

Untersuchungen über die chemische Zusammensetzung und Bildung der Enzyme.

VIII. Mitteilung.

Über die gleichzeitige Veränderung des Gehaltes an Invertase und an Gärungsenzymen in der lebenden Hefe.

Von

Hans Euler und David Johansson.

Mit drei Kurvenzeichnungen im Text.

(Aus dem biochemischen Laboratorium der Hochschule Stockholm.)
(Der Redaktion zugegangen am 10. Februar 1913.)

Die Veränderung der enzymatischen Rohrzuckerspaltung in lebender Hefe wurde in den vorhergehenden Untersuchungen von uns¹⁾ sowie von Euler und Meyer²⁾ quantitativ studiert, sowohl hinsichtlich des zeitlichen Verlaufs der Zunahme der enzymatischen Wirksamkeit einer gewissen Hefenmenge unter dem Einfluß einer Vorbehandlung, als auch hinsichtlich des Einflusses derjenigen Stoffe, mit welchen die Hefe vorbehandelt wird.

Gegenüber der «Enzyymbildung» bei der Galaktosevergärung³⁾ ergibt sich der Unterschied, daß in obigem Falle das Substrat nicht dem gebildeten Enzym zu entsprechen braucht. Es wurde demgemäß sicher kein größerer Zuwachs an rohrzuckerspaltender Wirkung beobachtet, wenn eine Vorbehandlung der Hefe mit Rohrzucker stattfand, als wenn die Hefe mit Glukose vorbehandelt wurde. Eine Gewöhnung an das Substrat bzw. eine Anpassungserscheinung lag also bei der von uns beobachteten enzymatischen Veränderung der invertierenden Wirkung nicht vor.

¹⁾ Euler und Johansson, Diese Zeitschrift, Bd. 76, S. 388, 1912.

²⁾ Euler und Meyer, Diese Zeitschrift, Bd. 79, S. 274, 1912.

³⁾ Euler und Johansson, Diese Zeitschrift, Bd. 78, S. 246, 1912.

I.

In Rücksicht auf die Versuche, welche L. Lichtwitz¹⁾ nach dem Erscheinen der Arbeiten von B. af Ugglas, Kullberg und uns veröffentlicht hat, wurden noch weitere Untersuchungen darüber angestellt, ob der Zuwachs der invertierenden Wirkung, welche lebende Hefe beim Verweilen in gewissen zuckerhaltigen Nährlösungen erfährt, von der Gegenwart der Spaltprodukte des Rohrzuckers (Glukose und Fruktose) in der Kulturflüssigkeit abhängig ist.

Unsere diesbezüglichen ergänzenden Versuche bezogen sich auf einen Vergleich des Einflusses der Fruktose mit dem des Rohrzuckers.

Es ist zunächst hervorzuheben, daß die Art der Vorbehandlung bei den Versuchen von Lichtwitz eine andere ist als bei unseren Versuchen.²⁾ Lichtwitz impft nämlich die Hefe in die verschiedenen Zuckerlösungen ein und läßt die Hefe sich darin entwickeln.

Die Hefe (Reinkultur der Weinhefe, Rasse «Oppenheimer Kreuz» wurde von Lichtwitz in zwei Reihen gezüchtet. In der Reihe a enthielt die Nährlösung (Hefewasser) 10% Rohrzucker, in der Reihe b 10% Invertzucker. Mit diesen beiden Hefen wurde, nachdem sie so längere Zeit gezogen waren, große Kulturen angelegt, welche bestimmte Mengen Rohrzucker, Invertzucker, oder Mischungen beider enthielten. Mit den auf Rohrzucker und den auf Invertzucker gewachsenen Zellen wurden dann vergleichende Gärungs- und Inversionsversuche angestellt.

Die in Invertzucker gewachsenen Zellen zeigten bei den Versuchen von Lichtwitz tatsächlich eine geringere invertierende Fähigkeit als diejenigen, welche sich in Gegenwart von Rohrzucker entwickelt hatten.

Im Gegensatz hierzu ergaben auch unsere neuen Versuche das Ergebnis, daß — bei unserer, auch hier beibehaltenen Versuchsanstellung — die Spaltpro-

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 78, S. 129, 1912.

²⁾ Dagegen war die von Lichtwitz angewandte Versuchsmethodik zur Ermittlung der invertierenden Wirkung der lebenden Zellen ganz analog der von Euler und Kullberg (Diese Zeitschrift, Bd. 71, S. 20, 1911) angegeben; vgl. daselbst den Abschnitt: Zur Dynamik der Enzymreaktionen mittels Hefezellen.

dukte des Rohrzuckers keinen spezifischen Einfluß auf das Inversionsvermögen der Hefezellen ausüben.

Daß es sich bei den Versuchen von Lichtwitz um eine «Fermentlähmung», also eine Erscheinung handelt, analog der von Tammann¹⁾ in seiner grundlegenden Arbeit beschriebenen, ist allerdings äußerst unwahrscheinlich, wie wir denn überhaupt auf die theoretische Behandlung der Erörterungen, welche Lichtwitz seinen an sich interessanten Versuchen angefügt hat, noch zurückkommen müssen.

II.

In der erwähnten Arbeit von Euler und Meyer wurde zwischen spezifischer und genereller Enzyymbildung unterschieden.

Eine spezifische Enzyymbildung tritt bei der Anpassung von Zellen an gewisse Nahrungsstoffe ein, eine generelle Enzyymbildung überall da, wo es sich um eine allgemeine Kräftigung der Zellen handelt.

Es wurde ferner die Vermutung ausgesprochen, daß bei der im hiesigen Laboratorium studierten Erhöhung des Inversionsvermögens durch Vorbehandlung vielleicht eine generelle Enzyymbildung vorliegt, wobei bereits betont wurde, daß allerdings von einer Parallelität der Zunahme nicht die Rede sein kann.

Um über die Art der «Invertasebildung» Aufschluß zu gewinnen, wurde in der vorliegenden Untersuchung die unter gewissen Bedingungen vorbehandelte Hefe gleichzeitig auf ihre Invertasewirkung und ihre Gärungswirkung untersucht.

Versuchsanordnung.

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

0,25 g $MgSO_4$	5 g KH_2PO_4
4 » $(NH_4)_2SO_4$	20 » Rohrzucker.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 16, S. 271, 1892. — Zeitschrift f. physik. Chem., Bd. 18, S. 426, 1895.

Diese Zusammensetzung der Nährlösung gilt für alle Versuche, welche in den Figuren 1 und 2 zusammengefaßt sind, und außerdem für die Versuche der Kurve 3 in Fig. 3.

Die Vorbehandlung der Hefe in den Versuchen der Kurve 1 Fig. 3 geschah in einer Nährlösung, welche weniger Stickstoff enthielt als die früher angewandte. Die Zusammensetzung war per Liter:

0,25 g $MgSO_4$	5 g KH_2PO_4
1 „ $NH_4H_2PO_4$	20 „ Rohrzucker.

Die in der Kurve 2, Fig. 3 dargestellte Hefe wurde mit folgender Lösung vorbehandelt:

0,25 g $MgSO_4$	5 g KH_2PO_4
0,25 „ $NH_4H_2PO_4$	20 „ Rohrzucker.

Ein Parallelversuch mit einer Nährlösung von der Zusammensetzung:

0,25 g $MgCl$	5 g KH_2PO_4
0,25 „ $NH_4H_2PO_4$	20 „ Rohrzucker

ergab gegenüber dem vorhergehenden Versuch keinen Unterschied. Wie bei der Untersuchung von Euler und H. Meyer (diese Zeitschrift, Bd. 79, S. 274; 1912) wurden nun, mit einer und derselben Hefe als Ausgangsmaterial, teils Reihenversuche angestellt, bei welchen sich die Hefe während verschiedener Zeiträume in der Nährlösung befand (in der Fig. 1 sind die betreffenden Beobachtungen mit I, II, III, IV und V bezeichnet) teils wurden Abzweigungen gemacht, indem einem Kolben dieser ersten Serie Hefe entnommen und in eine neue, gleich große Menge Nährlösung verpflanzt wurde (Serie II_1 , IV_1 und V_1). Auch von dieser zweiten Reihe wurde wieder eine abgewogene Hefemenge weiter verpflanzt (Serie II_1a).

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 Teiles der Hefe bei 95° bestimmt. Von dieser Hefe wurden 0,25 g in 10 ccm 1%iger NaH_2PO_4 -Lösung aufgeschwemmt und nach 10 Minuten mit 20 ccm einer 20%igen Rohrzuckerlösung versetzt.

Zur Messung der Inversionskraft der Hefe wurde nach bestimmten Versuchszeiten die gesamte Reaktion in jedem Kolben mit 10 ccm einer 5%igen Sodalösung abgebrochen. Die Lösung wurde hierauf abfiltriert und im 1 dm-Rohr polarisiert.

Bei den Gärversuchen wurde die Kohlensäure volumetrisch bestimmt. Die Übersättigung von Kohlensäure wurde vor jeder Ablesung durch anhaltendes energisches Schütteln aufgehoben. Bei allen Gärversuchen befand sich 0,5 g Hefe (von ca. 35% Trockengewicht) in 25 ccm 5%iger Rohrzuckerlösung. Versuchstemperatur bei der Gärung durchgehend 30°.

In allen Gärungstabellen und in allen Inversions- und Gärungskurven ist die Reaktionsgeschwindigkeit auf einen Trockengehalt von 35% reduziert. Die Inversionsversuche sind außerdem auf eine gemeinsame Versuchstemperatur 19° reduziert.

(Tab. 1.)

0.

Ohne Vorbehandlung. Temperatur 20°.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	6,75	—
15	5,29	52
25	4,30	56
35	3,62	52
∞	— 2,16	—

Trockensubstanz: 36,4%.

(Tab. 2.)

I.

6 Stunden vorbehandelt.

Temp. 20°.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	6,75	—
15	4,35	91
25	3,08	92
35	1,88	98
∞	— 2,16	—

Trockensubstanz: 32,9%.

(Tab. 3.)

II.

24 Stunden vorbehandelt.

Temp. 19,5°.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	6,75	—
15	4,02	106
25	2,54	111
35	1,40	114
∞	— 2,16	—

Trockensubstanz: 34,6%.

(Tab. 4.) III.
46 Stunden vorbehandelt.
Temp. 18,6°.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	6,75	—
15	4,00	107
25	2,55	111
35	1,35	116
∞	— 2,16	—

Trockensubstanz: 28,1%.

(Tab. 5.) IV.
70 Stunden vorbehandelt.
Temp. 18,5°.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	6,75	—
16	3,67	115
25	2,45	114
35	1,27	118
∞	— 2,16	—

Trockensubstanz: 28,9%.

(Tab. 6.) V.
118 Stunden vorbehandelt.
Temp. 19°.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	6,82	—
15	3,32	143
25	1,15	153
35	0,38	156
∞	— 2,18	—

Trockensubstanz: 35,2%.

(Tab. 7.) VI.
165 Stunden vorbehandelt.
Temp. 19°.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	6,85	—
15	2,82	171
25	0,97	183
35	— 0,36	198
∞	— 2,19	—

Trockensubstanz: 35,4%.

(Tab. 8.) V₁.
125 + 15 Stunden vorbehandelt.
Temp. 19°.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	6,82	—
15	2,55	186
25	0,85	194
25	— 0,48	206
∞	— 2,18	—

Trockensubstanz: 37,5%.

(Tab. 9.) V₂.
125 + 38 Stunden vorbehandelt.
Temp. 19°.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	6,85	—
15	2,43	194
25	0,55	207
35	— 0,62	217
∞	— 2,19	—

Trockensubstanz: 38,9%.

(Tab. 10.) IV₁.
74 + 42 Stunden vorbehandelt.
Temp. 19°.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	6,82	—
15	3,05	157
25	1,32	164
35	0,26	162
∞	-2,18	—

Trockensubstanz: 32,6%.

(Tab. 11.) IV₂.
74 + 115 Stunden vorbehandelt.
Temp. 19°.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	6,85	—
16	3,12	144
25	1,69	147
35	0,40	155
∞	-2,19	—

Trockensubstanz: 30,0%.

(Tab. 12.) II₁.
24 + 18 Stunden vorbehandelt.
Temp. 19°.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	6,75	—
15	3,29	142
26	1,50	149
35	0,48	151
∞	-2,16	—

Trockensubstanz: 30,6%.

(Tab. 13.) II_{1,a}.
24 + 18 + 18 Stunden vorbeh.
Temp. 19°.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	6,75	—
15	2,68	177
25	1,00	180
35	0,12	169
∞	-2,16	—

Trockensubstanz: 34,0%.

(Tab. 14.) II_{1,a₁}.
24 + 18 + 18 + 43 Stunden vor-
behandelt.
Temp. 192°.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	6,82	—
15	2,85	168
25	0,95	183
35	-0,23	190
∞	-2,18	—

Trockensubstanz: 35,5%.

(Tab. 15.) II_{1,a₁₂}.
24 + 18 + 18 + 43 + 18 Stunden
vorbehandelt.
Temp. 19°.

Minuten	α	$k \cdot 10^4$
0	6,82	—
16	2,12	200
25	0,55	207
35	-0,60	216
∞	-2,18	—

Trockensubstanz: 42,8%.

(Tab. 16.)

a)

Minuten	Ohne Vorbehand- lung ccm CO ₂	Vor- behandelt 46 Stunden ccm CO ₂	Vor- behandelt 70 Stunden ccm CO ₂	Vor- behandelt 118 Stunden ccm CO ₂	Vor- behandelt 165 Stunden ccm CO ₂
60	35,5	33,5	24	5	1
120	69	67	52	8	1,5
180	108	101	74	12	1,8
240	144	126	102	16	2
300	177	152	125	25	2,1

(Tab. 17.)

B

B

C

C

Minuten	Vorbehandelt 125 + 15 Std. ccm CO ₂	Vorbehandelt 125 + 38 Std. ccm CO ₂	Vorbehandelt 74 + 42 Std. ccm CO ₂	Vorbehandelt 74 + 115 Std. ccm CO ₂
60	7	6	29	23
120	12,5	11	59	45
180	18	15,5	87	62
240	25	19	107	83
300	32	22,5	132	103

(Tab. 18.)

b)

c)

d)

e)

Minuten	Vorbehandelt 24 + 18 Std. ccm CO ₂	Vorbehandelt 24 + 18 + 18 Stunden ccm CO ₂	Vorbehandelt 24 + 18 + 18 + 43 Stunden ccm CO ₂	Vorbehandelt 24 + 18 + 18 + 43 + 18 St. ccm CO ₂
60	38	32	19	10,5
120	72	61	35,5	21
180	103	90	54,5	34
240	130	113	79	47
360	154	—	—	59

(Tab. 19.)

1

Mi- nuten	Ohne Vor- behand- lung ccm CO ₂	Vor- behandelt 21 Std. ccm CO ₂	Vor- behandelt 69 Std. ccm CO ₂	Vor- behandelt 93 Std. ccm CO ₂	Vor- behandelt 117 Std. ccm CO ₂	Vor- behandelt 141 Std. ccm CO ₂	Vor- behandelt 165 Std. ccm CO ₂
60	36,5	43	30	22	15	11	2
120	72	85	59	44	31,5	20,5	3,5
180	107	122	88	67	52	33	5,5
240	137	155	117	89	70,5	46	7,5
300	167	181	141	112	87	60	9,5

(Tab. 20.)

2

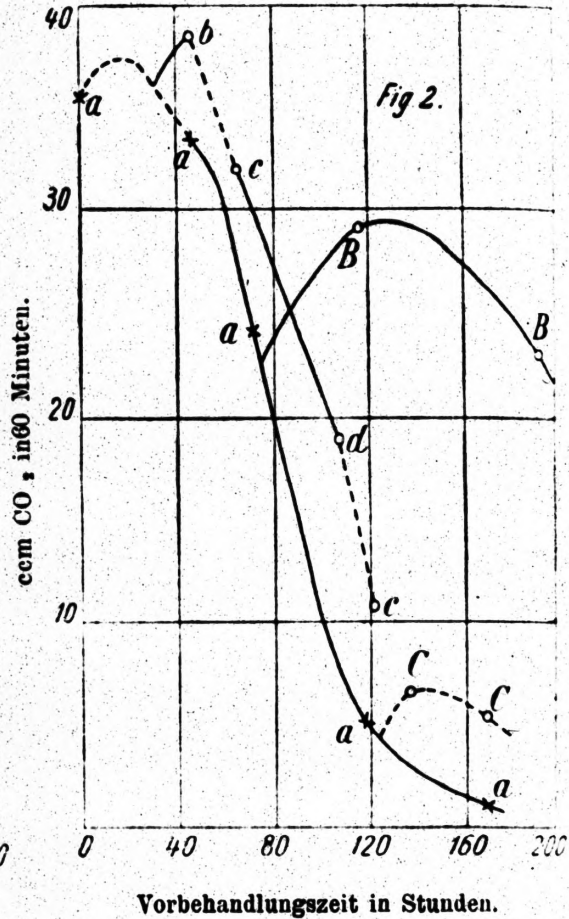
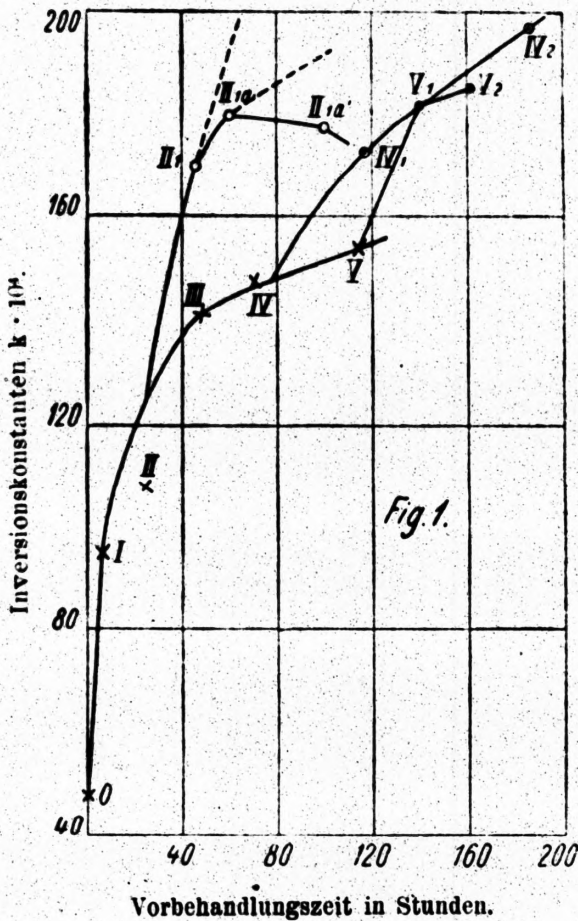
Minuten	Ohne Vorbehand- lung ccm CO ₂	Vorbehandelt 5 Stunden ccm CO ₂	Vorbehandelt 22 Stunden ccm CO ₂	Vorbehandelt 46 Stunden ccm CO ₂
60	36	48	41,5	35
120	76	92	83	67
180	114	139	121	97
240	148	—	155	123
300	187	—	182	147

(Tab. 21.)

3

Minuten	Ohne Vorbehand- lung ccm CO ₂	Vor- behandelt 23 Stunden ccm CO ₂	Vor- behandelt 45 Stunden ccm CO ₂	Vor- behandelt 69 Stunden ccm CO ₂	Vor- behandelt 93 Stunden ccm CO ₂
60	38	46	32	15	4
120	78	89	65	30,5	8
180	118	124	94	46,5	12
240	155	161	125	65,5	19
300	191	189	153	88,5	30

Die Mittelwerte der in den Tabellen 1—15 angegebenen Inversionskonstanten findet man in der Fig. 1 zusammengestellt. Zu den gleichzeitig angestellten Gärungsversuchen entnehmen



wir die Hefemengen denselben Kulturkolben, welche auch die Hefe für die Inversionsversuche lieferten, so daß die beiden Versuchsserien sich auf genau die gleiche Hefe beziehen. Diese Gärversuche sind in den Tabellen 16—18 wiedergegeben und in der Fig. 2 zusammengefaßt. Den einzelnen Versuchen a—e sowie B und C entsprechen in dieser Figur die so bezeichneten Punkte. Der Vergleich der Fig. 1 und 2 gibt also ein vollständiges Bild von der gleichzeitigen Veränderung der Inversions- und Gärkraft bei gleicher Vorbehandlung der Hefe.

Wie unmittelbar ersichtlich, besteht durchaus keine Parallelität zwischen der gleichzeitigen Änderung der beiden Enzymwirkungen durch die Vorbehandlung. Während z. B. das Inversionsvermögen der Hefe nach 40stündiger Vorbehandlung auf mehr als das 3fache steigt, ist in der gleichen Zeit die Gärkraft geringer als zu Anfang der Vorbehandlung geworden. Während dann weiter die Inversionskraft in den folgenden

Tagen immer noch erheblich zunimmt, wird gleichzeitig die Gärkraft ganz außerordentlich stark geschwächt, so daß, wenn wir das Verhältnis der beiden Enzymwirkungen in den in den Figuren gewählten relativen Einheiten ausdrücken, der Zahlenwert dieses Verhältnisses beträgt:

Inversionsk. : Gärkraft

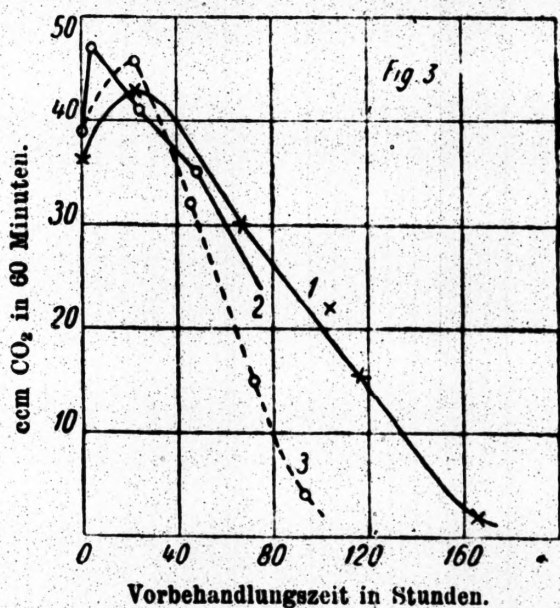
Vor Beginn der Vorbehandlung 50 : 35 = 1,4

Nach 100stündiger Vorbehandlung 150 : 10 = 15,0.

Es ist nun zunächst zu untersuchen, worauf die starke Erniedrigung der Gärkraft bei unserer Vorbehandlung beruht, und ob eine eventuelle Vermehrung der Zymase durch das Auftreten eines Hemmkörpers verdeckt wird.

Daß sich die Gärwirkung der Hefe nicht in dem Maße erhöhen läßt, wie dies nach den Ergebnissen des hiesigen Laboratoriums für die Inversionswirkung der Fall ist, war schon nach einer Reihe älterer Versuche zu erwarten. Insbesondere sind hier die Untersuchungen von H. Lange¹⁾ aus dem Institut für Gärungsgewerbe zu erwähnen und eine Arbeit von Buchner und Klatt.²⁾ Aus den Versuchen der genannten Forscher geht in guter Übereinstimmung hervor, daß Vermehrung der Gärkraft durch das sogenannte Regenerationsverfahren im Umfang von 30—100% auftritt, in höherem Maße aber nur dann, wenn die Gärkraft bezw. der Zymasevorrat im Ausgangsmaterial sehr gering war.

Wir machen hier noch besonders auf die Form der Gärkraftkurven der Fig. 2 und 3 aufmerksam. Es tritt bei der Vorbehandlung eine anfängliche Steigerung ein, welche sich auf die ersten 10—20 Stunden



¹⁾ Wochenschrift für Brauerei, Bd. 24, S. 417, 1907.

²⁾ Biochem. Zeitschrift, Bd. 9, S. 415, 1908.

erstreckt, und sich bei jeder Überimpfung auf eine neue Menge der Nährlösung, also in einen neuen Kolben wiederholt. (Man beobachte in Fig. 2 die Punkte b, B und C.) Diese anfängliche Steigerung der Gärkraft, welche etwa in den Zeitraum der nach der Einführung der Hefe eintretenden Gärung fällt, wurde noch durch besondere Versuche näher studiert, welche in den Tabellen 19—21 enthalten und in der Fig. 3 zusammengefaßt sind. Auch bei diesen Versuchen tritt deutlich das Maximum der Gärwirkung innerhalb der ersten 24 Stunden zutage.

Die Versuchsbedingungen der drei Versuche 1, 2 und 3 dieser Figur unterscheiden sich, wie Seite 100 erwähnt, hinsichtlich der Zusammensetzung der Nährlösung, indem bei den Versuchen 1 und 2 die Nährlösung bedeutend weniger NH_4 enthielt als bei Versuch 1. Diese Versuche mögen nur als für weitere Arbeiten orientierende betrachtet werden. Trotz den sehr wertvollen Versuchen von Lange lassen sich bis jetzt sehr wenig Schlüsse über die Erhöhung der Gärwirkung durch die Vorbehandlung ziehen.

Zusammenfassung.

Als Zusammenfassung unserer Versuche können die Kurven der Figuren 1—3 angesehen werden. Sie besagen, daß durch die von uns angewandte Vorbehandlung eine Vermehrung des enzymatischen Inversionsvermögens der Hefe eintritt,

welche weder als eine Anpassung aufgefaßt werden kann, da das Verweilen der Hefe in der Lösung des Spaltproduktes keine geringere Wirkung hervorruft als die Vorbehandlung mit dem Substrat Rohrzucker,

welche andererseits auch nicht auf eine allgemeine Erhöhung der vitalen Tätigkeit zurückgeführt werden kann, da gleichzeitig die Gärkraft sehr stark abnimmt,

sondern als eine Erscheinung eigener, noch unbekannter Art anzusehen ist.