

# Untersuchungen über die chemische Zusammensetzung und Bildung der Enzyme.

## XIII. (vorläufige) Mitteilung.

### Über die Änderungen des Enzymgehaltes in Kefirkörnern und in *Bact. lactis acid.*

Von

**Hans Euler.**

Nach Versuchen von E. Griese.

Mit sechs Kurvenzeichnungen im Text.

(Der Redaktion zugegangen am 6. April 1917.)

Seit einer Reihe von Jahren habe ich mit mehreren Mitarbeitern die Frage experimentell bearbeitet, durch welche chemischen Mittel und sonstigen Bedingungen der Enzymgehalt von Mikroorganismen, besonders von Hefen, beeinflußt werden kann, unter welchen physikalischen Einflüssen also die Enzymbildung<sup>1)</sup> in der lebenden Zelle geschieht.<sup>2)</sup>

Es hatte sich dabei, zunächst bezüglich der Invertase, ergeben, daß der Enzymzuwachs lebender Hefezellen, welcher unter dem Einfluß gewisser chemischer Substanzen eintritt, ein quantitativ gut reproduzierbarer Vorgang ist, welcher sich durch eine einfache, reaktionskinetische Formel darstellen läßt.

Die untersuchten Enzymbildungen traten unter dem Ein-

<sup>1)</sup> Unter der Bezeichnung Enzymbildung fassen wir einstweilen, wie schon mehrfach betont wurde, die Ausbildung bezw. Vermehrung der zu einem Enzymsystem gehörigen Substanzen, also Enzyme, Coenzyme, Aktivatoren usw. in der lebenden Zelle zusammen.

<sup>2)</sup> Euler und B. af Ugglas, Diese Zeitschr., Bd. 70, S. 279, 1911; Euler und D. Johansson, Diese Zeitschr., Bd. 76, S. 388 und Bd. 78, S. 246, 1912; Euler und H. Meyer, Diese Zeitschr., Bd. 79, S. 274, 1912; Euler und H. Cramér, Diese Zeitschr., Bd. 88, S. 430, 1913 und Biochem. Zeitschr., Bd. 58, S. 467, 1914.

fluß verschiedener Hexosen und Biosen ein,<sup>1)</sup> und es wurde bald gefunden, daß andere Stoffe, sogar solche, welche den Kohlenhydraten sehr nahe stehen, wie Milchsäure und Mannit, die Fähigkeit der Zucker, die Enzyymbildung hervorzurufen, nicht besitzen.

Neuere Versuche haben gezeigt, daß auch hinsichtlich des so interessanten Neubergschen Enzymes, der Carboxylase, eine Enzyymbildung durch Vorbehandlung erreicht werden kann.

Auch für die Bildung proteolytischer Enzyme bei geeigneter Vorbehandlung haben sich Anhaltspunkte ergeben.<sup>2)</sup>

Der Vorgang der Enzyymbildung in lebenden Zellen unter bestimmten chemischen und physikalischen Bedingungen dürfte, wie schon früher mehrfach betont, für physiologische Fragen von wesentlicher Bedeutung sein. Insbesondere lassen sich wichtige Erscheinungen in der Bakteriologie, so besonders die Änderungen der Virulenz im wesentlichen auf Enzyymbildungen unter dem Einfluß chemischer Nahrungs- und Reizmittel zurückführen.

Wie besonders die Versuche von Euler und Johansson gezeigt haben, ist die Bildung der Invertase in Hefezellen eine sehr exakt meßbare und gut reproduzierbare Erscheinung. Die Invertasewirkung konnte bei diesen Versuchen bis auf das 10fache des ursprünglichen Betrages gesteigert werden.

Immerhin ist bei der Hefe die Invertasewirkung von vornherein ziemlich groß, so daß ihre Steigerung die Gesamtleistung der vorbehandelten Hefe nicht in auffallender Weise ändert. Erheblich stärker erwies sich schon der Effekt bei der Vorbehandlung einer Bierhefe mit Galaktose, wo die Galaktasewirkung<sup>4)</sup> in kurzer Zeit auf das 20fache ihres ursprünglichen Betrages gebracht werden kann. Auch diese Effekte sind indessen noch relativ unbedeutend gegenüber solchen, welche

<sup>1)</sup> Eine Untersuchung von Meisenheimer, Gambarjan und Semper (Biochem. Zeitschr., Bd. 54, S. 122, 1913) hat eine volle Bestätigung unserer Resultate geliefert.

<sup>2)</sup> Euler und Dernby, Diese Zeitschr., Bd. 89, S. 408, 1914.

<sup>3)</sup> Euler und Löwenhamn, Diese Zeitschr., Bd. 97, S. 279, 1916.

<sup>4)</sup> Siehe hierzu diese Zeitschr., Bd. 78, S. 261, Anmerkung.

unter verschiedenen Züchtungsbedingungen an anderen Mikroorganismen hervorgebracht werden können.

Die chemischen Bedingungen, welche bei der Entwicklung der enzymatischen Wirkungen der Zellen bestimmen, sind in den meisten Fällen recht kompliziert, so daß eine endgültige Lösung der Aufgabe sehr zahlreiche Versuche erfordern wird. Es muß also betont werden, daß die folgenden Versuche nur als vorläufige zu betrachten sind, und nur deshalb jetzt mitgeteilt werden, weil in der nächsten Zeit wieder eine längere Unterbrechung dieser Arbeiten eintreten wird.

#### Vorbereitung der Versuche.

Um stets mit Kulturen arbeiten zu können, welche von fremden Keimen frei waren, mußten alle angewandten Nährsubstrate und Geräte, in welchen die Stäbchen von *Bact. acidilactis* und die Hefe gezüchtet und studiert wurden, sterilisiert werden. Zu diesem Zwecke wurden die zur Aufnahme der Nährlösungen und der Nährböden bestimmten Gefäße im Lufttrockenschrank auf 200° erhitzt. Die zu den Gärversuchen angewandten 100 ccm Erlenmeyer-Kolben wurden nach Auffüllen des Nährsubstrates 10 Minuten im Dampfstrom sterilisiert und nach Abkühlen auf Versuchstemperatur (28°) geimpft. Fraktionierte Sterilisation war nicht nötig, da sich die kurz behandelten Substrate als keimfrei erwiesen.

Für jede Versuchsserie war frische, d. h. kurz vor dem Ansetzen der Versuche bereitete Molke erforderlich. Molke, welche nach der Sterilisierung etwa 10—14 Tage aufbewahrt war, erwies sich als Entwicklungssubstrat ungeeignet; die Gärung ging darin sehr langsam vor sich oder blieb ganz aus. Die angewandte Molke war fast keimfrei.

Aus Magermilch wurde das Casein bei ungefähr 40° mit möglichst wenig verdünnter Essigsäure gefällt und nach Absetzen des Caseins die Molke klar filtriert, mit  $\text{NH}_3$  neutralisiert, erwärmt und, wenn nicht ganz klar, nochmals filtriert.

*Bact. lactis acidilactis* wurde in Milch gezüchtet, kurz nach dem Koagulieren der Milch in das Nährsubstrat gebracht und sofort zur Gärung angesetzt.

Die Zellenvermehrung bei Kefir wurde gewichtsanalytisch, bei *Bact. lactis acidi* durch das Plattengießverfahren ermittelt. Hierbei wurde als Verdünnung vor der Gärung 1 : 1000 gewählt, d. h. 1 ccm des Nährsubstrates wurde nach dem Einimpfen des Versuchsmaterialies auf 1000 ccm mit sterilem Wasser verdünnt, und von dieser Konzentration 1 ccm für jede Platte angewandt. Zur Untersuchung der Lösung nach der Gärung wurde die Verdünnung 1 : 10000 gewählt.

Die Anzahl der Keime wurde in üblicher Weise nach Wachstum von 6—8 Tagen bei Zimmertemperatur auf Nährgelatine mit Hilfe eines Zählapparates bestimmt. Die Nährgelatine hatte die Zusammensetzung:

20 g Pepton,	2,5 g Kochsalz,
10 » Traubenzucker,	1,0 » Magnesiumsulfat,
10 » Milchzucker,	120,0 » Gelatine
2 » Kaliumphosphat,	
mit Wasser auf 1 Liter aufgefüllt.	

Der Säuregehalt wurde durch Titrieren mit  $\frac{1}{10}$  n-Natronlauge festgestellt, die Acidität nach der Indikatormethode von Sörensen.

Von allen folgenden Versuchen und Bestimmungen sind mindestens 2 Kontrollversuche ausgeführt worden.

### Versuche mit Kefir.

Die zu diesen Versuchen angewandten Kefirkörner verdanke ich dem Chef des Bakteriologischen Laboratoriums der Zentralanstalt für das landwirtschaftliche Versuchswesen, Herrn Prof. Chr. Barthel.

Die Kefirkörner wurden zuerst 2 Tage mit lauwarmem Wasser behandelt, das jede zweite Stunde erneuert wurde. Sie wurden dann in sterilisierte Milch gebracht, bis neben Säuerung der Milch auch Gärung eintrat. Die so vorbereiteten Körner wurden durch Waschen mit lauwarmem Wasser vom anhaftenden Casein befreit und bis zum Ansetzen des Gärungsversuches jeden zweiten Tag in neue, sterile Molke übergeimpft.

Die Temperatur bei den Gärversuchen betrug stets 28°.

### Versuchsreihe I.

Die wie oben angegeben vorbehandelten Kefirkörner wurden in bezug auf die Entwicklung ihrer Gärkraft, also hinsichtlich der Bildung des gesamten an der alkoholischen Gärung beteiligten Enzymsystems untersucht. Die Methodik der Gärkraftmessungen war dieselbe wie in früheren Arbeiten des hiesigen Laboratoriums; die Kohlensäure wurde volumetrisch in Quecksilberbüretten gemessen, welche durch Kapillarröhren mit den Gärkölbchen verbunden waren.

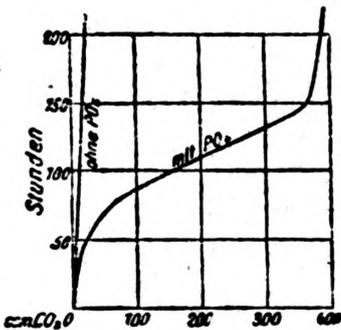
Die Acidität wurde durch Zugabe von Mononatriumphosphat zum gärenden Medium definiert und konstant gehalten.

Versuch A. 0,5 g Kefirkörner, nach obiger Angabe vorbehandelt, entsprechend einem Trockengehalt von 0,09 g, werden in folgender Gärlösung aufgeschwemmt:

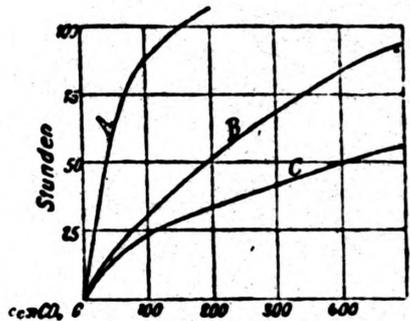
40 ccm Molke,	4,5 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,
20 „ Wasser,	3,0 „ Galaktose.

Der Gärverlauf, d. h. die Menge entwickelter Kohlensäure geht aus der obersten Kurve der Fig. 2 hervor.

#### Kefir



Figur 1.



Figur 2.

Während der Gärung trat eine schwache Zunahme des Säuregehaltes ein. Es wurde nämlich zur Neutralisation von 10 ccm Gärlösung verbraucht:

vor der Gärung:	45 ccm 0,10 n-NaOH
nach „ „ :	51 „ 0,10 n-NaOH.

Nach einer Gärdauer von 200 Stunden betrug das Gewicht der Kefirkörner 0,58 g mit 22% Trockengewicht. Letzteres hatte somit von 0,09 g auf 0,13 g zugenommen.

Versuch B. Nach 200 Gärstunden wurde der Versuch A abgebrochen und aus je einem Gärkolben 0,20 g der

gewaschenen Kefirkörner in eine frische Gärlösung von obiger Menge und Zusammensetzung eingetragen. Es wurden also, wie bei A, 2 Parallelversuche angestellt.

Es setzte nun sofort eine relativ kräftige Gärung ein, deren Verlauf aus der Kurve B der Figur 2 ersichtlich ist.

Säuregehalt: 10 ccm Gärlösung verbrauchten (Phenolphthalein).  
 vor der Gärung: 45 ccm 0,10 n-NaOH  
 nach 80 stünd. Gärung: 54 > 0,10 n-NaOH.

Zuwachs des Trockengehaltes der Kefirkörner: 0,0420 g auf 0,066 g.

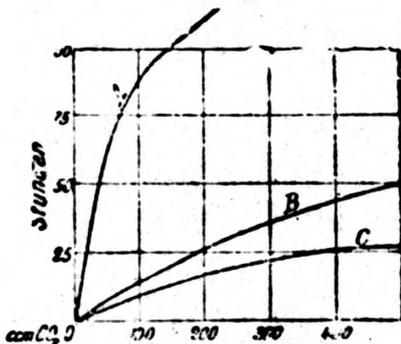
Nach Abbruch des Versuches B nach 80 Gärstunden wurden die Kefirkörner durch Waschen gereinigt und je 0,20 g derselben zu je einem neuen Gärversuch verwendet, bei welchem die gleiche Menge und Zusammensetzung der Gärlösung zur Anwendung kam wie bei A und B.

Die Gärung war nun noch kräftiger als im vorhergehenden Versuch, wie die Kurve C der Figur 2 zeigt.

Nach einer Gärdauer von 52 Stunden verbrauchten 10 ccm der Lösung zur Neutralisation (Phenolphthalein) 56 ccm 0,10 n-NaOH.

Zuwachs der Kefirkörner während der Gärung:

Trockengewicht der Kefirkörner vor der Gärung: 0,0465 g,  
 nach > > : 0,069 g.



Figur 3.

Reduziert man nun die Mittelwerte aus den drei Versuchen auf die gleiche Menge Kefir-Trockensubstanz, so ergeben sich die in Fig. 3 enthaltenen Gärungskurven. Man ersieht aus denselben unmittelbar den sehr bedeutenden Zuwachs der Gärkraft des angewandten Kefirs.

Zu betonen ist hierbei, daß in sämtlichen drei Versuchen A, B und C die äußeren Versuchsbedingungen vollkommen gleich waren, und daß auch beim Versuch A das Kefirmaterial keine toten Zellen, oder höchstens eine durchaus zu vernachlässigende Anzahl von solchen enthielt. Im

angewandten Material hatte also das System der Gärungsenzyme einen sehr erheblichen Zuwachs erfahren.

Daß wir es hier nicht etwa mit einer fortschreitenden Aufweichung der Kefirkörner zu tun haben, sondern mit einer Enzyymbildung bzw. Enzymaktivierung innerhalb der lebenden Zellen, geht auch daraus hervor, daß das Kefirmaterial, welches einen hohen Grad von Gärkraft erreicht hat, wie etwa im Versuch C, diese Gärkraft zum Teil wieder verliert, wenn die Kefirkörner längere Zeit in Milch oder Molke verbleiben, ohne daß dieses Substrat erneuert wird.

Daß übrigens für den Verlauf der Enzyymbildung die Gegenwart von Phosphat nicht unbedingt notwendig, obwohl vermutlich günstig ist, beweist die folgende

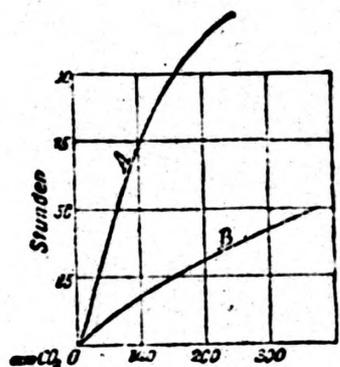
### Versuchsreihe II.

0,5 g Kefirkörner wurden 8 Tage gemäß den Angaben S. 61 vorbehandelt und dann in 60 ccm Molke eingetragen, welche nach Zusatz von 3 g Galaktose sterilisiert worden war.

Nach 162 stündiger Gärung wurden 0,25 g des Kefirmaterials, wie in der vorhergehenden Versuchsreihe, in 60 ccm frische Molke geimpft, welche ebenfalls nach Zusatz von 3 g Galaktose sterilisiert worden war.

Ich fasse die Gärungsergebnisse der Rausersparnis wegen in Fig. 4 zusammen, und zwar reduziert auf die Kefirmenge, welche 0,10 g Trockensubstanz entspricht.

Der Zuwachs an Gärkraft war bei dieser Versuchsreihe nicht ganz so groß wie bei der vorhergehenden, was möglicherweise durch das Fehlen des Phosphates verursacht sein mag.



Figur 4.

Diese Versuche sollen hier fortgesetzt werden, besonders um zu ermitteln, welche Komponente des Enzymsystems bei der angewandten Vorbehandlung einen Zuwachs erfährt.

Die folgende

### Versuchsreihe III

zeigt, wie die enzymatische Wirksamkeit des Kefirs abnimmt, wenn ein vorbehandeltes und stark wirksames Material eine kürzere Zeit sich in einem Medium befindet, in welchem es sein Enzymsystem nicht voll entwickeln kann.

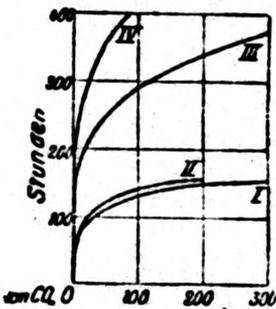
4,5 g Kefirkörner wurden in ein Substrat von folgender Zusammensetzung gebracht:

120 ccm Molke,	9 g Galaktose,
60 „ Wasser,	13,5 „ $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ .

Nach 8 tägiger Gärdauer bei  $28^\circ$  wurde der Versuch abgebrochen, die Kefirkörner wurden abfiltriert und auf 3 Kolben mit steriler Molke verteilt.

Nach Aufbewahren während 2, 4 und 6 Tagen in der sterilen Molke wurden je 0,5 g Kefirkörner gewaschen und in eine Gärlösung wie die obige übergeführt.

Die Gärkraft in den drei Versuchen ergibt sich aus Fig. 5.



Figur 5.

Es zeigt sich, daß ein mehr als 2tägiges Verweilen der Körner in der Molke die Gärkraft des Kefirs sehr erheblich herabsetzt, obwohl nach dieser Zeit, wie festgestellt wurde, tote Kefirkörner nicht oder nur in verschwindend kleiner Menge vorhanden waren.

Die chemische Seite dieser Erscheinungen, welche den Bakteriologen wohl bekannt sind, wird im hiesigen Laboratorium näher verfolgt werden.

### Versuche mit *Bact. lactis acidii*.

Frühere Versuche, welche von Herrn Dr. Herm. Meyer und Herrn Dozent Bj. Palm im hiesigen Laboratorium ausgeführt waren, hatten zum folgenden Ergebnis geführt:

Einerseits hatte eine Reinkultur von *Bact. lactis acidii* aus dem Berliner Institut für Gärungsgewerbe bei der Vorbehandlung mit einer Molke, welche neutrales Natriumphosphat und 4% Galaktose enthielt, ihr Säurebildungsvermögen vier-

mal stärker erhöht, wenn sie während 12 Tagen alle 48 Stunden in ein frisches Medium gebracht wurde, als wenn die Überführung innerhalb der 12 Tage nur 3mal erfolgte.

Andererseits hatte sich bei einer Versuchsreihe mit einer Kultur von *Bact. lactis acidi*, welche aus dem Carlsberg-Laboratorium stammte, bei der Vorbehandlung in einem Medium, welches durch Mononatriumphosphat auf saurer Reaktion gehalten wurde, die Fähigkeit zur Kohlensäureentwicklung eingestellt, und bei weiterer Überführung in frische (sterile) phosphathaltige und saure Lösungen weiter gesteigert.

Zur Prüfung dieser Ergebnisse waren Kontrollversuche unternommen worden und zwar mit einer Kultur, welche ich Herrn Prof. Chr. Barthel verdanke.

Die neuerdings gewonnenen Resultate haben indessen noch nicht den Grad von Sicherheit erreicht, daß ich die ziemlich komplizierten Verhältnisse als geklärt ansehen könnte. Soviel haben aber die neuen Versuche bestätigt, daß die Vorbehandlung des *Bact. lactis acidi* die Enzyymbildung nicht nur quantitativ, sondern auch qualitativ beeinflusst.

Als Beleg sei folgender Versuch angeführt (E. Griese):  
Je 1 ccm Reinkultur, nach S. 61 behandelt, wurden eingetragen in

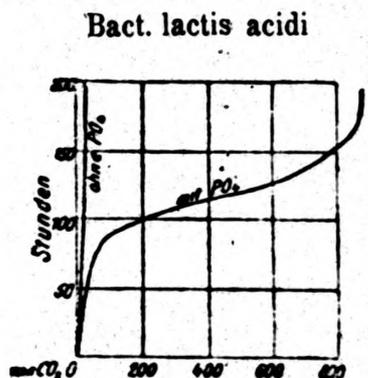
A.	B.
40 ccm Molke,	40 ccm Molke,
20 „ Wasser,	20 „ Wasser,
4,5 g $\text{Na}_2\text{PO}_4$ ,	3,0 g Galaktose
3,0 „ Galaktose,	(ohne Phosphat).

Beide Lösungen wurden auf eine gleichmäßige Wasserstoffionenkonzentration von  $p_H = 5,7$  gebracht.

Zweimalige Überimpfung nach je 48 Stunden in die genannten Lösungen A und B.

Hierauf wurde in den beiden Lösungen A (mit  $\text{PO}_4$ ) und B (ohne  $\text{PO}_4$ ) die Kohlensäureentwicklung bestimmt. Das Resultat von je 2 Parallelversuchen ergibt sich

aus Fig. 6.



Figur 6.

Das Auftreten der Milchsäure ergibt sich aus folgenden Zahlen, in je 5 ccm ermittelt:

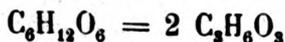
A. Mit Phosphat. <sup>1)</sup>		B. Ohne Phosphat.	
In der Lösung werden gebildet:		In der Lösung werden gebildet:	
nach 48 Stunden:	3 $10^{-4}$ g Äqu.	nach 48 Stunden:	2,6 $10^{-4}$ g Äqu.
› 72 ›	: 4,5 $10^{-4}$ › ›	› 72 ›	: 4,1 $10^{-4}$ › ›
› 96 ›	: 6,0 $10^{-4}$ › ›	› 96 ›	: 7,5 $10^{-4}$ › ›
› 120 ›	: 7,1 $10^{-4}$ › ›	› 120 ›	: 8,3 $10^{-4}$ › ›
› 192 ›	: 4,1 $10^{-4}$ › ›	› 192 ›	: 9,4 $10^{-4}$ › ›

**Keimzahl per Kubikzentimeter Gärlösung:**

A. Vor der Gärung:	1 108 000; 1 209 000 Keime,
Nach › ›	: 27 900 000; 33 480 000 ›
B. Vor › ›	: 1 523 000; 1 232 000 ›
Nach › ›	: 17 200 000; 16 140 000 ›

In mehreren anderen Versuchsreihen wurden ähnliche Ergebnisse erhalten.

Man kann hiernach also sagen, daß bei der Vorbehandlung von *Bact. lactis acidi* mit saurem Phosphat ein Enzym-system, welches zur CO<sub>2</sub>-Entwicklung führt, zur Ausbildung kam, während bei Abwesenheit von Phosphat die Reaktion nach der Gärungsgleichung



ziemlich rein eintrat.

Letzteres ist auch bei Gegenwart von neutralem Phosphat beobachtet worden.

<sup>1)</sup> Man bemerke, daß von einer gewissen Milchsäurekonzentration an bei diesem Versuch die Milchsäure wieder durch die Vergärung verbraucht wird.