

Untersuchungen über die chemische Zusammensetzung und Bildung der Enzyme.

XII. Mitteilung.

Von

Hans Euler und Erik Löwenhamm.

(Der Redaktion zugegangen am 21. Mai 1916.)

I.

Einwirkung von antiseptischen Mitteln und Giften auf Hefe.

Die Tatsache, daß die Gärungstätigkeit lebender Hefezellen durch antiseptische Mittel wie Toluol und Chloroform mehr oder weniger vollständig gehemmt wird, während die Dauerpräparate der Hefe sowie Hefesaft durch die gleichen Substanzen viel weniger oder gar nicht beeinflußt werden, ist schon lange bekannt, hat aber längere Zeit keine weitere Beachtung gefunden. In einer 1910 in dieser Zeitschrift erschienenen Mitteilung hat der eine von uns mit B. af Ugglas¹⁾ die Aufmerksamkeit auf obigen Sachverhalt gelenkt, und daraus folgenden Schluß gezogen:

Die Zymase ist in der lebenden Hefe als chemischer Komplex ganz oder teilweise an das Protoplasma²⁾ gebunden; wird die vitale Tätigkeit der Zelle dauernd oder zeitweilig aufgehoben, so wird auch die gärungserregende Gruppe des Protoplasmas, also die an das Plasma gebundene Zymase, inaktiviert; wirksam bleibt nur derjenige Teil des Gärungsenzymes,

¹⁾ H. Euler und B. af Ugglas, Diese Zeitschr., Bd. 70, S. 286, 1910.

²⁾ Unter Protoplasma soll hier nichts anderes verstanden werden als diejenige Substanz, welche der Träger der typischen Lebensfunktionen ist.

welcher frei ist, oder bei der Entwässerung der Hefe im Vakuum oder durch Alkohol freigemacht wird.¹⁾

Der Einfluß der Antiseptika Toluol, Thymol und Chloroform auf «Zymase», Maltase und Invertase wurde dann von Euler und Kullberg²⁾ näher untersucht und im Zusammenhang mit früheren, teilweise eingehenden Versuchen von Emil Fischer³⁾ besprochen. Euler und Kullberg kamen damals zu folgender Auffassung:

Die Hefenenzyme sind ursprünglich Bestandteile des Plasmas und werden entweder schon in der lebenden Zelle vom Plasma abgeschieden und dann am Plasma wieder regeneriert; sie sind dann relativ leicht extrahierbar und sind in relativ großer Menge in den Zellen vorhanden. Oder aber die Abtrennung erfolgt erst (teilweise) beim Entwässern der Hefe oder durch mechanische Mittel, überhaupt unter Umständen, unter welchen das Plasma getötet wird. Gegen Antiseptika sind die Hefenenzyme in dem Maße unempfindlich, als sie vom lebenden Plasma befreit sind.

Was dann speziell den Einfluß des Toluols auf lebende Hefe betrifft, so wurden die hierbei auftretenden Erscheinungen hinsichtlich der Zymase und Phosphatase weiter untersucht.⁴⁾

Vergleichende Versuche über die Einwirkung von Chloroform und Toluol auf lebende Hefe haben neuerdings auch Neuberg und seine Mitarbeiter angestellt.⁵⁾

Schließlich wurde vor kurzer Zeit noch der Befund, daß unter Umständen auch Trockenhefe bei ihrer Gärwirkung auf

¹⁾ Die erwähnte Auffassung, daß die Hefe, insoweit sie durch Antiseptika in ihrer Gärfähigkeit gehemmt wird, durch den Gärungskomplex ihres Protoplasmas und nicht durch die freie «Zymase» die Gärung der Kohlenhydrate bewirkt, vertritt, gestützt auf viele Versuche in einer sehr interessanten Arbeit auch Rubner (Arch. f. Physiol., 12. Suppl.).

²⁾ Euler und Kullberg, Diese Zeitschr., Bd. 73, S. 85, 1911.

³⁾ Emil Fischer, Bericht der Deutschen chem. Gesellsch., Bd. 28, S. 1429, 1895.

⁴⁾ Euler und Johansson, Diese Zeitschr., Bd. 80, S. 175, 1912.

⁵⁾ Neuberg und Nord, Biochem. Zeitschr., Bd. 67, S. 12, 1914.

Vgl. auch Neuberg und Rosenthal, Biochem. Zeitschr., Bd. 51, S. 128, 1913, sowie Neuberg und N. Iwanoff, Biochem. Zeitschr., Bd. 67 S. 1, 1914.

Hexosen durch Toluol gehemmt wird, durch den einen von uns einer Nachprüfung unterzogen.¹⁾

Wir führen die in den erwähnten Arbeiten beschriebenen Tatsachen nicht mehr einzeln auf, sondern verweisen auf die Monographie von Euler und Lindner²⁾ und gehen gleich zu unsern Befunden über.

Nun hat bekanntlich Neuberg³⁾ die für die Gärungschemie sehr interessante Entdeckung gemacht, daß die Alkalisalze der Brenztraubensäure sowohl durch Dauerhefe und durch Hefesaft, also rein enzymatisch als auch durch lebende Hefe in Gegenwart von antiseptischen Mitteln wie Chloroform und Toluol kräftig vergoren wird, und daß sich die Carboxylase auch in dieser Hinsicht scharf von der «Zymase» unterscheidet. Auch freie Brenztraubensäure wird kräftig vergoren.⁴⁾

In Hinsicht auf unsere oben erwähnten Arbeiten war es von Interesse, die Einwirkung von Toluol und Chloroform auf die Vergärung von Brenztraubensäure, ähnlich wie wir dies bezüglich der Glukosegärung getan haben, quantitativ zu untersuchen.

Versuchsmethode.

Wir haben die Gärungsgeschwindigkeit volumetrisch verfolgt und verweisen bezüglich der Versuchsanordnung auf die früheren Mitteilungen aus dem hiesigen Laboratorium. Es wurde durch Zusatz eines geeigneten Puffers (NaH_2PO_4) bei den meisten Versuchen für eine annähernd konstante Acidität gesorgt; wo dies nicht der Fall war, findet man eine besondere Angabe. Die von uns angewandte Hefe der St. Eriksbrauerei ist, wie früher mehrfach erwähnt, eine untergärrige Bierhefe.

¹⁾ Euler, Zeitschr. f. Gärungsphysiol., Bd. 5, S. 1, 1914.

²⁾ Euler und Lindner, Die Chemie der Hefe und der alkoholischen Gärung, Leipzig, Akad. Verlagsges. 1915.

³⁾ Neuberg und Mitarbeiter. Siehe zahlreiche Arbeiten in Biochem. Zeitschr., 1911—1916.

⁴⁾ Max Oppenheimer, Diese Zeitschr., Bd. 93, S. 235, 1914.

Tabelle 1.

0,4 g frische, abgepresste Hefe + 0,7 g NaH_2PO_4 + 5 ccm 5%ige
Na-Pyrovinatlösung + 20 ccm HO_2 .

Trocken- gewicht	38,8 %		40,6 %		35,0 %		nicht bestimmt	
	Ohne Toluol	0,5 ccm Toluol	0,25 ccm Toluol	1 ccm Toluol	Ohne Toluol	0,5 ccm Toluol	Ohne Toluol	0,5 ccm Toluol
15	1	2	3,5	1	1,5	1,5	1	2
30	2	5	4	1,5	2,5	2,5	1,5	3
45	2,5	8	4,5	2,5	3,0	3,5	2,5	4
60	3	11	5	3,5	3,5	4	3,5	6
90	4	14	6	5	4,5	6	5	11
120	—	—	6,5	7	5,5	7,5	6	14
150	—	—	8	8	6	9	—	—
180	—	—	9	8,5	6,2	11	—	—
240	—	—	11	11	6,5	15	—	—
1200	—	—	31	30	10,5	26	11,5	31

Tabelle 2.

Selbstgärung der Hefe.

0,4 g frische Hefe in 25 ccm Wasser.

Minuten	I		II	
	Ohne Zusatz	Mit 0,5 ccm Toluol	Ohne Zusatz	Mit 0,5 ccm Chloroform
15	2	2	1,5	1,3
30	2,2	2,5	1,8	1,7
45	2,5	2,8	2,2	2,2
60	3	3,2	2,5	2,7
90	3,3	3,4	3,0	3,2
120	3,5	3,8	3,5	3,8
150	4,0	4,5	4,0	4,4

Tabelle 3.

1 g frische Hefe (36%) + 0,7 g NaH_2PO_4 + 5 ccm 5% ige
Na-Pyrovinatlösung + 20 ccm H_2O .

Minuten	Ohne Zusatz	Mit 0,5 ccm Toluol	Mit 0,5 ccm Chloroform
15	1,5	2,5	3,5
30	3	5,5	7,5
60	6	15,5	16
90	7	20,5	24
120	9	25,5	29
210	11	—	41
1200	24	46	44

Tabelle 4.

0,7 g NaH_2PO_4 + 5 ccm 5% ige Na-Pyrovinatlösung + 20 ccm Wasser.

Zeit in Minuten	0,4 g frische Hefe (35,1%)		1 g frische Hefe	
	Ohne Zusatz	1 ccm Chloroform	Ohne Zusatz	0,5 ccm Chloroform
15	1,5	1,5	1,5	7,5
30	2,5	2,5	3	14,5
45	3,0	4	4	17
60	3,5	5	5	21
75	4	6	6	25,5
90	4,5	7,5	7	30
120	5,5	9,5	8	36
150	6	11	9	40
180	6,2	13	10	43
210	6,4	15,5	11	45,5

Tabelle 5.

Selbstgärung der Hefe.

Zeit in Minuten	0,4 g frische Hefe (38,2%)		
	Ohne Zusatz	1 ccm Toluol	1 ccm Chloroform
15	1,6	2,0	1,9
30	2,0	2,4	2,3
45	2,3	2,7	2,5
60	2,7	3,0	2,9
90	3,1	3,4	3,3
120	3,5	3,7	3,65
180	4,4	4,6	4,4
210	4,6	4,85	4,6

Wie aus den obigen Resultaten hervorgeht, bestätigt sich zunächst vollständig der Befund von Neuberg und seinen Mitarbeitern, daß lebende Hefe in Gegenwart von Toluol oder Chloroform das Alkalisalz der Brenztraubensäure mit erheblicher Geschwindigkeit zu vergären vermag und daß sich somit die «Carboxylase» auch scharf von der «Zymase» unterscheidet, und in dieser Hinsicht der Invertase näher steht.

Indessen ergibt sich aus einem Vergleich der Gärung von Natriumpyrovinat durch lebende Hefe in Gegenwart und in Abwesenheit von antiseptischen Mitteln ein bemerkenswerter Unterschied zwischen dem Verhalten von Invertase und Carboxylase gegenüber diesen Stoffen:

Während die Invertasewirkung der lebenden Hefe durch Toluol und Chloroform so gut wie gar nicht beeinflußt wird, wie Versuche von Euler und Kullberg gezeigt haben, wird die Vergärung des brenztraubensauren Salzes vermittelt lebender Hefe durch Antiseptika sehr erheblich beschleunigt.

Diese Beschleunigung der Brenztraubensäurevergärung durch die genannten antiseptischen Mittel tritt indessen nur bei der Verwendung frischer lebender Hefe ein. Wird Trockenhefe bei Zimmertemperatur während 24 Stunden getrocknet, und dann zur Spaltung des Pyrovinates benutzt, so ist der Einfluß der Antiseptika stets gering, unter Umständen negativ, wie die folgenden Tabellen 6 und 7 zeigen, welche mit zwei verschiedenen Dauerhefepräparaten angestellt sind.

Tabelle 6.
1 g Trockenhefe a.

Minuten	I. 10 ccm Na-Pyrovinatlösung + 15 ccm H ₂ O		II. 0,7 g NaH ₂ PO ₄ + 5 ccm 5%ige Pyrovinatlösg. + 20 ccm H ₂ O	
	Ohne Zusatz	0,5 ccm Toluol	Ohne Zusatz	0,5 ccm Chloroform
15	7	4,5	—	—
30	12	9	15	16
60	17,5	16	27	32
90	24	22	34	39
120	29	26	37	41
150	34	31	37,5	43
210	—	36	40	43,5
240	40	38	42,5	44

Tabelle 7.

0,5 g Trockenhefe b.

0,7 g NaH_2PO_4 + 5 ccm 5%ige Na-Pyrovinatlösung + 20 ccm H_2O .

Minuten	Ohne Zusatz	0,5 ccm Toluol
15	4	3
30	10	7
45	14	10
60	18	14
90	24	—
120	29	24
150	31	27
240	32	32

Charakterisiert wird die von uns benutzte Trockenhefe durch folgende Angaben:

Durch die Trocknung bei Zimmertemperatur auf einen Wassergehalt von unter 10% wird das Gärungsvermögen gegenüber Brenztraubensäure nur wenig (in der Regel zwischen 10 und 40%) vermindert, berechnet auf Trockensubstanz Hefe.

Kubikzentimeter CO_2 pro Gramm wasserfreie Hefe in 1 Stunde

frische Hefe	getrocknete Hefe
48	40

Die Gärkraft der frischen und wie oben getrockneten Hefe geht aus folgender Tabelle hervor:

Tabelle 8.

Zeit in Minuten	0,4 g frische Hefe + 0,7 g NaH_2PO_4 + 5 ccm 5%ige Glykoselösung + 20 ccm H_2O		1 g Trockenhefe + 0,7 g NaH_2PO_4 + 5 ccm 5%ige Glukoselösung + 20 ccm H_2O	frische Hefe
	beobachtet	auf 1 g Trockenh. ber.		getr. Hefe
15	2,5	15,6	1,5	10,4
30	5	31,2	3,5	8,9
45	12	75	6,5	11,5
60	16	100	8,5	11,8
90	24	150	13,5	11,1

Durch die Trocknung ist also die Gärkraft gegenüber Glukose im Verhältnis von rund 10 : 1 vermindert worden.

Zu den Tabellen ist noch folgendes zu bemerken: Die Vergärung von Pyrovinat in Abwesenheit von antiseptischen Mitteln ist, auch wenn Phosphat als Puffer zugegen ist, recht gering und übersteigt nur wenig die Selbstgärung der Hefe. Erst durch antiseptische Mittel usw. wird eine energische Vergärung brenztraubensaurer Salze hervorgerufen. Daß dieser Effekt nicht durch eine Wirkung dieser Stoffe auf die Carboxylase an sich veranlaßt wird, geht daraus hervor, daß die Spaltung der Pyrovinate durch Trockenhefe durch Stoffe wie Toluol, Chloroform u. a. nicht oder nur unwesentlich beschleunigt wird.¹⁾

Diese Giftwirkung bei der Brenztraubensäuregärung beruht aber nicht darauf, daß die Hefezellen durch das Gift getötet werden; gegen eine Erklärung dieser Tatsache durch Annahme einer weitgehenden Änderung der Permeabilität sprechen die Verhältnisse bei der Traubenzuckervergärung. Gerade in diesem Zusammenhang muß auf die Tatsache aufmerksam gemacht werden, daß die Selbstgärung der lebenden Hefe durch Antiseptika und manche anderen Stoffe beschleunigt wird. Wie Versuche, welche an anderer Stelle veröffentlicht werden sollen, ergeben haben, kommt dabei jedenfalls nicht ausschließlich Glukose zur Vergärung; auffallenderweise ist bis jetzt unseres Wissens überhaupt die Frage, auf welchem Wege das Glykogen bei der Selbstgärung zerfällt, experimentell nicht behandelt worden.

II.

Die Veränderung des Carboxylasegehaltes der lebenden Hefe durch Vorbehandlung.

Wie der eine von uns mit mehreren Mitarbeitern gezeigt hat,²⁾ kann der Gehalt der Hefe an Invertase durch geeignete

¹⁾ Siehe zum Vergleich z. B. A. Bau, Biochem. Zeitschr., Bd. 73, S. 340, 1916.

²⁾ Euler und B. af Ugglas, Svenska Vet. Akad. Arkiv f. Kemi, Bd. 3, Nr. 34, 1911; Euler und Johansson, Diese Zeitschr., Bd. 76, S. 388, 1912 und Bd. 78, S. 246, 1912, sowie Bd. 84, S. 97, 1913; Euler und Meyer, Diese Zeitschr., Bd. 79, S. 274, 1912.

Vorbehandlungen verschiedener Art — vorbereitende Gärung, Einhaltung bestimmter Temperaturbedingungen,¹⁾ Lüftung usw. bis über den 10fachen Betrag erhöht werden.

Eine Untersuchung über die gleichzeitige Veränderung des Gehaltes an Invertase und an Gärungsenzymen bei der lebenden Hefe hatte das Resultat ergeben, daß eine Anreicherung der Hefe an «Zymase» bei weitem nicht in dem Umfang durchgeführt werden kann, wie an Invertase, und daß im Gegenteil mit einer starken Zunahme des Vermögens zur Rohrzuckerspaltung, also des «Invertasesystems» eine Abnahme der Gärkraft parallel geht.

Die wichtige und eigenartige Stellung, welche die von Neuberg entdeckte Carboxylase unter den Gärungsenzymen einnimmt, hat uns veranlaßt, im Anschluß an die früheren Untersuchungen des hiesigen Laboratoriums über Enzymbildung zu untersuchen, in welcher Weise und durch welche Mittel die Bildung der Carboxylase in der lebenden Zelle stattfindet.

Es ergibt sich zunächst die Frage, in welchem Umfange hierbei die Carboxylase von den übrigen Bestandteilen der «Zymase» unabhängig ist. In dieser Hinsicht haben Neuberg und seine Mitarbeiter bereits wertvolle Tatsachen gefunden. Wir erwähnen vor allem die Abtrennung der Brenztraubensäurevergärung von der Zuckergärung durch Auswaschen getrockneter Hefe, also die Herstellung eines Präparates, welches Brenztraubensäure, nicht aber Zucker zu gären imstande ist; ferner das verschiedene Verhalten der Carboxylase und Zymase zu Giften und bei höheren Temperaturen.

Zunächst wurde untersucht, ob durch eine vorbereitende Gärung von Glukose, in Gegenwart von Asparagin und Lindnerscher Nährlösung, welche die rohrzuckerspaltende Wirkung der Hefe verdoppelt, eine Erhöhung der Carboxylasewirkung zu erzielen ist.

Bezüglich der Versuchsbedingungen können wir auf die früheren Arbeiten verweisen; es befanden sich wieder 10 g Hefe in 1 l Lindnerscher Nährlösung, welche 2% Trauben-

¹⁾ Euler und Cramér, Diese Zeitschr., Bd. 88, S. 430, 1913 und Bd. 89, S. 272, 1914.

zucker enthielt. Die Carboxylasewirkung geht aus folgender Tabelle hervor:

Tabelle 9.

0,7 g NaH_2PO_4 + 5 ccm 5%ige Na-Pyrovinatlösung + 20 ccm Wasser
+ 0,4 g Hefe (33,3% Trockensubstanz).

Minuten	Unvorbehandelte frische Hefe	Vorbehandelte Hefe	
		Gärtemperatur 10°	Gärtemperatur 20°
15	1,4	1,6	1,2
30	2,6	2,8	2,5
60	4,4	4,5	4,5
90	7,0	7,4	7,1
120	9,2	9,7	9,6
180	14,0	15,0	15,0

Die direkt beobachteten Volumina CO_2 sind auf einen gleichheitlichen Trockengehalt der Hefe von 33,3% umgerechnet. Bei der Vorbehandlung wurde die Gärung während 20 Stunden zu Ende geführt und erst dann die Hefe entnommen, von der vergorenen Flüssigkeit getrennt und mit kaltem Wasser schnell gewaschen.

Die Differenzen zwischen den drei Gärungsgeschwindigkeiten liegen innerhalb der Versuchsfehler; die Vorbehandlung hatte also keinen Einfluß auf die Carboxylasewirkung.

Ähnliche negative Ergebnisse wurden erhalten, als die vorbehandelnde Vergärung bei einer Temperatur von 35° und bei einem andern Versuch bei 20° unter Lüftung vorgenommen wurde.

Diese Versuche wurden später von einem von uns (E.) fortgesetzt, indem die Vorbehandlung mit einer 2%igen Lösung von Natriumpyrovinat vorgenommen wurde, welche im übrigen wie eine Lindnersche Nährlösung zusammengesetzt war. Vorbehandlungstemperatur 18°.

Die ersten Versuche verringerten die Spaltungsfähigkeit der Hefe gegenüber brenztraubensaurem Natrium beträchtlich (20 bis 70%). Als jedoch in den folgenden Versuchen die Vorbehandlung mit Pyrovinat unter Lüftung und bei einer Temperatur von 10° geschah, war der Effekt positiv. Wir führen einen solchen Versuch an:

Tabelle 10.

0,4 g frische Hefe. Trockensubstanz reduziert auf 35%.

Minuten	Unvorbehandelte Hefe		Vorbehandelte Hefe	
	in 5% iger Glukoselösung	in 2% iger Pyrovinatlösg.	in 5% iger Glukoselösung	in 2% iger Pyrovinatlösg.
15	3,2	—	2,7	4,0
30	6,2	5,9	6,0	7,8
60	15,7	12,6	14,0	14,5
120	31,0	22,9	28,1	27,9

Während also bei der gleichen Vorbehandlung die Gärkraft der Hefe gegenüber Glukose um etwa 10% gesunken ist, hat sich die Spaltungsfähigkeit gegenüber Pyrovinat um ca. 20% erhöht. Diese Vorbehandlung wirkt also — wie übrigens zahlreiche andere Faktoren¹⁾ auf die Fähigkeit zur Glukosevergärung und zur Brenztraubensäurevergärung verschieden ein. Einstweilen kann man aber hieraus nur schließen, daß eine der Komponenten, welche das Enzymsystem einerseits der «Zymase im engeren Sinne» und andererseits der Carboxylase bilden, bei der Vorbehandlung ungleich beeinflußt worden ist.

Daß die Lüftung hier von entscheidendem Einfluß ist, dürfte auf der Entfernung des bei der Brenztraubensäurevergärung gebildeten Acetaldehydes beruhen, welcher in einigermaßen erheblichen Konzentrationen als Gift wirkt.

Die Lüftungsversuche gaben Veranlassung, die Wirkung einiger Oxydationsmittel auf die Vergärung der Brenztraubensäure zu untersuchen. Die folgenden Zahlen sind Mittelwerte aus je zwei Versuchen:

Tabelle 11.

1 g frische Hefe (40,0%) + 0,7 g NaH_2PO_4 + 5 ccm 5% ige
Pyrovinatlösung + 0,5 ccm Toluol.
ccm CO_2

Minuten	Ohne Zusatz	+ 5 ccm 1% ige MnSO_4 -Lösung	+ 5 ccm 1% ige $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ -Lösung
15	3,5	4,5	4
30	8,0	9,0	8,75
60	14,5	15,75	17,0
90	19,75	21,5	22,0
120	24,0	27,0	25,5
180	32,5	34,0	30,0
240	35,0	38,0	31,5

¹⁾ Siehe die Arbeiten von Neuberg, z. B. Biochem. Zeitschr., Bd. 71, S. 1, 1915.

Im Anschluß hieran sei auch ein Versuch mitgeteilt, welcher zeigt, daß die Enzyymbildung der Invertase durch vorbehandelnde Gärung auch durch Vorbehandlung mit Natriumpyrovinat erzielt werden kann. Die Versuchsbedingungen waren ganz dieselben wie die oben angegebenen, und die Methodik die gleiche wie bei den Vorbehandlungsversuchen von Euler und Johansson bezw. Cramér. Vorbehandlungstemperatur 20°.

Tabelle 12.

Unvorbehandelte Hefe. Trockensubstanz 34,0%.

Minuten	Drehung	K · 10 ⁴
0	6,14	—
15	5,27	33
25	4,72	33
35	4,00	38
40	3,97	33
∞	— 1,97	

Dauer der Vorbehandlung: 25 Stunden.

Minuten	A		B	
	Drehung	K · 10 ⁴	Drehung	K · 10 ⁴
0	7,04	—	6,08	—
15	5,00	72	4,20	77
25	3,52	79	2,95	86
35	2,60	81	—	—
40	2,20	80	2,00	77
∞	— 2,25	—	— 1,95	—

Trockensubstanz: 35,2%.

Trockensubstanz: 35,7%.

Wie aus diesen Ergebnissen hervorgeht, wird durch eine vorbehandelnde Gärung mit Pyrovinat eine ebensgroße Vermehrung des Invertasesystems der Hefe hervorgerufen wie durch die Gärung mit Zucker.