

Verstärkung der Katalasewirkung in Hefezellen.

Von

Hans v. Euler und Ragnar Blix.

Mit 2 Figuren im Text.

(Aus dem biochemischen Laboratorium der Universität Stockholm.)
(Der Redaktion zugegangen am 15. März 1919.)

Ähnliche Vorbehandlungen, wie diejenigen, welche nach den Untersuchungen des hiesigen Laboratoriums ¹⁾ zu einer Vermehrung der Invertasewirkung in der Hefe führen, steigern gleichzeitig auch andere Enzymwirkungen ²⁾. Dies trifft allerdings nicht für sämtliche Hefenenzyme zu, und bei denjenigen Enzymwirkungen, welche erhöht werden, ist, wie schon betont wurde, die Zunahme prozentisch sehr ungleich.

Was die Katalase betrifft, so war bis jetzt über den Grad der Wirksamkeit dieses Enzymes in der lebenden Hefe nichts Quantitatives bekannt ³⁾. Es waren deshalb methodische Vorarbeiten notwendig.

I. Versuchsmethodik.

Zur Verfolgung von Wasserstoffsuperoxydspaltungen liegen drei Methoden vor.

Nach der ersten wird das aus dem Peroxyd freigemachte Sauerstoffgas volumetrisch gemessen. Hierzu sind mehrere,

¹⁾ Euler und Johansson, Diese Zeitschr. Bd. 76, S. 388; Bd. 78, S. 246 (1912). Euler und Cramér, ebenda, Bd. 88, S. 430 (1914).

²⁾ Euler und Meyer, Diese Zeitschr. Bd. 79, S. 298 (1912). Euler und Dernby, ebenda, Bd. 89, S. 408 (1914).

³⁾ Vergl. Medd. fr. Sv. Vet. Akad. Nobelinstitut Bd. 5, Nr. 23.

voneinander nicht wesentlich verschiedene Verfahren angegeben (O. Loew, Liebermann, Walton¹⁾, Battelli, Santesson²⁾, E. Hammersten, Weichardt und Apitzsch³⁾ u. a.). Die Methode hat den Vorteil, daß sie sich auch beim Arbeiten mit gefärbten und stark trüben Lösungen und Emulsionen anwenden läßt.

Von den Titrationsmethoden ist diejenige mit Kaliumpermanganat am meisten angewandt worden und am besten ausgearbeitet (Senter⁴⁾, Euler⁵⁾, Waentig und Steche⁶⁾ u. a.

Die jodometrische Methode ist u. a. von Jolles⁷⁾ benutzt worden. Beim Arbeiten mit Emulsionen, welche Mikroorganismen enthalten, liefert sie, wie Jorns⁸⁾ richtig angibt, Anlaß zu Irrtümern, da Jod gebunden wird.

Von den beiden ersteren Methoden ist vielleicht die volumetrische bequemer und bei geeigneter Anwendung meist ausreichend genau; die Permanganatmethode gibt, wo sie überhaupt anwendungsfähig ist, genauere Resultate, wie dies schon Senter und in letzter Zeit wieder Weichardt und Apitzsch betont haben.

Zu den folgenden Versuchen wurde deshalb überall, wo dies möglich war, die Permanganatmethode angewandt, und zwar wurde in der Regel mit 0,01 norm. Permanganatlösung unter Zusatz von Eis und etwas Schwefelsäure titriert.

Nur wo Permanganat auf anwesende Zusätze wie Glukose, Thymol u. a. einwirken konnte, wurde die Peroxydspaltung volumetrisch verfolgt.

Als Hefe kam bei der Mehrzahl der Versuche unsere

¹⁾ Walton, Zeitschr. f. physik. Chem. Bd. 47, S. 188 (1904). — Auch angewandt von Reiss, Zeitschr. f. klin. Med. Bd. 56 (1905).

²⁾ Santesson, Skand. Arch. f. Physiol. Bd. 23, S. 99 (1910).

³⁾ Weichardt und Apitzsch, Biochem. Zeitschr. Bd. 90, S. 337 (1918).

⁴⁾ Senter, Zeitschr. f. physik. Chem. Bd. 44, S. 257 (1903).

⁵⁾ Euler, Hofm. Beitr. Bd. 7, S. 1 (1906).

⁶⁾ Waentig und Steche, Diese Zeitschr. Bd. 72, S. 226 (1911).

⁷⁾ Jolles, Münch. med. Woch. 1904, 2083.

⁸⁾ Jorns, Arch. f. Hyg. Bd. 67, S. 134 (1908).

Brennerei-Oberhefe SB II zur Anwendung. Einzelne Vergleichsversuche wurden mit einer Brauerei-Unterhefe angestellt; dies ist besonders angegeben.

Es erwies sich bei mehreren Versuchen wünschenswert, in den Emulsionen einen Puffer anzuwenden, um die p_{H} -Werte leichter konstant halten zu können. Wie der Versuch zeigt, ist die Einwirkung von Natriumphosphat auf die Spaltungsgeschwindigkeit gering.

0,2 g Hefe in 100 ccm Wasser (A) bezw. in 100 ccm 0,2proz. Natriumphosphatlösung (B) aufgeschlemmt. Von diesen Emulsionen je 50 ccm zu 50 ccm 0,02 n. Peroxydlösung.

	A	B
k. 10^4	34	30
p_{H}	6,6	6,4

II. Verlauf der H_2O_2 -Spaltung durch lebende Hefe.

Herr G. Phragmén hat in einer kürzlich erschienenen Arbeit ¹⁾ gezeigt, daß die Spaltung durch lebende Hefe nach der Gleichung für monomolekulare Reaktionen verläuft, und daß die Reaktionskonstanten proportional mit der Hefemenge wachsen. Wir führen folgende Versuche Phragmén's an:

Es wurden 50 ccm H_2O_2 -Lösung mit 50 ccm Pufferlösung gemischt, worauf der Zusatz von 50 ccm Hefeemulsion erfolgte. Zu diesen Aufschlemmungen wurde die im Stockholmer Laboratorium vielfach untersuchte Brennerei-Oberhefe SB II angewandt.

Wenn bei diesen Versuchen p_{H} nicht zwischen 5 und 7 lag, so war ein ziemlich großer Gehalt an Puffersalz notwendig, um die H-Konzentration während des Versuchs konstant zu halten. Tab. a bezieht sich auf einen Versuch, den Reaktionsverlauf in angenähert neutraler Lösung zu bestimmen. Für gelöste Katalase haben Sørensen ²⁾ und Michaelis ³⁾ ein Maximum der Wirkung bei $p_{\text{H}} = 7$ gefunden.

¹⁾ G. Phragmén, Medd. från Sv. Vet. Akad. Nobelinstitut, Bd. 5, Arrhenius-Festschrift; 1919.

²⁾ Sørensen, Ergebnisse der Physiol. Bd 12, S. 393 (1912); Biochem. Zeitschr. Bd. 21, S. 131 (1909).

³⁾ Michaelis, Biochem. Zeitschr. Bd. 53, S. 390 (1913).

Im Kolben 1 war die Hefenemulsion genau doppelt so stark wie im Kolben 2 und enthielt 0,33 g Hefe (Trockengewicht 27%) in 100 ccm Reaktionsmischung.

Tabelle a.

Minuten	Kolben 1	k. 10 ³	Kolben 2	k. 10 ³
0	20,2	—	20,3	—
10	17,6	6,0	18,9	3,1
20	15,4	5,8	17,8	2,6
45	10,8	6,2	14,9	3,1
55	9,5	5,8	13,8	3,3
90	5,6	6,6	10,6	3,3

Der in der Tabelle a angegebene Reaktionskoeffizient

$$k = \frac{1}{t_n - t_{n-1}} \log \frac{C_{n-1}}{C_n}$$

ist in ziemlich hohem Grad konstant; der Verlauf entspricht demgemäß demjenigen einer monomolekularen Reaktion. Die Konstanten sind im Versuch 1, also bei der doppelten Hefemenge, doppelt so groß als im Versuch 2. Die Abweichungen von der Proportionalität sind nicht größer, als daß sie sich aus der Neigung der Hefe, sich aus der Emulsion abzusetzen, erklären lassen.“

Dieses Ergebnis konnten wir durch einen weiteren Versuch bestätigen.

Wie auch folgender Versuch zeigt, tritt Proportionalität innerhalb der untersuchten Grenzen zu Tage, wenn die Untersuchung bei der Temperatur 0 ° C. stattfindet. Arbeitet man zwischen 15 ° und 20 ° C. oder bei noch höherer Temperatur, so treten merkliche und schließlich starke Abweichungen von der Proportionalität auf, indem Verdoppelung der Hefemenge nicht die doppelte Reaktionsgeschwindigkeit, sondern eine kleinere Geschwindigkeit hervorruft.

A. 0,1 g Hefe (26,4 %) in 100 ccm 0,4 d-proz. Natriumphosphatlösung aufgeschlemmt; 50 ccm davon mit 50 ccm 0,02 n. Wasserstoff-superoxydlösung versetzt. $p_H = 6,8$.

B. Derselbe Versuch mit 0,2 g Hefe.

C. Derselbe Versuch mit 0,4 g Hefe.

Temp. 0° C.

Minuten	A		B		C	
	ccm	k. 10 ⁴	ccm	k. 10 ⁴	ccm	k. 10 ⁴
0	5,2	—	5,2	—	5,2	—
15	5,0	11	4,8	23	4,5	42
30	4,8	11	4,4	24	3,7	49
45	4,7	10	4,1	23	3,2	47
60	4,5	10	3,8	21	2,8	45

In dieser Hinsicht entsprechen die Verhältnisse bei der Katalase den früher für Invertase festgestellten Tatsachen.

Die folgende, der Arbeit von Phragmén entnommene Tabelle zeigt die Abhängigkeit der Katalasewirkung der lebenden Hefe von der H⁺-Konzentration.

Minuten	1	2	3	4	5
	pH = 3,5	4,1	5,1	5,3	7,9
0	13,3	13,2	12,7	12,3	12,2
15	10,0	10,6	9,2	8,0	7,3
35	6,8	7,6	6,0	4,7	4,1

Puffer: Im Versuch 1, 4, 5: 0,95 — mol. H₃PO₄.

Im Versuch 2, 3: 0,01 n. NaAc.

Hefe: 0,33 g (28 %) auf 100 ccm.

Die Katalasewirkung der lebenden Hefe ist von p_H bedeutend weniger abhängig als diejenige des Hefensaftes, welche bei p_H = 4 schon so gut wie vollständig gehemmt wird.

Die Invertasewirkung lebender Zellen läßt sich bei gegebener Zuckerkonzentration durch die Inversionskoeffizienten k bzw. soweit das Produkt Reaktionskoeffizient × Zuckerkonzentration konstant ist, durch den Quotienten

$$\frac{k \times g \text{ Zucker}}{\text{Zellenzahl}}$$

ausdrücken; wie aus zahlreichen Arbeiten des hiesigen Laboratoriums hervorgeht, kann dieser nach dem gegenwärtigen Stand der Kenntnisse als ein Maß des Invertasegehalts¹⁾ der Hefe angesehen werden. Mit der gleichen Menge ein und derselben Hefe wird nämlich unter übereinstimmenden äußeren Bedingungen (Temperatur, Acidität usw.) die gleiche Invertasewirkung erzielt, unabhängig davon, ob die Zellen durch Trocknen entwässert wurden (soweit hierbei eine für die Invertase schädliche Temperatur nicht geherrscht hat) oder durch Toluol bezw. Chloroform an Zuwachs und Gär-tätigkeit gehemmt wurden, oder ob die Hefe frisch zur Anwendung kam.

Wie in den folgenden Versuchen gezeigt wird, liegen bei der Katalase die Verhältnisse nicht so einfach, vielmehr wird die Katalasewirkung der Zellen in hohem Grade durch solche äußere Bedingungen beeinflusst, welche die Invertasewirkung nicht verändern. Diese Bedingungen müssen ermittelt werden, bevor eine Klarheit über die Bildung des studierten Enzyms in der Zelle gewonnen werden kann, und sie schienen uns für die Beurteilung der Enzymwirkungen in lebenden Zellen überhaupt von prinzipieller Bedeutung, so daß wir unsere diesbezüglichen Versuche hier mitteilen wollen.

Wir sind bei unserer Arbeit von der Annahme ausgegangen, daß nur eine Katalase in Hefezellen existiert: es

¹⁾ Mit welchen Einschränkungen der Begriff Invertasegehalt hier einstweilen anzuwenden ist, wurde bereits früher (vgl. H. Euler, Biochem. Zeitschr. Bd. 85, S. 407 [1918]) mehrfach betont. Das gleiche gilt für den im folgenden öfters wiederkehrenden Ausdruck Katalasegehalt. Es steht nach dem gegenwärtigen Stand unserer Kenntnisse nicht fest, ob die Menge der Enzymmoleküle selbst eine Veränderung erfährt. Eine vermehrte Enzymwirkung einer bestimmten Anzahl lebender Zellen kann nämlich auch eintreten durch eine Verminderung eines Paralysators oder durch die Vermehrung eines Aktivators oder Co-Enzyms. Bei der Invertase hat man solche spezifischen Paralysatoren bezw. Hilfsstoffe bis jetzt noch nicht beobachtet. Bei der Katalase sind hingegen Einflüsse solcher Stoffe mehrfach beschrieben worden.

soll aber erwähnt werden, daß unsere neueren Versuche Anhaltspunkte für das Vorhandensein zweier Katalasen im Sinne L o e w s liefern.

III. Versuche über das Verhalten der Katalase in frischen Hefezellen.

Unsere Absicht war nun, zu untersuchen, inwieweit die in frischer Hefe per Zelle gefundene Katalasewirkung als eine reine Enzymwirkung zu betrachten ist, mit anderen Worten, ob sich die Katalase in der frischen Hefe wie Invertase oder wie der Zymasekomplex verhält.

1. Einfluß von organischen Protoplasmagiften.

Toluol, Thymol, Chloroform und andere Narkotika, welche mit dem Zellinhalt nicht oder nur langsam chemische Reaktionen eingehen, beeinflussen frische Hefe bekanntlich in der Weise, daß die Vermehrung der Hefe und der größte Teil ihrer Gärtätigkeit sowie andere an das Protoplasma gebundene Reaktionen unterdrückt werden, während die Wirkungen freier, in den Zellen befindlicher Enzyme unbeeinflusst bleiben.

Wie sich Katalase in dieser Hinsicht verhält, war bisher unbekannt. In der älteren Literatur haben wir eine Angabe von G o t t s t e i n ¹⁾ gefunden, nach welcher Protoplasmagifte keinen merklichen Einfluß auf Hefezellen ausüben sollen.

Versuch Ia.

A. 0,2 g Hefe (26,6%) in 100 ccm Wasser aufgeschlemmt, das durch Zusatz von 0,5 ccm Toluol gesättigt war. Hierauf 50 ccm Emulsion mit 50 ccm 0,0185 n. H₂ O₂-Lösung gemischt. pH = 6,2.

B. Parallelversuch ohne Toluol pH = 6,8.

¹⁾ Gottstein, Virchows Archiv, Bd. 133, S. 295 (1893).

Minuten	A. Mit Toluol		B. Ohne Toluol	
	ccm	k. 10 ⁴	ccm	k. 10 ⁴
0	5,2	—	5,2	—
10	4,8	35	—	—
20	4,4	36	4,9	13
30	4,0	38	4,7	13
40	3,8	34	4,6	13
50	3,5	34	4,5	13
60	3,3	33	4,4	12
		<u>35</u>		<u>13</u>

Es ergab sich also eine starke Aktivierung (Verhältnis 1 : 2,7), welche durch die folgenden Versuche bestätigt wird.

Versuch 1b.

Genau die gleiche Versuchsanordnung wie bei I a, nur betrug p_{H_2} bei beiden Parallelversuchen übereinstimmend 6,2.

Minuten	A. Mit Toluol		B. Ohne Toluol	
	ccm	k. 10 ⁴	ccm	k. 10 ⁴
0	5,2	—	5,5	—
20	3,5	86	4,8	29
30	2,8	89	4,5	29
40	2,3	89	4,3	27
50	1,9	87	—	—
60	1,6	85	3,8	28
		<u>87</u>		<u>28</u>

Auch dieser Versuch zeigte die starke Vergrößerung der Katalasewirkung, und zwar im Verhältnis 1 : 3,1. Daß die Ergebnisse der beiden Versuche quantitativ nicht besser übereinstimmen, liegt wohl zum Teil an der Verschiedenheit von p_{H_2} bei I a, hauptsächlich aber an der ungleichen Aufschlemmung des Toluols, welches — in Wasser sehr wenig löslich — mit der Hefe nicht immer gleichartig in Berührung kommt.

Versuch 2a.

Ähnliche Versuche wie mit Toluol wurden mit Chloroform angestellt. In zwei Parallelversuchen wurden 0,2 g

frische Hefe (Trockensubstanz 30,2 %) in 100 ccm Wasser, bzw. in 100 ccm chloroformgesättigten Wassers aufgeschlemmt. Je 50 ccm dieser Emulsion wurden unmittelbar darauf mit 50 ccm 0,0185-n. H_2O_2 -Lösung vermischt.

Minuten	A. Mit Chloroform		B. Ohne Chloroform	
	ccm	k. 10 ⁴	ccm	k. 10 ⁴
0	5,6	—	5,6	—
20	2,7	158	5,05	22
30	1,8	164	4,8	22
40	1,4	150	4,6	21
50	0,9	<u>158</u>	4,2	<u>25</u>
		158		22,5

Aktivierung im Verhältnis 1 : 7,0.

Versuch 2b.

Genau die gleiche Versuchsanordnung wie bei 1 a. Die Werte von p_{H_2} bei A und B übereinstimmend 6,5.

Minuten	A. Mit Chloroform		B. Ohne Chloroform	
	ccm	k. 10 ⁴	ccm	k. 10 ⁴
0	5,6	—	5,6	—
10	3,4	167	—	—
20	2,5	150	4,8	26
30	1,6	159	4,5	26
40	1,2	155	4,1	21
50	0,8	<u>159</u>	4,0	<u>26</u>
		158		25

Aktivierung im Verhältnis 1 : 6,3.

Die Vergrößerung der Katalasewirkung durch Chloroform ist unter den hier eingehaltenen Bedingungen nach unseren Versuchen etwa doppelt so groß als diejenige durch Toluol.

Versuch 3.

Ein ähnlicher Versuch wurde mit Thymol angestellt, und zwar, da Thymol von Permanganat angegriffen wird, nicht durch Titration, sondern volumetrisch.

A. 0,2 g Hefe in 100 ccm mit Thymol gesättigten Wassers aufgeschlemmt, 50 ccm davon mit 50 ccm 0,0185 n. H_2O_2 -Lösung gemischt.

B. Parallelversuch ohne Thymol.

Minuten	ccm O_2 (15°; feucht)	
	Mit Thymol	Ohne Thymol
15	12	11
30	14	13
60	22	16
90	28	20
105	30	21

Schon durch die sehr geringe in Wasser lösliche Menge Thymol wird also eine starke Aktivierung hervorgerufen. Hier nimmt während des Versuchs die Aktivierung mit der Zeit zu.

Versuch 4.

Mit Toluol, Thymol und Chloroform, welche in Wasser eine sehr geringe Löslichkeit besitzen, konnte der Einfluß der Konzentration des Aktivators nicht untersucht werden.

Es wurde daher ein weiterer Versuch mit einem wasserlöslichen Protoplasmagift angestellt, und zwar mit Phenol.

In drei Parallelversuchen wurden 0,4 g frische Hefe (Trockensubstanz 26,6 %) in 100 ccm Wasser und 10 ccm 8%iger Dinatriumphosphatlösung aufgeschlemmt und mit 0 bzw. 0,5 und 2 g Phenol versetzt. Zu den Emulsionen wurden 100 ccm 1/100-n. H_2O_2 zugegeben. Die Messung der Reaktionsgeschwindigkeit geschah volumetrisch.

Minuten	ccm O_2		
	Ohne Phenol PH = 7	Mit 0,5 g Phenol PH = 6,9	Mit 2 g Phenol PH = 6,6
20	7,5	9,0	14,2
40	9,5	14,5	18,6
60	11,5	18,3	21,5
80	13,5	19,5	22,5

Die erhaltenen Zahlen zeigen, daß sich bei Phenol mehrere Einflüsse geltend machen. Zu Beginn der Reaktion

ist die Aktivierung einigermaßen proportional der zugesetzten Phenolmenge; schon nach $\frac{1}{2}$ Stunde macht sich aber ein schädigender Einfluß des Phenols auf das Enzym bemerkbar, und zwar in der konzentrierten Phenollösung stärker als in der verdünnteren, so daß die Proportionalität zwischen Phenolmenge und Aktivierung vollständig verschwindet und der zeitliche Fortschritt der Peroxydspaltung immer mehr gehemmt wird.

Es ist übrigens nicht ausgeschlossen, daß bei Anwendung von 2 g Phenol das Maximum der Aktivierung bereits überschritten war.

Aus den Versuchen 2 bis 4 ergibt sich also das auffallende Resultat, daß die Katalasewirkung der frischen Hefe durch Zusatz sehr geringer Mengen von Protoplasmagiften auf ihren 2—6fachen Wert, vermutlich höher, gesteigert werden kann.

Bevor man der Ursache dieses eigentümlichen Effektes weiter nachgeht, wird man fragen, ob bei anderen enzymatischen Reaktionen ähnliche Wirkungen bekannt sind.

Die Reizwirkungen sehr kleiner Mengen von Protoplasmagiften auf den Gärungsvorgang der Hefe, wie sie z. B. Hans und Beth Euler sowie Euler und Sahlén¹⁾ gemessen haben, können als Analogiefälle nicht in Betracht kommen; die Aktivierung ist dort von einer ganz anderen Größenordnung und geht bei etwas gesteigerten Giftmengen in eine Hemmung über. Eine starke Vergrößerung einer Enzymwirkung, nämlich der Karboxylasewirkung lebender Hefe, ist von H. und B. Euler (l. c.) und von Euler und Löwenhamn beschrieben worden²⁾.

¹⁾ Euler, Hans und Beth, Fermentforschung Bd. 1, S. 465 (1916). Euler und Sahlén, Zeitschr. f. Gärungsphysiol. Bd. 3, S. 225 (1913).

²⁾ Euler und Löwenhamn, Diese Zeitschr. Bd. 97, S. 279 (1916). Daß brenztraubensaure Salze auch in Gegenwart von Toluol und Chloroform vergoren werden, war bereits von Neuberg und seinen Mitarbeitern (Biochem. Zeitschr. Bd. 36, S. 76 [1911]) angegeben worden, welche jedoch die Aktivierung nicht beobachtet hatten; vgl. übrigens auch Biochem. Zeitschr. Bd. 79, S. 376 (1917).

Eine weitere interessante Analogie ist die Hervorruferung der Phosphatesewirkung frischer Hefe durch Toluol und Chloroform, welche 1912 von Euler und Johansson¹⁾ beschrieben wurde.

Unterschiede zwischen den beiden Fällen liegen insofern vor, als die Zymophosphatsynthese durch frische Hefe ohne Zusatz von Toluol usw. überhaupt nicht eintritt.

Unser neuer Effekt muß quantitativ noch weiter erforscht werden, insbesondere hinsichtlich des Einflusses der Einwirkungszeit und der Konzentration der Aktivatoren und bezüglich der Umkehrbarkeit der Aktivierung.

Einstweilen haben wir uns der Frage zugewandt, ob eine ähnliche Erhöhung der Katalasewirkung von Hefezellen in anderer Weise hervorgerufen werden kann.

Unsere nächsten Versuche betrafen die

2. Veränderung der Katalasewirkung beim Trocknen der Hefe.

Versuch 5a.

A. 0,2 g frische Hefe von der Trockensubstanz 26,8 % wurden in 100 ccm Wasser aufgeschlemmt. Von dieser Emulsion wurden 50 ccm mit 50 ccm 0,0185 n. H_2O_2 -Lösung vermischt. $p_H = 7,3$.

B. Die gleiche Hefe wurde 3 Stunden lang bei Zimmertemperatur getrocknet (Trockensubstanz nunmehr 54,2 %). Nun wurden 0,2 g in 100 ccm Wasser aufgeschlemmt und 50 ccm davon mit 50 ccm 0,0185 n. H_2O_2 -Lösung versetzt. $p_H = 7,3$.

C. Die gleiche Hefe wurde 20 Stunden lang bei Zimmertemperatur getrocknet (Trockengewicht nunmehr 87,4 %). 0,02 g dieser Hefe wurden wie oben behandelt. $p_H = 7,5$.

Minuten	A		B		C	
	ccm	k. 10^4	ccm	k. 10^4	ccm	k. 10^4
0	5,6	—	5,4	—	4,8	—
10	5,3	24	4,5	79	3,4	150
20	4,9	29	3,8	76	2,5	142
30	4,6	28	3,2	75	1,9	134
40	4,4	26	2,7	75	1,4	132
50	4,2	25	2,4	70	—	—
60	4,0	24	1,9	75	—	—
		<u>25</u>		<u>75</u>		<u>140</u>

¹⁾ Euler und Johansson, Diese Zeitschr. Bd. 80, S. 175 (1912).

Berechnet man die erhaltenen Konstanten auf das Trockengewicht 0,05 g, so ergeben sich folgende Zahlen:

Trockensubst. der Hefe	Trocknungsdauer Stunden	k. 10 ⁴	Verhältnis der Reaktions-Konst.
36,5 %	—	25	1,0
78,6 %	3	34	1,4
87,4 %	20	400	16,0

Versuch 5 b.

Ein vor dem Versuch 5 a angestellter orientierender, völlig analoger Versuch hatte folgende Resultate ergeben:

Trockensubst. der Hefe	Trocknungsdauer Stunden	k. 10 ⁴	Verhältnis der Reaktions-Konst.
26,5 %	—	16	1,0
38,6 %	3	32	2,0
87,5 %	20	175	11,0

Der Grad der Erhöhung der Katalasewirkung durch Trocknung ist offenbar abhängig von der Dauer und Temperatur der Trocknung, dem Ausgangszustand der Hefe usw.

Der gleiche Effekt, welcher hier bei der Brennerei-Oberhefe SB II festgestellt war, wurde nun auch bei einer Unterhefe, und zwar unserer Rasse H., untersucht.

Versuch 6.

A. 0,2 g frische Hefe (Trockensubstanz 36,4%) wurden in 100 ccm Wasser aufgeschlemmt; davon 50 ccm mit 50 ccm 1/50 n. H₂O₂-Lösung vermischt.

B. Die gleiche Hefe wird 3 Stunden bei Zimmertemperatur (Trockensubstanz nunmehr 78,6%) getrocknet; dann wie oben 0,2 g in 150 ccm Wasser aufgeschlemmt, 50 ccm hierauf mit 50 ccm 1/50 n. H₂O₂-Lösung versetzt.

C. Die gleiche Hefe wird 20 Stunden bei Zimmertemperatur getrocknet (Trockensubstanz nunmehr 87,4%); 0,2 g in 100 ccm Wasser aufgeschlemmt und dann wie oben behandelt.

Minuten	A		B		C	
	ccm	k. 10 ⁴	ccm	k. 10 ⁴	ccm	k. 10 ⁴
0	4,7	—	4,8	—	4,8	—
10	4,2	48	2,1	359	4,2	58
20	3,8	46	0,9	363	3,8	51
30	3,4	47	0,6	310	3,2	46
40	3,1	45	0,2	345	2,9	44
50	2,7	48		344	2,7	42
60	2,5	46				48
		47				
	Trockensubst. 0,073 g		Trockensubst. 0,157 g		Trockensubst. 0,0175 g	
	Berechnet auf		Berechnet auf		Berechnet auf	
	Trockensubst. 0,06 g		Trockensubst. 0,06 g		Trockensubst. 0,06 g	
	k. 10 ⁴ = 38,6		k. 10 ⁴ = 131		k. 10 ⁴ = 165	

Man findet also für unsere Unterhefe:

Trockensubst. der Hefe	Trocknungsdauer Stunden	k. 10 ⁴ ber. für 0,06 g	Verhältnis der Reaktions-Konst.
36,5 %	—	38,6	1,0
78,6 %	3	131	3,4
87,4 %	20	165	4,3

Versuch 7.

Eine wie bei Versuch 6 b hergestellte Emulsion wurde zweimal durch Filtrierpapier filtriert und hierauf mit H₂O₂-Lösung wie im Versuch 6 vermischt.

Minuten	ccm	k 10 ⁴
0	5,4	—
20	5,0	8
30	4,9	9
40	4,7	10
60	4,5	10
		9

Die Katalasewirkung der Lösung ist also nur gering, d. h. aus der getrockneten Hefe ist nur wenig lösliche Katalase in die umgebende Flüssigkeit übergegangen. Wenn

also die Trocknung eine Veränderung der Zellmembran hervorgerufen hat, so muß dieselbe sich hauptsächlich dadurch geltend machen, daß das Wasserstoffsperoxyd nach der Trocknung leichter in die Zellen eindringt.

Versuch 8.

Sowohl Entwässerung als Gegenwart von Protoplasma-
giften ruft bei frischer Hefe eine Erhöhung der Katalase-
wirkung hervor. Es wurde nun durch die folgenden Ver-
suche geprüft, ob die Aktivierung, welche Toluol und Chloro-
form bei der frischen Hefe hervorriefen, auch bei den ent-
wässerten Zellen eintritt.

A. Von der Hefe, welche während 24 Stunden bis zum Trocken-
gehalt 91,9% bei der Zimmertemperatur getrocknet worden war, wurden
0,02 g in 100 ccm Wasser aufgeschlemmt, die Emulsion mit 0,5 ccm
Toluol versetzt und geschüttelt. Davon 50 ccm gemischt mit 50 ccm
Peroxydlösung.

B. Die gleiche Menge der getrockneten Hefe ohne Toluolzusatz in
gleicher Weise behandelt.

Wir geben der Kürze halber nur die Mittelwerte der
Konstanten an:

	A	B
k. 10^4	26	22

Der Grad der Aktivierung durch Toluol ist also bei der
getrockneten Hefe äußerst gering und fällt kaum außerhalb
der Versuchsfehlergrenzen.

Ein analoger Versuch, bei welchem Chloroform anstelle
von Toluol zugesetzt wurde, hat sogar eine Erniedrigung
der Katalasewirkung ergeben:

	Mit Chloroform	Ohne Chloroform
k. 10^4	15	17

Möglicherweise handelt es sich hier um einfache Gift-
wirkung auf das freie Enzym. Ist dies der Fall, so muß
man annehmen, daß die Aktivierungen der frischen Hefe
noch größer sind, als die erhaltenen Konstanten angeben,
da sich über die Aktivierung noch eine Hemmung super-
poniert.

Versuch 9.

Wie die Versuche 5 a und b zeigen, ruft eine Entwässerung der Hefe durch Trocknung bei Zimmertemperatur eine Steigerung der Katalasewirkung auf das 10—15fache des ursprünglichen Wertes hervor. Auch die bekannte Methode, Hefe durch Behandlung mit Alkohol oder Aceton zu entwässern, liefert ein Präparat, welches gegenüber der frischen Hefe eine erheblich vergrößerte Katalasewirkung zeigt.

A. 0,2 g frische Hefe in 100 ccm einer 0,4proz. Natriumphosphatlösung aufgeschlemmt; davon 50 ccm zu 50 ccm der Peroxydlösung.

B. Frische Hefe vom Trockensubstanzgehalt 31,2% mit der 6fachen Menge 91proz. Alkohols 10 Minuten verrührt; um den schädlichen Einfluß des Alkohols herabzusetzen, war dieser vorher auf 5—10° C. abgekühlt worden. Nach 10 Minuten wurde dekantiert und der abgegossene Alkohol durch absoluten ersetzt, welcher weitere 10 Minuten mit der Hefe in Berührung blieb. Hierauf wurde nochmals dekantiert, der Rest abgesaugt und abgepreßt und schließlich im Vakuum verdunstet.

Von dieser Hefe (Trockengehalt 92,2 %) wurden 0,02 g wie bei A. behandelt.

Ein vollkommen analoger Versuch wurde mit Aceton ausgeführt.

Wir geben der Kürze halber die auf die Hefemenge 0,05 g (berechnet als Trockensubstanz) reduzierten Mittelwerte der Reaktionskonstanten:

	Frische Hefe	Alkohol-Trockenhefe	Aceton-Trockenhefe
k. 10 ⁴	22	106	102

Die Aktivierung war hier nur etwa halb so groß wie diejenige, welche durch einfache Trocknung an der Luft erzielt worden war. Das konnte dadurch bedingt sein, daß der Alkohol bzw. das Aceton einen Aktivator aus der Hefe durch Lösung entfernt, so daß eine primär eintretende starke Aktivierung durch diesen sekundären Effekt zum Teil aufgehoben wird.

Wie der folgende Versuch zeigt, ist dies aber nicht der Fall.

Versuch 10.

A. 0,2 g an der Luft auf 89,8% Trockensubstanz getrocknete Hefe wurden in 1000 ccm 0,4 n. Natriumphosphatlösung aufgeschlemmt: pH 6,8. Davon 50 ccm mit 50 ccm Peroxydlösung gemischt.

B. Die zu A verwendete luftgetrocknete Hefe mit der 10fachen Menge absoluten Alkohols im Mörser 1 Stunde verrieben. Hierauf abgeseigt, abgepreßt, getrocknet (Trockensubstanz 90,3%). Von der so behandelten Hefe 0,2 g wie bei A verwendet.

Wir geben die Reaktionskonstanten (unreduziert) an.

Minuten	A. Nicht extrahiert		B. Extrahiert mit Alkohol	
	ccm	k. 10^4	ccm	k. 10^4
0	4,7	—	5,1	—
10	2,4	292	2,8	260
20	1,3	279	1,5	265
		285		262

Eine wesentliche Beeinflussung der getrockneten Hefe durch den Alkohol findet also nicht statt.

3. Einfluß der Temperaturerhöhungen der wässrigen Hefemulsionen.

Versuch 11.

0,2 g Hefe in 100 ccm 0,4 proz. Natriumphosphatlösung aufgeschlemmt.

In Versuch A bleibt die Hefe bei Zimmertemperatur. Die entsprechenden Versuchslösungen B bis E werden 1 Stunde auf höherer Temperatur gehalten, und zwar:

	A	B	C	D	E
bei	17°	55°	60°	65°	70°
pH	6,7—6,9	6,8—6,9	6,7—6,9	6,7—6,9	6,7—6,9

Die angegebenen pH -Werte sind vor und nach der Erhitzung gemessen.

60 ccm der Emulsionen werden mit je 50 ccm H_2O_2 -Lösung versetzt die Spaltungsgeschwindigkeiten werden durch Titration gemessen.

Minuten	A		B		C		D		E	
	ccm	k. 10^4	ccm	k. 10^4	ccm	k. 10^4	ccm	k. 10^4	ccm	k. 10^4
0	4,7	—	4,5	—	4,7	—	4,9	—	4,9	—
20	3,6	57	3,5	55	1,2	297	3,6	67	4,9	—
40	2,7	60	2,8	52	0,5	268	2,8	61	4,9	—
60	2,25	54	2,2	52	—	—	2,3	55	4,9	—
80	—	—	1,8	50	—	—	2,0	50	4,9	—
		57		52		282		58		

Die außerordentlich auffallende Wirkung der Temperatur konnte darauf beruhen, daß ein wesentlicher Teil der Katalase aus den Zellen austritt und im Medium gelöst die erheblich größere Spaltungsgeschwindigkeit der auf 60° C. erwärmten Lösung hervorruft. Um zu prüfen, ob mit einer solchen Annahme gerechnet werden kann, wurde der folgende Versuch angestellt.

Versuch 12.

Vier Parallelversuche.

0,2 g frische Hefe (Trockensubstanz 27,3%) wurden in 100 ccm 0,4 %iger Natriumphosphatlösung aufgeschlemmt. In den Versuchen A1 und A2 wurden die Emulsionen 1 Stunde auf 60°C. gehalten, die Emulsionen B1 und B2 wurden nicht erwärmt.

Die Emulsion A1 wurde nach dem Erwärmen und Wiederabkühlen filtriert, die Emulsion A2 wurde in der gewöhnlichen Weise unfiltriert untersucht. Es ergab sich folgendes:

A1. Filtriert.	
Vor Erwärmung: $pH = 6,3$	
Nach „ $pH = 6,4$	
Minuten	ccm
0	5,0
20	5,0
40	4,8
60	4,7

A2. Nicht filtriert.		
Vor Erwärmung: $pH = 6,3$		
Nach „ $pH = 6,4$		
Minuten	ccm	k. 10^4
0	5,0	—
20	1,4	277
40	0,4	274

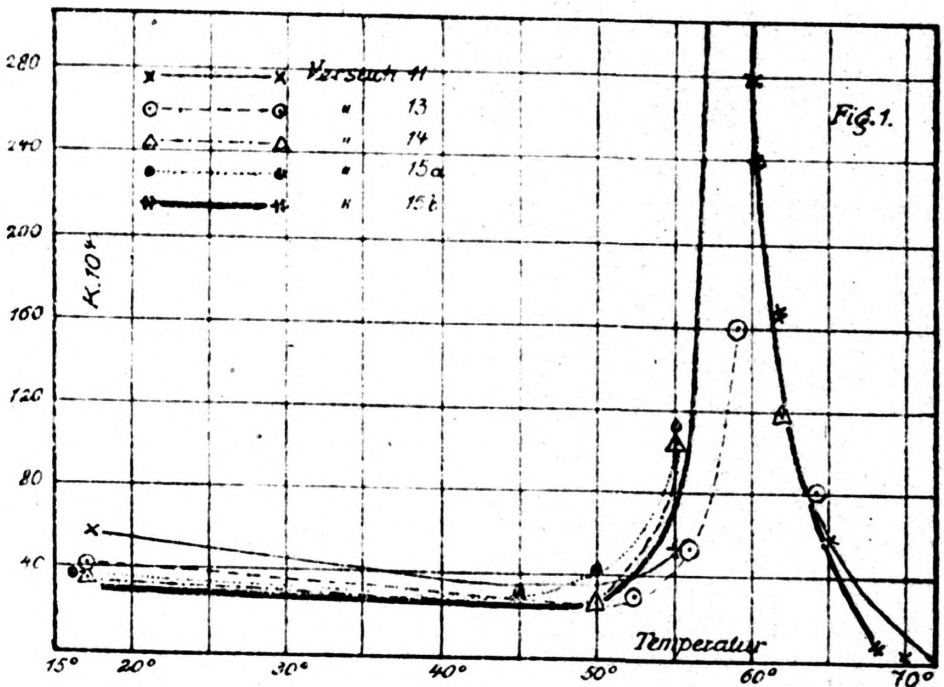
Die Parallelversuche B wurden in gleicher Weise ausgeführt:

B1. Filtriert.	
Vor Erwärmung: $pH = 6,3$	
Nach „ $pH = 6,4$	
Minuten	ccm
0	5,2
20	5,1
40	5,0
60	4,9

B2. Nicht filtriert.		
Vor Erwärmung: $pH = 6,3$		
Nach „ $pH = 6,4$		
Minuten	ccm	k. 10^4
0	5,3	—
20	4,1	56
40	3,2	55
60	2,5	54
		<u>55</u>

Ob die in den Versuchen A 1 und B 1 beobachtete geringfügige Spaltung von gelöster Katalase herrührt oder von einigen in das Filtrat übergegangenen Hefezellen, können wir nicht mit Sicherheit sagen.

Daß die Konstante des Versuches A 2 etwas kleiner ausgefallen ist als im vorhergehenden Versuch (275 gegen 282), beruht auf kleinen Unterschieden der Hefepräparate, der Acidität und der Dauer des Erwärmens. Dieser Unterschied beträgt kaum 3 % des Wertes der Konstanten und



liegt innerhalb der Versuchsfehler. Die Übereinstimmung muß also als gut bezeichnet werden.

Versuch 13.

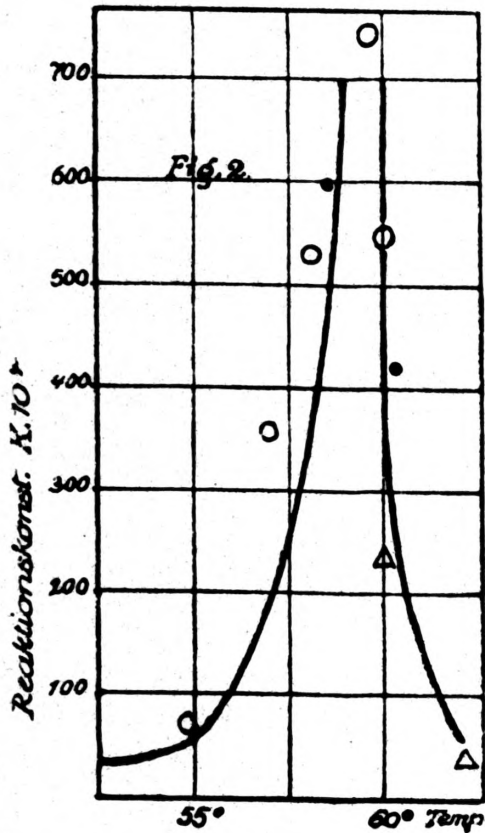
Ein in ganz ähnlicher Weise ausgeführter Versuch lieferte folgende Ergebnisse (Erwärmungsdauer 1 Stunde, $pH = 6,7-6,9$ nach der Erhitzung).

	A	B	C	D	E
Temperatur:	17°	52,5°	56°	59°	64°
k. 10 ⁴	39	30	54	161	80

Versuch 14.

Bei diesem Versuch wurde die Erhitzung 80 Minuten lang vorgenommen. Die Acidität betrug 6,6–6,8, eingestellt nach der Erhitzung.

	A	B	C	D
Temperatur:	17°	50°	55°	62°
k. 10 ⁴	32	29	104	119



In der Figur 1 haben wir die Ergebnisse der Versuche 11, 13 und 14 zusammengestellt, Figur 2 gibt direkt die Konstanten von vier weiteren Versuchen an.

Es liegt nahe, für den zuletzt beschriebenen Effekt und die Wirkungen der Entwässerung und der Protoplasmagifte eine gemeinsame Deutung zu suchen.

Versuch 15.

Die Lage des Temperatur-Maximums der Katalasewirkung muß auch von der Dauer der Erhitzungszeit ab-

hängig sein. Bei einem Versuch mit 2 stündiger Erhitzung mißglückte leider die Messung bei der höchsten Temperatur, so daß nur der erste Teil der Kurve festgelegt werden konnte.

Nach dem Erhitzen der Lösungen wurde p_{H_2} auf 6,7—7,0 eingestellt.

	A	B	C	D
Temperatur:	17°	45°	50°	55°
k. 10 ⁴	34	32	42	105

Versuch 16.

Die Abhängigkeit der Aktivierung von der Dauer der Erwärmung wurde in folgenden Versuchen festgestellt.

a.

2 g frische Hefe in 1000 ccm einer 0,4 %igen Natriumphosphatlösung aufgeschlemmt; von dieser Emulsion 60 ccm in jedem Kolben.

4 Kolben erwärmt auf 55° während 1/2, 1, 2 und 3 Stunden,
3 " " " 60° " 1, 2 und 3 Stunden.

Nach der Erwärmung wird jeder Kolben mit 50 ccm 0,0185 n. H₂O₂-Lösung versetzt.

p_{H_2} 6,7—6,9

Trockensubstanz: 26,6 %.

Wir geben die Mittelwerte der aus 3—4 Beobachtungen erhaltenen Konstanten k. 10⁴ an.

Stunden erwärmt:	1/2	1	2	3
Temperatur 55°	61	97	404	381
" 60°	351	282	173	90

Für die nicht erwärmte Emulsion wurde k. 10⁴ = 38 gefunden.

b.

Die gleiche Versuchsanordnung wie bei a: p_{H_2} = 6,8—7,0.

Stunden erwärmt:	0	1/2	1	2	3
Temperatur 57°	45	309	391	406	316

Einfluß von Zusätzen auf die Wärme-Aktivierung der Katalase.

Es hat sich gezeigt, daß die Verstärkung der Katalasewirkung durch Erwärmung von der Anwesenheit verschiedener Stoffe wesentlich beeinflusst wird. Obwohl die Art

dieses Effektes noch keineswegs aufgeklärt ist, wollen wir die in dieser Hinsicht bis jetzt gewonnenen Resultate mitteilen, um später ausführlicher auf die genannte Erscheinung, die hier weiter verfolgt wird, zurückzukommen.

Versuch 17.

2 g frische Hefe in 1000 ccm einer 0,4%igen Natriumphosphatlösung aufgeschlemmt. Die Versuche A enthalten keinen weiteren Zusatz, die Versuche B enthalten 3% Natriumsulfat (wasserfrei), die Versuche C enthalten 6% des gleichen Salzes.

A, B und C werden 1 Stunde auf 58° C. erwärmt, Versuche A, B und C 2 Stunden auf die gleiche Temperatur.

Wir beschränken uns darauf, die Mittelwerte der Konstanten anzugeben:

Stunden erwärmt	Ohne Zusatz	3% Na ₂ SO ₄	6% Na ₂ SO ₄
1	545	550	487
2	239	289	465

Natriumsulfat scheint hier bei längerer Erwärmung eine Schutzwirkung auf die Katalase auszuüben. Für die nicht erwärmte Emulsion wurde die Konstante 29 ermittelt.

Versuch 18.

Dieselbe Versuchsanordnung wie in Versuch 17, jedoch wurde an Stelle des Natriumsulfates nun Natriumchlorid zugesetzt.

Stunden erwärmt	Ohne Zusatz	3% NaCl	6% NaCl
1	620	46	12
2	480	0	0
0	38		

Hier wird eine eventuelle Schutzwirkung von dem spezifisch schädlichen Einfluß des NaCl verdeckt, das bei 2 stündiger Einwirkung bei 58° C. die Katalasewirkung vollständig zerstört.

Dieses Resultat rührt nur zu einem kleinen Teil von der Hemmung her, welche NaCl auf die Spaltung des Wasserstoffsperoxyds durch Katalase bei Zimmertemperatur ausübt. Dies wurde durch folgenden Versuch bestätigt, bei welchem die Versuchsbedingungen dieselben waren wie die oben angegebenen. Es wurde also die Spaltung durch 2 Hefenemulsionen verglichen, von welchen die eine nur 0,4 % Phosphat, die andere außerdem noch 4 % NaCl enthielt, abgesehen von der üblichen H_2O_2 -Menge. Bei beiden Versuchen war $p_H = 6,7$. Erwärmung fand nicht statt.

Minuten	Ohne NaCl		Mit NaCl	
	ccm	k. 10^4	ccm	k. 10^4
0	7,5	—	7,4	—
10	7,1	24	6,9	30
20	6,7	25	6,3	35
30	6,3	25	5,9	33
		25		33

Versuch 19.

Sehr auffallend sind die verschiedenen Wirkungen, welche bei einzelnen Nichtelektrolyten gefunden wurden. Bei Gegenwart der untersuchten Substanzen, Alkohol, Glyzerin, Glukose und Milchzucker, konnte nicht mit der Permanganatmethode gearbeitet werden, und es wurden deshalb die Versuche volumetrisch angestellt. Dieselben beziehen sich wieder auf 1- und 2-stündige Erwärmung auf $58^\circ C.$, bei $p_H = 6,8$ (0,4 % Phosphat als Puffer). Wir teilen der Raumersparnis wegen nicht die vollständigen Versuchsreihen mit, sondern die nach 60 Minuten bei Zimmertemperatur erhaltene Anzahl ccm O_2 .

Dauer d. Erwärmung	Ohne Zusatz	6 % Glyzerin	6 % Lactose
0 St.	13	—	—
1 "	28	27	5
2 "	26	26	6

Versuch 20.

Ein analoger Versuch wurde mit Alkohol, Glukose und Rohrzucker angestellt. Nach 30 Minuten wurden erhalten die angegebenen ccm O₂. Bei der Erwärmung war $p_{H} = 6,8$.

Dauer d. Erwärmung	Ohne Zusatz	6 % Äthylalkohol	6 % Glukose	6 % Rohrzucker
0 St.	17,5 ccm	—	—	—
1 St.	40 „	41	10	39

Nach den vorliegenden Versuchen könnte man annehmen, daß die Aldehydgruppe den zerstörenden Einfluß auf die Katalase ausübt. Einstweilen ist aber das Versuchsmaterial noch zu klein, um Schlüsse über die Art dieses Effektes ziehen zu können.

IV. Diskussion.

Da aus der enzymologischen Praxis bekannt ist, daß gewisse Enzyme, welche aus den frischen Hefezellen durch Wasser nicht ohne weiteres extrahiert werden, nach Trocknen der Hefe in die wässrige Lösung gebracht werden können, so wird man zunächst an die Möglichkeit denken, daß die Permeabilität der Zellen durch die drei Behandlungsweisen derart vergrößert wird, daß die Scheidewand zwischen Katalysator und Substrat mehr oder weniger vollständig verschwindet.

Gegen diese Annahme läßt sich indessen der wesentliche Einwand machen, daß der gleiche Effekt sich dann auch bei allen anderen Enzymwirkungen der frischen Zellen zeigen müßte, wo ebenfalls das Substrat zum Enzym der Zelle diffundieren muß, z. B. bei der Inversion des Rohrzuckers. Die invertierende Wirkung frischer Hefezellen auf Rohrzucker rührt, wie Euler und Kullberg nachgewiesen haben, ausschließlich von dem in den Zellen enthaltenen Enzym her, nicht etwa von in Lösung gegangener Invertase; in dieser Hinsicht entsprechen sich Invertase und Katalase vollständig. Es wäre also, wenn man sich eine Veränderung

der Permeabilität der Zellmembran als Ursache der Beschleunigung der Katalasewirkung denkt, zu erwarten, daß ähnliche Effekte auch bei der Inversion des Rohrzuckers durch frische Zellen eintreten. Dies ist aber nicht der Fall.

Daß Protoplasmagifte die Inversion durch frische Hefe nicht beschleunigen, ist bereits durch Euler und Kullberg gezeigt worden; Toluol und Chloroform üben auf die Inversion durch Hefezellen gar keinen Einfluß aus. Auch durch die Trocknung tritt bei der Inversion keinerlei Erhöhung der Enzymwirkung ein, es wird vielmehr, wie im hiesigen Laboratorium mehrfach nachgewiesen wurde, der gleiche Enzymgehalt der Zellen gefunden, sei es, daß sie frisch oder getrocknet untersucht werden.

Hinsichtlich des Einflusses der Erhitzung in wässriger Lösung lagen bisher bezüglich der Inversion noch keine Erfahrungen vor. Obwohl bei früheren Arbeiten über die Invertasewirkung der frischen Hefe nie Anzeichen eines solchen Effektes beobachtet worden waren, wurden einige mit den Versuchen 11–15 analoge Inversionsserien von Herrn J. Laurin und Frl. Heintze ausgeführt und uns zur Verfügung gestellt.

Versuch.

Es wurden je 0,4 g der zu den Katalaseversuchen verwendeten Oberhefe SB II in 50 ccm Wasser aufgeschlemmt. Die auf $pH = 4,5$ eingestellten Aufschlemmungen wurden 60 Minuten auf 55° bzw. 60° und 65° C. gehalten und dann schnell auf Zimmertemperatur abgekühlt. Nach dem Abkühlen wurde bei allen Emulsionen die Einstellung auf $pH = 4,5$ kontrolliert. Die Emulsionen wurden mit 50 ccm einer 8prozentigen Rohrzuckerlösung versetzt, welche 2prozentig in bezug auf Natriumphosphat war ($pH = 4,5$); damit wurden die Inversionsversuche in der üblichen Weise begonnen. Die Versuchsmethodik war die gleiche, wie die im hiesigen Laboratorium bei früheren Inversionsversuchen mit frischer Hefe stets angewandte.

Die erhaltenen Inversionskonstanten sind in der zweiten Spalte der folgenden Tabelle angegeben, umgerechnet auf $k \cdot 10^5 = 100$ für den nicht erwärmten Saft bzw. Emulsion.

Erwärmung	FrISCHE Hefe [J. Laurin; S. Heintze] k. 10 ⁵ [Mittel]	Invertaselösung [B. af Ugglas ¹⁾ ; Kullberg ¹⁾] k. 10 ⁵ [Mittel]
Nicht erwärmt	100	100
60 Minut. auf 55°	86	83
60 „ „ 60°	63	58
60 „ „ 65°	5	6,5

Die Versuchsreihen von Laurin und Heintze zeigen, daß eine Erhöhung der Enzymwirkung durch Erwärmung, wie sie bei der Katalase auftritt, sich hier nicht geltend macht ²⁾).

Wir geben daneben die von B. af Ugglas und von Kullberg an Invertaselösungen früher erhaltenen Ergebnisse ¹⁾ an.

Auch hinsichtlich der Erhitzung weist also die Invertasewirkung der Hefe keinerlei Analogie mit der Katalasewirkung auf.

Was die Erhöhung der Enzymwirkung durch Protoplasmagifte und durch Entwässerung betrifft, so lassen sich, wie bereits auf Seite 93 angegeben, aus den Arbeiten des hiesigen Laboratoriums einige analoge Fälle finden; durch beide Einwirkungen kommt nämlich die Wirkung der Hefen-Phosphatase erst zum Vorschein, bei diesem Enzym liegt also eine noch stärkere Erhöhung der Enzymwirkung durch beide Einflüsse vor.

Die Wirkung der frischen Hefezellen auf Brenztraubensäure weist nach Euler und Löwenhamn und Hans und Beth Euler hinsichtlich der Wirkung von Protoplasmagiften ebenfalls eine Analogie auf; entsprechende Ver-

¹⁾ Euler und af Ugglas, Diese Zeitschr. Bd. 65, S. 124 (1910). Bei dieser Gelegenheit sei ein Druckfehler, der sich in diese Arbeit eingeschlichen hat, verbessert. Auf Seite 129, 3. Versuchsreihe, muß in der Tabelle die H-Ionenkonzentration $7 \cdot 10^{-6}$ stehen statt $7 \cdot 10^{-7}$.

Euler und Kullberg, Diese Zeitschr. Bd. 71, S. 134 (1911).

²⁾ Eine ausführlichere Studie über die Wärme-Inaktivierung der Invertase wird demnächst in Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi erscheinen.

suche über den Effekt der Entwässerung und der Erhitzung in wässriger Lösung liegen unseres Wissens noch nicht vor.

Was speziell die Phosphatase betrifft, so wurde besonders festgestellt, daß unter dem Einfluß von Toluol nicht etwa Enzym aus den Zellen austritt und in der umgebenden Lösung weiter wirkt, wodurch eine Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit bezw. eine Ermöglichung der Reaktion überhaupt verständlich wäre.

Kehren wir zur Katalase zurück und sehen von der Änderung der Permeabilität der Zellmembran ab, so kann der beobachtete Effekt darauf beruhen, daß die Katalase der lebenden Zelle in einen reaktionsfähigeren Zustand versetzt wird, sei es dadurch, daß das Enzym in Freiheit gesetzt wird¹⁾ oder aus einem Proenzymzustand entsteht, sei es, daß Aktivatoren gebildet oder Hemmungskörper vernichtet werden.

Betrachtet man den hier gefundenen Erscheinungskomplex für sich, so erscheint die Annahme, daß ein Aktivator der katalytischen Wirkung gebildet wird oder noch eher, daß durch Entwässerung, Erhitzung oder Einwirkung von Protoplasmagift ein Hemmungskörper verschwindet, nicht unwahrscheinlich, um so mehr, als die katalytische Spaltung des Wasserstoffsperoxyds in der Zelle mit anderen Lebenserscheinungen in derselben, wie Gärung und Atmung, eng verknüpft zu sein scheint. Nach den bisher bekannt gewordenen Tatsachen. — wir verweisen auf die interessanten Versuche von Bach²⁾ sowie von Batelli³⁾ und Stern

¹⁾ Der Einfluß der Erwärmung ließe sich vielleicht darauf zurückführen, daß das kolloidale Enzym einen höheren Dispersitätsgrad erreicht; durch Narkotika und durch Entwässerung wird aber ein solcher Effekt kaum hervorgerufen.

²⁾ A. Bach, Chem. Ber. Bd. 39, S. 1669 (1906).

A. Bachs Versuche über den Einfluß der Peroxydase auf die Tätigkeit der Katalase hat zu dem bemerkenswerten Ergebnis geführt, daß aktive Peroxydase (pflanzlichen Ursprungs) eine starke Vergrößerung der Wirkung einer tierischen Katalase hervorruft.

³⁾ Batelli und Stern, Journ. de Physiol. Pathol. Bd. 7, S. 919 (1905). Soc. Biol. Bd. 68, S. 811 (1910). Inwieweit die Ergebnisse von

— würde man annehmen, daß ein am Oxydationssystem der Zelle beteiligter Stoff bei den von uns gefundenen Erscheinungen verändert wird.

Die Oxydationsvorgänge in pflanzlichen und tierischen Zellen werden bekanntlich nach der jetzt ziemlich allgemein angenommenen Hypothese durch drei Enzyme zusammenwirkend vermittelt: Oxydasen veranlassen die Bildung von Peroxyden; diese Peroxyde werden durch Peroxydasen gespalten und werden ferner durch die Katalase in einen Rest und molekularen Sauerstoff aufgeteilt.

Das enzymatische Oxydationssystem ist stark abhängig von der Mitwirkung von Aktivatoren und Hemmungskörpern. Bereits Bach hatte gefunden, daß aktive Peroxydase auf die zellfreie alkoholische Gärung einen hemmenden Einfluß ausübt. Neuere Untersuchungen von Batelli und Stern haben zu weiteren Befunden über die gegenseitige Beziehung von Peroxydase und Katalase geführt. Nach Angabe dieser Forscher findet sich im tierischen Organismus eine Verbindung, welche die Tätigkeit der Katalase nach 15 Minuten langer Berührung bei 37° C. um etwa $\frac{2}{3}$ verringert; sie belegten diese Verbindung mit dem Namen Antikatalase oder, in Rücksicht auf deren Eisengehalt, Ferrosin.

Der außerordentlich hohe Temperaturkoeffizient der Aktivierung der Katalasewirkung durch Erwärmung deutet jedenfalls darauf hin, daß wir es mit Veränderungen eines Enzymsystems oder eines Eiweißkörpers zu tun haben; es sind wenig Vorgänge an anderen Stoffen mit derartig hohen Temperaturkoeffizienten bekannt, und da die Gärungsvorgänge, wie Untersuchungen der letzten Zeit ergeben haben, mit den Wirkungen der Katalase eng verknüpft sind, so liegt es nahe, die hier mitgeteilten Erscheinungen auf Veränderung eventuell Denaturation des Gärungskomplexes im Protoplasma zurückzuführen.

Bach und Batelli durch Verschiedenheiten in der Acidität beeinflusst sind, müssen erst weitere Versuche zeigen.

Anhang.

Steigerung der Katalasewirkung per Zelle
bezw. per Gewichtseinheit Hefe bei der
Gärung.

Zum Schluß seien einige Versuche angegeben, welche den Einfluß einer Vorbehandlung durch Gärung zeigen.

Läßt man frische Hefe in verdünnten Zuckerlösungen gären, so beobachtet man — besonders in Gegenwart von Stickstoffnahrung und von Nährsalzen — wie eingangs erwähnt, eine Anreicherung gewisser Enzyme, besonders der Invertase, per Zelle oder per Gewichtseinheit Hefesubstanz gerechnet.

Sucht man in der gleichen Weise die Katalasewirkung der Hefenzellen zu erhöhen, so fallen die diesbezüglichen Versuche tatsächlich ebenfalls positiv aus. Wird beispielsweise 1 Liter Lindnersche Nährlösung, welche 20 g Rohrzucker per Liter enthält, mit 10 g Hefe vergoren, so steigt innerhalb 24 Stunden die Katalasewirkung per Zelle erheblich an. Der Vergleich einer solchen Hefe mit der ursprünglichen — von jeder Probe wurden 0,2 g Hefe in 100 ccm einer 0,4 n. Natriumphosphatlösung aufgeschlemmt und davon 50 ccm mit 50 ccm Peroxydlösung vermischt ($p_{\text{H}} = 6,7$) — ergab die Konstanten:

	Nicht vorbehandelt	Vorbehandelt
k. 10^4	43	61

Bei anderen Versuchen wurde die Hefe nur mit phosphathaltiger Rohrzuckerlösung ohne Stickstoffnahrung vorbehandelt; dabei wuchsen die Werte k. 10^4 von 39 bis 55.

Nach einer Reihe ähnlicher Ergebnisse wurde untersucht, in welchem Grade diese Zahlen reproduzierbar sind, bzw. durch welche Faktoren sie beeinflusst werden.

Zunächst wurde der Einfluß eines Reduktionsmittels, Methylenblau¹⁾, untersucht. Der Zusatz von 0,1 % Me-

¹⁾ Methylenblau wirkt auf die Gärung durch lebende Hefe insofern wie eine Anzahl von Protoplasmagiften ein, als mäßige Konzentrationen

thylenblau ruft, offenbar bis zum Verbrauch des Reduktionsmittels selbst, eine Beschleunigung hervor.

Mit Acetaldehyd, welcher wegen seiner Rolle bei der Gärung und als Oxydationsprodukt des Äthylalkohols in Betracht kam, haben einige Versuche dagegen eine Hemmung ergeben.

Diese Versuche, welche einstweilen nicht weiter verfolgt wurden, zeigen ebenfalls, daß die bei der Vorbehandlung der Hefe erhaltenen Reaktionskonstanten von verschiedenen Nebenwirkungen, welche bei der Vorbehandlung eintreten können, nicht unwesentlich beeinflußt werden¹⁾, und

die Gärkraft hemmen, während in sehr großer Verdünnung eine deutliche, wenn auch nicht besonders große Aktivierung eintritt. Dabei wird Methylblau selbst reduziert. Diese Reduktion ist, wie Harden und Young an getrockneter Hefe nachgewiesen haben, von der Gegenwart eines Stoffes abhängig, welcher aus der getrockneten Hefe durch Auswaschen entfernt werden kann.

Versuch (volumetrisch ausgeführt).

A. 0,4 g Hefe (Trockengewicht 26,2%) in 100 ccm 0,4 n. Phosphatlösung aufgeschlemmt; die Lösung mit 0,05 g Methylblau versetzt und auf $p_H = 6,8$ gebracht.

B. Der gleiche Versuch mit 0,1 g Methylblau.

C. Parallelversuch ohne Methylblau.

Minuten	ccm O ₂		
	A	B	C
30	19	22	12
60	24	29	18
75	26	30	—

¹⁾ Da die Katalase zweifellos an den wesentlichsten Lebensprozessen der Zellen, vermutlich an den Oxydationen beteiligt ist, wurde die Einwirkung von verdünnter Wasserstoffsperoxydlösung auf die Zymasewirkung bzw. Zymasebildung studiert. Wie der folgende Versuch zeigt, rief eine verdünnte H₂O₂-Lösung eine Schwächung der Gärkraft hervor.

A. 2 g nicht vorbehandelte Hefe (Trockengewicht 27,0%) in 200 ccm proz. Rohrzuckerlösung, enthaltend 4 g NaH₂PO₄ · p_H = 5.

B. 2 g Hefe werden 2 Stunden mit 100 ccm 1/50 n. H₂O₂-Lösung vorbehandelt. Dabei wird das Wasserstoffsperoxyd quantitativ zerlegt.

daß sie also zu Schlüssen über den Enzymgehalt der Zellen nicht in ähnlicher Weise verwendet werden dürfen, wie dies hinsichtlich der Invertasewirkung geschehen konnte.

Wir müssen uns also einstweilen mit der Feststellung der Tatsache begnügen, daß die Katalasewirkung frischer Hefe durch Vorbehandlung mit synthetischer Nährlösung (Rohrzucker, Asparagin, Kaliumphosphat, Magnesiumsulfat) stark erhöht wird.

Zusammenfassung.

Wie durch Versuche von G. Phragmén gezeigt worden war, ruft frische Hefe eine Spaltung von verdünntem Wasserstoffsuperoxyd hervor, ohne daß ein lösliches Enzym an die umgebende Flüssigkeit abgegeben wird, und die von den Zellen selbst bzw. von der darin enthaltenen Katalase bewirkte Spaltung verläuft innerhalb gewisser Grenzen als Reaktion erster Ordnung. Die Reaktionskonstanten wachsen proportional der Hefenmenge.

Durch die vorliegende Untersuchung haben sich drei Wege ergeben, auf welchen die katalytische Wirkung der Hefezellen stark erhöht werden kann, ohne daß sie Anhaltspunkte für eine Neubildung von Enzym zeigen. Schon geringe Mengen eines Protoplasmagiftes wie Toluol oder Chloroform steigern die katalytische Wirkung der Zellen auf das 6fache des ursprünglichen Wertes. Eine noch stärkere Wirkung tritt ein, wenn die Zellen durch einfache Trocknung an der Luft oder in anderer Art, welche das En-

In dieser Lösung werden nun 8 g Rohrzucker + 4 g NaH_2PO_4 aufgelöst; hierauf Verdünnung auf 200 ccm $\text{pH} = 5$.

Minuten	ccm CO_2	
	A	B
15	15,5	15
30	29	26
45	44	40
60	61	53
75	79	69
90	98	83

zym nicht schädigt, entwässert wird; das getrocknete Präparat wird dadurch leicht auf die 10—15fache Wirksamkeit der ursprünglichen Hefe gebracht (berechnet auf die gleiche Substanzmenge).

Aktivierungen von der gleichen Größenordnung, auf das 20—30fache des Ausgangswertes, werden erzielt, wenn Emulsionen frischer Hefe kürzere Zeit, etwa 0,5—2 Stunden, auf höhere Temperaturen, etwa 55—63° C., gebracht werden.

Diese Aktivierung durch Erwärmen der aufgeschlemmten Zellen kann durch Stoffe, welche in der Emulsion gelöst sind, stark beeinflusst werden.

Wie neuere Versuche aus dem hiesigen Laboratorium zeigen, sind die hier beschriebenen Aktivierungen nicht auf Hefen beschränkt, sondern treten bei zahlreichen anderen Mikroorganismen auf.

Die Katalasewirkung per Zelle oder per Gewichtseinheit Hefengewicht kann durch Vorbehandlung der Hefe mit Zuckerlösungen erhöht werden. Die erhaltenen Reaktionskonstanten sind aber kein Maß für den Katalasegehalt der Zellen.