusionszeit Tage	k gef.	k berechn.	Rückstand	Aktivität: + 0" Minuten
0	380	—	0,05	12½
7	292	236	0,031	10,1
4	360	292	0,0385	10,14

Schließlich sei ein Versuch angeführt, bei welchem sowohl die Wirksamkeit als der Stickstoffgehalt des Präparates untersucht wurde.

Wir schichteten eine Lösung, welche 1 g Invertasepräparat in 20 ccm enthielt, unter die dreifache Menge Wasser und ließen bei 16° die Diffusion vorsichgehen. Das Resultat ergibt sich aus der folgenden Zusammenstellung:

	Aktivität Min.	g Substanz in 21 ccm	N-Gehalt in %
Bei Beginn der Diffusion	+ 0 = 12,5	1,00	4,59
Nach 4,6 Tagen	+ 0 = 10,0	0,58	1,85

Durch die mehrtägige Diffusion sind offenbar hauptsächlich Verunreinigungen von relativ niedrigem Molekulargewicht aus der Lösung entfernt worden, deren Aktivität dadurch um etwa 25% zugenommen hat.

Zur Reinigung von Invertasepräparaten oder Enzympräparaten, überhaupt von Beimengungen inaktiver Stoffe, läßt sich mit Erfolg die freie Hydrodiffusion verwenden, sofern die Beimengungen ein relativ niedriges Molekulargewicht besitzen.

#### Zur chemischen Dynamik der Invertasewirkung.

Mit einem unserer reinsten Präparate haben wir Versuche angestellt über die Proportionalität zwischen der Konzentration einer Lösung an unserem Präparat und der Wirksamkeit.

Mit 1 g Präparat wurde eine 5%ige wässrige Lösung hergestellt, welche mit Wasser weiter verdünnt wurde. Jede der so gewonnenen Verdünnungen wurde in bezug auf  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1%ig und in bezug auf Rohrzucker 16%ig gemacht.

Invertase in 25 ccm		Reaktions- konstante $k \cdot 10^4$	Invertase- konzentration $\times k \cdot 10^4$
Absolut in g	Relativ		
0,05	1	440	440
0,025	1 : 2	213	426
0,0045	1 : 11	40	440
0,0024	1 : 21	20	420

Es zeigt sich also eine ausgedehnte und vollständige Proportionalität zwischen Enzymgehalt und Wirksamkeit. Dieses Ergebnis steht in sehr guter Übereinstimmung mit den Resultaten der exakten Versuche, welche vor einiger Zeit Hudson<sup>1)</sup> angestellt hat.

<sup>1)</sup> Journ. Amer. Chem. Soc., Bd. 30, S. 1160 und 1564, 1908.