

Untersuchungen über die chemische Zusammensetzung und Bildung der Enzyme.

V. Mitteilung.

Zur Kenntnis der Invertasebildung.

Von

Hans Euler und Hermann Meyer.

Mit sechs Kurvenzeichnungen im Text.

(Aus dem biochemischen Laboratorium der Hochschule Stockholm.)

(Der Redaktion zugegangen am 8. Mai 1912.)

Bis jetzt ist der Verlauf der Enzyymbildung in zwei Fällen verfolgt worden, nämlich die Bildung der Galaktase bzw. des die Galaktose vergärenden Enzymkomplexes und die Bildung der Invertase.¹⁾ Im ersten Falle handelt es sich unzweifelhaft um eine Anpassung an das Nahrungssubstrat, denn es hat sich gezeigt, daß nur die Vorbehandlung mit Galaktose die erwähnte Änderung der Gärungsfähigkeit hervorruft.

Dagegen scheint die Vermehrung der Invertasewirkung der Hefe durch Vorbehandlung mit zuckerhaltiger Nährlösung von der Natur des zugesetzten Kohlenhydrates ziemlich unabhängig zu sein. Die quantitative Konstatierung dieser Tatsache war für uns wichtig genug, um den vorläufigen Versuch von Euler und Johansson ausführlicher zu wiederholen.

Wir teilen zunächst die diesbezüglichen Messungen mit:

Versuchsordnung.

Zur Vorbehandlung wurden 5 g der abgepreßten, gewaschenen Hefe in 500 ccm sterilisierter Lindnerscher Nährlösung eingetragen, welche im Liter enthielt:

0,25 g MgSO ₄	5 g KH ₂ PO ₄
4 » Asparagin	20 » Zucker.

Die eine gewisse Anzahl Stunden vorbehandelte Hefe wurde abfiltriert und einige Minuten auf Ton getrocknet. Der dabei erreichte Gehalt an Trockensubstanz wurde jedesmal durch Entwässern eines Anteils der Hefe bei 90° bestimmt. Von dieser Hefe wurden 0,25 g in einer Mischung von 20 ccm 20%iger

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 76, S. 388, 1912 und Bd. 78, S. 100, 1912.

Rohrzuckerlösung und 10 ccm 1%iger NaH_2PO_4 -Lösung aufgeschlemmt. (Durch die Anwesenheit von Phosphat wird bei allen Versuchen eine geeignete und sehr nahezu gleiche Konzentration der H-Ionen eingehalten.) Die Inversion des Rohrzuckers wird durch Zusatz von 10 ccm 5%iger Sodalösung nach bestimmten Zeiten abgebrochen, worauf die abfiltrierte Lösung im Polarisationsapparat untersucht wird, und zwar im 1 dm-Rohr bei etwa 20° . Der Inversionsvorgang selbst findet bei 18° statt.

Versuchsreihe 1.

In den folgenden Tabellen sind die Inversionszeiten t in Minuten angegeben, daneben die direkt beobachteten Drehungen, ferner die zur Zeit t noch zu durchlaufenden Drehungsänderungen in Graden und endlich die Reaktionskonstanten

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

Hefe H.

Ohne Vorbehandlung.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	7,53	—
15	6,42	34
25	5,71	35
35	5,09	35
40	4,71	36
∞	-2,41	—

Trockensubstanz: 33%.

Glukose.

21 Stunden vorbehandelt.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	7,56	—
16	5,00	80
25	3,83	81
35	2,57	86
40	2,00	88
∞	-2,42	—

Trockensubstanz: 30,53%.

Rohrzucker.

23,5 Stunden vorbehandelt.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	7,56	—
15	4,99	86
25	3,41	93
35	1,97	102
40	1,40	104
∞	-2,42	—

Trockensubstanz: 29,80%.

Glukose.

72 Stunden vorbehandelt.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	8,12	—
15	5,68	75
25	3,84	89
35	2,59	90
40	2,00	92
∞	— 2,60	—

Trockensubstanz: 29,88%.

93,5 Stunden vorbehandelt.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	8,21	—
15	5,67	77
25	3,83	90
35	2,60	90
40	2,03	92
∞	— 2,63	—

Trockensubstanz: 30,93%.

120 Stunden vorbehandelt.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	8,08	—
15	5,46	81
25	3,87	87
35	2,62	89
40	—	—
∞	— 2,59	—

Trockensubstanz: 31,08%.

Rohrzucker.

69,5 Stunden vorbehandelt.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	8,21	—
15	5,17	95
25	3,56	97
35	2,27	99
40	1,65	101
∞	— 2,60	—

Trockensubstanz: 28,95%.

96 Stunden vorbehandelt.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	8,04	—
15	5,01	97
25	3,41	100
35	2,17	100
40	1,50	104
∞	— 2,57	—

Trockensubstanz: 30,63%.

117,5 Stunden vorbehandelt.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	8,08	—
16	4,29	123
25	2,54	127
35	1,15	130
40	0,50	135
∞	— 2,59	—

Trockensubstanz: 38,76%.

Reduziert man die Mittelwerte der für die Zeiten 25 Minuten und 35 Minuten gefundenen Konstanten auf einen Trockengehalt der Hefe von 30% und auf gleiche Vorbehandlungszeiten, so ergibt sich die folgende Zusammenstellung der Reaktionskonstanten $k \cdot 10^4$ für 18°.

Zucker	Dauer der Vorbehandlung in Stunden				
	0	22	71	95	119
Glukose	32	82	88	87	86
Rohrzucker		98	101	100	100

In einem früheren Versuch von Euler und Johansson wurde durch Vorbehandlung der Hefe mit Rohrzucker enthaltender Nährlösung kein stärkeres Anwachsen der Invertasemenge erzielt, als bei der Vorbehandlung mit einer Nährlösung, welche Glukose enthielt.

Bei dem hier mitgeteilten Versuch wächst zwar die Invertasewirkung in ersterem Falle etwas schneller und stärker an als im letzteren, aber jedenfalls ist der Unterschied gering.

Hervorgehoben sei, daß in beiden Fällen die Hefe ihre maximale Invertasewirkung sehr schnell — etwa in 25 Stunden — erreicht.

Nach unseren früheren Messungen war der Verlauf der Enzyymbildung ein logarithmischer. Es konnte eine «Enzyymbildungskonstante» berechnet werden und die hieraus zurückberechneten Punkte der Enzyymbildungskurve stimmten mit den gefundenen ziemlich gut überein.

Unter sehr ähnlichen Bedingungen haben wir mit der gleichen Hefe eine entsprechende Versuchsreihe ausgeführt. Die Zusammensetzung der Nährlösung war die gleiche wie früher (4 g Asparagin im Liter); die Hefemenge pro Menge Nährlösung war etwas geringer, nämlich 1 g Hefe auf 100 ccm Lösung; früher hatte sich 1,5 g Hefe in 100 ccm Lösung befunden.

Versuchsreihe 2.

Hefe H.

Ohne Vorbehandlung.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	7,70	—
17	6,77	24
25	6,33	25
35	5,72	27
40	5,39	28
∞	2,46	—

Trockensubstanz: 28,78 %.

21 Stunden vorbehandelt.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	7,70	—
15	5,54	69
25	4,21	73
35	3,04	76
40	2,43	79
∞	— 2,46	—

Trockensubstanz: 28,17 %.

70,5 Stunden vorbehandelt.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	7,70	—
15	5,37	75
25	3,91	81
35	2,72	84
40	2,15	86
∞	— 2,46	—

Trockensubstanz: 27,30 %.

45 Stunden vorbehandelt.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	7,70	—
15	5,44	73
25	3,94	80
35	2,70	84
40	2,13	86
∞	— 2,46	—

Trockensubstanz: 28,97 %.

117 Stunden vorbehandelt.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	7,22	—
16	4,77	81
25	3,55	85
35	2,42	87
40	1,90	89
∞	—	—

Trockensubstanz: 26,82 %.

Nimmt man die Mittelwerte der für die Zeiten $t = 25'$ und $35'$ erhaltenen Konstanten und reduziert diese Werte auf einen gemeinsamen Trockengehalt von 30%, so erhält man die folgenden Zahlen (vgl. Fig. 1).

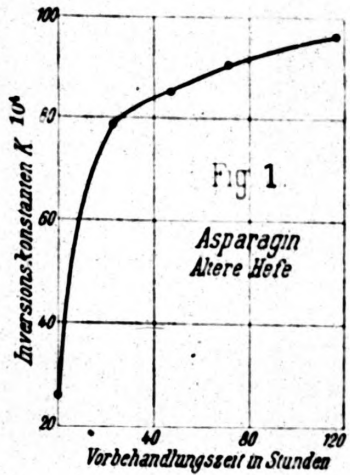
Vorbehandlung. Stunden	0	21	45	70,5	117
Reduz. Inversionskonst. $k \cdot 10^4$	27	79	85	91	96

Wir haben den Versuch mit der früher gefundenen Enzymbildungs-konstante $k_{EB} = 0,020$ berechnet.

Dauer der Vorbehandlung Stunden	$k \cdot 10^4$	
	Gefunden	Berechnet
0	27	27
21	79	71
45	85	89
70,5	91	95
117	96	—
∞	98	—

Die hier ermittelte Geschwindigkeit der Enzymbildung ist also etwa ebenso groß wie die früher gefundene; dagegen lag hier das Maximum des Enzymgehalts niedriger, nämlich 98 gegenüber dem früheren Wert 110.

Wir kommen nun zur Hauptfrage: Wie verändern sich Maximum und Geschwindigkeit der Enzymbildung?



Mit der Hefe H wurde zunächst der Einfluß der Stickstoffnahrung untersucht, und zwar wurde dazu Asparagin, Glykokoll und Ammoniumsulfat gewählt.

Bei den ersten diesbezüglichen Versuchen befanden sich 5 g Hefe in 250 ccm Nährlösung, während bei den übrigen Versuchen doppelt so viel Nährlösung zur Anwendung kam. Dies hatte zur Folge, daß nun der Enzymzuwachs viel geringer war als früher und auch einen anderen Verlauf nahm.

Versuchsreihe 3.

Vorbehandlung bei 18°.

A. 4 g Ammoniumsulfat im Liter Nährlösung.

Ohne Vorbehandlung.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	7,05	—
15	5,91	38
25	5,17	39
36	4,51	38
40	4,31	38
∞	— 2,25	—

Trockensubstanz: 33,64 %.

3 Stunden vorbehandelt.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	7,05	—
15	5,69	46
25	4,74	(59)
35	4,05	48
40	3,76	48
∞	— 2,25	—

Trockensubstanz: 33,75 %.

30 Stunden vorbehandelt.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	7,05	—
15	5,15	66
25	3,77	76
35	2,76	77
40	2,30	77
∞	— 2,25	—

Trockensubstanz: 34,12 %.

146 Stunden vorbehandelt.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	7,50	—
15	4,99	85
25	3,58	87
35	2,31	92
40	1,69	96
∞	— 2,40	—

Trockensubstanz: 34,96 %.

195 Stunden vorbehandelt.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	7,50	—
15	5,01	84
25	3,62	86
35	2,38	90
40	1,87	91
∞	— 2,40	—

Trockensubstanz: 33,54 %.

B. 4 g Glykokoll im Liter Nährlösung.

Ohne Vorbehandlung.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	7,05	—
15	5,94	37
25	5,18	39
35	—	—
40	4,17	40
∞	— 2,25	—

Trockensubstanz: 32,74 %.

19,5 Stunden vorbehandelt.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	7,05	—
15	5,29	61
25	4,12	66
35	3,00	71
40	2,51	73
∞	— 2,25	—

Trockensubstanz: 30,73 %.

44 Stunden vorbehandelt.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	7,05	—
15	5,08	69
26	3,53	79
35	2,59	81
40	2,20	(80)
∞	— 2,25	—

Trockensubstanz: 30,30 %.

70,5 Stunden vorbehandelt.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	7,05	—
15	4,85	78
25	3,49	88
35	2,24	90
40	1,69	93
∞	— 2,25	—

Trockensubstanz: 31,57 %.

140 Stunden vorbehandelt.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	7,50	—
15	5,29	81
25	3,69	84
35	2,57	85
40	2,13	85
∞	— 2,40	—

Trockensubstanz: 30,73 %.

187,5 Stunden vorbehandelt.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	7,50	—
15	4,98	85
25	3,57	88
35	2,34	91
40	1,80	93
∞	— 2,40	—

Trockensubstanz: 32,54 %.

C. 4 g Asparagin im Liter Nährlösung.

Ohne Vorbehandlung.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	7,05	—
15	5,92	37
25	5,07	42
35	4,39	42
40	4,03	42
∞	— 2,25	—

Trockensubstanz: 33,76 %.

20 Stunden vorbehandelt.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	7,05	—
15	5,14	66
25	3,91	72
35	2,66	76
40	2,20	80
∞	— 2,25	—

Trockensubstanz: 33,61 %.

95,5 Stunden vorbehandelt.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	7,50	—
15	5,52	65
25	4,29	68
35	3,18	71
40	2,71	72
∞	— 2,40	—

Trockensubstanz: 31,13 %.

116 Stunden vorbehandelt.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	7,50	—
15	5,54	64
25	4,25	69
35	3,21	70
40	2,75	71
∞	— 2,40	—

Trockensubstanz: 30,70 %.

144 Stunden vorbehandelt.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	7,50	—
15	5,33	72
25	4,05	74
35	3,00	75
40	2,53	76
∞	— 2,40	—

Trockensubstanz: 31,35 %.

Um einen Vergleich über die Enzymbildung in den 3 angewandten Nährlösungen zu gewinnen, haben wir die erhaltenen Konstanten auf einen einheitlichen Trockengehalt von 30% umgerechnet und die Werte für 20, 100 und 150 Stunden durch Interpolation ermittelt und in folgender Tabelle zusammengestellt; dieselbe enthält also die so ermittelten Konstanten $k \cdot 10^4$.

Stunden der Vorbehandlung	Nährlösung enthält		
	Asparagin	Glykokoll	Ammoniumsulfat
0	38	37	35
20	70	70	69
100	72	88	85
150	73	88	86

Das wesentliche Ergebnis dieser Versuche ist also, daß die Enzymbildung von der Natur der drei der Nährlösung zugesetzten stickstoffhaltigen Substanzen wenig abhängig ist.

Diese Versuche werden weiter ausgedehnt, besonders um die Beziehungen zwischen der Enzyymbildung und der Bildung des Plasmaeiweißes¹⁾ aufzuklären.

Bei allen drei Serien nahm das Maximum der Invertasewirkung einen ziemlich geringen Wert an und wurde schnell, etwa in 100 Stunden, erreicht. Bei länger fortgesetzten Versuchen machte sich nach 150—200stündiger Vorbehandlung die Tendenz zu abermaliger Abnahme der Konstanten geltend.

Dieser Verlauf der Inversionskonstanten legte die Vermutung nahe, daß die Hefemenge während der Vorbehandlung in ähnlicher Weise variieren würde, daß also die anfängliche Zunahme nach einiger Zeit aufhören würde, und daß hierauf etwa das Absterben der Zellen die Neubildung überwiegen würde.

Die Vorbehandlung geschah also mit ungefähr je 5 g abgepreßter Hefe ganz wie beim vorigen Versuch, nur wurde jetzt die Hefe nach gewissen Zeiten quantitativ abfiltriert, einmal mit kaltem Wasser gewaschen, abgepreßt und bis zur Gewichtskonstanz bei 90° getrocknet. Dabei wurden die folgenden Zahlen erhalten:

Ammoniumsulfat	Glykokoll	Asparagin
Ohne Vorbehandl. 1,7530	Ohne Vorbehandl. 1,8380	Ohne Vorbehandl. 1,6910
Nach 6,5 Std. 1,6485	Nach 6 Std. 1,8336	Nach 5 Std. 1,7400
› 44,5 › 1,4600	› 24 › 1,6695	› 24 › 1,6470
› 69,5 › 1,4445	› 47 › 1,5670	› 47,5 › 1,5570
› 94,25 › 1,4140	› 72 › 1,5310	› 70 › 1,5350
› 117,5 › 1,3610	› 95 › 1,4380	› 117,5 › 1,4980

Entgegen der Erwartung zeigte sich, daß die Hefemenge in allen 3 Serien von Beginn des Versuches an abnahm, obwohl sich die Hefe in einer für die Entwicklung geeigneten Lösung allerdings in ziemlich großer Menge befand. Die Hefe muß in dieser Zeit einen Teil ihrer eigenen Substanz verbraucht haben, es liegt also entweder ein Verbrauch der eigenen Kohlenhydrate der Zellen oder Autolyse vor. Um hierüber eine Entscheidung

¹⁾ Über die Einflüsse des Nährsubstrates auf die Bildung des Plasmaeiweißes bei Hefen und Schimmelpilzen hat F. Ehrlich neuerdings eine interessante Untersuchung veröffentlicht. (Biochem. Zeitschr., Bd. 36, S. 488; 1912.)

zu gewinnen, wurde die Änderung des Stickstoffgehaltes verfolgt, welche unter den erwähnten Versuchsbedingungen eintrat.

Diese Stickstoffbestimmungen wurden nach der Methode von Kjeldahl ausgeführt. Wie bei den vorhergehenden Versuchen wurden jedesmal ca. 5 g abgepreßte Hefe in 250 ccm Nährlösung aufgeschlemmt, die Ammoniumsulfat als Stickstoffkomponente enthielt. Nach dem Abfiltrieren wurde die Hefe bis zum Verschwinden der Schwefelsäurereaktion ausgewaschen.

Vorbehandlung	Stickstoffgehalt der Trockenhefe in %
Sofort abfiltriert	9,09
5 Stunden	9,32
21 „	9,46
46,5 „	9,68
69,5 „	9,99
94 „	9,97

Während also bei der beschriebenen Behandlung die Gesamtsubstanz der Hefe abnimmt, wächst der prozentische Stickstoffgehalt. Allerdings beträgt die Zunahme des Stickstoffgehaltes nur etwa 10%, während der gesamte Substanzverlust der Hefe etwa 20% ausmacht.

Man wird also den Schluß ziehen, daß die Hefe sowohl Eiweiß als Kohlenhydrate verloren hat. Ob unter ähnlichen Verhältnissen ein derartiger Substanzverlust der Hefe beobachtet wurde, ist uns nicht bekannt. Meist wurde die Autolyse in Wasser unter Zusatz von antiseptischen Mitteln, speziell Chloroform studiert (Salkowski¹⁾). Nach Effront²⁾ verlaufen die Vorgänge der in Wasser suspendierten Hefe verschieden, je nachdem die Hefe in reinem oder in alkoholhaltigem Wasser sich befindet; in letzterem Medium soll hauptsächlich Eiweißselbstverdauung eintreten. Was bei obigen Versuchen auffällt, ist der Umstand, daß gleichzeitig eine Vergrößerung der Invertasewirkung, eine Abnahme der Gesamtsubstanz und eine Zunahme des Stickstoffs eintritt, Veränderungen, welche in folgender Tabelle zusammengestellt sind.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 13, S. 506, 1889.

²⁾ Bull. Soc. Chim. (3), Bd. 33, S. 847, 1905.

Vorbehandlung in Std.	Vergrößerung der Invertasewirkung %	Abnahme der Gesamtsubstanz %	Zunahme des Stickstoffgehalts %
5	40	5	2,5
40	120	16	5,5
90	135	20	8,8

Die weitere Verfolgung dieser Erscheinung liegt zunächst nicht im Bereiche dieser Untersuchung. Es erübrigt also nur noch, darauf hinzuweisen, daß die Abnahme der Gesamtsubstanz und die Zunahme des Stickstoffgehaltes vor und während der Hauptgärung eintritt. Allerdings war dies nur bei den Versuchen mit Ammoniumsulfat der Fall. Bestand die Stickstoffquelle aus Glykokoll, so war innerhalb sechs Stunden die Abnahme sehr gering, bei Asparagin trat eine Zunahme ein.

Bei der anderen Versuchsreihe, welche den Einfluß der Stickstoffkomponente auf die Enzyymbildung betraf, befanden sich stets 5 g abgepreßte Hefe in der doppelten Menge Nährlösung, also in 500 ccm.

Versuchsreihe 4.

Hier ist zunächst zu erwähnen, daß die Versuchsreihe 2 fortgesetzt wurde, allerdings nur mit 5 g Hefe. Nach 69 stündiger Vorbehandlung wurde der Inhalt eines Kolbens abfiltriert, auf Ton abgepreßt und in 500 ccm frische Nährlösung eingetragen. In der neuen Lösung verblieb die Hefe noch 50 Stunden.

69 + 50 Stunden vorbehandelt.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	7,22	—
15	3,67	135
25	2,03	137
35	0,73	142
40	0,12	148
∞	— 2,31	—

Trockensubstanz: 33,76 %.

Aus der Tabelle Seite 278 geht hervor, daß die maximale Konstante, die beim Verbleiben der Hefe in ein und derselben

Nährlösung erreicht wurde, 98 betrug; hier zeigt sich, daß durch Überführung der Hefe in eine zweite Lösung dieser Wert bedeutend überschritten wird; er beträgt, reduziert auf Trockengewicht, 30%, $k \cdot 10^4 = 136$.

Die logarithmische Kurve der Enzyymbildung wurde in einer früheren Mitteilung in der Weise theoretisch abgeleitet, daß angenommen wurde, die Geschwindigkeit der Enzyymbildung sei in jedem Moment proportional mit der Differenz $A - x$ zwischen dem bereits erreichten Enzymgehalt x und dem unter den betreffenden Umständen überhaupt erreichbaren Enzymgehalt A . Es muß hier also besonders betont werden, daß der in einer gewissen Nährlösung in maximo erreichbare Enzymgehalt A unter anderen Umständen weit überschritten werden kann. Dem Studium dieses Grenzwertes A , welcher offenbar von zahlreichen Faktoren abhängig ist, galten unsere nächsten Versuche.

Versuchsreihe 5.

4 g Ammoniumsulfat im Liter Nährlösung.

Ohne Vorbehandlung.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	7,32	—
15	6,02	42
25	5,20	43
35	4,39	45
40	3,87	48
∞	— 2,34	—

Trockensubstanz: 30,12 %.

48 Stunden vorbehandelt.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	7,32	—
15	5,12	75
25	3,56	86
35	2,38	89
40	1,78	93
∞	— 2,34	—

Trockensubstanz: 29,39 %.

23 Stunden vorbehandelt.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	7,32	—
15	5,38	65
25	4,02	73
35	2,97	74
40	2,47	76
∞	— 2,34	—

Trockensubstanz: 30,00 %.

72 Stunden vorbehandelt.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	7,32	—
15	4,60	96
25	3,03	102
35	1,84	104
40	1,25	107
∞	— 2,34	—

Trockensubstanz: 30,40 %.

118 Stunden vorbehandelt.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	7,32	—
15	4,26	110
25	2,50	120
35	1,21	124
40	0,60	129
∞	— 2,34	—

Trockensubstanz: 30,55 %.

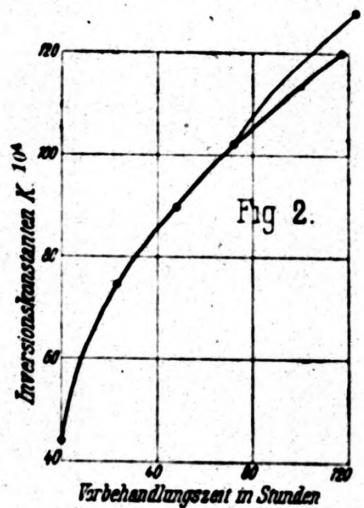
Der Inhalt eines Kolbens wurde nach 71 stündiger Vorbehandlung abfiltriert, auf Ton abgepreßt und in 500 ccm frische Nährlösung eingetragen. In der neuen Lösung verblieb die Hefe dann noch 50 Stunden.

71 + 50 Stunden vorbehandelt.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	7,32	—
15	4,00	122
25	2,28	128
35	1,05	130
40	0,40	137
∞	— 2,34	—

Trockensubstanz: 30,21 %.

Stellt man die auf den Trockengehalt 30% reduzierten Konstanten dieser Serie zusammen, so zeigt sich nun ein anderer Verlauf der Enzymbildung wie früher. Wie die nebenstehende Figur 2 zeigt, verläuft die Enzymbildung in einer gestreckteren Kurve und strebt weniger ausgeprägt einem Endwert zu. Der Zuwachs an Enzym ist bedeutend größer. Dieser Verlauf ist — wenigstens bei unserer Rasse



— für junge Hefezellen charakteristisch. Junge Hefezellen besitzen hiernach einen viel höheren Grad von Enzymbildungsvermögen als ältere. Dabei spielen natürlich die Umstände, unter welchen sich die Hefe entwickelt hat, eine große Rolle. Welche Substanzen hierbei besonders wirksam sind, bleibt erst noch festzustellen.

Versuchsreihe 6.

Der gleiche Verlauf der Enzymbildung zeigt sich in folgendem Versuch, welcher ebenfalls mit junger Hefe angestellt ist, unter ähnlichen Bedingungen wie der vorige.

A. 4 g Ammoniumsulfat im Liter Nährlösung.

Ohne Vorbehandlung.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	7,30	—
15	6,29	32
25	5,57	34
35	4,94	35
40	4,52	37
∞	— 2,34	—

Trockensubstanz: 31,09 %.

93 Stunden vorbehandelt.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	6,52	—
15	2,69	171
25	0,87	185
35	— 0,17	186
40	— 0,58	189
∞	— 2,09	—

Trockensubstanz: 37,57 %.

24,5 Stunden vorbehandelt.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	7,30	—
15	5,15	73
25	3,60	84
35	2,50	86
40	1,78	92
∞	— 2,34	—

Trockensubstanz: 29,74 %.

193 Stunden vorbehandelt.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	7,47	—
15	2,21	221
25	— 0,08	252
35	— 1,16	258
40	— 1,60	267
∞	— 2,39	—

Trockensubstanz: 40,87 %.

Dieser Versuch ist durch die Kurve A der Figur 3 graphisch dargestellt. Die Inversionskonstanten sind auf einen Trockengehalt von 30% reduziert.

Versuchsreihe 7.

In der Figur 2 ist die Enzyymbildung in einer bereits vorbehandelten Hefe nur durch einen einzigen Punkt festgelegt. Wir haben uns veranlaßt gesehen, die Kurve der in neue Lösung übergeführten Hefe weiter zu verfolgen. Die Versuchsanordnung war dieselbe wie in voriger Serie, die Stickstoffkomponente der Nährlösung bestand in Asparagin, und zwar 4 g per Liter.

Ohne Vorbehandlung.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	7,30	—
15	6,29	32
25	5,57	34
35	4,94	35
40	4,52	37
∞	— 2,34	—

Trockensubstanz: 31,09 %.

72,5 Stunden vorbehandelt.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	7,43	—
15	4,42	106
25	2,80	111
35	1,56	113
40	1,01	115
∞	— 2,38	—

Trockensubstanz: 28,91 %.

45 Stunden vorbehandelt.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	7,35	—
15	5,04	79
25	3,59	85
35	2,51	86
40	1,95	88
∞	— 2,35	—

Trockensubstanz: 27,70 %.

165,5 Stunden vorbehandelt.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	6,44	—
15	2,89	157
25	1,21	166
35	0,10	170
40	— 0,41	178
∞	— 2,06	—

Trockensubstanz: 29,64 %.

Nach 45 stündiger Vorbehandlung wurde der Inhalt von 3 Kolben — jeder 5 g Hefe auf 500 ccm Nährlösung enthaltend — abfiltriert und die Hefe auf 500 ccm frische Nährlösung übertragen. Nach weiteren 21,5 bzw. 48 und 144 Stunden Vorbehandlung wurde die Hefe untersucht.

Vorbehandelt 45 + 21,5 Stunden.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	7,38	—
15	3,89	128
25	1,78	148
35	0,50	153
40	-0,03	155
∞	-2,36	—

Trockensubstanz : 32,36 %.

Vorbehandelt 45 + 48 Stunden.

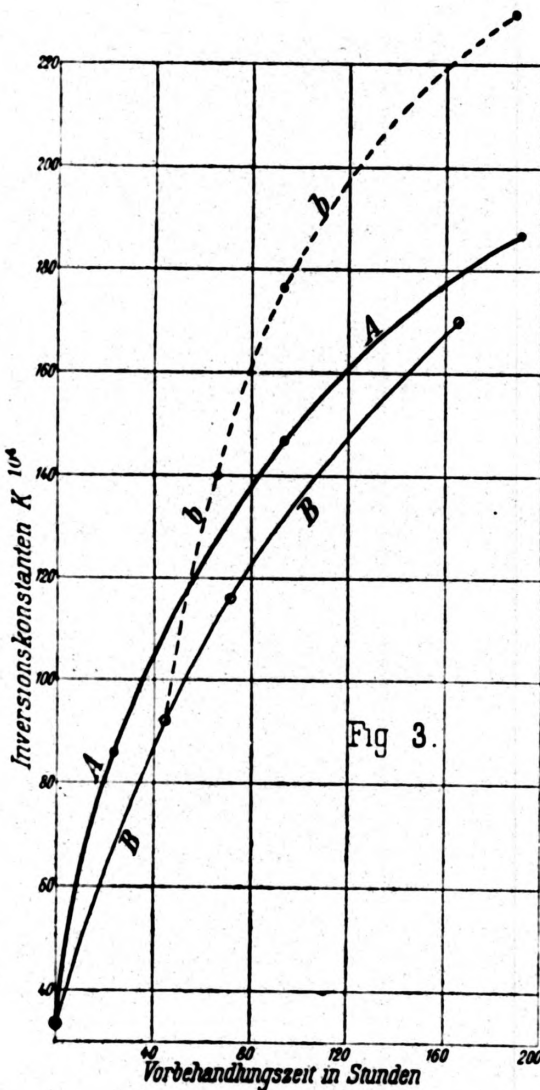
Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	6,44	—
15	2,68	169
25	0,83	187
35	-0,27	193
40	-0,81	208
∞	-2,06	—

Trockensubstanz : 32,44 %.

Vorbehandelt 45 + 144 Std.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	7,37	—
15	2,65	192
25	0,32	224
35	-0,83	230
40	-1,25	235
∞	-2,36	—

Trockensubstanz : 29,76 %.



Der Verlauf der auf 30% Trockengewicht reduzierten Konstanten ist in Figur 3 durch die Kurve B bzw. b dargestellt. Es geht aus dieser Kurve noch deutlicher hervor, was bereits Figur 2 erkennen ließ, daß durch die Erneuerung der Nährlösung eine gesteigerte Enzymbildung eintritt. Der Grund dieser Erscheinung kann zunächst darin gesucht werden, daß

die Reaktionsprodukte der Hefe die Enzymbildung verzögern. Indessen kann ein solcher Schluß aus unseren Versuchen noch

nicht mit Bestimmtheit gezogen werden. Es ist nämlich noch ein Umstand, der mit dem Wechsel der Nährlösung verbunden ist, in Betracht zu ziehen.

Über die Berechnung des Verlaufs der Enzyymbildung ist noch folgendes hinzuzufügen: Bei der Ableitung der Formeln erster Ordnung für die Enzyymbildung ist die stillschweigende Voraussetzung gemacht, daß das Medium während der Dauer der Vorbehandlung unverändert bleibt. Dies war nun tatsächlich bei unseren Versuchen nicht der Fall, denn im Anfang der Vorbehandlung tritt eine Gärung ein, so daß gegen Ende der Vorbehandlung einerseits der Zucker verschwunden ist, andererseits die Lösungen eine gewisse Menge Alkohol enthalten müssen. Es ist nun von vornherein nicht unwahrscheinlich, daß die Enzyymbildung mit der Gärung zeitlich verknüpft ist, und die Annahme liegt nahe, daß gerade während der Gärung eine gesteigerte Enzyymbildung stattfindet. Wirklich deuten auch einige Kurven darauf hin, so z. B. diejenige der Figur 1, wo der hauptsächlichste Zuwachs an Invertase in den ersten 20 Stunden der Vorbehandlung eintritt. Auch in Figur 4 könnte man die Kurve a in zwei Abschnitte teilen, etwa bis zur Vorbehandlungszeit 30 Stunden und einen zweiten Teil von 30—140 Stunden. Wir haben einige Versuche angestellt, um zu sehen, in welcher Periode die Vergärung des Zuckers unter den Bedingungen der Vorbehandlung stattfindet.

Die folgenden Versuche beziehen sich auf 5 g abgepreßte Hefe in 500 ccm Nährlösung.

Versuch 1		Versuch 2	
Gärungszeit in Std.	CO ₂ in g	Gärungszeit in Std.	CO ₂ in g
4	0,45	4	0,50
20	3,05	20	3,20
24	3,25	24	3,45
28	3,45	28	3,50
		44	3,60

Die Tabelle zeigt, daß in etwa 24 Stunden die Gärung so gut wie beendet war, nach 30 Stunden wurde Fehlingsche

Lösung nicht mehr reduziert. Der zweite Teil der Kurven der Figuren 1 und 4 entspricht tatsächlich auch etwa dem Enzymzuwachs, welcher in zuckerfreier Nährlösung gefunden wurde (Fig. 6). Indessen ist zu bemerken, daß in Figur 2 und 3 die Gärungsperiode nicht oder nur sehr unscharf zum Ausdruck kommt. Streng genommen müßte der Verlauf der Enzymbildung in einem Medium von konstanter Zusammensetzung und konstantem Zuckergehalt studiert werden.

Versuchsreihe 8.

Es war natürlich von Interesse, zu ermitteln, wie lange bei mehrmaliger Überführung der Hefe in neue Nährlösung eine weitere Steigerung des Enzymgehaltes stattfindet. Darüber geben die folgenden Messungen Aufschluß.

Ohne Vorbehandlung.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	8,84	—
15	7,87	25
25	7,17	27
35	6,58	27
40	6,13	29
∞	— 2,83	—

Trockensubstanz: 29,43 %.

72 Stunden vorbehandelt.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	7,92	—
15	5,07	93
25	3,48	96
35	1,99	104
40	1,45	105
∞	— 2,53	—

Trockensubstanz: 30,76 %.

46 Stunden vorbehandelt.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	7,94	—
15	5,60	73
25	4,15	78
35	2,76	84
40	2,15	87
∞	-- 2,54	—

Trockensubstanz: 26,92 %.

142 Stunden vorbehandelt.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	7,90	—
17	3,89	124
25	2,41	130
35	0,96	136
40	0,26	143
∞	— 2,53	—

Trockensubstanz: 35,94 %.

Nach 46 stündiger Vorbehandlung wurde ein Teil der Hefe abfiltriert, auf Ton gepreßt und in neue Nährlösung übertragen

(je 5 g abgepreßte Hefe auf 500 ccm Lösung). Es folgen die unter dieser Serie b angestellten Messungen.

46 + 49 Stunden vorbehandelt.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	7,90	—
15	4,57	111
25	2,82	116
35	1,14	129
40	0,32	141
∞	-2,53	—

Trockensubstanz: 33,33 %.

46 + 98 Stunden vorbehandelt.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	7,90	—
15	3,97	137
25	2,13	140
35	0,46	155
40	-0,16	161
∞	-2,53	—

Trockensubstanz: 34,56 %.

Von der Serie b wurde nach 49 stündiger Vorbehandlung ein Teil abfiltriert, gepreßt, gewogen und in eine dritte Nährlösung übertragen, welche wiederum die gleiche Zusammensetzung besaß. Die Serie c wurde nach weiteren 72 und 119 Stunden unterbrochen.

46 + 49 + 72 Stunden vorbehandelt.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	7,52	—
15	3,26	162
25	1,22	175
35	-0,14	183
40	-0,60	185
∞	-2,41	—

Trockensubstanz: 41,95 %.

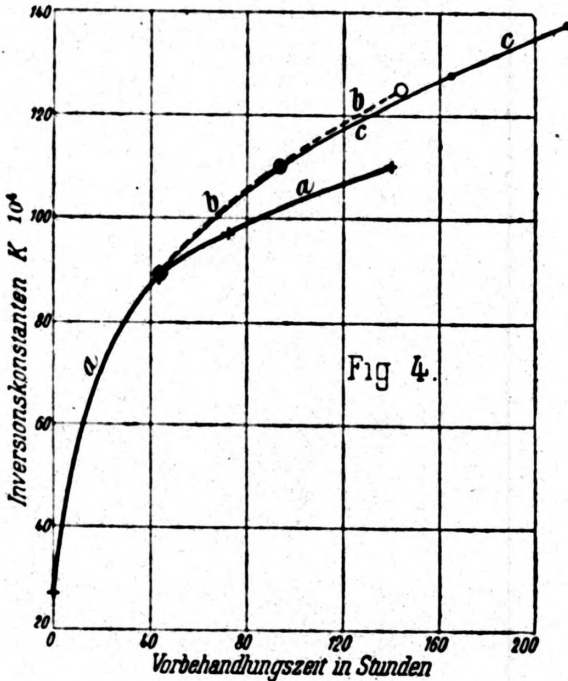
46 + 49 + 119 Stunden vorbehandelt.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	7,50	—
15	3,26	162
25	1,34	169
35	+0,06	173
40	-0,58	179
∞	-2,40	—

Trockensubstanz: 37,52 %.

Die auf den Trockengehalt 30% reduzierten Konstanten der 3 Serien findet man in der Figur 4.

Zu diesem Versuch war eine etwas ältere Hefe als zu dem in Figur 3 dargestellten Versuch angewandt worden, so daß der gesamte Enzymzuwachs nicht so stark wie früher gefunden wurde. Immerhin hatte eine einmalige Überführung der Hefe in neue Nährlösung eine Steigerung des Enzymgehaltes zur Folge. Eine nochmalige Überführung in neue Lösung hatte,



wie aus der Figur ersichtlich, keinen Effekt mehr, denn die Kurven b und c fallen fast vollständig zusammen.

Weitere Versuche mit jüngerer Hefe sind natürlich erforderlich; immerhin zeigt es sich, daß bei der Kultur in einer gewissen Nährlösung ein absolutes Maximum des Enzymgehaltes ziemlich bald erreichbar ist. Es ist noch hervorzuheben,

daß bei diesen letzten Versuchen der Betrag der Enzymanreicherung recht erheblich war; in Figur 3 wird ersichtlich, daß die Invertasewirkung im Verhältnis 1 : 7,5 wuchs; beim letzten Versuch (Fig. 4) betrug der Zuwachs etwa 500%.

Versuchsreihe 9.

Nachdem es sich gezeigt hatte, daß die Natur der Stickstoffkomponente der Nährlösung nicht von wesentlicher Bedeutung für die Größe der Enzymbildung ist, war zu fragen, ob Hefe nicht in reiner Zuckerlösung ihren Invertasegehalt erhöhen kann.

Es wurden also je 5 g Hefe in 500 ccm Rohrzucker bzw. Glukoselösung von 2% Gehalt vorbehandelt.

Ohne Vorbehandlung.

Minuten	a	k · 10 ⁴
0	7,47	—
15	6,56	28
25	5,62	36
35	4,85	38
40	4,48	39
∞	— 2,39	—

Trockensubstanz: 29,93 %.

Rohrzucker.

22 Stunden vorbehandelt.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	7,47	—
17	5,13	69
25	4,05	74
35	2,83	79
40	2,23	82
∞	— 2,39	—

Trockensubstanz: 37,81 %.

46 Stunden vorbehandelt.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	7,47	—
15	5,00	84
25	3,65	85
35	2,37	90
40	1,61	98
∞	— 2,39	—

Trockensubstanz: 35,21 %.

72 Stunden vorbehandelt.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	7,93	—
15	4,92	98
25	3,30	101
35	1,91	106
40	0,98	115
∞	— 2,54	—

Trockensubstanz: 35,26 %.

Glukose.

24 Stunden vorbehandelt.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	7,47	—
15	5,60	61
25	4,55	61
35	3,20	70
40	2,65	73
∞	— 2,39	—

Trockensubstanz: 40,76 %.

48 Stunden vorbehandelt.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	7,50	—
15	5,04	83
25	3,63	86
35	2,39	90
40	1,74	95
∞	— 2,40	—

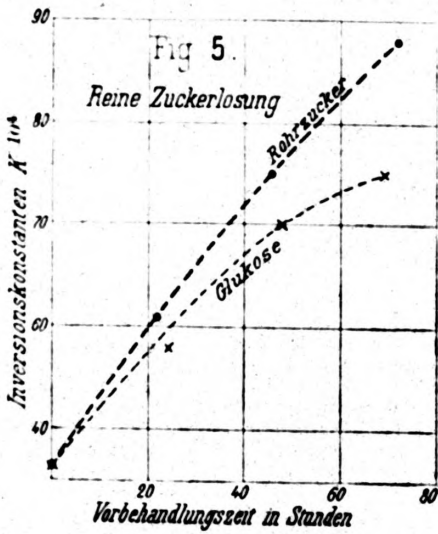
Trockensubstanz: 37,71 %.

70 Stunden vorbehandelt.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	7,93	—
15	5,50	76
28	3,66	81
35	2,72	85
40	2,03	90
∞	— 2,54	—

Trockensubstanz: 33,08 %.

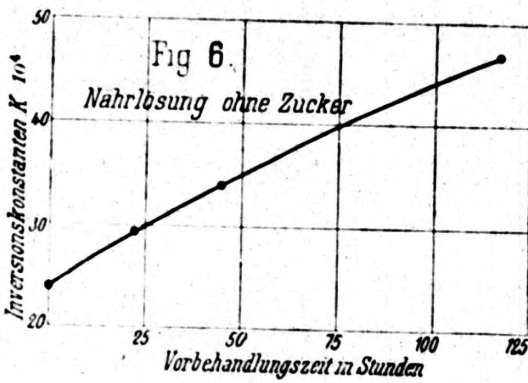
Die reduzierten Konstanten findet man wiederum in zwei Kurven (Fig. 5), aus welchen ersichtlich wird, daß die Vorbehandlung mit Rohrzucker eine etwas größere Vermehrung der Invertasewirkung veranlaßt, als die Vorbehandlung mit Glukose. Dabei ist allerdings zu betonen, daß die mit Rohr-



zucker hergestellte Lösung schon nach einem kleinen Bruchteil der Vorbehandlungszeit nur Invertzucker enthalten haben kann, da ja die Inversion durch lebende Hefe außerordentlich schnell vor sich geht.

Auffallend ist, daß in Abwesenheit von stickstoffhaltigen Substanzen in der Vorbehandlungslösung immerhin eine Invertasevermehrung von mehr als 100% eintritt.

Versuchsreihe 10.



Schließlich wurde festgestellt, welchen Einfluß die von uns angewandte Nährlösung auf die Invertasebildung besitzt, wenn kein Zucker darin enthalten ist. Alle Versuchsbedingungen sind wie früher angegeben. Das Ergebnis der nach-

stehenden Tabelle ist, daß ohne Zucker die Invertasebildung langsamer, bzw. in viel geringerem Grade vor sich geht (vgl. Fig. 6).

Nährlösung mit 4 g Asparagin im Liter; ohne Zucker.
Ohne Vorbehandlung. 22 Stunden vorbehandelt.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	8,79	—
16	7,85	23
25	7,27	24
35	6,58	26
40	6,28	26
∞	— 2,81	—

Trockensubstanz: 31,50 %.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	8,90	—
15	7,88	26
25	7,10	29
35	6,45	29
40	6,06	30
∞	— 2,85	—

Trockensubstanz: 29,55 %.

45,5 Stunden vorbehandelt.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	8,84	—
15	7,69	30
25	6,83	33
35	6,04	34
40	5,62	35
∞	— 2,83	—

Trockensubstanz: 29,56 %.

118 Stunden vorbehandelt.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	7,92	—
15	6,70	36
25	5,87	38
35	5,05	40
40	4,63	41
∞	— 2,53	—

Trockensubstanz: 27,56 %.

Die hier beschriebene Erscheinung unterscheidet sich wesentlich von dem anderen der beiden quantitativ studierten Fälle von Enzyymbildung, nämlich dem Auftreten von Galaktase in Hefen. In letzterem Falle war es nämlich notwendig, die Hefe in einer Galaktose enthaltenden Lösung zu kultivieren und es rief also das Substrat die Bildung des spezifischen Enzymes hervor.

Dagegen findet bei der Vermehrung der Invertasewirkung durch Lindnersche Nährlösung eine Zunahme des Enzymgehaltes auch statt, wenn die Vorbehandlung mit einer Nährlösung geschieht, welche nicht den der Invertase entsprechenden Zucker, also Rohrzucker, sondern an dessen Stelle ein Spaltprodukt desselben, Glukose, enthält.

Schon hierin liegt eine große Differenz. Die in der vorliegenden Arbeit studierte Vermehrung der Enzymwirkung wird ferner durch folgende Tatsachen charakterisiert:

Wird Hefe durch eine Nährlösung, wie die in obigen Versuchen angewandte, vorbehandelt, so tritt nicht nur die Verstärkung der Invertasewirkung ein, die durch unsere Messungen nunmehr quantitativ bestimmt ist, sondern gleichzeitig vergrößert sich die Wirkung der Hefe gegenüber einer Reihe von anderen Substraten. Nach Versuchen, welche der eine von uns vor einiger Zeit ausgeführt hat, nimmt bei der Vorbehandlung in asparaginhaltiger Nährlösung nicht nur die Invertasewirkung zu, sondern gleichzeitig die Fähigkeit, Kohlenhydratphosphorsäureester zu synthetisieren,

die Geschwindigkeit, Glukose zu vergären, und die Geschwindigkeit, Nucleinsäuren zu spalten. Es braucht kaum betont zu werden, daß die prozentische Zunahme der betreffenden Enzymwirkungen sehr ungleich ausfiel. Diese Tatsachen können kaum anders gedeutet werden, als daß durch die Vorbehandlung eine allgemeine Erhöhung bzw. eine Beschleunigung der vitalen Prozesse hervorgerufen wird.

Im Anschluß hieran sei noch kurz eine Gruppe von Tatsachen erwähnt, auf welche wir bald eingehender zurückkommen, da sie mit der Erscheinung der Enzymbildung aufs engste verknüpft ist.

Protoplasmagifte rufen bekanntlich, wenn sie in geringen Quantitäten zu Hefensuspensionen zugesetzt werden, eine Reizwirkung hervor, welche eine erhöhte allgemeine enzymatische Tätigkeit der Zellen zur Folge hat. Wird eine gewisse Konzentration überschritten, so tritt im Gegenteil eine Hemmung der normalen Enzymwirkungen ein, und es ist somit möglich, die größte Konzentration festzustellen, welche von der Hefe ohne Hemmung oder Verzögerung ihrer normalen Funktionen ertragen wird. Diese Konzentration ist der quantitative Ausdruck für die Widerstandsfähigkeit der Hefe gegen einen Fremdstoff.

Zur Messung dieser Konzentrationen kann man gewisse enzymatische Reaktionen verfolgen; indessen eignen sich hierzu nicht alle Enzyme, sondern nur diejenigen, welche mit dem Protoplasma verbunden sind (vgl. Euler und af Ugglas, Diese Zeitschr., Bd. 70, S. 279, 1911, sowie Kullberg, ebenda, Bd. 73, S. 85, 1911). In den meisten Fällen wird man die Gärung zur Messung verwenden, wie wir dies getan haben. Andererseits erhält man einen Wert für die Toleranz Fremdkörpern gegenüber, wenn man die Vermehrung der Zellen quantitativ verfolgt. Die so gewonnenen Werte stimmen nur der Größenordnung nach miteinander überein. In welchem Umfang im allgemeinen die beiden Methoden übereinstimmende Werte liefern, konnte noch nicht festgestellt werden. Offenbar sind derartige Versuche für das ganze Problem der Enzymbildung von erheblicher Bedeutung.

Es hat sich nun gezeigt, daß die so gemessene Widerstandsfähigkeit der Hefe durch Vorbehandlung mit Lindnerscher Nährlösung sehr bedeutend gesteigert werden kann, ohne daß eine erhebliche Vermehrung der Zellenzahl eintritt; nach den vorläufigen Versuchen des einen von uns wird von der nach obiger Methode vorbehandelten Hefe die doppelte Menge Fluornatrium ertragen. Diese Menge kann dann durch weitere Vorbehandlung mit Fluornatrium noch gesteigert werden, wie Effront gezeigt hat, welchem man sehr wichtige Beobachtungen auf diesem Gebiet verdankt. (Effront, Die Diastasen. Deutsch von Bücheler, Leipzig, 1900.)

Welche chemischen Reaktionen der Mikroorganismen für die Gifttoleranz in Betracht kommen, ist einstweilen noch nicht klar. Jedenfalls darf man annehmen, daß die Geschwindigkeit, mit welcher die Zelle Fremdstoffe zu zerstören vermag, der ausschlaggebende Faktor ist; es ist also die Gruppe der den betreffenden Fremdstoff spaltenden und oxydierenden Enzyme, welche in Betracht kommt, und man wird also den Schluß ziehen, daß auch diese Enzymgruppe durch die Vorbehandlung verstärkt wird.

Man wird also künftig zwei Arten von Enzyymbildung zu unterscheiden haben:

1. eine spezifische Enzyymbildung, welche durch die Gewöhnung an das betreffende Substrat hervorgerufen ist, und
2. eine generelle Enzyymbildung, für welche die Vorbehandlung mit einem spezifischen Substrat nicht erforderlich ist.

Das Material, welches uns bisher vorliegt, deutet darauf hin, daß die beiden Vorgänge durchaus verschieden sind. Das charakteristische Merkmal der letzteren Enzyymbildung scheint zu sein, daß unter gewissen Umständen die Fortpflanzungsfähigkeit, bezw. die Vermehrungsgeschwindigkeit der Zellen erhöht ist. Immerhin ist daran festzuhalten, daß die letztere Erscheinung wirklich eine «generelle Enzyymbildung» ist, denn die erhöhte Lebenskraft des Protoplasmas, also die Resistenz Fremdstoffen gegenüber und die vergrößerte Vermehrungsfähigkeit, muß eben als eine Steigerung der an diesen Vorgängen

beteiligten Enzymwirkungen, welche wir im einzelnen noch nicht kennen, betrachtet werden.

Die Untersuchung der Beziehungen zwischen Enzyymbildung, Anpassung und äußeren Lebensbedingungen von Mikroorganismen wird in größerem Umfange an anderem Material fortgesetzt. Die Mittel zu diesen Arbeiten verdanken wir einer Schenkung von Herrn Max Sievert.
