

Untersuchungen über die chemische Zusammensetzung und Bildung der Enzyme.

XI. Mitteilung.

Von

Hans Euler und K. G. Dernby.

Mit sieben Kurvenzeichnungen im Text.

(Aus dem biochemischen Laboratorium der Hochschule Stockholm.)

(Der Redaktion zugegangen am 24. Januar 1914.)

Durch Vorbehandlung von Hefe mit zuckerhaltigen Nährlösungen wird, wie der eine von uns mit seinen Mitarbeitern gezeigt hat, die Inversionsfähigkeit der Hefe bedeutend gesteigert, was vermutlich auf einer Erhöhung des Invertasegehaltes beruht, und zwar ist diese Enzyymbildung unabhängig von der Natur des in der Nährlösung gelösten Zuckers; der Effekt tritt nämlich mit Glukose und Mannose ebensowohl ein als mit Rohrzucker.

Zur Aufklärung der Vorgänge, welche zu dieser vermehrten enzymatischen Wirksamkeit führen, wurden im hiesigen Laboratorium schon vor einiger Zeit einige Vorversuche angestellt,¹⁾ um zu ermitteln, ob unter der gleichen Vorbehandlung auch andere Enzymreaktionen eine Verstärkung erfahren. Bezüglich der Nucleinsäurespaltung war ein positives Resultat erhalten worden und es erschien uns deshalb lohnend, den Einfluß der Vorbehandlung auf die für die Entwicklung der Hefe so wichtigen proteolytischen Enzyme zu untersuchen, um so mehr als dieselben nach den Untersuchungen F. Ehrlichs mit den Gärungsenzymen der Hefe in nahem Zusammenhang stehen müssen.

¹⁾ Vgl. Diese Zeitschrift, Bd. 79, S. 298, 1912.

Die proteolytischen Enzyme der Hefe machen sich am deutlichsten geltend bei der Autolyse, wo die Eiweißspaltung gegenüber allen anderen Vorgängen in den Vordergrund tritt. Demgemäß ist auch die Wirkung der proteolytischen Enzyme am häufigsten beim autolytischen Zerfall des Hefeneiweißes studiert worden. Nicht minder interessant ist aber die Spaltung der Hefenproteine, welche unter normalen Verhältnissen eintritt und mit den Lebenserscheinungen der Hefe aufs engste verknüpft ist. Besonders diese normale enzymatische Eiweißspaltung, welche wir als Autoproteolyse bezeichnen wollen, bedarf noch in vieler Hinsicht der Aufklärung, und es sollen diesem Vorgang in der nächsten Zeit im hiesigen Laboratorium eine Reihe von Untersuchungen gewidmet werden, besonders hinsichtlich der Anpassung der proteolytischen Enzyme an äußere Bedingungen.

Unsere ersten Arbeiten betreffen die Abspaltung von Aminostickstoff und gesamtem, gelöstem Stickstoff in plasmolysierter Hefe unter der Einwirkung der proteolytischen Enzyme. Bevor wir auf diese Versuche näher eingehen, wollen wir unsere im folgenden stets wiederkehrende Versuchsmethodik beschreiben.

Versuchsmethodik.

Die Hefe wurde bei allen Versuchen in plasmolysiertem Zustande untersucht. Dadurch wird erreicht, daß die Reaktionsmasse bei der Verdauung viel homogener ist, als wenn intakte Hefezellen zur Anwendung kommen, und es braucht auf die Löslichkeit der proteolytischen Enzyme keine Rücksicht genommen zu werden. Die Plasmolyse wurde stets in der Weise ausgeführt, daß für jeden Verdauungsversuch 10 g gewaschene und abgepreßte Hefe (der hiesigen St. Eriksbrauerei) mit 10 ccm Glycerin während drei Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen wurde. Während dieser Zeit wurde die Hefe so gut wie vollständig verflüssigt und nun mit 10 ccm Chloroformwasser und 50 ccm destilliertem Wasser versetzt. Jeder Kolben wurde nun mit Baumwolle verschlossen und in einen Thermostaten von 37° eingesenkt. Aus diesem wurden

die einzelnen Kolben nach bestimmten Zeiten, welche aus den folgenden Tabellen hervorgehen, entnommen. Die Reaktion wurde dadurch abgebrochen, daß jeder Kolben nach Zusatz einiger Tropfen von Eisessig in ein kochendes Wasserbad eingetaucht wurde, wodurch die Abtötung der Enzyme und die Koagulation von Eiweiß erreicht wurde. Der Kolbeninhalt wurde nun in einen Meßkolben übergeführt, auf 100 ccm verdünnt, filtriert und vom Filtrat wurden teils 20 ccm zur Bestimmung des Stickstoffgehalts nach Kjeldahl verwendet, teils 40 ccm zur Bestimmung des gelösten Aminostickstoffes nach der ausgezeichneten Methode von Sörensen — in der Ausführungsform von Jessen-Hansen,¹⁾ welche wegen der Anwesenheit von Phosphorsäure angewandt werden muß.

40 ccm Lösung wurden mit 2 g krystallisiertem Baryumchlorid, ferner mit 1 ccm 0,5%iger Phenolphthaleinlösung und dann mit soviel Normal-Baryt versetzt, daß Rotfärbung eintrat, und hierauf mit einem Überschuß von 5 ccm. Diese Mischung wurde auf 100 ccm verdünnt. Nach einer halben Stunde war das Carbonat und Phosphat ausgefallen. Von der überstehenden klaren Flüssigkeit wurden 50 ccm (entsprechend 20 ccm der Lösung) abfiltriert, mit 0,2 normaler Salzsäure unter Anwendung von Lackmus neutralisiert. Hierauf werden 15 ccm Formolmischung zugefügt und mit 0,2 normalem Baryt «zum dritten Stadium» titriert, unter Vergleich mit einer Kontrollösung. Werden x ccm verbraucht und der Titer ist n, so enthält die Probe

$$n \cdot x \cdot 2,8 \text{ mg Stickstoff.}$$

In jedem verwendeten Hefematerial wurde besonders der Trockengehalt und der Stickstoff nach Kjeldahl (mit Quecksilber) bestimmt.

Versuche.

I.

Wir zeigen zunächst die Übereinstimmung der nach den beiden Analysenmethoden erhaltenen Kurven.

¹⁾ Siehe Jessen-Hansen in Abderhaldens Handbuch der biochem. Arbeitsmethoden, Bd. 6, S. 270.

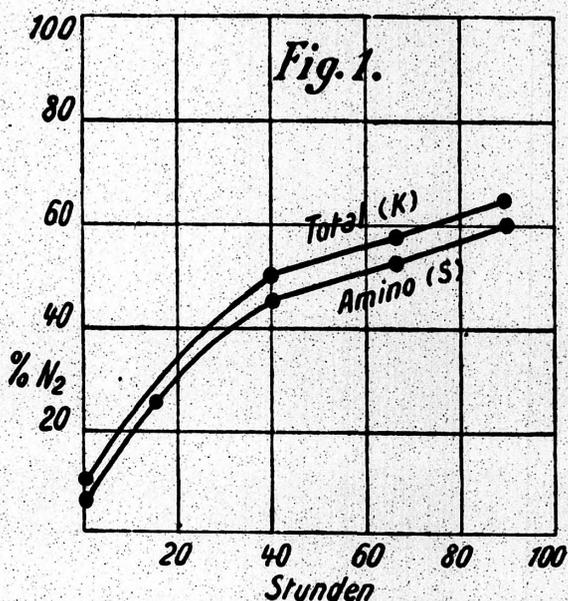


Tabelle I (Fig. 1).

2 g abgepreßte Hefe enthielt 40,04 mg Stickstoff.

| Stunden | % Stickstoff | |
|---------|--------------|-----------|
| | Amino (S) | Total (K) |
| 0 | 6 | 12 |
| 16 | 26 | 26 |
| 40 | 45 | 51 |
| 66 | 58 | 58 |
| 88 | 60 | 64 |

Tabelle II.

2 abgepreßte Hefe enthielt 36,4 mg Stickstoff.

| Stunden | % Stickstoff | |
|---------|--------------|-----------|
| | Amino (S) | Total (K) |
| 0 | 8 | 14 |
| 14 | 29 | 29 |
| 110 | 72 | 71 |

In den folgenden Versuchen haben wir der leichteren Ausführung wegen zum großen Teil die Formoltitration angewandt.

Mit dieser Methode sind die Ergebnisse der folgenden Tabellen gewonnen.

Tabelle III.

| Stunden | % N |
|---------|-----|
| 0 | 8 |
| 14 | 29 |
| 38 | 44 |
| 62 | 58 |
| 110 | 72 |

Tabelle IV.

| Stunden | % N |
|---------|-----|
| 0 | 11 |
| 16 | 35 |
| 40 | 46 |
| 112 | 79 |

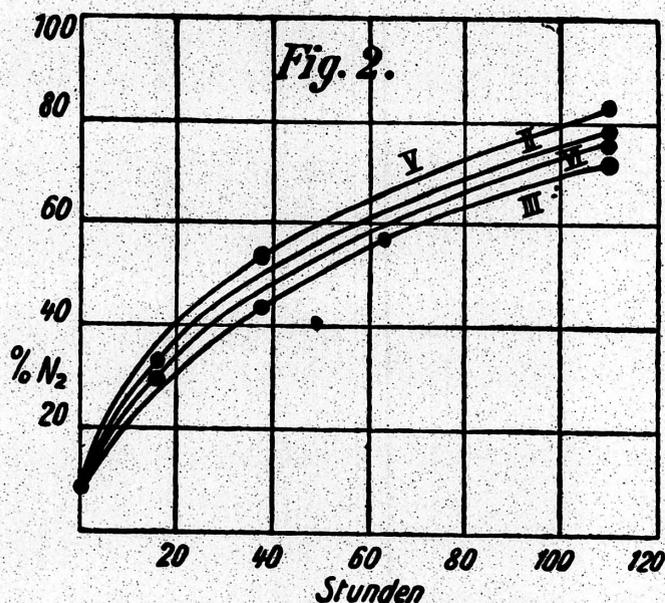
Tabelle V.

| Stunden | % N |
|---------|-----|
| 0 | 10 |
| 40 | 52 |
| 112 | 82 |

Tabelle VI.

| Stunden | % N |
|---------|-----|
| 0 | 9 |
| 16 | 30 |
| 136 | 80 |

Auf die Ziffern der obigen Tabellen III—VI beziehen sich die Kurven der folgenden Figur 2.



Was den Verlauf dieser Kurven betrifft und die Wiedergabe der Zahlen durch eine Formel, so verweisen wir auf die folgende Mitteilung des einen von uns (Dernby) im gleichen Heft dieser Zeitschrift.

Nachdem durch die angegebenen

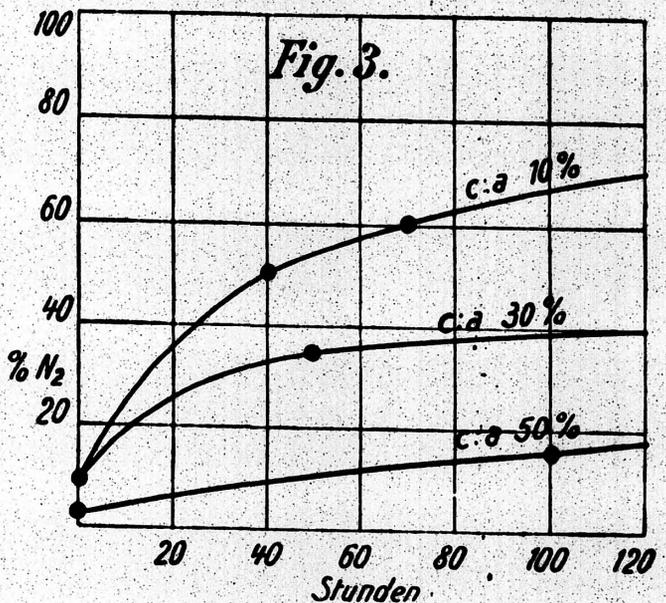
Versuche die Form des zeitlichen Verlaufs der Autolyse festgestellt ist, muß auf die absolute Größe des gespaltenen Eiweißes mit einigen Worten eingegangen werden.

Unsere ersten Versuche waren in etwas anderer Weise angestellt worden als oben angegeben, insofern die Autolyse nicht in Gegenwart von 60 ccm, sondern nur von 10 ccm Wasser vor sich ging, so daß das Glycerin angenähert 50%ig

war. Bei dieser Versuchsanordnung wurde nur eine Spaltung von etwa 16% erzielt, während sich später bei den oben beschriebenen Konzentrationen 70% des Eiweißes in der gleichen Zeit hydrolysierten. Die Abhängigkeit des Spaltungsgrades bei verschiedenen Glycerinkonzentrationen unter Einwirkung der gleichen Enzymmenge geht aus der folgenden Figur 3 hervor.

Das Ergebnis dieser Versuche steht in qualitativer Übereinstimmung mit Angaben von Gromow und Grigorieff.¹⁾ Quantitativ unterscheiden sich allerdings unsere Ergebnisse von denjenigen der genannten Autoren insofern, als dieselben eine größere Hemmung durch Glycerin fanden, was vermutlich darauf beruht, daß sie mit nicht plasmolysierter Hefe arbeiteten.

Um zu untersuchen, ob und in welchem Grade unsere Versuchsergebnisse von der Dauer der Plasmolyse abhängig sind, wurden folgende Versuche ausgeführt. Ein und dieselbe Hefe wurde in einer



Anzahl Kolben teils eine Stunde teils zwei Stunden und teils drei Stunden plasmolysiert, worauf der Autolyseversuch in der oben beschriebenen Weise bei 37° angestellt wurde. Die Versuchsergebnisse sind in der folgenden Tabelle ersichtlich.

Tabelle VII.

| Autolysezeit in Stunden | % N nach Plasmolysezeit in Stunden | | |
|----------------------------|------------------------------------|----|----|
| | 1 | 2 | 3 |
| 0 | 8 | 9 | 9 |
| 18 | 29 | 31 | 31 |
| 136 | 80 | 79 | 79 |

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 42, S. 299, 1904.

Es zeigte sich also, daß unsere Ergebnisse von der willkürlich gewählten dreistündigen Dauer der Plasmolyse ganz unabhängig sind, so daß sie einen weitgehenden Grad von Gültigkeit besitzen.

Einfluß einiger Oxydationsmittel auf die Autolyse.

Nach Angaben von Gromow (l. c.) soll Kaliumnitrat die Autolyse der Hefe in hohem Grade beeinflussen; zufolge einer Messung nach 120-stündiger Autolyse sollte die Reaktionsgeschwindigkeit durch KNO_3 um 95% angewachsen sein. Qualitativ wurde diese Beobachtung von Palladin¹⁾ bestätigt, welcher jedoch eine schwächere stimulierende Einwirkung fand.

Diese an sich interessante Einwirkung von Kaliumnitrat veranlaßte uns zu einer Nachprüfung und einer Erweiterung der Versuche mit zwei anderen Oxydationsmitteln, nämlich Kaliumchlorat und Wasserstoffsperoxyd.

In 12 Kolben wurde Hefe in gewöhnlicher Weise plasmolysiert. In der Versuchsreihe wurde die Hefe mit 60 ccm Wasser versetzt, in der Versuchsreihe B mit 60 ccm 5%iger Kaliumnitratlösung, in der Versuchsreihe C mit ebensoviel 5%iger Kaliumchloratlösung und in der Versuchsreihe D mit 60 ccm 1%igem Wasserstoffsperoxyd.

Die Ergebnisse waren die folgenden:

Tabelle VIII.

| Stunden | % N | | | |
|---------|-------------|------------------------|-------------------------|--------------------------------|
| | A Wasser | B 5% KNO_3 | C 5% KClO_3 | D 1% H_2O_2 |
| 0 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| 40 | 52 | 64 | 58 | 52 |
| 112 | 82 | 88 | 88 | 78 |

Es zeigt sich also auch bei unseren Versuchen eine, allerdings geringfügige Erhöhung der Endotryptasewirkung durch Kaliumnitrat und auch durch andere Oxydationsmittel.

¹⁾ Biochem. Zeitschrift, Bd. 44, S. 318, 1912.

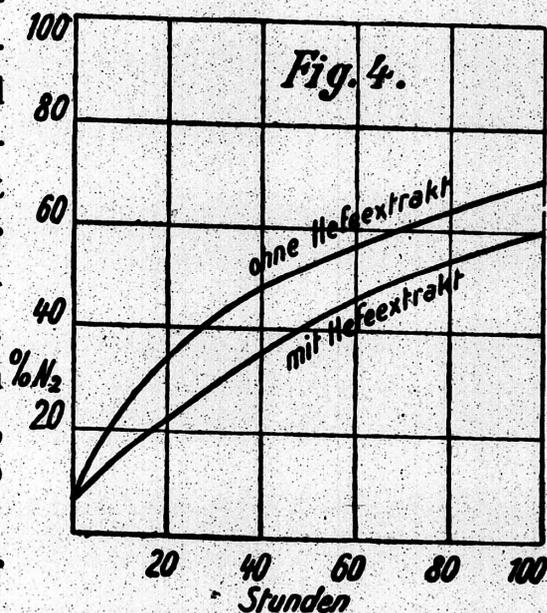
Einfluß von Antiproteasen auf die Autoproteolyse.

Buchner¹⁾ hat bekanntlich vor einiger Zeit nachgewiesen, daß der Hefeprässaft einen Stoff enthält, welcher die eiweißartigen Bestandteile des Hefeprässaftes gegen die Einwirkung der proteolytischen Enzyme schützt. Die Kenntnis dieser Stoffe ist natürlich für die Beurteilung des Verlaufes der Proteolyse in der Hefe von großer Bedeutung und besonders für die Auffassung, welche man sich hinsichtlich einer vermehrten proteolytischen Tätigkeit durch den Einfluß einer Vorbehandlung zu bilden hat. Wir haben deswegen den Antiproteasen einige Versuche gewidmet, und besonders versucht dieselben direkt aus der lebenden Hefe zu gewinnen.

100 g lebende Hefe wurden direkt mit 400 ccm kochendem Wasser übergossen, 15 Minuten lang extrahiert und hierauf durch Filtration von der Flüssigkeit getrennt, in welcher die Gegenwart von Antiproteasen vermutet werden konnte.

In einer Serie von Autolyseversuchen wurde nun ein Teil der Kolben mit 50 ccm dieses Extraktes an Stelle mit 50 ccm destilliertem Wasser versetzt. Der Hefeextrakt enthielt selbst Stickstoff und zwar hauptsächlich Aminostickstoff. Diese Quantität wurde im letzteren Teil der Tabelle von allen erhaltenen Werten subtrahiert. Die nebenstehenden Kurven zeigen (Fig. 4 und Tab. IX), daß der Einfluß des so gewonnenen Extraktes ziemlich gering, aber immerhin merkbar ist.

Derartige Versuche sollen gelegentlich mit einem günstigeren Verhältnisse von Antiprotease und proteolytischem Enzym wiederholt werden.



¹⁾ Biochem. Zeitschr., Bd. 19, S. 191, 1909.

In diesem Zusammenhang sei ein Versuch angegeben, welcher zeigt, daß die Endotryptasewirkung der Hefe während der Autolyse derselben zunimmt.

Frisch abgepreßte Hefe (je 10 g) werden mit 10 ccm Glycerin während drei Stunden bei 18° plasmolysiert, in der Versuchsreihe A sofort, in der Versuchsreihe B nach dreitägigem Stehen mit 3 Tropfen Chloroform bei 18°. Die plasmolysierte Hefe wird dann bei 37° der Selbstverdauung überlassen, worauf der gelöste Stickstoff teils nach Kjeldahl, teils nach Sörensen bestimmt wurde. Worauf die gefundene Erhöhung der proteolytischen Wirksamkeit beruht, ob auf einem vermehrten Enzymgehalt, ob auf der Bildung eines Aktivators oder der Zerstörung einer hemmenden Substanz, ist noch schwer zu sagen.

| Stunden | % N | |
|---------|--------|-------------------------|
| | Sofort | Nach 3-tägiger Autolyse |
| 0 | 8 | 12 |
| 14 | 29 | — |
| 38 | 44 | 52 |
| 62 | 58 | 69 |
| 86 | — | 76 |
| 110 | 72 | — |

II.

Einfluß der Vorbehandlung auf die Wirkung der Endotryptase.

1. Vergrößerung der Geschwindigkeit der Auto-proteolyse.

Wir kommen nun auf das eigentliche Thema dieser Untersuchung. Zunächst hatten wir festzustellen, in welcher Weise durch eine Vorbehandlung, welche durchaus derjenigen entsprach, welche früher zur Veränderung des Invertasegehalts angewandt wurde,¹⁾ auf die tryptische Verdauung der Hefe einwirkt.

Die Versuchsanordnung zur Feststellung der Geschwindigkeit der Verdauung entsprach ganz der in den vorhergehenden

¹⁾ Vgl. Euler u. Johansson, Diese Zeitschr., Bd. 76, S. 388, 1912.
Euler und Meyer, ebenda, Bd. 79, S. 274, 1912.
Euler und Johansson, ebenda, Bd. 84, S. 97, 1913.

Tabelle IX.

| Stunden | % Stickstoff (nach Sørensen) | |
|---------|------------------------------|---|
| | Ohne Zusatz von Hefeextrakt | Anstatt Wasser mit 50 ccm antiproteasehaltigem Hefeextrakte |
| 0 | 8 | 8 |
| 14 | 29 | 22 |
| 38 | 44 | 41 |
| 62 | 58 | 54 |
| 110 | 72 | 63 |

Versuchen befolgten. Der Stickstoff wurde sowohl nach der Methode von Kjeldahl als nach derjenigen von Sørensen bestimmt.

Die Vorbehandlung geschah in folgender Weise:

9 l Lindners Nährlösung wurden auf 6 Stück 2-l-Kolben verteilt und jeder mit 15 g Hefe geimpft, nachdem eine genaue Sterilisierung der Lösung vorgenommen worden war. Die Nährlösung nach Lindner enthielt folgende Stoffe im Liter:

| | | | |
|---------------------------------|--------|------------|---------|
| MgSO ₄ | 0,25 g | Asparagin | 4,00 g |
| H ₂ KPO ₄ | 5,00 g | Rohrzucker | 20,00 g |

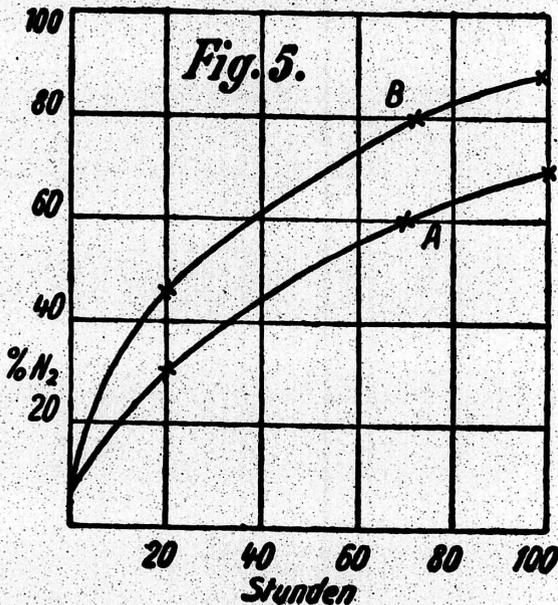
Nach einer Vorbehandlung von 48 Stunden wurde die Hefe abfiltriert, gewaschen und auf Ton getrocknet. Dann wurde Trockensubstanz und Stickstoff bestimmt (siehe folgende Tabelle).

Tabelle X.

| Stunden | % Stickstoff | | | |
|---------|---------------------|--------|---------------------|--------|
| | a | | b | |
| | Ursprüngliche Hefe. | | Vorbehandelte Hefe. | |
| | Trockensubstanz | 31,2 % | Trockensubstanz | 26,2 % |
| | % N pr. | 6,3 % | % N pr. | 7,3 % |
| | K | S | K | S |
| 0 | 12 | 6 | 15 | 12 |
| 16 | 26 | 26 | 36 | — |
| 40 | 51 | 45 | — | 57 |
| 64 | 58 | 53 | 70 | 67 |
| 88 | 64 | 60 | — | — |

Tabelle XI.

| Stunden | A | | B | |
|---------|---|--|---|--|
| | Ursprüngliche Hefe Trockensubstanz 31,5% % N pr. > 6,0% | | Vorbehandelte Hefe 48 Stunden bei 28° Trockensubstanz 25,5% % N pr. > 7,3% | |
| 0 | 8 | | 10 | |
| 15 | 29 | | — | |
| 39 | 44 | | 62 | |
| 63 | 58 | | — | |
| 87 | 66(?) | | 88 | |



Wie aus den obigen Tabellen ohne weiteres ersichtlich ist, wurde die Endotryptasewirkung durch die Vorbehandlung erhöht. Aus den Konstanten, welche der eine von uns aus diesen Zahlen berechnen konnte, ergibt sich für die Verdauungsgeschwindigkeit der unvorbehandelten und vorbehandelten Hefe ein Unterschied von 36%.

Auf die gute Übereinstimmung zwischen den nach den beiden analytischen Methoden gewonnenen Kurven sei besonders hingewiesen.

2. Einfluß der Temperatur auf die Vorbehandlung.

Die Invertasebildung ist, wie aus früheren Versuchen hervorgeht, recht bedeutend von der Temperatur abhängig,¹⁾ etwa im selben Grade wie die Bildung des Protoplasmas.

Auffallenderweise hat sich die Vorbehandlung in bezug auf die Endotryptase ziemlich unabhängig von der Temperatur

¹⁾ Euler und Cramér, Diese Zeitschr., Bd. 89, S. 272, 1914.

gezeigt. Es wurden drei Kolben, die im übrigen ganz wie in vorhergehenden Versuchen bereitet und behandelt wurden, in einem Thermostaten bei 26—30° gehalten, während sich drei Parallelversuche an der freien Luft bei einer mittleren Temperatur von 6—7° befanden.

Wie sich aus der Tabelle XII ergibt, steigt der End-tryptasegehalt deutlich im Verlauf der Vorbehandlung, ohne daß die Temperatur einen Einfluß darauf ausübt.

Tabelle XII.

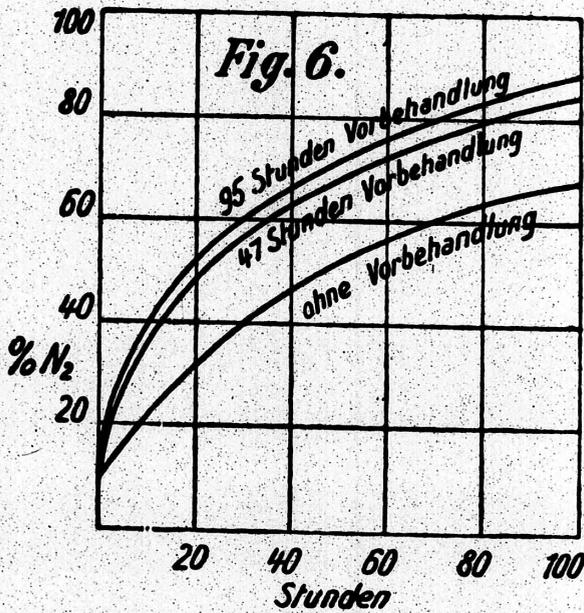
| Stunden | % Stickstoff nach Sørensen | | |
|---------|---|---|--|
| | a Trockensubst. 31,5% % N in do. 6,0% Ohne Vorbehandlung | b Bei ca. 6° vorbehandelt in 48 Stunden Trockensubst. 26,5% % N in do. 7,0% | c Bei 28° vorbehandelt in 48 Stunden Trockensubst. 25,5% % N in do. 7,3% |
| 0 | 8 | 13 | 10 |
| 39 | 44 | 62 | 62 |
| 87 | 66 | 85 | 88 |

3. Über die gleichzeitige Änderung der Verdauung und Gärung durch die Vorbehandlung.

Die Hefe wurde in der gewöhnlichen Weise teils 47 und teils 95 Stunden vorbehandelt. Die Verdauungsgeschwindigkeit und die Gärungsgeschwindigkeit der Hefe wurde sowohl vor als nach diesen Vorbehandlungen untersucht. Die Tabellen XIII und XIV und Fig. 6 und 7 ergeben die Resultate dieser Versuche.

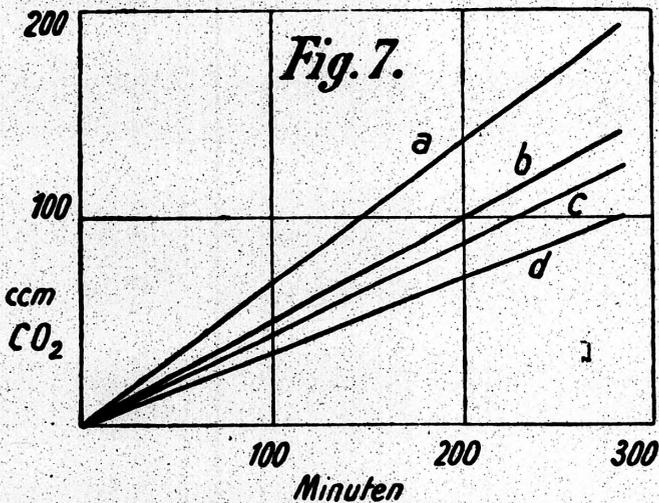
Tabelle XIII.

| Stunden | % Stickstoff nach Sørensen | | |
|---------|----------------------------|--|---------------------------------------|
| | Ohne Vorbehandlung 6,1% | In 47 Stunden vorbehandelt % N pr. Trockensubstanz 6,7% | In 95 Stunden vorbehandelt 6,9% |
| 0 | 11 | 11 | 11 |
| 15 | 35 | 47 | 47 |
| 40 | 47 | 59 | 61 |
| 88 | 67 | 84 | 87 |



Die Bestimmung der Gärkraft geschah volumetrisch und zwar in folgender Weise: In kleine Erlenmeyer-Kolben wurden 0,5 g gepreßte Hefe und 20 ccm 10% ige Rohrzuckerlösung eingeführt, worauf die Kolben mit den Gasbüretten verbunden wurden. Jede folgende Versuchsreihe stellt das

Mittel aus 2 Parallelversuchen dar. Die abgelesenen Volumina der Kohlensäure sind auf 18°, 760 mm Druck und 30% Trockengewicht reduziert und in folgender Tabelle zusammengestellt worden. In diese Tabelle ist auch eine Versuchsreihe aufgenommen, bei welcher die Vorbehandlung in einer phosphatfreien Nährlösung erfolgt ist. Wir kommen auf diesen Versuch im nächsten Abschnitt zurück.



Vergleicht man die Veränderung der beiden Enzymwirkungen unter der gleichen Vorbehandlung, so zeigt sich, daß das Ansteigen der tryptischen Wirkung von einem starken Abfall der Gärkraft begleitet ist. Die Vorbehandlung hatte

Tabelle XIV.

Kubikzentimeter CO₂ bei 18° C. 760 mm Druck. 30% Trockengewicht.

| Minuten | Ohne Vorbehandlung | In 47 Stunden vorbehandelt | | In 95 Stunden vorbehandelt |
|---------|--------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------|
| | | mit KH ₂ PO ₄ | ohne KH ₂ PO ₄ | |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 40 | 32,2 | 25,0 | 21,9 | 18,1 |
| 80 | 62,7 | 46,7 | 44,3 | 31,8 |
| 120 | 91,6 | 70,1 | 64,4 | 45,5 |
| 160 | 120,0 | 88,5 | 84,0 | 59,2 |
| 200 | 145,9 | 106,3 | 101,5 | 73,2 |
| 240 | 171,9 | 124,5 | 118,9 | 88,4 |
| 280 | 196,7 | 142,6 | 131,1 | 101,6 |

also hier auf die Zymase den gleichen Einfluß wie bei den Versuchen von Euler und Johansson,¹⁾ welche die gleichzeitige Veränderung der Zymase- und Invertasewirkung verglichen hatten.

4. Einfluß der Phosphate unter der Vorbehandlung.

In der Reihe C der vorhergehenden Tabelle wurde ein Versuch angegeben, bei welchem die Vorbehandlung in Abwesenheit von Phosphat erfolgt ist. Der Unterschied gegenüber der Vorbehandlung mit Phosphat war offenbar nur ein geringer. Wir haben dann einige weitere Versuche angestellt, in Rücksicht auf einige Angaben von L. Iwanoff,²⁾ welcher den Eiweißzerfall von Preßhefe, welche teils in Gegenwart, teils in Abwesenheit von Phosphaten gegoren hatte, verglich. Dieser Forscher gibt folgende Zahlen an:

| Eiweißzerfall der Preßhefe | |
|--|-----|
| Nicht gegorene Hefe | 54% |
| Gegorene Hefe ohne KH ₂ PO ₄ | 28% |
| ' ' mit ' | 68% |

Wir behandelten frische Hefe 48 Stunden lang teils in einer Lindnerschen Nährlösung, welche Phosphat, und in einer solchen, welche kein Phosphat enthielt. Die Ergebnisse gehen aus folgender Tabelle hervor:

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 84, S. 97, 1913.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 42, S. 464, 1904.

Tabelle XV.

| Stunden | % Stickstoff | |
|---------|---|-------------------------------|
| | Vorbehandelt mit KH_2PO_4 | ohne KH_2PO_4 |
| 0 | 11 | 10 |
| 40 | 59 | 57 |
| 80 | 84 | 83 |

Wie ersichtlich, ist der Verlauf der tryptischen Verdauung in beiden Fällen sehr angenähert der gleiche und wir haben also keinen Einfluß der Phosphate, wie ihn Iwanoff beobachtet hat, konstatieren können.

5. Einfluß des Fluornatriums auf die Endotryptase,

Auf einige Enzyme übt Fluornatrium bekanntlich eine außerordentlich starke Giftwirkung aus. Andererseits ist bekanntlich durch die sehr interessanten Versuche von Effront gezeigt worden, daß die lebende Hefe sich an relativ große Mengen dieses Salzes gewöhnen läßt und nach erfolgter Anpassung durch das Fluornatrium zu gesteigerter Gärwirkung veranlaßt wird. Effront hat gezeigt, daß dabei Fluor von den Hefezellen aufgenommen wird, und daß Kalksalze hierbei zweifellos mitwirken.

Nach diesen Ergebnissen war es nicht unwahrscheinlich, daß auch die proteolytischen Enzyme der Hefe schon durch geringe Menge Fluornatrium beeinflußt werden. Wie hier gleich erwähnt sei, konnte hier nur ein geringer Effekt konstatiert werden; bei der Vorbehandlung übt die Gegenwart von Fluornatrium jedenfalls keinen hemmenden Einfluß auf die proteolytischen Enzyme aus.

Tabelle XVI.

| Stunden | % Stickstoff nach Kjeldahl | |
|---------|----------------------------|---------|
| | Vorbehandelt ohne NaF | mit NaF |
| 0 | 15 | 15 |
| 39 | 43 | 45 |
| 63 | 47 | 49 |

Die im zweiten Teil der vorliegenden Mitteilung beschriebene Beschleunigung der enzymatischen Proteolyse haben wir bei der Darstellung unserer Ergebnisse als eine Enzymbildung aufgefaßt. Wir wollen indessen nicht unterlassen, darauf hinzuweisen, daß dies nicht die einzig mögliche Deutung unserer Resultate ist. Vielmehr wäre es auch noch denkbar, daß unter dem Einfluß der Vorbehandlung Eiweißkörper entstehen, welche leichter als die älteren, bereits in der Hefe vorhandenen, gespalten werden und dadurch die größere Geschwindigkeit der Bildung freier Aminogruppen und löslichen Stickstoffs überhaupt veranlassen. Darüber müssen weitere Versuche entscheiden.

Schließlich wollen wir auch hier Frl. stud. phil. E. Vougt für die Ausführung der Gärungsversuche unseren Dank aussprechen.

Nachtrag: Aminostoffwechsel während der Vorbehandlung mit NaF.

Diese Versuche beziehen sich auf die Autoproteolyse der Hefe, d. h. auf den normalen Stoffwechsel, und es kam uns darauf an, festzustellen, ob und wie viel Aminosäuren bei der Vorbehandlung mit NH_4 -haltiger Nährlösung aus der Hefe austritt.

In 1-Liter-Kolben wurden genau 500 ccm Nährlösung¹⁾ teils mit, teils ohne 0,005% NaF abgemessen. In jeden wurden nach Sterilisation genau 5 g lebende Hefe eingewogen, deren Trockensubstanz und Stickstoffgehalt bestimmt wurde. Nach gewissen Zeiten wurde der Kolbeninhalt filtriert, die Hefe auf Ton getrocknet und wieder in bezug auf Trockensubstanz und Stickstoffgehalt untersucht.

200 ccm des Filtrates wurden in einen Meßkolben von 300 ccm übergeführt. Es wurden nun 10 g festes BaCl_2 , 1 ccm Phenolphthalein und Baryt bis zur deutlichen Rotfärbung zugesetzt, wobei Baryumphosphat und Baryumsulfat ausfielen. Hierauf wurde mit destilliertem Wasser auf 300 ccm verdünnt; die Lösung blieb einige Stunden stehen, und in 75 ccm (ent-

¹⁾ In 1 Liter Lösung: 0,25 g MgSO_4 , 5 g H_2KPO_4 , 2 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ und 20 g Rohrzucker.

sprechend 50 ccm Lösung) wurde der gesamte Stickstoffgehalt nach Sørensen und in 150 ccm das Ammoniak durch Magnesia-destillation bestimmt. Im Rückstand wurde der Aminostickstoff nach Sørensen gemessen. Die Tabelle gibt über das Resultat Aufschluß.

| Vorbe- handlungs- Zeit in Stunden | In 1 g Hefe | | mg N per 100 ccm Lösung | | | Zu- satz |
|--|---------------------------------|------|------------------------------------|---|-----------------------------|---------------|
| | Trocken- gewicht der Hefe | % N | NH ₃ , dest. mit MgO | NH ₃ + Amino-N n. Sørensen | Amino-N nach Sørensen | |
| 0 | 31,73 | 6,90 | 41,2 | 43,8 | 0 | } Ohne NaF |
| 5 | 26,78 | 8,15 | 36,8 | 38,2 | > 1 | |
| 22 | 31,33 | 8,25 | 32,1 | 33,9 | 1—2 | |
| 60 | 30,70 | 8,42 | 32,1 | 32,8 | 1—2 | |
| 0 | 31,73 | 6,90 | 41,2 | 43,8 | 0 | } Mit NaF |
| 5 | 26,07 | 7,70 | 38,3 | 40,4 | > 1 | |
| 22 | 32,70 | 8,37 | 36,4 | 39,3 | 1—2 | |
| 60 | 35,70 | 9,17 | 36,1 | 39,3 | 1—2 | |

Diese Versuche deuten darauf hin, daß in Gegenwart von NaF aus der gärenden, NH₄-haltigen Nährlösung weniger Stickstoff von der Hefe aufgenommen wird als in NaF-freier Lösung. Gleichzeitig mit der Gärung wird also die N-Assimilation verzögert.

Die Versuche werden fortgesetzt mit NH₄-ärmeren Nährlösungen.