

Über den Einfluß des Toluols auf die Zymasen und auf die Phosphatase.

Von

Hans Euler und David Johansson.

(Aus dem biochemischen Laboratorium der Hochschule Stockholm.)

(Der Redaktion zugegangen am 1. Juli 1912.)

Die Enzyme der Hefe lassen sich in bezug auf ihr Verhalten gegen antiseptische Mittel in zwei Gruppen einteilen. Für die erste Gruppe ist die Invertase typisch: Lösungen isolierter Invertasepräparate werden durch Toluol nicht beeinflusst, und auch die rohrzuckerspaltende Wirkung der lebenden Hefe bleibt in Gegenwart von Toluol, Chloroform usw. ungeschwächt. In Gegensatz hierzu stehen die Zymasen: auch hier sind die von der Zelle abgetrennten Enzyme unempfindlich gegen die Protoplasmagifte, aber die Gärwirkung der lebenden Hefe wird durch diese Substanzen stark geschwächt und oft vollständig aufgehoben. Wird die Hefe in geeigneter Weise durch Behandlung mit Alkohol oder Aceton, durch Trocknen im Vakuum bei 40° oder durch langsames Trocknen bei gewöhnlicher Temperatur von ihrem Wassergehalt befreit, so wird die Gärung von Zuckerlösungen durch diese Trockenpräparate in Gegenwart von Toluol viel weniger gehemmt als die Gärung durch lebende Hefe.

Die erwähnten Tatsachen sind durch eine Hypothese¹⁾ zusammengefaßt worden, nach welcher freie Enzyme im allgemeinen durch Protoplasmagifte in ihrer Wirksamkeit nicht gehemmt werden, während diese Enzyme, solange sie an das Protoplasma gebunden sind, durch antiseptische Mittel außer

¹⁾ H. Euler und Beth af Ugglas, Diese Zeitschrift, Bd. 70, S. 279, 1911.

Tätigkeit gesetzt werden. Mit diesem Verhalten der Enzyme gegen Gifte steht nun noch eine zweite Eigenschaft in Zusammenhang, nämlich ihre Extraktionsfähigkeit: die Invertase und die Enzyme der gleichen Gruppe, welche in lebenden Zellen von Protoplasmagiften nicht inaktiviert werden, lassen sich aus der getrockneten Hefe durch Wasser leicht extrahieren, während die Zymasen der Hefen nicht oder — je nach der Heferasse — nur in sehr geringem Maß in die wässrige Lösung, in welcher die Zellen digeriert werden, übergehen.

Für die Vergiftungserscheinungen der lebenden Hefezellen kommen die relativen Mengen von Protoplasmagift und Hefe stark in Betracht, sodaß ein großer Überschuß von Toluol eine Inaktivierung hervorruft, während kleinere Mengen fast ohne Einwirkung sind. Welche Wirkungen der zugesetzten Antiseptika hier in Betracht kommen, inwieweit eine Beeinflussung der Oberflächenspannung ausschlaggebend ist, oder ob die Auflösung der Lipoide der Protoplasmahaut bzw. der Zellwand die wesentlichste Rolle spielt, läßt sich erst nach weiteren Versuchen entscheiden.

Was im folgenden mitgeteilt werden soll, ist die, wie wir glauben, wesentliche Tatsache, daß durch Zusätze von Protoplasmagiften die Geschwindigkeit der Kohlensäureentwicklung in gärenden Zuckerlösungen gegen den Betrag des gebildeten organischen Phosphorsäureesters stark verschoben werden kann.

Läßt man Zucker durch lebende Hefe in Gegenwart von Phosphaten vergären, so wird dabei kein Kohlenhydratphosphorsäureester in der vergärenden Flüssigkeit gebildet. Wird hingegen der entsprechende Versuch in Gegenwart von Toluol angestellt, so erfolgt eine sehr erhebliche Bindung von anorganischem Phosphat, indem auf 100 Gewichtsteile Zucker 100 Gewichtsteile $\text{Na}_2\text{HP}_4\text{O} + 12 \text{H}_2\text{O}$ und mehr gebunden werden.

Versuche.

Erlenmeyer-Kölbchen mit Meißl-Ventilen wurden mit 20 ccm 20%iger Glukose und 20 ccm einer 10%igen Lösung von $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + 12 \text{H}_2\text{O}$, ferner mit 6 g lebender Hefe und

0,2 ccm Toluol gefüllt. Nach einer gewissen Zeit wurde ein Erlenmeyer-Kolben gewogen, um die entwickelte Kohlensäure zu ermitteln, hierauf der Kolbeninhalt filtriert und in 5 ccm des Filtrates die freie Phosphorsäure bestimmt. Die Lösungen waren vor Beginn des Versuches mit CO_2 gesättigt worden.

I.

Minuten	g CO_2	g $\text{Mg}_3\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10^4$ in 5 ccm
Urspr. Lösg.	—	789
40	—	800
72	0,346	777
100	0,417	740
195	0,511	708
350	0,843	48

II.

Minuten	g CO_2	g $\text{Mg}_3\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10^4$ in 5 ccm
Urspr. Lösg.	—	837
70	—	772
142	0,392	768
220	0,525	142
324	0,973	30

III a.

Minuten	g CO_2	g $\text{Mg}_3\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10^4$ in 5 ccm
0	—	825
112	0,156	752
390	0,340	000

III b und c.

Parallelversuch ohne Toluol.

Minuten	g CO_2	g $\text{Mg}_3\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10^4$ in 5 ccm
0	—	825
135	ca. 1	808
0	—	795
330	ca. 1	801

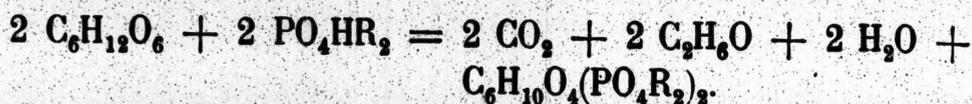
Zunächst ist auf Versuch III und die Parallelversuche hinzuweisen (es ist dies eine der sehr zahlreichen, im hiesigen Laboratorium ausgeführten Versuchsserien über den Einfluß des Toluols, welche alle zum gleichen Ergebnis geführt haben). Während bei Zusatz von Toluol in $6\frac{1}{2}$ Stunden vollständige Bindung des anwesenden Phosphates eingetreten ist, hat eine solche in Abwesenheit von Toluol gar nicht stattgefunden.

Auf die Zusammensetzung des hierbei entstehenden Phosphorsäureesters werden wir bald zurückkommen.

Die beiden Versuche I und II zeigen, wie viele andere hier nicht angeführte, das auffallende Verhalten, daß in den

ersten drei Stunden die Abnahme des freien Phosphates sehr gering ist und erst nach dieser Zeit mit erheblicher Geschwindigkeit einsetzt. Die nächstliegende Deutung scheint die zu sein, daß im Anfang der Reaktion durch die Gärung erst dasjenige Produkt erzeugt werden muß, welches durch das Phosphat unter der Einwirkung der Phosphatase verestert wird.

Diese Versuche bedürfen noch in mehreren Richtungen weiterer Ergänzungen, besonders in Beziehung auf die Ergebnisse von Harden und Young über das Verhältnis zwischen Phosphorsäurebindung und Gärung, auf welches jede Gärungstheorie Rücksicht nehmen muß, und auf die bekannte Gleichung¹⁾ dieser Forscher:



Die Frage, in welchem Umfang diese Gleichung bei Zusätzen von Protoplasmagiften gültig bleibt, scheint uns für die Einsicht in den Mechanismus der alkoholischen Gärung wesentlich.

Mit einer anderen Heferasse wurde ein Versuch angestellt in der Weise, daß die bei gewöhnlicher Temperatur getrockneten Zellen mit angegozener Glukose und mit Phosphatlösungen in Gegenwart und Abwesenheit von Toluol in Berührung kam.

- 2 g getrocknete Hefe,
- 10 ccm Wasser,
- 10 > 20%ige angegozene Glukoselösung,
- 9 > 5%ige Na_2HPO_4 -Lösung.

Minuten	g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$	
	Mit 0,5 ccm Toluol	Ohne Toluol
Urspr. Lösg.	294	304
0 + 20	119	148
41 + 20	38	44
83 + 20	29	48
120 + 20	—	76
265 + 20	22	88
360 + 20	20	133

¹⁾ Proc. Roy. Soc. (B.), Bd. 82, S. 321, 1910.

Die Gramm $Mg_3P_2O_7 \cdot 10^4$ beziehen sich auf Proben von je 10 ccm. Vor der Fällung mit der Magnesiamischung mußten die Lösungen von der Trockenhefe abfiltriert werden, was eine Zeit von etwa 30 Min. in Anspruch nahm. Während dieser Zeit war der unfiltrierte Teil der Lösung im Trichter mit der Hefe in Berührung.

In Abwesenheit von Toluol tritt nach einer gewissen Zeit wieder eine Vermehrung der freien Phosphorsäure ein, was offenbar darauf beruht, daß nun der gebildete Phosphorsäure-ester gespalten und vergoren wird. Ähnliche Erscheinungen sind bereits früher im hiesigen Laboratorium gefunden worden.¹⁾

Wie aus den beschriebenen Versuchen hervorgeht, ist die Phosphatase der untersuchten Hefe einerseits weniger empfindlich gegen Toluol als die Gärungsenzyme, andererseits kann sie aus der getrockneten Hefe leicht extrahiert werden. Sie schließt sich also in dieser Hinsicht den Enzymen der Invertasegruppe an, und die an diesem Enzym gemachten Beobachtungen bilden also eine Bestätigung des früher aufgestellten Satzes, daß Hefenenzyme gegen Antiseptika in dem Maße unempfindlich sind, als sie vom lebenden Plasma befreit sind.

Jedenfalls bilden diese Versuche aber einen neuen Beweis dafür, daß die Phosphatase ein selbständiges, von den übrigen Gärungsenzymen abtrennbares Enzym ist.

Im Anschluß an die beschriebenen Versuche wurde noch untersucht, in welcher Weise die Gärung der Aminosäuren durch Toluol beeinflusst wird.

Es war vorher festgestellt worden, daß auch bei Gegenwart von Toluol eine Hefe, welche Glykokoll vergärt, anorganisches Phosphat nicht zu verestern vermag. Es wird also bei der alkoholischen Gärung des Glykokolls kein Zwischenprodukt gebildet, welches dem bei der Hexosengärung entstehenden entspricht. Die Versuche mit Glykokoll, von welchen wir nur zwei anführen, waren von Parallelversuchen mit Rohrzucker be-

¹⁾ Biochem. Zeitschrift, Bd. 41, S. 215, 1912.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 70, S. 279, 1910, und Bd. 73, S. 85, 1911.

gleitet, welche letztere gleichzeitig mit derselben Hefe angestellt wurden.

Versuche.

3 g Glykokoll + 50 ccm Wasser
+ 10 g lebende Hefe.

Minuten	ccm CO ₂	
	Ohne Toluol	Mit 5 ccm Toluol
43	31	27
83	47	40
114	58	46
332	82	64
458	94	75

3 g Rohrzucker + 50 ccm Wasser
+ lebende Hefe.

Minuten	ccm CO ₂	
	Ohne Toluol	Mit 5 ccm Toluol
	(2 g Hefe)	(10 g Hefe)
25	70	29
55	150	53
90	230	66
111	—	71
320	—	103
445	—	120

3 g Glykokoll + 50 ccm Wasser
+ 10 g lebende Hefe.

Minuten	ccm CO ₂	
	Ohne Toluol	Mit 5 ccm Toluol
43	32	28
87	48	40
140	60	48
263	79	66
337	86	74

50 ccm Wasser + 10 g lebende
Hefe.

Minuten	ccm CO ₂	
	Ohne Toluol	Mit 5 ccm Toluol
52	25	34
100	32	45
150	48	59
275	67	81
350	74	93

Die Tatsache, daß die Autolyse der Hefe durch Zusatz von Toluol beschleunigt wird, ist bereits bekannt. Harden hat in einer interessanten Arbeit im Journal of the Institute of Brewing (1910)¹⁾ darauf hingewiesen und diese Erscheinung mit den Beobachtungen von H. E. und E. F. Armstrong über die Wirkung von Betäubungsmitteln auf Blätter in Beziehung gesetzt.

Der Einfluß des Toluols bei der Vergärung der Aminosäuren geht indessen in einer umgekehrten Richtung wie bei der Autolyse und es zeigt sich also, daß die Vergärung von

¹⁾ Ref. in Woch. f. Brauerei, Bd. 28, S. 104, 1911.

Glykokoll ähnlich wie die vom Rohrzucker durch Zusätze von Toluol stark erniedrigt wird.

Dieses Resultat war von vornherein nicht zu erwarten und wird durch Untersuchungen an anderen Aminosäuren weiter verfolgt werden.

Zusammenfassung.

Als wesentlichstes Ergebnis sei hervorgehoben, daß lebende Hefe, welche unter normalen Umständen in phosphathaltigen Zuckerlösungen keine Veresterung bewirkt, bei Gegenwart von Toluol Phosphat schnell und in großen Mengen an Kohlenhydrat bindet.
