

Untersuchungen über die chemische Zusammensetzung und Bildung der Enzyme.

IX. Mitteilung.

Zur Kenntnis der Invertasebildung.

Von

Hans Euler und Harald Cramér.

(Aus dem biochemischen Laboratorium der Hochschule Stockholm.)

(Der Redaktion zugegangen am 13. November 1913.)

Bevor wir über die in dieser Arbeit mitzuteilenden neuen Versuche berichten, wollen wir an die Resultate erinnern, welche bis jetzt bezüglich des Verlaufs der Invertasebildung im hiesigen Laboratorium gewonnen worden sind. Seit der Veröffentlichung der letzten dieser Arbeiten ist eine Abhandlung von Meisenheimer, Gambarjan und Semper¹⁾ erschienen. Diese Arbeit, sowie eine Kritik derselben von Lichtwitz²⁾ werden wir im Zusammenhang mit den oben genannten Untersuchungen zu besprechen haben.

Bei den 1910 angestellten orientierenden Versuchen³⁾ war eine ziemlich umständliche Methodik zur Anwendung gekommen, indem die unter verschiedenen Bedingungen kultivierte Hefe getrocknet und zur Gewinnung der Invertase mit Wasser extrahiert wurde. Bald darauf wurde das einfachere und zuverlässigere Verfahren gewählt, die Invertase in der vorbehandelten Hefe selbst zur Wirkung kommen zu lassen. Schon O'Sullivan und Thompson,⁴⁾ sowie Brown⁵⁾ hatten in

¹⁾ Biochem. Zeitschr., Bd. 54, S. 122 (1913).

²⁾ Biochem. Zeitschr., Bd. 56, S. 160 (1913).

³⁾ Euler und af Ugglas, Svenska Vet. Akad. Arkiv f. Kemi, Bd. 3, S. 34 (1910).

⁴⁾ Journ. Chem. Soc., Bd. 61, S. 926 (1892).

⁵⁾ Journ. Chem. Soc., Bd. 81, S. 373 (1902).

dieser Weise Inversionsversuche angestellt, und es wurde nun eine Methode ausgearbeitet, welche gestattete, exakte Angaben über die Geschwindigkeit durch Ermittlung der Inversions-

konstanten $k = \frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-x}$ zu machen.¹⁾

Die vorbehandelte Hefe wurde abgepreßt und in einer Rohrzuckerlösung aufgeschlemmt, und zwar 0,25 g Hefe in 25 ccm 16%iger Rohrzuckerlösung bzw. in einer Mischung von 20 ccm 20%iger Rohrzuckerlösung und 10 ccm 1%iger NaH_2PO_4 -Lösung.²⁾ Nach verschiedenen Zeiten wurde die Reaktion durch Zusatz von 10 ccm 5%iger Sodalösung abgebrochen worauf die abfiltrierte Lösung im Polarisationsapparat untersucht wurde und zwar im 1 dm-Rohr bei etwa 20°.

Einfluß von Rohrzucker, Glukose und Fruktose.

Die ersten mit Reinkulturhefe angestellten Versuche galten dem Vergleich von Hefezellen, welche einerseits mit dem Substrat, andererseits mit den Spaltprodukten des Rohrzuckers vorbehandelt worden waren. Durch dieselben sollte endgültig konstatiert werden, ob in lebenden Hefezellen eine Hemmung der Invertase durch die Spaltprodukte des Substrates eintritt, wie dies bei dem isolierten Enzym beobachtet worden war.

Bei diesen Versuchen von Euler und D. Johansson und den späteren von Euler und Mayer wurde etwa 3 g Hefe in 200 ccm einer Nährlösung eingeführt, welche im Liter enthielt:

| | |
|------------------------|------------------------------|
| 0,25 g MgSO_4 | 5 g KH_2PO_4 |
| 4 » Asparagin | 20 » Zucker. |

Es wurden also Parallelversuche angestellt mit solchen Lösungen, welchen einerseits Rohrzucker, andererseits Traubenzucker zugesetzt war. Als Ergebnis führen wir die in folgender Tabelle enthaltenen Werte an:

¹⁾ Euler und Kullberg, Diese Zeitschr., Bd. 71, S. 20 (1911).

²⁾ Durch die Anwesenheit von Phosphat wird bei allen Versuchen eine geeignete und sehr nahe gleiche Konzentration der H-Ionen eingehalten.

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

Es zeigte sich also deutlich, daß die Erhöhung des Invertasegehaltes, welche bei der Vorbehandlung der Hefe mit Rohrzucker eintritt, sicher nicht spezifisch ist. Vielmehr wird durch eine entsprechende Vorbehandlung mit Glukose ebenfalls eine sehr starke Enzymbildung — annähernd 300% — erzielt.¹⁾

Diese unerwarteten Ergebnisse haben in neuester Zeit eine vollständige Bestätigung durch eine eingehende Untersuchung von Meisenheimer, Gambarjan und Semper gefunden (l. c.). Mit der gleichen Methodik wie Euler und Meyer fanden die genannten Forscher z. B. folgende Inversionskonstanten:

| Nach Stunden | Auf Glukose | Auf Rohrzucker |
|--------------|-------------|----------------|
| 0 | 28 | 28 |
| 26 | 97 | 115 |
| 72 | 103 | 120 |
| 96 | 105 | 139 |

Meisenheimer und seine Mitarbeiter haben noch eine zweite Arbeitsmethode gewählt, welche von der unseren besonders dadurch abwich, daß die Vorbehandlung der untergärigen Bierhefe in reiner Zuckerlösung geschah, also ohne Zusatz anderer organischer oder unorganischer Nährstoffe.

Die Gärung dieser Hefe in den reinen Rohrzuckerlösungen wurde nach bestimmten Zeiten (1—2 Tagen) durch Abkühlen mit Eis unterbrochen.

¹⁾ Was den relativen Grad der Enzymbildung angeht, welcher einerseits in Rohrzucker, andererseits in Glukose erhalten wird, so ist derselbe in hohem Grad von Zuckerkonzentration, Hefenmenge und anderen Versuchsbedingungen abhängig. In der Regel wird durch Rohrzucker eine etwas kräftigere Wirkung erzielt. Hierzu ist zu bemerken, daß bei der Vorbehandlung die Saccharose in kurzer Zeit invertiert ist, und dann tatsächlich eine Invertzuckerlösung vorliegt. Invertzucker und besonders Fruktose hat Meisenheimer besonders wirksam gefunden.

Von der sich bald zu Boden setzenden Hefe wurde abdekantiert und eine Probe zur Anfertigung von Preßsaft und Acetonfällung entnommen; der Rest wurde mit neuer Zuckerlösung überschichtet usw.

Die Prüfung der im Exsikkator gut getrockneten Acetonfällung auf ihren Invertasegehalt wurde mit 0,002 g oder mit 0,004 g in schwach angesäuerter Zuckerlösung bei 20° vorgenommen.

Da die Mitteilung von Meisenheimer, welche eine Besprechung der Versuche von Lichtwitz enthielt, diesen zu einer Gegenkritik veranlaßte, welcher wir unsererseits nicht beipflichten können, sei gleich hier die Aufmerksamkeit auf unsere Versuchsbedingungen gelenkt, um mißverständliche Deutungen der experimentellen Ergebnisse, welche mit unserer Methodik gewonnen worden sind, von vornherein auszuschließen.

Bei den ersten Versuchen von D. Johansson wurden in 100 ccm Nährlösung 1,5 g Hefe, bei den späteren¹⁾ 1 g Hefe angewandt. Letzteres Verhältnis wählten auch Euler und Meyer²⁾ bei den l. c. S. 285 u. ff. angegebenen Versuchen; nur bei der ersten Serie geschah die Vorbehandlung mit 2 g Hefe in 100 ccm.

Unter den angegebenen Bedingungen befindet sich nach direkten Zählungen, welche wir Herrn Doktor B. Palm verdanken, beim Einwägen der Hefe in die Flüssigkeit $18 \cdot 10^{10}$ Zellen.

Es wurde ferner besonders festgestellt, daß in dieser Lösung bzw. in dieser Aufschlämmung von Zellen ein deutliches Wachstum eintritt, solange der Hefe vergärbare Zucker zur Verfügung steht.

1 g frische Hefe in 100 ccm Nährlösung.

| | | |
|--------------------------------------|--------------------|-----------|
| Zellenzahl beim Beginn des Versuchs: | $18 \cdot 10^{10}$ | } Gärung. |
| » nach 24 Stunden: | $31 \cdot 10^{10}$ | |
| » » 48 » : | $34 \cdot 10^{10}$ | |

Indessen zeigte nicht allein die zunehmende Zellenzahl, sondern auch das Aussehen der Hefe,³⁾ daß es sich unter diesen Umständen keineswegs um eine Autolyse handeln kann. Viel-

¹⁾ Euler und D. Johansson, Diese Zeitschr., Bd. 84, S. 274 (1912).

²⁾ Euler und H. Meyer, Diese Zeitschr., Bd. 79, S. 274 (1912).

³⁾ In der überwiegenden Anzahl der gezählten Zellen hatten sich die Vakuolen zu einer einzigen vereinigt.

mehr war daran zu denken, inwiefern die Verjüngung der Zellen die Verstärkung der Enzymwirkung verursachen kann.

Schon in der vorhergehenden Arbeit wurde in Rücksicht darauf, daß die Hefe unter der Vorbehandlung eine weitgehende allgemeine Kräftigung erfährt, geprüft, ob und in welchem Grade die Gärwirkung der Hefe gleichzeitig mit der Inversionsfähigkeit zunimmt. Die Versuche von Euler und Johansson haben gezeigt, daß die erwartete Erhöhung der Gärkraft bei der von uns gewählten Art der Vorbehandlung nicht eintritt, daß vielmehr unter den gewählten Umständen die Gärkraft der Hefe ständig sinkt. Es geht dies aus den beiden Figuren auf Seite 106 der genannten Mitteilung hervor.

Während z. B. das Inversionsvermögen der Hefe nach 40stündiger Vorbehandlung auf mehr als das Dreifache 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 Figuren gewählten relativen Einheiten ausdrücken, der Zahlenwert dieses Verhältnisses beträgt:

Inversionskraft : Gärkraft:

| | | | |
|---------------------------------|-----|---|------------|
| Vor Beginn der Vorbehandlung | 50 | : | 35 = 1,4, |
| Nach 100stündiger Vorbehandlung | 150 | : | 10 = 15,0. |

Wir haben auf Grund dieser Versuche dann auch als Ergebnis angegeben, daß die von uns beobachtete Enzyymbildung nicht auf eine allgemeine Erhöhung der vitalen Tätigkeit zurückgeführt werden kann.

Daß es sich bei den im hiesigen Laboratorium ausgeführten Versuchen nicht um eine vermehrte Invertasewirkung im beschädigten Anteil der Zellen handelt, wird jedenfalls auch dadurch widerlegt, daß gerade da, wo weitgehende Autolyse stattfindet, also beim Stehen der Hefe in reinem Wasser keine oder höchstens eine geringe Enzyymbildung zu beobachten war.

Es seien nun einige Versuche angeführt, welche in Rücksicht auf die Angaben von Lichtwitz¹⁾ ausgeführt wurden.

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

Dieselben ließen die Annahme offen, daß beim Einimpfen weniger Zellen in eine Nährlösung, in welcher starkes Wachstum eintritt, andere Vorbehandlungserscheinungen auftreten als unter den von uns gewählten Bedingungen. Dies ist, wie sich ergeben hat, nicht der Fall, so daß wir ebensowenig wie Meisenheimer die Ergebnisse von Lichtwitz erklären können.

Vorbehandlung wachsender Hefezellen mit Rohrzucker bzw. Glukose.

10 ccm Hefenemulsion (Reinkultur der Hefe H) wurden steril in zwei Kolben eingeführt, welche je 500 ccm Lindners Nährlösung mit 25 g Rohrzucker bzw. 25 g Glukose enthielten. Nach Verlauf von zwei Tagen wurden aus diesen Kolben wiederum je 10 ccm entnommen und in entsprechende neue Lösungen eingeführt, und dieses Überimpfen wurde noch ein drittes Mal wiederholt.

Mit den so erhaltenen Kulturen wurden nach zwei Tagen Inversionsversuche angestellt (A); da aber bei diesen Versuchen die Inversion sehr schwach war, wurde aus der vorletzten der obigen Kulturen eine Überimpfung von 30 ccm Emulsion angestellt, und nach zwei weiteren Tagen wurden mit diesen Kulturen die Inversionsversuche (B) ausgeführt.

Gleichzeitig mit den Inversionsversuchen wurde in jedem Kolben die Zellenanzahl mikroskopisch durch Zählen festgestellt.

Zur Ausführung der Inversionsversuche wurden jedem Kolben nach kräftigem Umschütteln 10 ccm Emulsion entnommen, welche in 20 ccm 20%iger Rohrzuckerlösung + 10 ccm 1%iger Lösung von NaH_2PO_4 eingetragen wurde. Die Reaktion wurde mit 10 ccm 5%iger Sodalösung abgebrochen.

1. Versuchsreihe A.

Rohrzucker.

I. Zellenanzahl: 222,0.

Drehung der Nährlösung: $-0,07^\circ$.

| Minuten | α | $k \cdot 10^6$ |
|----------|----------|----------------|
| 0 | 5,54 | — |
| 60 | 5,48 | 60 |
| 180 | 5,38 | 53 |
| 270 | 5,30 | 54 |
| ∞ | -1,77 | — |

II. Zellenanzahl: 161,6.

Drehung der Nährlösung: $-0,05^\circ$.

| Minuten | α | $k \cdot 10^6$ |
|----------|----------|----------------|
| 0 | 5,52 | — |
| 60 | 5,49 | 50 |
| 180 | 5,41 | 43 |
| 270 | 5,34 | 45 |
| ∞ | -1,77 | — |

Glukose.

I. Zellenanzahl: 139,4.

Drehung der Nährlösung: $+0,18^\circ$.

| Minuten | α | $k \cdot 10^6$ |
|----------|----------|----------------|
| 0 | 5,52 | — |
| 60 | 5,49 | 30 |
| 180 | 5,42 | 33 |
| 270 | 5,38 | 31 |
| ∞ | -1,77 | — |

II. Zellenanzahl: 145,0.

Drehung der Nährlösung: $+0,18^\circ$.

| Minuten | α | $k \cdot 10^6$ |
|----------|----------|----------------|
| 0 | 5,54 | — |
| 60 | 5,51 | 30 |
| 180 | 5,43 | 31 |
| 270 | 5,40 | 31 |
| ∞ | -1,77 | — |

Hieraus ergaben sich folgende Mittelwerte für: $\frac{k \cdot 10^6}{\text{Zellenanzahl}}$

| | I. | II. |
|------------|----|-----|
| Rohrzucker | 25 | 28 |
| Glukose | 23 | 21. |

2. Versuchsreihe B.

Rohrzucker.

I. Zellenanzahl: 337,9.

Drehung der Nährlösung: $-0,20^\circ$.

| Minuten | α | $k \cdot 10^6$ |
|----------|----------|----------------|
| 0 | 5,48 | — |
| 60 | 5,32 | 16,2 |
| 120 | 5,17 | 15,9 |
| 240 | 4,89 | 15,4 |
| ∞ | -1,75 | — |

II. Zellenanzahl: 391,9.

Drehung der Nährlösung: $-0,22^\circ$.

| Minuten | α | $k \cdot 10^6$ |
|----------|----------|----------------|
| 0 | 5,48 | — |
| 60 | 5,30 | 16,8 |
| 120 | 5,18 | 15,3 |
| 240 | 4,88 | 15,7 |
| ∞ | -1,75 | — |

Glukose.

I. Zellenanzahl: 402,0.

Drehung der Nährlösung: $+0,43^\circ$.

| Minuten | α | $k \cdot 10^6$ |
|----------|----------|----------------|
| 0 | 5,48 | — |
| 60 | 5,35 | 13,1 |
| 120 | 5,24 | 12,2 |
| 240 | 5,00 | 12,4 |
| ∞ | -1,75 | — |

II. Zellenanzahl: 365,0.

Drehung der Nährlösung: $+0,43^\circ$.

| Minuten | α | $k \cdot 10^6$ |
|----------|----------|----------------|
| 0 | 5,48 | — |
| 60 | 5,36 | 12,1 |
| 120 | 5,26 | 11,2 |
| 240 | 5,02 | 11,9 |
| ∞ | -1,75 | — |

Die Mittelwerte $\frac{k \cdot 10^8}{\text{Zellenzahl}}$ dieser Versuchsreihe sind:

| | I. | II. |
|------------|----|-----|
| Rohrzucker | 47 | 41 |
| Glukose | 31 | 32 |

Der für den Quotienten $\frac{K \cdot 10^8}{\text{Zellenzahl}}$ erhaltene Wert für unvorbehandelte Hefe ist 9,0.

Das Ergebnis der Vorbehandlung ist also unter Bedingungen, welche denen von Lichtwitz sehr nahe kommen, das gleiche wie das früher von uns und dann auch von Meisenheimer erhaltene: Es wird sowohl durch Rohrzucker als durch die Spaltprodukte desselben eine Invertasebildung erzielt. Für eine «Fermenthemmung» wurden keine Anhaltspunkte gefunden.

Ein wesentlicher Teil unserer Versuche galt der Frage, in welcher Weise die Enzyymbildung fortschreitet. In dieser Hinsicht war in diesem Laboratorium bereits ein anderes Enzym, die Galaktase, untersucht worden, und es hatte sich ergeben, daß bei der Kultur der Hefe in einer bestimmten Nährlösung ein Maximum der betreffenden Enzymwirkung erreicht wird. Auch für die Invertasewirkung ergab sich ein ähnliches Resultat, wie aus der Figur Seite 394 (Diese Zeitschr., Bd. 76) sowie aus dem Vergleich zwischen den gefundenen und den aus der Enzyymbildungskonstanten berechneten Werten der Inversionsgeschwindigkeit hervorgeht.

Das so erhaltene Maximum gilt jedoch nur, solange die Hefe sich in ein und derselben Nährlösung befindet. Wird die Hefe, nachdem sie das erste Maximum erreicht hat, oder während sie demselben zustrebt, in eine frische Nährlösung von der gleichen Zusammensetzung wie die erste übergeführt, so tritt eine weitere Vermehrung der Enzymwirkung ein, und diese Überimpfung kann mit dem gleichen Erfolg mehrmals wiederholt werden. Auf diese Weise gelangt man schließlich zu recht erheblichen Beträgen der Enzymanreicherung; Euler und Meyer erzielten so eine Vermehrung der Invertasewirkung im Verhältnis 1 : 7,5.

Invertasebildung und Stickstoffnahrung.

Allen Wahrscheinlichkeit nach ist die Invertasebildung mit der Neubildung des Protoplasmas der Hefezellen aufs engste verknüpft. Der Aufbau des Protoplasmas ist aber wiederum abhängig einerseits von der Energie liefernden Gärung, andererseits von dem Gehalt der Nährlösung an geeigneten NH_3 liefernden Substanzen. Es war also von vornherein anzunehmen, daß die Natur der Stickstoffnahrung die Invertasebildung beeinflussen wird. Einstweilen hat sich indessen noch kein großer Unterschied in dieser Hinsicht ergeben, wie die folgende Zusammenstellung zeigt.

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

Sogar wenn der zur Vorbehandlung verwandten Lösung überhaupt kein Stickstoffmaterial zugesetzt wird, tritt noch eine Invertasebildung ein, allerdings in geringerem Maße.

Daß in den Hefezellen die Neubildung des Protoplasmas an die Zuckergärung geknüpft ist, haben die grundlegenden Studien F. Ehrlichs gezeigt. Während für andere Zellen, wie z. B. *Willia anomala*, einerseits Aminosäuren, andererseits unvergärbares, kohlenstoffhaltiges Material, wie Glycerin, sogar Alkohol zum Aufbau der lebenden Substanz genügt, ist die Hefezelle in dieser Hinsicht auf die vergärbaren Zuckerarten angewiesen. Ähnliche Verhältnisse scheinen auch in bezug auf die Bildung der Invertase stattzuhaben.

Euler und Meyer haben allerdings gefunden, daß eine Vorbehandlung der Hefe mit einer zuckerfreien, asparaginhalten Nährlösung nach Hayduck eine Verstärkung der Invertasewirkung um etwa 100% hervorrufen kann. Indessen ist hier die Möglichkeit nicht ausgeschlossen, daß durch den Glykogenreichtum der Hefe genügendes vergärbares Material vorhanden war. Die neuen Versuche, welche wir mit Mannit,

Natriumlactat und Natriumformiat als Kohlenstoffmaterial der Nährlösung angestellt haben, zeigen jedenfalls, daß diese Stoffe die Zucker nicht zu ersetzen vermögen.

Mannit, Natriumlactat und Natriumformiat in den Nährlösungen.

Die Vorbehandlungsversuche wurden durchaus in der früher beschriebenen Weise ausgeführt. Es befanden sich also wieder bei der Vorbehandlung je 1 g Hefe in 100 ccm Nährlösung. Die Temperatur betrug 17—18°.

Auf die Reinheit der Substanzen wurde besonders geachtet; der Mannit war ein Kahlbaumsches Präparat, die beiden Salze stellten wir in Lösung selbst aus den entsprechenden reinen Säuren dar.

1. Mannit.

2 g in 100 ccm Lindners (Hayducks) Nährlösung.

| Dauer der Vorbehandlung: 22 Stunden | | | Dauer der Vorbehandlung: 47 Stunden | | |
|--|----------|----------------|--|----------|----------------|
| Minuten | α | $k \cdot 10^4$ | Minuten | α | $k \cdot 10^4$ |
| 0 | 5,90 | — | 0 | 5,69 | — |
| 60 | 5,45 | 4,3 | 60 | — | — |
| 120 | 5,09 | 3,8 | 120 | 4,77 | 4,7 |
| 180 | 4,61 | 4,4 | 180 | 4,37 | 4,7 |
| ∞ | — 1,89 | — | ∞ | — 1,82 | — |

Parallelversuche.

| Nicht vorbehandelte Hefe. | | | Vorbehandelt mit 2% Rohrzucker enthaltender Nährlösung. | | | | | |
|------------------------------|----------|----------------|--|----------|----------------|---------------------------------------|----------|----------------|
| | | | Dauer der Vorbehandlung 22 Stunden | | | Dauer der Vorbehandlung 47 Stunden | | |
| Min. | α | $k \cdot 10^4$ | Min. | α | $k \cdot 10^4$ | Min. | α | $k \cdot 10^4$ |
| 0 | 6,15 | — | 0 | 6,02 | — | 0 | 5,69 | — |
| 60 | 5,64 | 4,7 | 60 | 3,59 | 26 | 60 | 2,30 | 44 |
| 120 | 5,20 | 4,5 | 120 | 1,71 | 28 | 120 | 0,71 | 39 |
| 180 | 4,90 | 4,0 | 180 | 0,47 | 29 | 180 | 0,67 | 45 |
| ∞ | — 1,97 | — | ∞ | — 1,93 | — | ∞ | — 1,82 | — |

Drehung der Nährlös.: — 0,15° Drehung der Nährlös.: 0

2. Natriumformiat und Natriumlactat.

2 g in 100 ccm Lindners Nährlösung.

Nach 22stündiger Vorbehandlung.

| Minuten | Formiat | | Lactat | | Rohrzucker | | |
|----------|----------|----------------|----------|----------------|------------|----------------|--|
| | α | $k \cdot 10^4$ | α | $k \cdot 10^4$ | α | $k \cdot 10^4$ | |
| 0 | 6,62° | — | 6,62° | — | 6,62° | — | Drehung der Nähr- lösung —0,10°. |
| 60 | 6,36 | 2,2 | 6,06 | 4,8 | 4,06 | 25 | |
| 120 | 5,94 | 2,9 | 5,71 | 4,0 | 1,93 | 28 | |
| 180 | 5,49 | 3,6 | 5,32 | 3,9 | 0,59 | 28 | |
| ∞ | —2,12 | — | —2,12 | — | —2,12 | — | |

Nach 45stündiger Vorbehandlung.

| Minuten | Formiat | | Lactat | | Rohrzucker | | |
|----------|----------|----------------|----------|----------------|------------|----------------|--|
| | α | $k \cdot 10^4$ | α | $k \cdot 10^4$ | α | $k \cdot 10^4$ | |
| 0 | 6,75° | — | 6,75° | — | 6,50° | — | Drehung der Nähr- lösung —0,05°. |
| 60 | 6,42 | 2,7 | 6,26 | 4,1 | 3,50 | 31 | |
| 120 | 6,01 | 3,1 | 5,75 | 4,2 | 1,23 | 34 | |
| 180 | 5,55 | 3,5 | 5,40 | 3,9 | 0,24 | 32 | |
| ∞ | —2,16 | — | —2,16 | — | —2,08 | — | |

Nach 70stündiger Vorbehandlung.

| Minuten | Formiat | | Lactat | | Rohrzucker | | |
|----------|----------|----------------|----------|----------------|------------|----------------|--|
| | α | $k \cdot 10^4$ | α | $k \cdot 10^4$ | α | $k \cdot 10^4$ | |
| 0 | 6,59° | — | 6,59° | — | 6,59° | — | |
| 60 | 6,10 | 4,2 | (5,91) | (6,9) | 3,22 | 35 | |
| 120 | 5,77 | 3,6 | 5,56 | 4,5 | — | — | |
| 180 | 5,27 | 4,0 | 5,15 | 4,4 | 0,30 | 31 | |
| ∞ | —2,09 | — | —2,09 | — | —2,09 | — | |

Es geht aus diesen Versuchen deutlich hervor, daß bei unserer Vorbehandlung der Zucker nicht durch die untersuchten Säuren und auch nicht durch den dem Zucker so nahestehenden Mannit ersetzt werden kann. Wir ziehen daraus den Schluß, daß die Vermehrung der Invertase nicht durch eine Abspaltung oder Sekretion aus dem Plasma oder sonstigen Zellbestandteilen geschieht, sondern daß es sich dabei um eine Synthese handelt, zu welcher die durch die Gärung zu liefernde Energie

ebenso notwendig ist, wie überhaupt zur Bildung von Protoplasma in Hefezellen.

Im Anschluß an diese Versuche haben wir noch geprüft, ob die beiden angewandten organischen Salze in Gegenwart von Zucker die Invertasebildung beeinflussen. Milchsäure Salze werden von vielen Mikroorganismen als Kohlenstoffquelle besonders gut ausgenützt und erhöhen, wie früher festgestellt wurde,¹⁾ die Gärungsintensität.

Einwirkung von Natriumlactat und Natriumformiat auf Vorbehandlung mit Zucker.

500 ccm Lindners Nährlösung wurden mit 50 ccm 22%iger Lösung von Natriumlactat versetzt, so daß die Nährlösung zweiprozentig in bezug auf dieses Salz wurde. Die Vorbehandlung geschah in der früher beschriebenen Weise.

1. Natriumlactat.

Nicht vorbehandelte Hefe.

| Minuten | α | $k \cdot 10^4$ |
|----------|----------|----------------|
| 0 | 6,92° | — |
| 15 | 6,30 | 27 |
| 25 | 5,70 | 25 |
| 35 | 5,14 | 27 |
| 40 | 4,72 | 30 |
| ∞ | — 2,21 | — |

Trockensubstanz: 28,24%.

Nach 20 stündiger Vorbehandlung.

| Minuten | Mit Lactat | | Ohne Lactat | |
|----------|------------|----------------|-------------|----------------|
| | α | $k \cdot 10^4$ | α | $k \cdot 10^4$ |
| 0 | 6,67° | — | 6,67° | — |
| 15 | 4,20 | 95 | 4,52 | 81 |
| 25 | 2,68 | 105 | 3,13 | 89 |
| 35 | 1,72 | 103 | 2,01 | 94 |
| 40 | 1,04 | 111 | 1,56 | 94 |
| ∞ | — 2,13 | — | — 2,13 | — |

Trockensubstanz; 29,78%

¹⁾ Euler und Cassel, Diese Zeitschrift, Bd. 86, S. 122, 1913.

Nach 44stündiger Vorbehandlung.

| Minuten | Mit Lactat | | Ohne Lactat | |
|----------|-------------------------|----------------|-------------------------|----------------|
| | α | $k \cdot 10^4$ | α | $k \cdot 10^4$ |
| 0 | 6,62° | — | 6,62° | — |
| 15 | 3,79 | 113 | 4,12 | 98 |
| 25 | 2,10 | 126 | 2,91 | 96 |
| 35 | 0,93 | 130 | 1,41 | 112 |
| 40 | 0,32 | 136 | 0,96 | 113 |
| ∞ | — 2,12 | — | — 2,12 | — |
| | Trockensubstanz: 32,07% | | Trockensubstanz: 30,66% | |

Nach 92stündiger Vorbehandlung.

| Minuten | Mit Lactat | | Ohne Lactat | |
|----------|-------------------------|----------------|-------------------------|----------------|
| | α | $k \cdot 10^4$ | α | $k \cdot 10^4$ |
| 0 | 6,60° | — | 6,60° | — |
| 15 | 3,17 | 145 | 3,83 | 111 |
| 25 | 1,37 | 159 | 2,17 | 123 |
| 35 | 0,04 | 173 | 0,93 | 131 |
| 40 | 0,46 | 180 | 0,39 | 136 |
| ∞ | — 2,11 | — | — 2,11 | — |
| | Trockensubstanz: 33,12% | | Trockensubstanz: 29,41% | |

2. Natriumformiat.

Nicht vorbehandelte Hefe.

| Minuten | α | $k \cdot 10^4$ |
|----------|----------|----------------|
| 0 | 6,80° | — |
| 15 | 5,96 | 28 |
| 25 | 5,42 | 29 |
| 35 | 4,84 | 31 |
| 40 | 4,61 | 30 |
| ∞ | — 2,18 | — |

Nach 24stündiger Vorbehandlung.

| Minuten | Mit Formiat | | Ohne Formiat | |
|-------------------------|-------------|-------------------------|--------------|----------------|
| | α | $k \cdot 10^4$ | α | $k \cdot 10^4$ |
| 0 | 6,91° | — | 6,91° | — |
| 15 | 5,52 | 48 | 5,03 | 67 |
| 25 | 4,71 | 48 | 3,97 | 68 |
| 35 | 3,98 | 48 | 2,96 | 70 |
| 40 | 3,57 | 48 | 2,45 | 73 |
| ∞ | — 2,21 | — | — 2,21 | — |
| Trockensubstanz: 31,71% | | Trockensubstanz: 27,77% | | |

Nach 48stündiger Vorbehandlung.

| Minuten | Mit Formiat | | Ohne Formiat | |
|-------------------------|-------------|-------------------------|--------------|----------------|
| | α | $k \cdot 10^4$ | α | $k \cdot 10^4$ |
| 0 | 6,94° | — | 6,94° | — |
| 15 | 5,12 | 64 | 4,05 | 110 |
| 25 | 4,00 | 67 | 2,35 | 120 |
| 35 | 3,24 | 64 | 1,72 | 105 |
| 40 | 2,33 | 67 | 1,24 | 106 |
| ∞ | — 2,22 | — | — 2,22 | — |
| Trockensubstanz: 35,34% | | Trockensubstanz: 34,37% | | |

Nach 72stündiger Vorbehandlung.

| Minuten | Mit Formiat | | Ohne Formiat | |
|-------------------------|-------------|-------------------------|--------------|----------------|
| | α | $k \cdot 10^4$ | α | $k \cdot 10^4$ |
| 0 | 6,91° | — | 6,91° | — |
| 15 | 5,38 | 53 | 3,61 | 130 |
| 25 | 4,35 | 57 | 2,13 | 129 |
| 35 | 3,57 | 57 | 1,22 | 121 |
| 40 | 3,31 | 55 | 0,62 | 127 |
| ∞ | — 2,21 | — | — 2,21 | — |
| Trockensubstanz: 31,48% | | Trockensubstanz: 33,73% | | |

Reduziert man die Mittelwerte der erhaltenen Konstanten auf den Trockengehalt der Hefe von 33%, so erhält man durch Interpolation folgende Werte:

| | Vorbehandlung in Stunden | | | |
|-----------------------|--------------------------|-----|-----|-----|
| | 0 | 22 | 45 | 80 |
| Rohrzucker | 29 | 80 | 108 | 128 |
| » + Lactat | | 105 | 127 | 165 |
| » + Formiat | | 48 | 64 | 57 |

Der begünstigende Einfluß des Natriumlactates ist also, wie ersichtlich, nicht unbedeutend; indessen wird durch Natriumformiat, welches die Gärung ebenfalls beschleunigt, ein entgegengesetzter Effekt hervorgerufen, so daß die Art dieser Einwirkung vorläufig nicht erklärt werden kann.

Schließlich sei noch erwähnt, daß die Vorbehandlung der Hefe mit Mannose einen Effekt hervorruft, welcher dem durch die Spaltprodukte des Zuckers erzeugten durchaus analog ist. Es ist also der Gärungsvorgang als solcher, welcher die Invertasebildung hervorruft bzw. ermöglicht, und weder das Substrat noch die Reaktionsprodukte üben einen spezifischen Einfluß aus.

Schon in einer früheren Mitteilung wurde betont, daß die hier studierte Invertasebildung von der Vermehrung der Galaktase bzw. der Anpassung der Hefe an Galaktose vermutlich ganz verschieden ist.

Als Ergebnis unserer Versuche, insbesondere der hier mitgeteilten Vorbehandlungen wachsender Hefezellen bzw. verhältnismäßig zellenarmer Emulsionen und der mit Mannit, Lactat und Formiat gewonnenen Resultate sei hier noch einmal hervorgehoben, daß die Invertasebildung an diejenigen Bedingungen geknüpft zu sein scheint, unter welchen eine Neubildung des Protoplasmas eintritt.

Der St. Eriksbrauerei in Stockholm und besonders Herrn Ingenieur F. Hildebrandt sind wir für die Überlassung von Reinkulturhefe zu Dank verpflichtet.

Nachtrag zu Versuchserie 2, S. 440. Die zu diesem Versuch angewandte Hefe ergab vor der Vorbehandlung folgende Konstanten:

| Minuten | α | $k \cdot 10^4$ |
|----------|----------|----------------|
| 0 | 6,81 | — |
| 60 | 6,28 | 4,4 |
| 120 | 5,91 | 3,8 |
| 180 | 5,50 | 3,8 |
| ∞ | — 2,18 | — |

¹⁾ Euler und Meyer, l. c.

²⁾ Euler und Johannson, Diese Zeitschrift, Bd. 78, S. 246, 1912.