

Über die Temperaturempfindlichkeit der Saccharase (Invertase).

Von

H. v. Euler und I. Laurin.

(Mit 4 Figuren im Text.)

(Aus dem biochemischen Laboratorium der Hochschule Stockholm.)
(Der Redaktion zugegangen am 20. Juli 1919.)

Die Temperaturempfindlichkeit der Saccharase ist im hiesigen Laboratorium bereits in zwei Arbeiten, von Euler und B. af Ugglas¹⁾ und von Euler und Kullberg²⁾, behandelt worden. Diese Arbeiten enthalten die Bestimmung des Temperaturkoeffizienten der enzymatischen Rohrzuckerspaltung und den Hinweis, daß dieser Temperaturkoeffizient bedeutend kleiner ist als derjenige der katalytischen Rohrzuckerspaltung durch Säuren. Ferner wurden die Angaben der älteren Literatur über „Optimal“- und „Tötungstemperatur“ der Saccharase durch die Bestimmung einer „Inaktivierungskonstante“ ersetzt.

Die genannten Messungen waren noch in vieler Hinsicht der Erweiterung und Ergänzung bedürftig, welche erst im Laufe des letzten Jahres durchgeführt werden konnten³⁾. Die vorliegende Untersuchung betrifft folgende Punkte:

I. Temperaturkoeffizient der Rohrzuckerinversion durch eine Oberhefe.

¹⁾ Euler und af Ugglas, Diese Zeitschr. Bd. 65, S. 124 (1910).

²⁾ Euler und Kullberg, Diese Zeitschr. Bd. 71, S. 134 (1911).

³⁾ Ein wesentlicher Teil dieser Arbeit wurde im April 1919 der schwedischen Akademie der Wissenschaften vorgelegt.

- II. Zeitlicher Verlauf der Inaktivierung der Saccharase; der „Inaktivierungskoeffizient“ k_C .
- III. Abhängigkeit des Inaktivierungskoeffizienten von der Temperatur.
- IV. Abhängigkeit der Temperaturempfindlichkeit der Saccharase von der Acidität.
- V. Beeinflussung des Inaktivierungskoeffizienten durch den Luftsauerstoff.
- VI. Vergleich des Inaktivierungskoeffizienten k_C einer Oberhefe und einer Unterhefe.
- VII. Vergleich des Inaktivierungskoeffizienten k_C bei Anwendung isolierter Saccharase und frischer Hefe.
- VIII. Schutzwirkungen.

Die Inversionsversuche sind als Beilagen an die genannten acht Kapitel angereiht worden.

Am Schluß dieser Mitteilung haben wir unsere wichtigeren Ergebnisse zusammengefaßt.

I. Temperaturkoeffizient der Rohrzuckerinversion durch eine Oberhefe.

Bekanntlich gilt für die Abhängigkeit der Reaktionskoeffizienten von der Temperatur, auch wenn die Reaktionen durch Enzyme katalysiert werden, in recht weiten Grenzen die Formel von Arrhenius:

$$k_2 = k_1 e^{\frac{A(T_2 - T_1)}{R \cdot T_1 T_2}}$$

wo A eine Konstante bedeutet, R die Gaskonstante und T_2 bzw. T_1 die den Reaktionskoeffizienten k_2 und k_1 entsprechenden absoluten Temperaturen.

Die Konstante A der Arrheniusschen Formel haben Euler und B. af Ugglas¹⁾ für die Inversion durch die Invertase aus einer Unterhefe gemessen. Nach dieser Untersuchung ist „zwischen 0° und 20° der Wert der Konstante

$$A = 11\,000 \pm 200$$

¹⁾ Euler und B. af Ugglas, Diese Zeitschr. Bd. 65, S. 138 (1910).
Hoppe-Seyler's Zeitschrift f. physiol. Chemie. CVIII.

wenigstens für Lösungen, deren H-Konzentration etwa 10^{-6} bis 10^{-4} beträgt“.

Obwohl bekanntlich die sich aus der Formel für monomolekulare Reaktionen ergebenden Reaktionskoeffizienten erster Ordnung, k , in der Regel keine absolute Konstanz zeigen und hier durch die Anfangsgeschwindigkeiten hätten ersetzt werden können, so dürfte doch durch die Anwendung von Mittelwerten aus den Koeffizienten k — über den Grad ihrer Konstanz geben die Beilagen Auskunft — die größte Zuverlässigkeit erreicht worden sein. Für eine künftige Untersuchung des Einflusses der Rohrzuckerkonzentrationen wird mit den Michaelis schen Konstanten zu rechnen sein. Michaelis und Menten, Biochem. Zeitschr. Bd. 49, S. 333 (1913).

Da wir in der vorliegenden Untersuchung zahlreiche Inversionen mit Saccharase aus einer Oberhefe ausführen mußten, so wollten wir uns nicht mit der Annahme begnügen, daß die Inversion durch Saccharasen aus Oberhefe und Unterhefe den gleichen Temperaturkoeffizienten besitzt, sondern haben die Arrheniussche Konstante¹⁾ A für die Inversion durch eine Oberhefensaccharase besonders bestimmt, und zwar bei genau festgelegter optimaler Acidität $p_H = 4,5$. Die Konstanthaltung der Acidität wurde durch die Anwendung von KH_2PO_4 als Puffer ermöglicht.

Die Versuchslösungen wurden in der gewöhnlichen Weise hergestellt aus:

10 ccm der im Verhältnis 1 : 50 verdünnten Enzymlös. 3b,
12,5 „ einer 4%igen KH_2PO_4 -Lösung,
8 g Rohrzucker

ad 100 ccm Wasser.

Die zu unseren Versuchen angewandte Saccharaselösung 3b aus Oberhefe verdanken wir Herrn Dr. O. Svanberg. Wegen der Darstellung derselben verweisen wir auf die Mitteilung von Euler und Svanberg über die Darstellung hochaktiver Saccharasepräparate, Diese Zeitschr. Bd. 107, S. 269 (1919).

¹⁾ Aus der obigen Temperaturformel ergeben sich die folgenden Hilfsformeln:

$$A = \frac{\log \left(\frac{k_2}{k_1} \right) \cdot T_1 \cdot T_2 \cdot 2}{M (T_2 - T_1)} \quad \text{und} \quad \log k_2 = \log k_1 + \frac{AM (T_2 - T_1)}{2 \cdot T_1 \cdot T_2}$$

wo $M = \log e = 0,434 \dots$

Vor dem Zusammenschütten der Enzym- und Zuckerlösungen wurden diese in einem Wasserbad auf die gewünschte Temperatur gebracht. Aus der Mischung wurden von Zeit zu Zeit je 10 ccm in abgemessene Sodalösungen einpipettiert.

Drei Temperaturen kamen zur Untersuchung, und zwar in der Nähe von 0°, 10° und 20°. In der Beilage findet man die Versuchsreihe 1 auf S. 96 zusammengestellt.

Das Ergebnis der ersten Versuchsreihe war folgendes:

Temperatur	1,1°	10,9°	20,7°
$k \cdot 10^4$	20,0	41,2	82,9

Verwenden wir je zwei der gefundenen Konstanten zur Berechnung der Konstanten A und berechnen damit die dritte, so ergibt sich folgendes Resultat:

Temperatur	$k \cdot 10^4$ gefunden	$k \cdot 10^4$ ber.		
		A = 11500	A = 11950	A = 11700
1,1°	20,0	* 20,0	19,9	* 20,0
10,9°	41,2	* 41,2	* 41,2	41,7
20,7°	82,9	81,1	* 82,9	* 82,9

Bei dieser Versuchsreihe sind hinsichtlich der Polarisations-temperatur vermutlich kleine Fehler vorgekommen: Wir haben deswegen eine weitere Versuchsreihe ausgeführt, bei welcher die Polarisations-temperatur der Zucker-Sodalösung genau auf 19° eingestellt war; die maximale Linksdrehung wurde für diese Temperatur berechnet.

Versuchsreihe 22.

Temperatur	$k \cdot 10^4$ gefunden	$k \cdot 10^4$ ber.		
		A = 10200	A = 10850	A = 10500
0,8°	11,8	12,7	* 11,8	12,3
10,4°	23,9	* 23,9	23,1	23,5
18,9°	40,3	* 40,3	* 40,3	* 40,3

Bei der Berechnung der Konstante A aus obigen Daten ist in Betracht zu ziehen, daß die Temperaturbestimmung

bzw. die Temperaturkonstanz bei $18,9^\circ$ am besten war (Schwankungen innerhalb $\pm 0,1^\circ$), während bei $0,8^\circ$ und $10,4^\circ$ kurze Schwankungen bis $0,2^\circ$ und vereinzelt $0,3^\circ$ vorkamen. Wir haben deshalb die Bestimmung für $18,9^\circ$ allen Berechnungen zu Grunde gelegt. Wir erhalten so die beiden Werte $A = 10200$ und $A = 10850$ und als Mittel:

$$A = 10500 \pm 300$$

(Temperatur $0-20^\circ$; $p_H = 4,5$); den so berechneten k -Werten schließen sich sehr nahe die beobachteten an. Die gefundene Konstante fällt mit der früher von Euler und af Ugglas für Unterhefensaccharase ermittelten fast im Bereich der Versuchsfehler zusammen. Wir nehmen bis auf weiteres für Hefensaccharasen die gemeinsame Temperaturkonstante

$$A = 10500 \pm 500$$

an. In einer dritten Versuchsreihe wurde ein höher gelegenes Temperaturintervall, $20-52,2^\circ$, untersucht.

Die Methodik war die gleiche wie früher. Infolge der Wärmeausdehnung der bei 52° abpipettierten Lösung ist die Anfangsdrehung etwas geringer als bei den früheren Versuchen. Die Polarisation geschah wieder bei Zimmertemperatur, für welche auch die Linksdrehung berechnet ist.

Versuchsreihe 23.

Temperatur	$k \cdot 10^4$ gefunden	$k \cdot 10^4$ ber.	
		$A = 9200$	$A = 8430$
$20,0^\circ$	44,8	* 44,8	* 44,8
$45,3^\circ$	155	* 155	136
$52,2^\circ$	188	211	* 188

Als Mittelwert im Intervall $20-52^\circ$ kann somit einseitigen angenommen werden

$$A = 8800 \pm 400.$$

Wir finden hier also einen nicht unbedeutend kleineren Wert für A als im Intervall $0-20^\circ$. Dies entspricht dem Befund von Euler und af Ugglas, nach welchem für Unterhefe gefunden wurde:

Im Intervall 0—20° : $A = 11000$,

„ „ 20—30° : $A = 9340$.

Für nicht enzymatische Katalysen ist bekanntlich in einem großen Temperaturintervall stets ein sehr guter Anschluß an die Arrheniussche Formel gefunden worden und vielfach auch für enzymatische Reaktionen *in vitro*, obwohl hier weniger Untersuchungen vorliegen, welche über ein so großes Temperaturgebiet reichen¹⁾. Wir wollen aus unseren Ergebnissen in dieser Hinsicht noch keine bestimmten Schlüsse ziehen. Bei vitalen Reaktionen innerhalb lebender Zellen sind einige stark abfallende Temperaturkoeffizienten gefunden worden²⁾. Wenn die Arrheniussche Konstante A bei einer enzymatischen Reaktion mit steigender Temperatur etwas kleiner wird, so beruht dies vielleicht darauf, daß der enzymatische Katalysator selbst mit steigender Temperatur unter dem kritischen Gebiet der (irreversibeln) Zerstörung reversibel verändert wird, was natürlich auch den Temperaturkoeffizienten der durch das Enzym beschleunigten Reaktion beeinflußt.

Wenn auch unterhalb des kritischen Gebietes keine dauernde Veränderung der Aktivität des Enzymes eintritt, so kann sich doch z. B. die Affinität des Enzymes zum Substrat reversibel ändern.

Eine solche Änderung des Katalysators geht aber nicht in die Voraussetzung für die Arrheniussche Formel ein.

Einen besseren Anschluß an die Beobachtungen kann man natürlich gewinnen, wenn man in der Arrheniusschen Formel den Wert T_2 mit einem geeigneten Exponenten versieht. Indessen würde durch diese empirische Modifikation nur eine formale Übereinstimmung mit der Erfahrung erreicht.

Ein tatsächlicher Fortschritt läßt sich vielleicht in folgender Weise gewinnen: Bekanntlich hat Michaelis mit L. Menten³⁾, von der Voraussetzung ausgehend, daß die Geschwindigkeit der Inversion proportional der jeweiligen Konzentration der Rohrzucker-Enzym-Verbindung ist, die Dissociationskonstante k

¹⁾ Siehe hierzu Arrhenius, *Immunochemie* (Leipzig 1907).

²⁾ Kanitz, *Temperatur u. Lebensvorgänge* (Berlin, Bornträger).

³⁾ Michaelis und Menten, *Biochem. Zeitschr.* Bd. 49, S. 333 (1913).

dieser Verbindung für die Temperatur von 25° berechnet. Die Änderung dieser Dissociation mit der Temperatur muß natürlich den gesamten Temperaturkoeffizienten der enzymatischen Inversion wesentlich beeinflussen.

Der zweite bestimmende Faktor ist die Änderung des elektrolytischen Dissociationsgrades der Saccharase mit der Temperatur.

Beide Faktoren sind der experimentellen Messung zugänglich, welche hier in Angriff genommen wird.

II. Über den zeitlichen Verlauf der Inaktivierung der Saccharase.

Sei E die anfängliche Konzentration des wirksamen Enzyms, y die im gleichen Volumen zur Zeit t zerstörte Menge Enzym, so erhalten wir durch Integration von

$$\frac{dy}{dt} = k_C (E - y)$$

die Gleichung:

$$k_C = \frac{1}{t} \ln \frac{E}{E - y}$$

wenn man die Annahme zu Grunde legt, daß der Zerfall der Saccharase beim Erhitzen im Wasser eine Reaktion erster Ordnung ist.

Machen wir die weitere Annahme, daß die enzymatische Inversionsgeschwindigkeit der Konzentration der wirksamen Invertase proportional ist, so wird E durch die in der betreffenden Lösung sich ergebenden Inversionskonstanten k gemessen, und obige Formel geht über in

$$k_C = \frac{1}{t} \ln \frac{k_a}{k_t}$$

wenn wir mit k_a die Inversionskonstante der ursprünglichen, nicht erhitzten Saccharaselösung bezeichnen und mit k_t die Inversionskonstante, die sich nach einer Erhitzungsdauer von t Minuten ergibt.

Die Gültigkeit dieser Formel für die Inaktivierung der Saccharase ist bis jetzt noch keiner genaueren Prüfung unterzogen worden, und wir mußten uns deshalb selbst darüber

orientieren, innerhalb welcher Grenzen die Konstante k_C von der Zeit und von der Enzymkonzentration unabhängig ist.

Die Prüfung geschah bei der hierfür sehr geeigneten Temperatur von 59° .

Erhitzungs- dauer Minuten	$k \cdot 10^4$	Rel.	$k_C \cdot 10^3$
---------------------------------	----------------	------	------------------

Versuchsreihe 24.

0	37,6	100	—
30	24,0	64	6,6
60	18,0	48	5,3
120	14,4	38	3,5

Versuchsreihe 25.

0	43,0	100	—
30	27,4	64	6,5
60	22,3	52	4,8
90	19,3	45	3,9
120	17,1	40	3,3

Die Werte von k_C nehmen also hier mit steigender Erhitzungsdauer stark ab, mit anderen Worten, die Inaktivierung geht mit steigender Erhitzungsdauer immer langsamer vor sich.

Diese Versuche waren mit Enzymlösung 3b ausgeführt, und zwar in der gewöhnlichen Verdünnung 1 : 200 bis 1 : 250 (von der Verdünnung 1 : 50 wurden 10 ccm weiter auf 40 bzw. 50 ccm verdünnt).

Eine weitere Versuchsreihe wurde mit konzentrierterer Enzymlösung ausgeführt, und zwar wurde zu jedem Erhitzungsversuch angewandt:

30 ccm Enzymlösung 3b, Verdünnung 1 : 7,5,
10 ccm 4%ige KH_2PO_4 -Lösung,
 40 ccm (im 50 ccm-Meßkolben).

Die gesamte Verdünnung betrug also 1 : 10.

Nach der Erhitzung wurde der Inhalt des Meßkolbens auf 50 ccm verdünnt und davon wurden zu jeder Inversion

5 ccm entnommen; dieselben wurden zu Lösungen von der folgenden Zusammensetzung zugesetzt:

8 g Rohrzucker,
85 g Wasser,
10 ccm 4%ige KH_2PO_4 -Lösung,
95 ccm.

Das Ergebnis war folgendes:

Versuchsreihe 26.

Erhitzungs- dauer Minuten	$k \cdot 10^4$		Rel.	$k_C \cdot 10^3$
0	89	83	100	—
30	38,2	—	43	12,3
60	—	21,7	26	9,7
120	18,7	—	21	5,7

Auch bei diesem Versuch nimmt also k_C ab. Außerdem bemerkt man, daß die absoluten Werte der Konstanten k_C ungefähr doppelt so groß sind als in den vorhergehenden Versuchsreihen. Die Temperaturempfindlichkeit scheint also mit steigender Enzymkonzentration zuzunehmen, was in Übereinstimmung mit früheren Angaben steht¹⁾. Es lag nahe, diese Tatsache mit der Abnahme der Konstanten k_C in den Versuchsreihen 24—25 in Beziehung zu setzen.

Um hierüber weitere Anhaltspunkte zu gewinnen, wurde der folgende Versuch angestellt:

Enzymlösungen wurden in 3 Verdünnungen, nämlich

A	B	C
1 : 10	1 : 50	1 : 200

gleichzeitig 1 Stunde lang auf $59^\circ \pm 0,3^\circ$ erhitzt. Diese Enzymlösungen waren in gleicher Weise hergestellt wie in der vorigen Versuchsreihe:

¹⁾ Effront, Die Diastasen, Deutsche Übers. 1900, S. 62.

30 ccm Enzymlösung 3b, verdünnt $\left\{ \begin{array}{l} 1 : 7,5 \text{ bei A} \\ 1 : 37,5 \text{ „ B} \\ 1 : 150 \text{ „ C,} \end{array} \right.$
10 ccm 4%ige KH_2PO_4 -Lösung,
 40 ccm (in 50-ccm-Meßkolben).

Nach Erhitzen wurden die Lösungen auf 50 ccm verdünnt. Zur Inversion wurde von jeder Lösung so viel verwandt, als 0,2 ccm unverdünnter Enzymlösung entspricht, nämlich

A	B	C
2,5 ccm	12,5 ccm	50 ccm

Der Rohrzucker wurde in der erforderlichen Verdünnung zugesetzt, so daß das gesamte Volumen stets 100 ccm betrug, es kamen also zu 8 g Rohrzucker:

bei A	B	C
85 ccm Wasser	80 ccm Wasser	50 ccm Wasser,
<u>12,5 ccm</u> Phosphatlös.,	<u>7,5 ccm</u> Phosphatlös.,	
97,5 ccm,	87,5 ccm.	

Die folgende Tabelle enthält die Ergebnisse:

Versuchsreihe 27.

Verdünnung des Enzyms während der Erhitzung	Nicht erhitzt $k \cdot 10^4$	Erhitzt auf 59°		
		$k \cdot 10^4$	Rel.	$k_C \cdot 10^3$
1 : 10	40,2	12,6	31	8,4
1 : 50	44,8	22,9	51	4,9
1 : 200	42,6	24,2	58	4,1

Auch hier zeigt sich also deutlich eine Abhängigkeit der Inaktivierungskonstanten k_C von der Enzymkonzentration, und zwar um so stärker, je höher die Enzymkonzentration ist; bei geringer Enzymkonzentration ist der Einfluß auf den Wert von k_C gering.

Die hier gefundene Konzentrationsfunktion erinnert an eine ähnliche Beziehung, welche Chick und Martin¹⁾ in

¹⁾ Chick und Martin, Journ. of Physiol. Bd. 40, S. 404 (1910).

ihrer grundlegenden Arbeit über die Koagulation der Proteine aus Lösungen von Ei-Albuminkristallen festgestellt haben¹⁾, wie ja überhaupt die Hitzekoagulation der Eiweißkörper und die Hitze-Inaktivierung der Enzyme wesentliche Analogien darbieten²⁾.

Chick und Martin nehmen an, daß die abnorm schnelle Abnahme der Koagulationsgeschwindigkeit auf der Änderung der Acidität während der Reaktion beruht. Eine analoge Möglichkeit lag auch bei unseren Versuchen vor, und wir haben bei einer Wiederholung der Versuchsreihen 24 und 25 die Acidität vor und nach einstündigem Erhitzen auf 59° bestimmt, mit folgendem Resultat:

Vor dem Erhitzen: $p_H = 4,45$,
Nach „ „ : $p_H = 4,6$.

Die Aciditätsänderung kann also die Abnahme der Inaktivierungsgeschwindigkeit nicht beeinflußt haben.

Wenn nun auch die in Rede stehende Konzentrationsfunktion sowie die Abweichung der Inaktivierung vom monomolekularen Verlauf noch genauer festgelegt werden kann, als es hier geschehen ist, so ist doch deutlich, daß die genannten Abweichungen von den einfachsten Verhältnissen nicht auf Versuchsfehler zurückgeführt werden können³⁾.

Man kann die Annahme machen, daß sich nicht alle Moleküle der Saccharase, welche sicher eine hochmolekulare Substanz ist (Euler und Kullberg haben an einem sehr reinen Präparat ein Molekulargewicht von ca. 30 000 gefunden)

¹⁾ Die Koagulation von Hämoglobin verläuft nach Chick und Martin hingegen normal.

²⁾ Auch Madsen und Streng, Zeitschr. f. physik. Chem. Bd. 70. S. 263 (1910) fanden, daß der Zerfall des Coliagglutinins aus Kaninchen sowie des Typhusagglutinins aus Ziege nicht monomolekular verläuft, sondern mit bedeutend schneller abnehmender Geschwindigkeit.

³⁾ In diesem Zusammenhang soll besonders betont werden, daß Fehler in der Bestimmung der Erhitzungszeit unsere Resultate nur wenig beeinflußt haben dürften. Bei der Einstellung auf die Erhitzungstemperatur wurde das kritische Temperaturgebiet, das bei etwa 55° beginnt, schnell — in höchstens 60 Sekunden — durchlaufen und noch weit schneller geschah die Abkühlung unter das kritische Gebiet.

im gleichen Zustand der Hydratation befinden, sondern wie z. B. Eialbumin (Sörensen und Höyrup) verschiedene Mengen Wasser binden, so daß sich tatsächlich verschiedene Arten von Saccharasemolekülen in der Lösung befinden, welche miteinander im Gleichgewicht stehen¹⁾.

Diesen verschiedenen Hydratationsformen wird eine verschiedene Stabilität zukommen, und bei Erhitzung müssen die labilsten Moleküle zuerst der Inaktivierung unterliegen. Wenn nun die Einstellung des Hydratationsgleichgewichts langsamer verläuft als die Inaktivierung, so wird die Folge sein, daß der nichtinaktivierte Anteil der Enzymmoleküle immer stabiler wird.

Was die experimentelle Bestimmung der Temperaturempfindlichkeit betrifft, so wird man den Inaktivierungskoeffizienten k_c , wie er eingangs definiert wurde, als Maß beibehalten, muß aber, da der Ausdruck $\frac{1}{t} \ln \frac{k_a}{k_t}$ sich mit k_a ändert, die Bedingungen, unter denen k_c bestimmt werden soll, festlegen, um die Ergebnisse verschiedener Untersuchungen vergleichbar zu machen²⁾.

Wir schlagen folgende Bedingungen vor:

Erhitzungszeit: 50—70 Minuten; Interpolation auf 60 Minuten. Die Enzymkonzentration wird so gewählt, daß bei Zimmertemperatur die Inversionskonstante unter Normalbedingungen (8 g Rohrzucker, $p_{II} = 4,5$) etwa den Wert $40 \cdot 10^{-4}$ bekommt. Durch den hieraus erhaltenen Wert von k_c und die Angabe der Erhitzungstemperatur ist dann die Temperaturempfindlichkeit der Saccharase festgelegt.

Es dürfte oft Vorteile bieten, auch zur Ermittlung bzw. Angabe der „Tötungstemperatur“ eine größere Erhitzungs-

¹⁾ Sörensen und Höyrup, Diese Zeitschr. Bd. 103, S. 267 (1918). Man vergleiche die sehr interessanten Ausführungen S. 289 ff.

²⁾ An einigen Enzymen, wie Urease, Lipase u. a., glaubte Groll (Kolloid-Zeitschr. Bd. 21, S. 138 [1917]) periodische Schwankungen bei der Inaktivierung gefunden zu haben. Die betr. Befunde dürften sich in einfacherer Weise erklären lassen (Euler und Brandting, Biochem. Zeitschr. Bd. 96 [1919]).

dauer zu wählen, als die früher¹⁾ vorgeschlagenen 15 oder 30 Minuten, auch hier dürften 60 Minuten meist die geeignete Zeit sein, so daß also als „Tötungstemperatur“ diejenige zu bezeichnen wäre, bei welcher das Enzym in wäßriger Lösung (ohne Substrat, bei festgelegtem bzw. optimalem p_H) nach 60 (bzw. 30) Minuten langer Erhitzung auf die Hälfte seiner Aktivität sinkt.

III. Abhängigkeit des Inaktivierungskoeffizienten k_C von der Temperatur.

In der folgenden Tabelle sind die Inaktivierungskoeffizienten für Temperaturen von 50° — $64,3^{\circ}$ zusammengestellt.

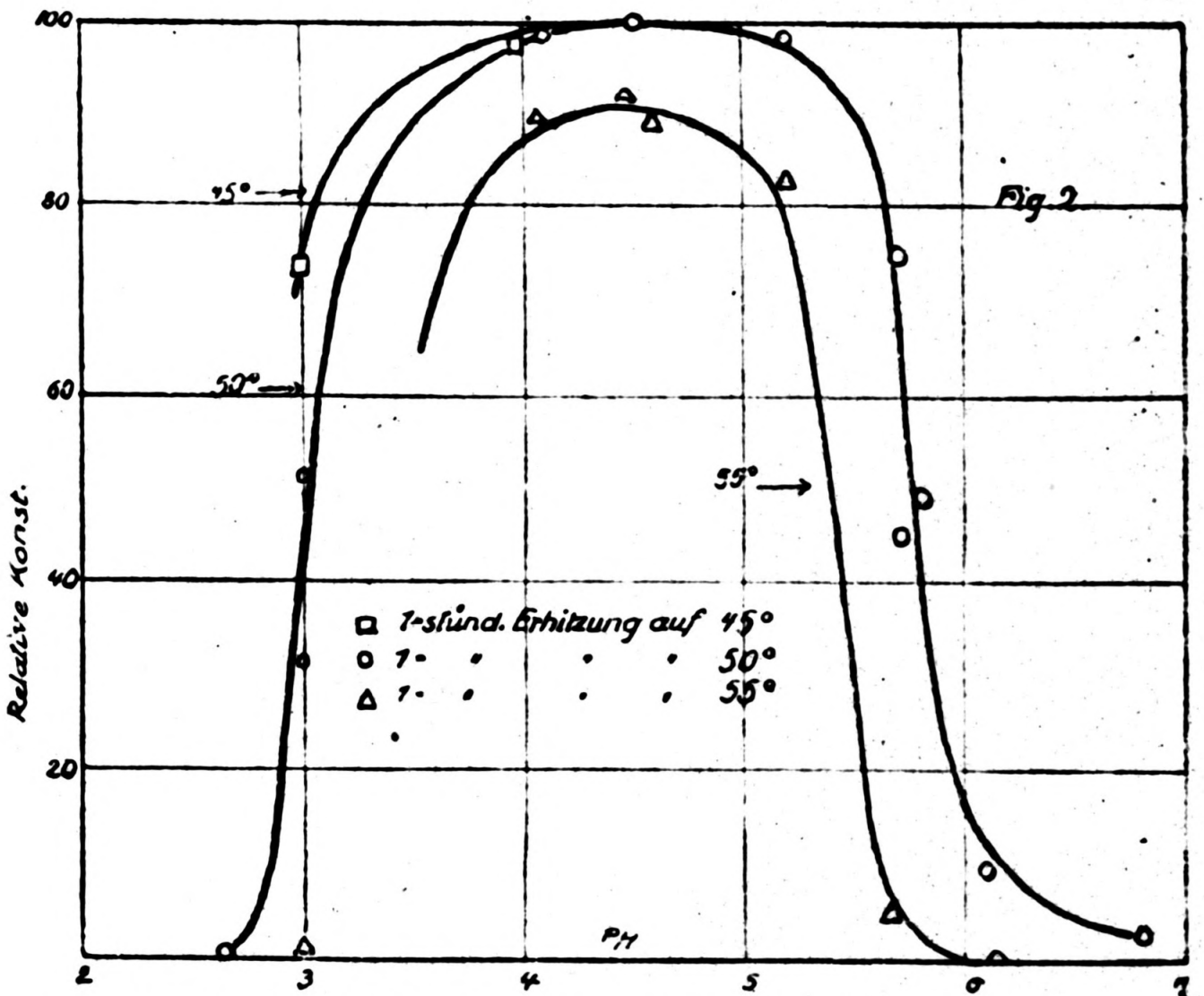
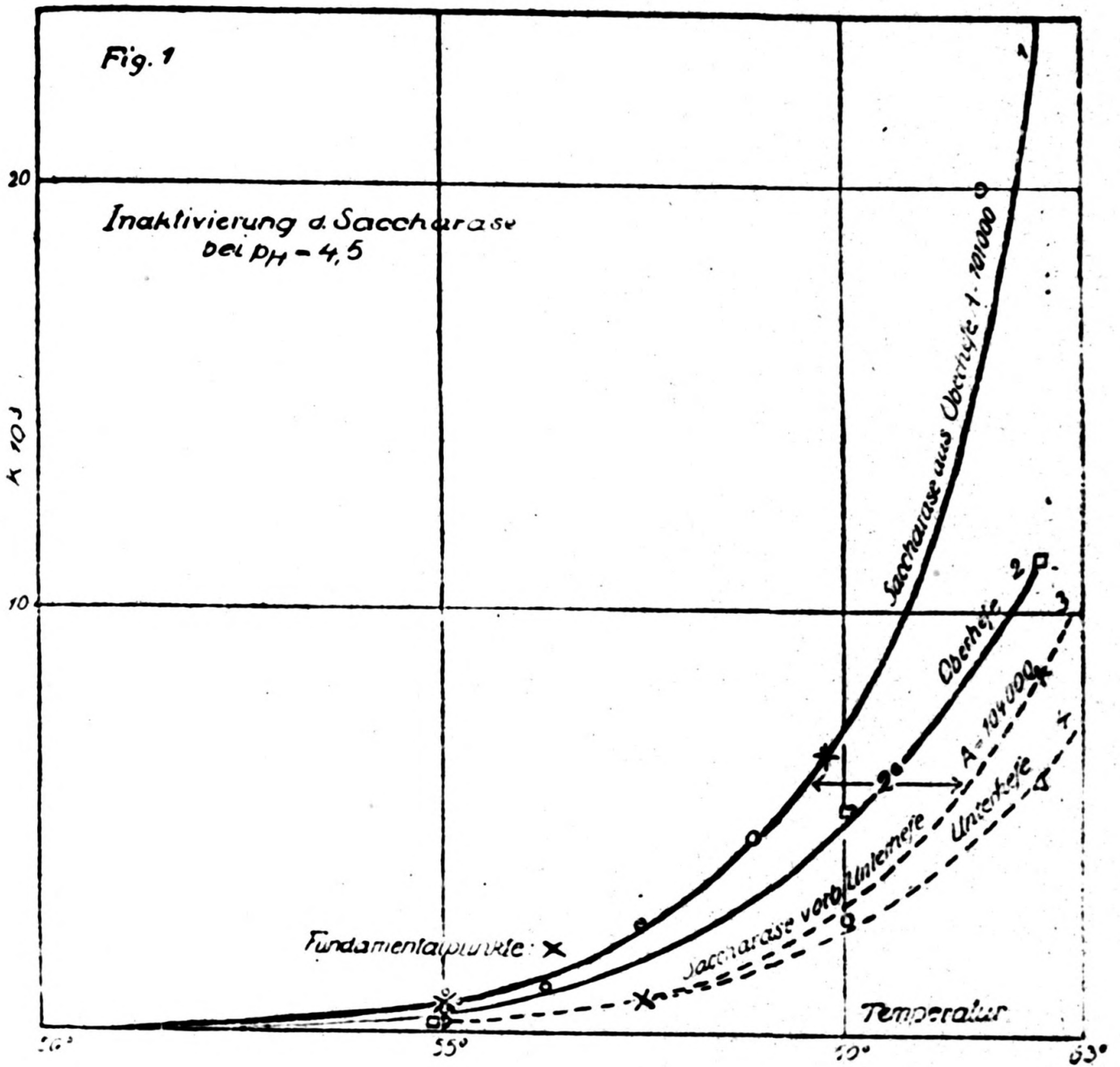
Aus den in der letzten Spalte mit * bezeichneten Koeffizienten sind die Arrheniussche Temperaturkonstante $A = 101000$ und weiter die übrigen in derselben Spalte gegebenen k_C -Werte berechnet.

Saccharase aus Oberhefe. Optimale Acidität ($p_H = 4,5$); Enzymlös. 3 b.

Vers.- Nr.	Temperat. °	Dauer d. Erhitzung Minuten	$k_C \cdot 10^3$	
			gefunden	berechnet
5	50,0	60	0	0,06
12	55,0	60	0,68	* 0,68
6	55,1	60	0,6	0,7
18	56,1	60	1,1	1,1
24	57,5	60	2,3	2,2
103	59,0	60	5,3	4,4
107	59,2	60	4,8	4,8
19	59,9	60	6,62	* 6,62
25	61,8	30	20	16
26	64,3	30	43	47

Die k_C -Werte sind in der nachstehenden Fig. 1, in Kurve 1 zusammengestellt. Letztere stellt also die berechnete Temperaturfunktion dar.

¹⁾ Euler, Allg. Chemie der Enzyme, Wiesbaden 1910, S. 176; Euler und Kullberg, Diese Zeitschr. Bd. 71, S. 136 (1911).



Relative Aktivität nach 1 stündiger Erhitzung auf: 45°, 50° u. 55°.

IV. Abhängigkeit der Temperaturempfindlichkeit der Saccharase von der Acidität.

In jeder Versuchsreihe haben wir das Verhältnis zwischen den Inversionskonstanten der 1 Stunde lang erhitzten und der nicht erhitzten Enzymlösungen von der gleichen Acidität berechnet und mit 100 multipliziert. Die so erhaltenen Zahlen, welche den Versuchsreihen 2—13 entnommen wurden, sind als Ordinatenwerte in der umstehenden Fig. 2 eingetragen.

Man sieht aus der Figur, daß ein sehr ausgeprägtes Maximum der Toleranz bzw. ein Minimum der Empfindlichkeit zwischen $p_H = 4$ und 5 liegt.

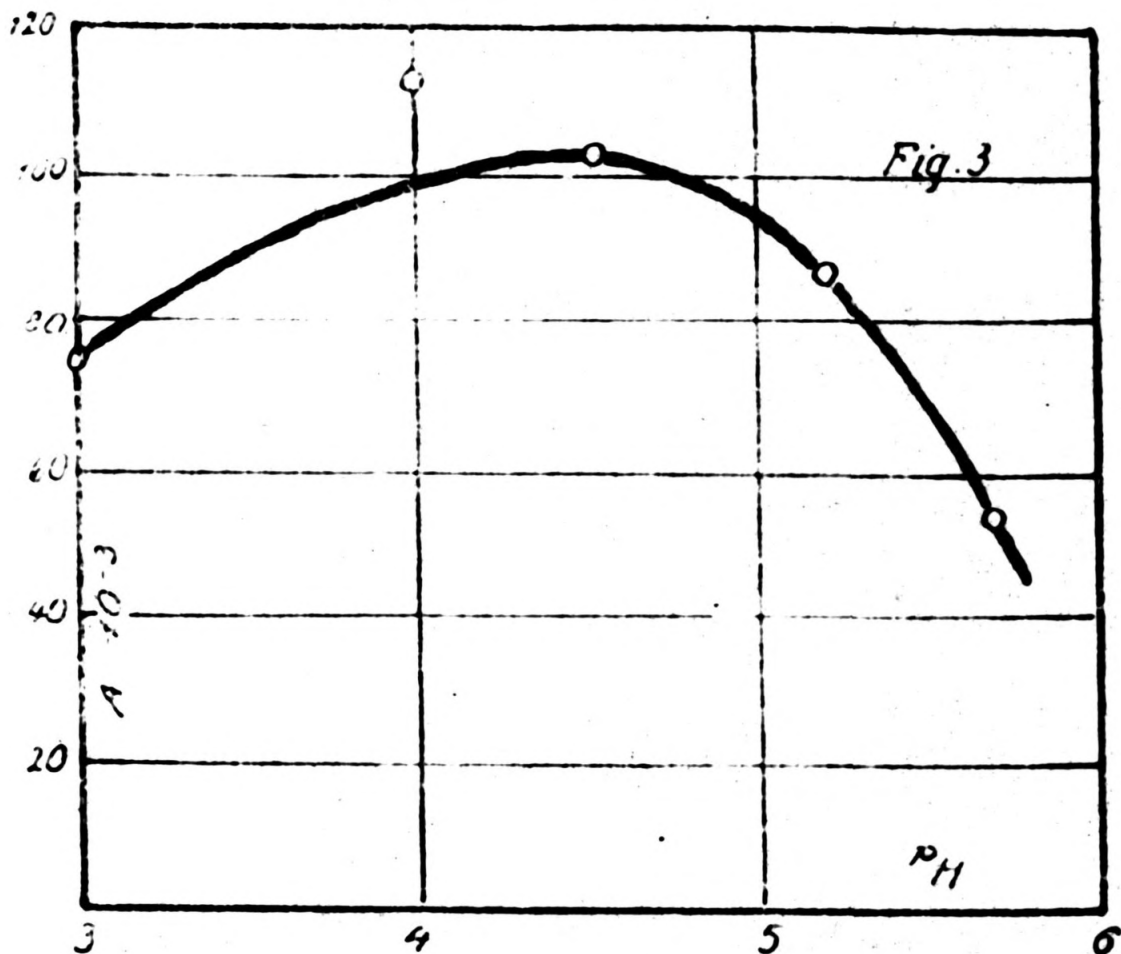
Einstündige Erhitzung.

Vers.-Nr.	Temperat. °	pH	Rel. = $\frac{k_t}{k_a} \cdot 100$
28	45	3,0	74
31	45	4,0	97
15	50	2,6	1
21	50	3,0	50
29	50	3,0	26
32	50	4,0	98
34	50	4,1	99
5	50	4,4	101
36	50	5,2	99
8	50	5,7	46
40	50	5,7	76
42	50	5,8	50
44	50	6,1	11
48	50	6,8	4
35	55	4,1	90
6	55	4,4	92,5
12	55	4,5	91
37	55	5,2	83
9	55	5,7	6
45	55	6,1	0

Es wurde ferner die Arrheniussche Konstante A der Inaktivierung, also die Temperaturkonstante des Koeffizienten k_C für verschiedene p_H berechnet.

Vers.- Nr.	pH	Temperat. °	Dauer d. Erhitzung Minuten	kC · 10 ⁴		A
				gefunden	berechnet	
36	5,2	50,0	60	0,05	0,17	87 000
37		54,9	60	1,3	* 1,3	
55		57,1	60	3,3	* 3,3	
32	4,0	50,8	60	0,2	0,07	111 000
52		54,9	60	0,92	* 0,92	
53		60,0	45	12,8	* 12,8	
28	3,0	45,4	60	2,2	* 2,2	75 000
29		50,2	60	9,8	* 9,8	
39	5,7	42,8	60	0,32	* 0,32	53 000
40		50,0	60	2,0	* 2,0	

In der Fig. 3 ist A als Funktion von p_H dargestellt.



Wir entnehmen aus dieser Kurve, daß A, also der Temperaturkoeffizient der Inaktivierungskonstanten, am größten ist in dem Gebiet, in welchem die Temperaturempfindlichkeit selbst ihr Minimum hat, in welchem also das Enzym die größte Temperaturstabilität besitzt. Dieses Gebiet fällt ganz in die Nähe der optimalen Wirkung der Saccharase, woraus folgt,

daß das freie Saccharasemolekül den größten Temperaturkoeffizienten der Inaktivierung besitzt, während die Inaktivierungsreaktion durch überschüssige H- und OH-Ionen mit steigender Temperatur langsamer zunimmt.

V. Beeinflussung des Inaktivierungskoeffizienten k_c durch den Luftsauerstoff.

Nach Duclaux und Fernbach wird Saccharase durch den Sauerstoff der Luft unter Oxydation mehr oder weniger rasch zerstört, relativ schnell in alkalischer Lösung, viel langsamer in Gegenwart einer Säure. Für unsere Arbeit war es zunächst wesentlich, festzustellen, ob bei Ausführung der Inaktivierungsversuche ($p_H = 4,5$) mit unserer experimentellen Anordnung — die Lösungen befanden sich beim Erhitzen in langhalsigen Meßkolben — der Sauerstoff der Luft einen Einfluß auf die Resultate ausüben kann.

Wir haben deshalb Parallelversuche in der Weise angestellt, daß die bei höheren Temperaturen auf Inaktivierung zu untersuchenden Lösungen in zuschmelzbare Glasröhren gebracht wurden, welche nach Einfüllen der Lösungen teils mit Luft und teils mit reinem Wasserstoff gefüllt und dann zugeschmolzen wurden. Die Erwärmung geschah also teils in einer Luft-, teils in einer Wasserstoffatmosphäre. Jede Röhre enthielt 10 ccm Enzymlösung (aus Oberhefe) + 5 ccm 4%ige KH_2PO_4 -Lösung.

Nach der Erhitzung wurden die Röhren sofort abgekühlt und die Inversion geschah nach Zugabe des Röhreninhaltes zu einer Rohrzuckerlösung von folgender Zusammensetzung:

4,8 g Rohrzucker

40 ccm dest. Wasser

5 ccm 4%ige KH_2PO_4 -Lösung.

Das Versuchsergebnis wird aus der folgenden Tabelle (Versuchsreihe 20) ersichtlich.

Eine zerstörende Einwirkung des Luftsauerstoffs hat sich also sicher nicht geltend gemacht. Die etwas stärkere Inaktivierung unter Wasserstoff ist vielleicht veranlaßt durch die Umrührung beim Einleiten des Gases (Schüttel-Inaktivierung).

Versuchsreihe 20:

Vers.- Nr.	Erhitzung	in Luft		i. Wasserstoff	
		k · 10 ⁴	Rel.	k · 10 ⁴	Rel.
86	Nicht erhitzt	61,0	100	61,0	100
88, 87	75 Minuten auf 57,4°	51,0	84	48,0	79
90, 89	60 " " 59,9°	35,2	58	31,8	52

Dieses Ergebnis bestätigt also vollkommen die Angabe von Jodlbauer¹⁾, daß die Hitze-Inaktivierung der Saccharase unbeeinflusst davon verläuft, ob Sauerstoff anwesend ist oder nicht.

VI. Vergleich des Inaktivierungskoeffizienten k_C einer Oberhefe und einer Unterhefe.

Die früheren Versuche aus dem hiesigen Laboratorium über die Temperaturempfindlichkeit der Saccharase waren mit Enzym aus Unterhefe angestellt worden. Nachdem nun an Oberhefe Resultate mit genauer definierter Acidität gewonnen waren, wollten wir mit der gleichen Methodik auch die Saccharase einer Unterhefe aufs neue untersuchen, um damit die schon früher behandelte Frage wieder aufzunehmen, ob die Saccharase aus beiden Hefetypen Verschiedenheiten in der Temperaturempfindlichkeit aufweist²⁾.

Euler und Kullberg hatten früher Bezug genommen auf Angaben der Literatur³⁾, nach welchen die Optimaltemperatur der Saccharase der Oberhefe um 25° höher liegt als die entsprechende Temperatur der Unterhefe. Im Gegensatz hierzu war in der erwähnten Arbeit angegeben worden, daß ein vorläufiger Versuch einen außerordentlich viel geringeren Unterschied ergeben hatte, nämlich von etwa 1 Grad, wobei allerdings die verhältnismäßig sehr großen Versuchsfehler betont wurden, welche sich bei der Arbeit mit der angewandten sehr Saccharase-armen Hefe ergaben.

¹⁾ Jodlbauer, Biochem. Zeitschr. Bd. 3, S. 483 (1907).

²⁾ Die Ermittlung der „Zerfallskonstanten“ der Enzyme zu ihrer Charakterisierung hat schon Tammann vorgeschlagen (Zeitschr. f. physik. Chem. Bd. 18, S. 442 [1895]).

³⁾ Kjeldahl, Med. fr. Carlsberg Labor. (1879).

Als Unterhefe wurde unsere oft untersuchte Brauerei-Unterhefe H angewandt, und zwar nach der genau gleichen Methodik untersucht wie die Oberhefe.

Relative Inversionskonstanten bei $p_H = 4,5$.

Vers.- Nr.	Temperatur °	Dauer der Erhitzung	Saccharase aus Oberhefe	Saccharase aus Unterhefe
5, 57	50	60	101	99
12, 71	55	60	91	97
24, 63	57,5	60	74	89
19, 64	60	60	40	70
25, 72	61,8; 62,5	30; 60	24	31

Aus der Tabelle geht hervor, daß die Saccharase aus der vorbehandelten Unterhefe weniger temperaturempfindlich ist als das entsprechende Enzym aus Oberhefe. Dieser Befund ist jedenfalls unerwartet, da ja die Unterhefe, welche der Brauerei entstammt, dortselbst lange an die Gärungstemperatur von etwa 10° gewöhnt war, während die Oberhefe bei einer mittleren Temperatur von etwa 20° gezüchtet war.

Nun war allerdings dies hier untersuchte Unterhefenzym aus der Brauereihefe gewonnen worden, nachdem diese zwecks Anreicherung an Saccharase bei etwa 25° im Laboratorium vorbehandelt worden war und dabei während 15 Tagen Gärungen durchgemacht hatte. Es war nicht ausgeschlossen, daß sich die Hefe und damit ihre Saccharase während dieser Vorbehandlung bei höherer Temperatur verändert hatte.

Aus diesem Grund wurden einige weitere Versuchsreihen (18—19) mit unvorbehandelter Unterhefe H, wie sie aus der Brauerei kam, angestellt¹⁾. Der Vergleich bezieht sich in

¹⁾ Eine bei dieser Versuchsreihe ausgeführte Zellenzählung ergab die Zellenzahl $1,0 \cdot 10^{10}$, somit die Inversionsfähigkeit $\text{Inv.} = \frac{k \cdot g \text{ Zucker}}{\text{Zellenzahl}}$
 $= \frac{149 \cdot 10^{-4} \cdot 8}{1,0 \cdot 10^{10}} = 12 \cdot 10^{-12}$, bei $p_H = 4,5$ ccm und 16° . (Vergl. hierzu Euler und Svanberg, Diese Zeitschr. Bd. 106, S. 201 (1919).

dieser Versuchsreihe, wie besonders betont werden soll, nicht, wie oben, auf die isolierten Enzyme, sondern auf die von den Zellen selbst ausgeübten Enzymwirkungen.

Die Hefe wurde auf 55° , 60° und $62,5^{\circ}$ erhitzt. Wir stellen die Resultate mit den (vorher und gleichzeitig) an unvorbehandelter Oberhefe gewonnenen zusammen, und geben für jede Erhitzung sowohl die relativen Werte der Inversionskonstanten an (nicht erhitzte Hefe = 100) als die Inaktivierungskonstanten k_C .

Vers.- Nr.	Erhitzung: Heferasse	60 Minuten auf 55° bzw. $55,3^{\circ}$		60 Minuten auf 60° , bzw. $60,1^{\circ}$		30 Minuten auf $62,5^{\circ}$	
		Rel. k	$k_C \cdot 10^3$	Rel. k	$k_C \cdot 10^3$	Rel. k	$k_C \cdot 10^3$
82, 85, 83	Unterhefe H	95	0,35	61	3,6	65	6,2
77, 78, 80	Oberhefe SBII	94	0,45	49	5,2	46	11,2

Das Ergebnis dieses Versuches stimmt also recht angenähert mit demjenigen des vorhergehenden überein, und es ergibt sich also auch für die unvorbehandelte Unterhefe H eine merkbar höhere Temperaturtoleranz als für die Oberhefe SB. Man findet die beiden zu vergleichenden Kurven 2 und 4 in der Fig. 1.

Dies ist, wie oben erwähnt, nicht in Übereinstimmung mit den Angaben der Literatur, insbesondere scheint unser Resultat unvereinbar mit den Angaben Kjeldahls¹⁾ über die sehr starken Unterschiede zwischen den Optimaltemperaturen der Oberhefe und der Unterhefe.

Wir betrachten zunächst noch den Temperatureinfluß auf die Inaktivierung der aus vorbehandelter Unterhefe isolierten Saccharase. Aus folgender Tabelle ersehen wir, daß sich die Beobachtungen gut an die Arrheniussche Formel anschließen. Die Messungen sind bei der Acidität $p_H = 4,5$ ausgeführt.

¹⁾ Kjeldahl, Medd. fr. Carlsberg Labor. (1879).

Vers.- Nr.	Temperatur °	Dauer der Erhitzung Minuten	k _c · 10 ³		
			gefunden	berechnet	
57	50,1	60	0,1	0,02	} A = 104 000
71	55,0	60	0,2	0,2	
63	57,5	60	0,82	*0,82	
64	60,0	60	2,6	2,6	
72	62,5	60	8,5	*8,5	

Der Temperaturkoeffizient der Inaktivierung ist also für die Saccharase aus Unterhefe genau der gleiche wie für die Saccharase aus Oberhefe. In der Fig. 1 ist diese Exponentialfunktion durch eine gestrichelte Kurve angegeben. Es geht aus dieser Figur hervor, daß der Unterschied in der Inaktivierungskonstante k_c beider Saccharasen einer Temperaturdifferenz von etwa 2° entspricht.

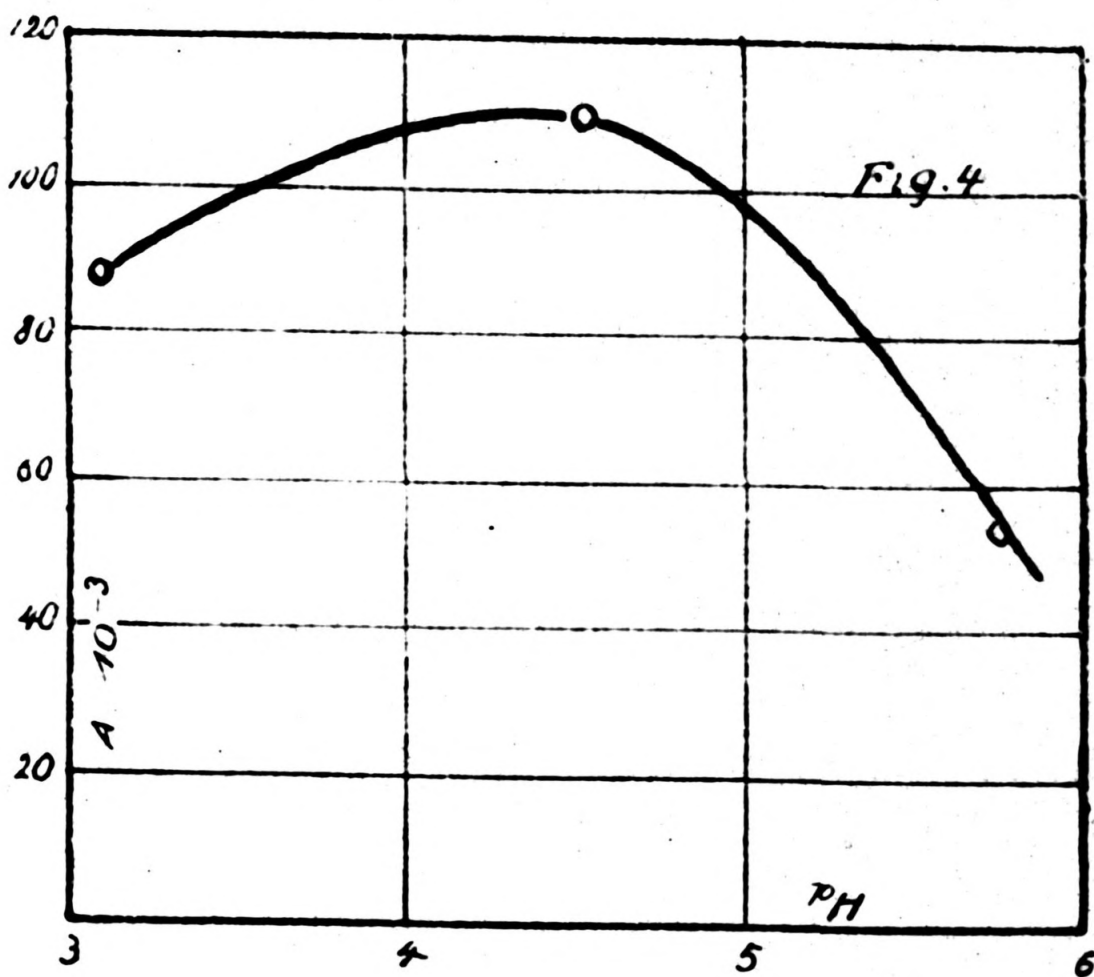
Unerwartet ist der Befund, daß die größere Empfindlichkeit gegen höhere Temperaturen sich gerade bei derjenigen Hefe zeigt, welche unter normalen Bedingungen bei höherer Temperatur kultiviert wird. Zunächst ist also nochmals zu betonen, wie dies bereits auf Grund des vorläufigen Versuchs von Euler und Kullberg 1910 geschehen ist, daß von einer Anpassung der Saccharase der Oberhefe an die höhere Temperatur der Kulturen nicht die Rede sein kann.

Was dann die Frage betrifft, ob — gleichgültig aus welcher Ursache — überhaupt verschiedene Saccharasen existieren, so wollen wir uns auf Grund des vorliegenden Materials noch nicht endgültig äußern. Einerseits haben wir, wie aus der Versuchsreihe 21 hervorgeht, keine speziellen Schutzstoffe finden können, welche die größere Temperaturtoleranz der Unterhefe veranlassen könnte. Andererseits liegen bisher nur die Messungen an einer Oberhefe und einer Unterhefe vor, so daß erst festgestellt werden muß, ob und in welchen Grenzen für die Oberhefen und für die Unterhefen die Temperaturempfindlichkeit eine konstante und von äußeren Einflüssen unabhängige Größe ist.

Es wurde nun auch für aus Unterhefe isoliertes Enzym die Temperaturkonstante A noch bei verschiedenen Aciditäten untersucht.

Vers.-Nr.	Temperatur °	Dauer der Erhitzung Minuten	kC · 10 ³		
			gefunden	berechnet	
pH = 5,4					
60	50,1	60	0,58	0,52	} A = 56 000
61	54,9	60	1,82	*1,82	
65	57,5	60	3,55	*3,55	
66	60,0	45	9,2	6,7	
pH = 3,1					
68	50,0	60	1,45	* 1,45	} A = 90 000
69	55,0	60	12,3	*12,3	

In Fig. 4 ist A als Funktion von p_H dargestellt:



Wie ersichtlich, stimmt diese Kurve recht gut mit derjenigen der Fig. 3 überein, welche sich auf Oberhefe bezieht.

Aus dem nun noch für das Unterhefenzym gefundenen Maximum für A zwischen p_H = 4 und 5 erklärt sich bis zu einem gewissen Grad der in den Untersuchungen von Euler und af Ugglas sowie von Euler und Kullberg gefundene

kleinere Wert $A = 70000$, da in den genannten Untersuchungen meist bei Aciditäten gearbeitet wurde, welche zu beiden Seiten des Maximums, überwiegend auf der alkalischen Seite lagen.

Versuch mit *Saccharomyces Thermanittonum*.

In weiterer Verfolgung der Frage, ob tatsächlich

1. in verschiedenen Hefen Saccharasen mit verschiedener Temperaturempfindlichkeit vorkommen,
2. ob sich Anhaltspunkte dafür finden lassen, daß diese Verschiedenheiten das Ergebnis von Anpassungen an verschiedene Temperaturen sind, unter welchen die Hefen kultiviert wurden,

haben wir unsere Untersuchung auf *Saccharomyces Thermanittonum* (Johnson) ausgedehnt, welche, auf südlichen Pflanzen aufgefunden, an höhere Temperaturen angepaßt zu sein scheint, als die gewöhnlichen Kulturhefen. So macht A. Joergensen über die Temperaturverhältnisse dieser Hefe folgende Angaben¹⁾: „Die Hefe entwickelte sich in einer Flasche, welche zufällig bei einer Temperatur von 84° C. infiziert worden war. Die Zellen waren aber bei dieser hohen Temperatur nicht getötet worden. . . . Für Gärungen im großen benutzt Johnson eine Temperatur von 50° C. als Anstelltemperatur. . . . Die Optimaltemperatur für Vermehrung und Gärung liegt zwischen 40 und 44° C.“

Den von uns untersuchten Stamm verdanken wir Herrn Direktor Alfr. Joergensen, welcher so freundlich war, uns 2 Kulturen aus seiner Sammlung zu überlassen. Die Hefe war im gärungschemischen Laboratorium von A. Joergensen 14 Jahre in gehopfter Würze von ca. 11° Ball. bei Zimmertemperatur aufbewahrt worden.

Von uns wurde die Hefe in Hefenwasser übergeimpft, welches ca. 1% Trockensubstanz und außerdem 2% zugesetzten Rohrzucker enthielt. In dieser Nährlösung wurde sie bei 25—30° gezüchtet; bei dieser Temperatur wächst die

¹⁾ Alfr. Joergensen, Die Mikroorganismen der Gärungsindustrie. 5. Aufl. Berlin (1909).

Hefe sehr rasch aus; schon im Laufe von 2 Tagen ist das Wachstum der Hauptsache nach beendet.

Die Hefe wurde abzentrifugiert und dann in Wasser aufgeschlemmt. Von dieser Suspension wurden 10 ccm zu jedem Versuch benutzt.

Wir werden auf diese Messungen an anderer Stelle zurückkommen und führen hier nur die Endergebnisse an:

Versuchsreihe	Temperatur °	Dauer der Erhitzung Minuten	Rel. Inversionskonstanten	$k_C \cdot 10^3$
A	17	—	100	0
	59,7	60	82	1,5
	64,1	60	15	14
	64,5	30	26	19
B	17	60	100	0
	57,5	60	90	0,8
	62,5	60	(63)	(3,4)
	65,0	30	39	13

Nach diesen Versuchen erträgt die Saccharase aus *Saccharomyces Thermantitonus* ohne nennenswerte Inaktivierung einen wesentlich höheren Temperaturgrad als die Saccharase unserer Kulturhefen. Der Unterschied in der Inaktivierungskonstanten k_C der Saccharase aus unserer Brennerei-Oberhefe und aus *Saccharomyces Thermantitonus* entspricht einer Temperaturdifferenz von etwa 3°.

Ob der von uns untersuchte *Thermantitonus*stamm durch das lange Verweilen bei einer tieferen Temperatur als der für ihn natürlichen eine Veränderung hinsichtlich seiner Temperaturkonstanten erlitten hat, können wir nicht angeben; es soll jedoch versucht werden, den Stamm wieder an höhere Temperaturen „anzupassen“.

VII. Vergleich des Koeffizienten k_C bei Anwendung isolierter Saccharase und frischer Hefe.

Bezüglich einer Schutzwirkung, welche die Hefenzelle auf die in ihr enthaltene Saccharase ausübt, liegt eine Angabe

von A. Fernbach¹⁾ vor, welche, wenn sie sich als allgemein zutreffend erwiese, ein erhebliches Interesse beanspruchen könnte. Nach dieser Angabe ist die in der Hefenzelle eingeschlossene Saccharase bedeutend toleranter gegen höhere Temperaturen als das gleiche Enzym in wäßriger Lösung, und zwar in dem Grad, „daß, wenn eine wäßrige Hefenemulsion $\frac{1}{4}$ Stunde im Kochen gehalten wird, nur ein Teil der in ihr enthaltenen Saccharase zerstört wird“. „Si, lorsque l'ébullition cesse, la levure reste encore pendant quelque temps en contact avec le liquide, la sucrase intérieure se diffuse à l'extérieur, et reste inaltérée dès que la température est descendue assez bas, c'est-à-dire au voisinage de 70 ou 75°. A partir de ce moment, le liquide aura des propriétés inversives d'autant plus énergiques que le contact avec la levure sera prolongé davantage.“

Fernbach gibt dann z. B. folgenden Versuch an: Zwei gleiche Teile Hefe werden mit der 10fachen Menge Wasser $\frac{1}{4}$ Stunde lang gekocht. Der eine Teil (A) wird schnell abgekühlt, der andere wird der freiwilligen Abkühlung überlassen. Nach Verlauf von $1\frac{1}{2}$ Stunden werden die beiden Infusionen filtriert und man läßt 5 ccm von jeder auf 5 ccm einer 50%igen Rohrzuckerlösung während 3 Stunden bei 56° einwirken. Folgende Mengen invertierten Rohrzuckers wurden gefunden:

A 0,156 g,

B 0,072 g.

Diese Angelegenheit erschien uns, schon in methodischer Hinsicht, wichtig genug, um weiter geprüft zu werden.

Versuch.

Von einer homogenen Aufschlämmung von 20 g frischer Oberhefe S B II in 200 ccm Wasser werden zu 3 Versuchen je 50 ccm angewandt.

- A Emulsion aufgekocht; kocht 15 Min.; rasche Abkühlung,
 B „ „ ; „ 15 „ ; langsame „
 C „ „ und unmittelbar abgekühlt.

¹⁾ Fernbach, Ann. Inst. Pasteur Bd. 4, S. 641 (1890).

Nach 1½ Stunden wird filtriert, die Filtration dauert ca. 2 Stunden. Das Filtrat wird mit 12,5 ccm 4%iger KH_2PO_4 -Lösung und Wasser auf 50 ccm verdünnt.

Inversion mit 50 ccm Rohrzuckerlösung (8 g Rohrzucker) bei 50—52°.

Es wurden folgende Drehungen gefunden:

Stunden	A	B	C
¼	1,34	1,34	1,34
3	1,32	1,33	1,30
16	1,24	1,24	1,20

Somit hatten sich Spuren einer Inversion bemerkbar gemacht. Zur Kontrolle wurde nun in den entsprechenden Lösungen der nach 17stündiger Inversion gebildete Invertzucker nach Bertrand bestimmt, und zwar in Proben von je 2 ccm.

Nach Abzug der in einem Blindversuch erhaltenen Reduktion wurde gefunden:

	A: $p_{\text{H}} = 4,7$	B: $p_{\text{H}} = 4,4$	C: $p_{\text{H}} = 4,4$
g Invertzucker	0,30	0,355	0,16.

Auf Grund dieses Ergebnisses, welches also tatsächlich eine Inversion anzeigte, wurde nun ein Inversionsversuch mit Lösungen ausgeführt, welche entsprechende Phosphatmengen und entsprechende Acidität ($p_{\text{H}} = 4,7$), aber kein Hefenwasser enthielten. Hierbei wurden innerhalb der Versuchsfehlergrenzen die gleichen Mengen Invertzucker erhalten.

Da Fernbach meist bei optimaler Acidität invertiert hat, so wird die von ihm gefundene Inversion zum Teil eine Wirkung der Säure sein. Allerdings läßt sich mit dieser Annahme das Ergebnis seines zweiten, l. c. S. 645 beschriebenen Versuchs nicht erklären, welcher andererseits vielleicht doch auf Infektion zurückzuführen ist.

Jedenfalls haben wir keine Anhaltspunkte dafür gefunden, daß die Saccharase des Hefenwassers zum Teil kochbeständig ist.

Gegen Gifte und alle bis jetzt untersuchten Einflüsse verhält sich die Saccharase in den Hefezellen ebenso wie das isolierte Enzym. Immerhin bestand die Möglichkeit, daß Bestandteile der Zelle eine Schutzwirkung gegen die Inaktivierung ausüben. Deswegen haben wir die Inaktivierung bei $p_H = 4,5$ einerseits der freien Saccharase aus Autolysesaft und andererseits der Saccharase frischer Zellen der gleichen Oberhefe miteinander verglichen.

Die Enzymlösung wurde in der S. 75 beschriebenen Weise untersucht, und zwar wurden hierzu 10 ccm derselben angewandt. Zur Untersuchung der frischen Hefezellen kam statt dieser 10 ccm eine Emulsion, enthaltend 1 g Hefe S B II zur Anwendung. Im übrigen stimmten alle Versuchsbedingungen miteinander überein. Die Kolben mit Enzymlösung und diejenigen mit Hefezellen wurden, um Ungleichheiten der Erhitzung auszuschließen, im gleichen Thermostaten gleichzeitig erwärmt. $p_H = 4,5$.

Die Versuche findet man in der Beilage, Versuchsreihe 17. Die Endergebnisse sind in folgender Tabelle zusammengestellt (vergl. auch S. 83).

Oberhefe S B II.

Vers.-Nr.	Erhitz.- Temperat. °	Dauer der Erhitzung Minuten	Isoliertes Enzym		Hefe	
			$k \cdot 10^4$	Rel.	$k \cdot 10^4$	Rel.
73, 76	—	—	33,5	100	25,0	100
74, 77	55,3	60	28,8	(86) 90	23,5	94
75, 78	60,1	60	12,3	37	12,2	49

Man ersieht aus der obigen Tabelle, daß die Hefezelle eine gewisse Schutzwirkung auf die Saccharase ausübt. Dieselbe entspricht etwa einem Temperaturunterschied von 1° (vergl. hierzu Fig. 1).

Um ein Maß der Temperaturkonstanten A für die Inaktivierung des nicht isolierten Enzyms zu erhalten, führen wir den Vergleich zwischen Oberhefe und Unterhefe (S. 83) wieder an.

Erhitzungs- temperatur °	Dauer der Erhitzung Minuten	Oberhefe SB II		
		Vers.-Nr.	kc · 10 ³ gef.	kc · 10 ³ ber.
				A = 80000
55,3	60	77	0,45	0,8
60,1	60	78	5,2	4,75
62,5	30	80	11,2	* 11,2

Erhitzungs- temperatur °	Dauer der Erhitzung Minuten	Unterhefe H		
		Vers.-Nr.	kc · 10 ³ gef.	kc · 10 ³ ber.
				A = 75000
55,0	60	82	0,35	0,5
60,0	60	85	3,6	2,7
62,5	30	83	6,2	* 6,2

Hierbei wäre allerdings der Umstand zu berücksichtigen, daß die Saccharase innerhalb lebender Zellen möglicherweise unter der Einwirkung einer anderen Acidität steht, als derjenigen, welche in der Lösung außerhalb der Zellen herrscht.

Als wahrscheinlichste Werte können wir angeben:

Saccharasewirkung in Oberhefenzellen: $A = 80000 \pm 8000$,
 „ „ „ Unterhefenzellen: $A = 75000 \pm 8000$.

Die Resultate deuten also darauf hin, daß die Temperaturkonstante für die in der Zelle befindliche Saccharase etwas niedriger liegt als für das isolierte Enzym (75 000 gegen 100 000).

Ein ähnliches Ergebnis wurde auch für *Saccharomyces Thermantitonus* erhalten; für die Saccharasewirkung der Zellen ergab sich ein A-Wert zwischen 64 000 und 96 000, also im Mittel 80 000, während der entsprechende Wert für freie Saccharase bedeutend höher liegt.

Die Schutzstoffe der Zelle beeinflussen also nicht nur die absoluten Werte von k_c , sondern auch die Temperaturkonstante A der Inaktivierung.

VIII. Schutzwirkungen.

Von wesentlichster Bedeutung für die Frage, ob wirklich Unterschiede im Verhalten der Saccharase aus Oberhefe und Unterhefe vorliegen, ist natürlich die exakte Feststellung, ob und in welchem Grade sich hier Schutzwirkungen geltend machen können.

Zur Beleuchtung dieser Frage mögen die folgenden Angaben über die Zusammensetzung der Autolysesäfte dienen, welche wir Herrn Dr. O. Svanberg verdanken.

Saft aus Oberhefe: 15,4% Trockensubstanz.

Davon: 1,85% N und 63% Kohlehydrate.

Saft aus Unterhefe: 7,0% Trockensubstanz.

Davon: 2,8% N und 60% Kohlehydrate.

Der von uns angewandte „Untersaft“ ist in Bezug auf das Volum 2mal, also in Bezug auf die Trockensubstanz 4mal so aktiv wie unser „Obersaft“. Die gleiche Enzymmenge, welche im „Obersaft“ von 1,85% N und 63% Kohlehydrat begleitet wird, ist also im „Untersaft“ zugleich mit 0,7% N und 12% Kohlehydrat enthalten. Dieser Umstand macht es schon unwahrscheinlich, daß bei Unterhefe eine größere Schutzwirkung eintreten soll als bei Oberhefe.

Immerhin mußte noch eine experimentelle Entscheidung herbeigeführt werden.

Zwei Lösungen mit Untersaft wurden zwecks Inaktivierung 24 Stunden auf 60° erhitzt, bei welcher Temperatur die im Saft vorhandenen Eiweißstoffe und anderen Kolloide noch nicht koagulierten. Hierauf wurde zu der einen Lösung 10 ccm Obersaft zugesetzt, zu der anderen 10 ccm Wasser, worauf die Erhitzung 1 Stunde fortgesetzt wurde. Ein dritter Kolben wurde gleichzeitig mit Obersaft und Phosphat erhitzt, und ein vierter Kolben mit Obersaft blieb unerhitzt. $p_H = 4,5$.

Mit sämtlichen Enzymlösungen wurde dann die Inversion in der gewöhnlichen Weise ausgeführt.

Es wurde gefunden:

Versuchsreihe 21.

Enzymlösung	k · 10 ⁴
Nicht erhitzter Obersaft	40,3
1 Std. auf 60° erhitzter Obersaft . . .	21,2
1 Std. auf 60° erhitzter Obersaft und 25 Std. auf 60° erhitzter Untersaft	21,3
25 Std. auf 60° erhitzter Untersaft . .	3,3
Obersaft erhitzt mit Untersaft, korr. .	18,0

Es zeigte sich also bei diesem Versuch keine Spur einer Schutzwirkung des erhitzten Saftes der Unterhefe auf die Saccharasewirkung des Oberhefensaftes.

Schutzwirkung von Rohrzucker auf Saccharase.

Die Schutzwirkung, welche Substrate auf ihre spezifischen Enzyme ausüben, ist wohl gerade im Fall Rohrzucker-Saccharase konstatiert worden, und zwar in der bekannten Untersuchung von O'Sullivan und Tompson¹⁾. Analoge Effekte sind von Biernacki, Vernon²⁾, Bayliss und Starling³⁾ bei Trypsin, von Wohl und Glimm⁴⁾ bei Amylase und später noch mehrfach gefunden worden. Auch die Reaktionsprodukte üben eine ähnliche Wirkung aus, allerdings in verschiedenem Grad; so haben z. B. Hudson und Paine⁵⁾ einen diesbezüglich starken Einfluß von Fruktose auf Saccharase gemessen, und schreiben auch diese Wirkung einer Verbindung mit dem Enzym zu, wie dies O'Sullivan und Tompson für Rohrzucker und Saccharase angenommen hatten. Solche Verbindungen zwischen Saccharase und Rohrzucker, Fruktose und verschiedenen anderen Stoffen sind dann in neuerer Zeit von

¹⁾ O'Sullivan und Tompson, Trans. Chem. Soc. Bd. 57, S. 834 (1890).

²⁾ Vernon, Journ. of Physiol. Bd. 27, 28, 31 (1901—1904).

³⁾ Bayliss und Starling, Journ. of Physiol. Bd. 30, S. 61 (1903).

⁴⁾ Wohl und Glimm, Biochem. Zeitschr. Bd. 27, S. 365 (1910).

⁵⁾ Hudson und Paine, J. Amer. Chem. Soc. Bd. 32, S. 988 (1911).

Michaelis und Menten¹⁾ eingehender studiert worden. Vergleicht man die Ergebnisse dieser Forscher über die Hemmung der Saccharasewirkung durch Substrat bzw. Reaktionsprodukte²⁾ mit den Tatsachen, welche über die Schutzwirkung dieser und anderer³⁾ Stoffe bekannt geworden sind, so findet man eine durchgehende Parallelität, was für die Richtigkeit der Grundannahme spricht. Wir werden Gelegenheit haben, hierauf noch zurückzukommen.

Wir führen noch einen eigenen Versuch über die Schutzwirkung des Rohrzuckers auf Saccharase an:

- 2 Meßkolben a und b zu 50 ccm werden beschickt mit
 10 ccm Saccharaselösung (3b, verdünnt 1 : 50),
 12,5 „ 4%ige KH_2PO_4 -Lösung,
 2 g Rohrzucker.

2 Meßkolben c und d werden zu Parallelversuchen ebenso beschickt, jedoch ohne Rohrzucker. Die 4 Kolben werden gleichzeitig 1 Stunde auf $60,0^\circ \pm 0,3^\circ$ erhitzt. Nach der raschen Abkühlung wird die Inversion einer 8%igen Rohrzuckerlösung wie gewöhnlich gemessen. Für die rohrzuckerhaltigen Lösungen a und b wird die maximale Linksdrehung aus der maximalen Rechtsdrehung einer 10%igen Rohrzuckerlösung bestimmt, welche $3,30^\circ$ beträgt.

Wir erhielten folgendes Ergebnis:

	Nicht erhitzt		Erhitzt	
	$k \cdot 10^4$	$k \cdot 10^4$	Rel.	$kc \cdot 10^3$
Ohne Rohrzucker	42,4	19,3	45	5,8
Mit „	37,4	23,8	64	3,3

Die Werte der letzten Spalten zeigen die bedeutende Schutzwirkung des Rohrzuckers.

Durch diese Schutzwirkung wird es auch verständlich,

¹⁾ Michaelis u. Menten, Biochem. Zeitschr. Bd 49, S. 333 (1913).

²⁾ Siehe hierzu auch Michaelis und Pechstein, Biochem. Zeitschr. Bd. 60, S. 79 (1914).

³⁾ Man vergleiche z. B. die geringe Hemmungswirkung der Laktose (Michaelis und Menten l. c.) mit der geringen Schutzwirkung dieser Biose (Euler und Kullberg, Diese Zeitschr. Bd. 71, S. 134 [1911]).

daß die für die Temperatur von $52,5^{\circ}$ geltende Kurve von Sörensen und Koefoed¹⁾, welche die Abhängigkeit der Saccharasewirkung von der H-Konzentration darstellt, so gut mit der von Michaelis und Davidsohn²⁾ bei $22,3^{\circ}$ gefundenen Kurve übereinstimmt. Nur auf der sauren Seite des Optimums liegen die Werte von Sörensen bedeutend unter denen von Michaelis.

Man konnte darnach erwarten, daß die Schutzwirkung des Rohrzuckers auf der sauren Seite des Optimums geringer ist als auf der alkalischen. Um diese Vermutung zu prüfen, wurde eine Versuchsreihe wie die vorige angestellt, nur wurde der Zusatz von Puffer so geregelt, daß die Lösungen die Acidität $p_H = 3,3$ bzw. $6,3$ erhielten.

Die Lösungen wurden gleichzeitig 1 Stunde auf $52,5^{\circ} \pm 0,2^{\circ}$ erhitzt.

Die Inversionsbestimmung geschah dann wie oben und lieferte die folgenden Resultate:

Versuchsreihe 29.

$p_H = 3,5$	Nicht erhitzt		Erhitzt	
	$k \cdot 10^4$	$k \cdot 10^4$	Rel.	$k \cdot 10^3$
Ohne Rohrzucker	38,6	9,7	25	9,9
Mit "	38,2	17,7	46	5,6

Der Versuch mißglückte insofern, als bei $p_H = 6,5$ eine so starke Inaktivierung eintrat, daß die Resultate in diesen Lösungen nicht den gleichen Grad von Zuverlässigkeit besitzen wie die übrigen Bestimmungen. Immerhin geht daraus hervor, daß die Schutzwirkung auf der alkalischen Seite des Optimums ($p_H = 6,5$) größer ist als auf der sauren Seite. Dies steht im Einklang mit einer von Hudson und Paine ausgeführten Versuchsreihe bezüglich der Schutzwirkung von Fruktose³⁾.

¹⁾ Siehe S. P. L. Sörensen, Ergebnisse d. Physiol. Bd. 12, S. 459 (1912).

²⁾ Michaelis und Davidsohn, Biochem. Zeitschr. Bd. 35, S. 386 (1911).

³⁾ Hudson u. Paine, Journ. Amer. Chem. Soc. Bd. 32, S. 988 (1910).

Beilagen.

Invertose-temperatur	Minuten	Drehung im 10 cm-Rohr (Verdünnung 1 : 2)	$k \cdot 10^4$	$k \cdot 10^4$ Mittelw. ¹⁾
Versuchsreihe 1. $p_H = 4,5$.				
1. $1^{\circ}1 \pm 0,2$	0	2,64	—	20,0
	31	2,15	19,4	
	46	1,91	20,2	
	60	1,72	20,2	
	∞	-1,16		
2. $10^{\circ}9 \pm 0,4$	0	2,62	—	41,2
	30	1,77	39,0	
	46	1,36	40,4	
	62	0,95	43,4	
	∞	-1,00		
3. $20^{\circ}7 \pm 0,3$	0	2,60	—	82,9
	31	1,08	80,4	
	46	0,53	85,3	
	∞	-0,88		

Vorbehandlung	Minuten	Drehung	$k \cdot 10^4$	Berechnungen
Versuchsreihe 2. Inv.-Temp. 15° .				
4. Nicht erhitzt $p_H = 4,4$	0	2,64	—	$k \cdot 10^4 = 36,3$ Rel. = 100
	29	1,88	35,9	
	45	1,53	35,8	
	60	1,19	37,3	
	∞	-0,96		
5. 1 Stunde auf $50^{\circ}0 \pm 0,2$ erhitzt $p_H = 4,4$	0	2,64	—	$k \cdot 10^4 = 36,7$ Rel. = 101
	30	1,88	35,9	
	45	1,53	35,8	
	61	1,15	38,3	
6. 1 Stunde auf $55^{\circ}1 \pm 0,2$ erhitzt $p_H = 4,4$	0	2,64	—	$k \cdot 10^4 = 33,6$ Rel. = 92,5 $k_C \cdot 10^3 = 0,6$
	30	1,91	33,0	
	45	1,59	33,3	
	61	1,26	34,5	

¹⁾ Die Mittelwerte sind in dieser Versuchsreihe — wegen der relativ großen Differenzen der einzelnen Konstanten — unter Berücksichtigung der ungleichen Zuverlässigkeit der Konstanten berechnet.

Vorbehandlung	Minuten	Drehung	$k \cdot 10^4$	Berechnungen
7. Nicht erhitzt PH = 5,7	0	2,64	—	$k \cdot 10^4 = 28,4$ Rel. = 100
	45	1,75	27,6	
	61	1,44	29,1	
8. 1 Stunde auf $50^{\circ} \pm 0,2$ erhitzt PH = 5,7	0	2,64	—	$k \cdot 10^4 = 13,0$ Rel. = 46 $kc \cdot 10^3 = 5,7$
	30	2,35	12,7	
	45	2,17	13,5	
	60	2,04	13,3	
9. 1 Stunde auf $55^{\circ} \pm 0,2$ erhitzt PH = 5,7	0	2,64	—	$k \cdot 10^4 = 1,6$ Rel. = 6 $kc \cdot 10^3 = 21$
	30	2,61	1,3	
	45	2,58	1,8	
	60	2,56	1,7	
Versuchsreihe 3. Inv.-Temp. 17° .				
10. Nicht erhitzt PH = 4,5	0	2,64	—	$k \cdot 10^4 = 43,4$ Rel. = 100
	30	1,74	42,0	
	45	1,34	43,6	
	60	0,99	44,7	
	∞	-0,94		
11. $\frac{1}{2}$ Std. auf $55^{\circ} \pm 0,2$ erhitzt PH = 4,5	0	2,64	—	$k \cdot 10^4 = 41,5$ Rel. = 96 $kc \cdot 10^3 = 0,65$
	30	1,76	41,0	
	45	1,40	41,2	
	60	1,06	42,2	
12. 1 Std. auf $55^{\circ} \pm 0,2$ erhitzt PH = 4,5	0	2,64	—	$k \cdot 10^4 = 39,5$ Rel. = 91 $kc \cdot 10^3 = 0,68$
	30	1,79	39,3	
	45	1,45	38,9	
	60	1,11	40,3	
13. 2 Std. zu $55^{\circ} \pm 0,3$ erhitzt PH = 4,5	0	2,64	—	$k \cdot 10^4 = 37,7$ Rel. = 87 $kc \cdot 10^3 = 0,51$
	30	1,82	37,7	
	45	1,48	37,8	
	60	1,19	37,5	
14. Nicht erhitzt PH = 2,6	0	2,64	—	$k \cdot 10^4 = 39,4$ Rel. = 100
	30	1,80	38,7	
	45	1,41	40,7	
	60	1,16	38,7	
15. 1 Std. zu $50^{\circ} \pm 0,2$ erhitzt PH = 2,6	0	2,64	—	$k \cdot 10^4 = 0,4$ Rel. = 1
	30	2,63	0,3	
	45	2,62	0,4	
16. $\frac{1}{2}$ Std. zu $55^{\circ} \pm 0,3$ erhitzt PH = 2,6	Keine Inversion			

Vorbehandlung	Minuten	Drehung	$k \cdot 10^4$	Berechnungen
Versuchsreihe 4. Inv.-Temp. 16°.				
17. Nicht erhitzt PH = 4,5	0	2,64	—	$k \cdot 10^4 = 41,7$ Rel. = 100
	45	1,40	40,9	
	60	1,04	42,6	
	∞	-0,95		
18. 1 Std. zu 56°1 ± 0,4 erhitzt PH = 4,5	0	2,64	—	$k \cdot 10^4 = 35,7$ Rel. = 86 $kc \cdot 10^3 = 1,1$
	31	1,87	33,9	
	45	1,54	35,4	
	60	1,18	37,9	
19. 1 Std. zu 59°9 ± 0,2 erhitzt PH = 4,5	0	2,64	—	$k \cdot 10^4 = 16,7$ Rel. = 40 $kc \cdot 10^3 = 6,6$
	31	2,24	16,4	
	45	2,07	16,7	
	60	1,89	17,0	
20. Nicht erhitzt PH = 3,0	0	2,64	—	$k \cdot 10^4 = 41,6$ Rel. = 100
	45	1,40	40,9	
	60	1,05	42,3	
21. 1 Std. zu 55°0 ± 0,3 erhitzt PH = 3,0	0	2,64	—	$k \cdot 10^4 = 20,9$ Rel. = 50 $kc \cdot 10^3 = 5,0$
	31	2,18	19,4	
	45	1,92	21,6	
	60	1,71	21,7	
22. 1 Std. zu 56°1 ± 0,4 erhitzt PH = 3,0	Keine Inversion			
Versuchsreihe 5. Inv.-Temp. 16°.				
23. Nicht erhitzt PH = 4,5	0	2,64	—	$k \cdot 10^4 = 43,5$ Rel. = 100
	30	1,74	42,1	
	45	1,33	44,2	
	61	0,98	44,3	
	∞	-0,95		
24. 1 Std. zu 57°5 ± 0,3 erhitzt PH = 4,5	0	2,64	—	$k \cdot 10^4 = 32,3$ Rel. = 74 $kc \cdot 10^3 = 2,3$
	30	1,91	33,0	
	45	1,63	32,0	
	61	1,35	31,9	
25. 1/2 Std. zu 61°8 ± 0,3 erhitzt PH = 4,5	0	2,64	—	$k \cdot 10^4 = 10,6$ Rel. = 24 $kc \cdot 10^3 = 20$
	30	2,39	10,7	
	45	2,27	10,7	
	61	2,16	10,3	
26. 1/2 Std. zu 64°3 ± 0,3 erhitzt PH = 4,5	0	2,64	—	$k \cdot 10^4 = 2,7$ Rel. = 5 $kc \cdot 10^3 = 43$
	30	2,58	2,7	
	45	2,57	2,2	
	61	2,56	1,8	

Vorbehandlung	Minuten	Drehung	$k \cdot 10^4$	Berechnungen
Versuchsreihe 6. Inv.-Temp. 13°.				
27. Nicht erhitzt PH = 3,0	0	2,64	—	$k \cdot 10^4 = 30,0$
	30	1,96	30,0	Rel. = 100
	45	1,67	30,0	
	60	1,41	30,0	
	∞	0,99		
28. 1 Std. zu 45° ± 0,2 erhitzt PH = 3,0	0	2,64	—	$k \cdot 10^4 = 22,2$
	30	2,12	22,3	Rel. = 74
	45	1,90	22,0	$kc \cdot 10^3 = 2,2$
	60	1,68	22,2	
29. 1 Std. zu 50° ± 0,3 erhitzt PH = 3,0	0	2,64	—	$k \cdot 10^4 = 7,8$
	30	2,44	8,0	Rel. = 26
	45	2,36	7,8	$kc \cdot 10^3 = 9,8$
	60	2,29	7,3	
30. Nicht erhitzt PH = 4,0	0	2,64	—	$k \cdot 10^4 = 30,8$
	30	1,95	30,7	Rel. = 100
	45	1,66	30,5	
	60	1,37	31,2	
31. 1 Std. zu 45° ± 0,2 erhitzt PH = 4,0	0	2,64	—	$k \cdot 10^4 = 29,9$
	30	1,96	30,0	Rel. = 97
	45	1,68	29,6	$kc \cdot 10^3 = 0,2$
	60	1,41	30,0	
32. 1 Std. zu 50° ± 0,3 erhitzt PH = 4,0	0	2,64	—	$k \cdot 10^4 = 30,1$
	30	1,95	30,7	Rel. = 98
	45	1,68	29,6	$kc \cdot 10^3 = 0,2$
	60	1,41	30,0	
Versuchsreihe 7. Inv.-Temp. 16°.				
33. Nicht erhitzt PH = 4,1	0	2,64	—	$k \cdot 10^4 = 33,6$
	30	1,90	33,3	Rel. = 100
	45	1,62	32,3	
	60	1,26	35,3	
	∞	-0,95		
34. 1 Std. zu 50° ± 0,3 erhitzt PH = 4,1	0	2,64	—	$k \cdot 10^4 = 93,3$
	45	1,61	32,7	Rel. = 99
	60	1,30	33,9	
35. 1 Std. zu 54° ± 0,4 erhitzt PH = 4,1	0	2,64	—	$k \cdot 10^4 = 31,3$
	45	1,65	31,1	Rel. = 90
	60	1,37	31,5	$kc \cdot 10^3 = 0,5$

Vorbehandlung	Minuten	Drehung	$k \cdot 10^4$	Berechnungen
36. 1 Std. zu $50^{\circ}0 \pm 0,3$ erhitzt $p_H = 5,2$	0	2,64	—	$k \cdot 10^4 = 33,4$
	30	1,93	32,0	Rel. = 99
	45	1,58	33,8	$kc \cdot 10^3 = 0,05$
	60	1,28	34,5	
37. 1 Std. zu $54^{\circ}9 \pm 0,4$ erhitzt $p_H = 5,2$	0	2,64	—	$k \cdot 10^4 = 28,0$
	30	2,04	26,7	Rel. = 83
	45	1,71	28,9	$kc \cdot 10^3 = 1,3^1)$
	60	1,48	28,3	

Versuchsreihe 8. Inv.-Temp. 15° .

38. Nicht erhitzt $p_H = 5,7$	0	2,64	—	$k \cdot 10^4 = 28,2$
	30	2,00	28,3	Rel. = 100
	45	1,75	27,3	
	60	1,45	29,0	
	∞	-0,96		
39. 1 Std. zu $42^{\circ}8 \pm 0,2$ erhitzt $p_H = 5,7$	0	2,64	—	$k \cdot 10^4 = 27,0$
	30	2,04	26,3	Rel. = 96
	45	1,75	27,3	$kc \cdot 10^3 = 0,3$
	60	1,50	27,5	
40. 1 Std. zu $50^{\circ}0 \pm 0,2$ erhitzt $p_H = 5,7$	0	2,64	—	$k \cdot 10^4 = 21,3$
	30	2,16	20,0	Rel. = 76
	45	1,89	22,5	$kc \cdot 10^3 = 2,0$
	60	1,71	21,5	

Versuchsreihe 9. Inv.-Temp. 15° .

41. Nicht erhitzt $p_H = 5,8$	0	2,64	—	$k \cdot 10^4 = 32,3$
	30	1,94	31,3	Rel. = 100
	45	1,50	33,3	
	60	1,35	32,2	
	∞	-0,95		
42. 1 Std. zu $50^{\circ}0 \pm 0,2$ erhitzt $p_H = 5,8$	0	2,64	—	$k \cdot 10^4 = 16,3$
	30	2,26	16,3	Rel. = 50
	45	2,08	16,2	
	60	1,91	16,3	

¹⁾ Dieser Koeffizient ist nicht ganz zuverlässig wegen des Mangels einer „Grundkonstante“ k_a in dieser Versuchsreihe bei demselben p_H . Der Fehler ist jedoch sehr klein, weil $p_H = 4,1$ und $5,2$ ungefähr gleichviel vom Optimum entfernt sind.

Vorbehandlung	Minuten	Drehung	$k \cdot 10^4$	Berechnungen
---------------	---------	---------	----------------	--------------

Versuchsreihe 10. Inv.-Temp. 15°.

43. Nicht erhitzt PH = 6,1	0	2,64	—	$k \cdot 10^4 = 28,5$ Rel. = 100
	30	2,01	27,7	
	46	1,70	28,5	
	60	1,42	29,4	
	∞	-0,95		
44. 1 Std. zu 50°0 ± 0,3 erhitzt PH = 6,1	0	2,64	—	$k \cdot 10^4 = 3,0$ Rel. = 11 ..
	45	2,54	2,7	
	60	2,47	3,3	
45. 1 Std. zu 55°0 ± 0,3 erhitzt PH = 6,1	Keine Inversion			
46. 1 Std. zu 59°9 ± 0,2 erhitzt PH = 6,1				

Versuchsreihe 11. Inv.-Temp. 14°.

47. Nicht erhitzt PH = 4,5	0	2,64	—	$k \cdot 10^4 = 34,8$ Rel. = 100
	30	1,88	34,1	
	45	1,54	35,0	
	60	1,19	35,2	
	∞	-0,99		
48. 1 Std. zu 50°0 ± 0,3 erhitzt PH = 6,8	0	2,64	—	$k \cdot 10^4 = 1,5$ Rel. = 4
	30	2,64	0	
	45	2,53	2,9	
	60	2,56	1,7	
49. 1 Std. zu 55°1 ± 0,5 erhitzt PH = 6,8	Keine Inversion			

Versuchsreihe 12. Inv.-Temp. 15°.

50. Nicht erhitzt PH = 3,0	0	2,64	—	$k \cdot 10^4 = 34,6$ Rel. = 100
	30	1,87	34,7	
	45	1,57	34,0	
	60	1,24	35,2	
	∞	-0,96		
51. 1/2 Std. zu 54°9 ± 0,2 erhitzt PH = 3,0	0	2,64	—	$k \cdot 10^4 = 0,9$ Rel. = 3 $kc \cdot 10^3 = 53$
	90	2,57	0,9	
	120	2,55	0,9	

Vorbehandlung	Minuten	Drehung	$k \cdot 10^4$	Berechnungen
52. 1 Std. zu $54^{\circ}9 \pm 0,2$ erhitzt PH = 4,0	0	2,64	—	$k \cdot 10^4 = 31,3$
	30	1,94	31,3	Rel. = 88
	45	1,64	31,4	$kc \cdot 10^3 = 0,92^1)$
	60	1,38	31,2	
53. $\frac{3}{4}$ Std. zu $60^{\circ}0 \pm 0,3$ erhitzt PH = 4,0	0	2,64	—	$k \cdot 10^4 = 9,7$
	30	2,39	10,0	Rel. = 27
	45	2,29	9,8	$kc \cdot 10^3 = 12,8^1)$
	60	2,20	9,3	
Versuchsreihe 13. Inv.-Temp. 13° .				
54. Nicht erhitzt PH = 5,2	0	2,64	—	$k \cdot 10^4 = 27,6$
	30	2,03	26,7	Rel. = 100
	45	1,72	28,3	
	61	1,47	27,7	
	∞	-0,99		
55. 1 Std. zu $57^{\circ}1 \pm 0,2$ erhitzt PH = 5,2	0	2,64	—	$k \cdot 10^4 = 17,6$
	30	2,22	17,7	Rel. = 64
	45	2,05	17,1	$kc \cdot 10^3 = 3,3$
	60	1,84	18,0	
Versuchsreihe 14. Inv.-Temp. 16° .				
56. Nicht erhitzt PH = 4,5	0	2,64	—	$k \cdot 10^4 = 42,5$
	30	1,74	41,7	Rel. = 100
	45	1,36	42,4	
	60	1,02	43,3	
	∞	-0,95		
57. 1 Std. zu $50^{\circ}1 \pm 0,2$ erhitzt PH = 4,5	0	2,64	—	$k \cdot 10^4 = 41,9$
	30	1,73	42,4	Rel. = 99
	45	1,40	40,9	$kc \cdot 10^3 = 0,1$
	60	1,05	42,4	
58. 1 Std. zu $54^{\circ}9 \pm 0,2$ erhitzt PH = 4,5	0	2,64	—	Korrektion für 3% Enzym, die ver- loren gingen
	30	1,76	40,7	$k \cdot 10^4 = 41,8$
	45	1,44	39,2	Rel. = 98
	60	1,06	41,8	$kc \cdot 10^3 = 0,1$
59. Nicht erhitzt PH = 5,4	0	2,64	—	$k \cdot 10^4 = 38,6$
	30	1,81	38,1	Rel. = 100
	45	1,47	38,1	
	60	1,13	39,5	

¹⁾ Vergl. Note zur Versuchsreihe 15.

Vorbehandlung	Minuten	Drehung	$k \cdot 10^4$	Berechnungen
60. 1 Std. zu $50^{\circ}1 \pm 0,2$ erhitzt $p_H = 5,4$	0	2,64	—	$k \cdot 10^4 = 35,6$
	30	1,89	34,1	Rel. = 92
	45	1,54	35,4	$k_C \cdot 10^3 = 0,58$
	60	1,19	37,3	
61. 1 Std. zu $54^{\circ}9 \pm 0,2$ erhitzt $p_H = 5,4$	0	2,64	—	$k \cdot 10^4 = 30,0$
	30	2,02	29,3	Rel. = 78
	45	1,71	30,2	$k_C \cdot 10^3 = 1,8$
	60	1,40	30,5	

 Versuchsreihe 15. Inv.-Temp. 13° .

62. Nicht erhitzt $p_H = 4,5$	0	2,64	—	$k \cdot 10^4 = 35,0$
	45	1,54	34,7	Rel. = 100
	60	1,24	35,2	
	∞	-1,01		
63. 1 Std. zu $57^{\circ}5 \pm 0,3$ erhitzt $p_H = 4,5$	0	2,64	—	$k \cdot 10^4 = 31,3$
	30	1,97	29,7	Rel. = 89
	45	1,62	31,8	$k_C \cdot 10^4 = 0,8$
	60	1,33	32,3	
64. 1 Std. zu $60^{\circ}0 \pm 0,3$ erhitzt $p_H = 4,5$	0	2,64	—	$k \cdot 10^4 = 24,5$
	30	2,07	24,7	Rel. = 70
	45	1,82	24,7	$k_C \cdot 10^3 = 2,6$
	60	1,61	24,0	
65. 1 Std. zu $57^{\circ}5 \pm 0,3$ erhitzt $p_H = 5,4$	0	2,69	—	$k \cdot 10^4 = 19,5$
	30	2,18	19,7	Rel. = 61
	45	1,99	19,1	$k_C \cdot 10^3 = 3,55^1)$
	60	1,77	19,8	
66. $\frac{3}{4}$ Std. zu $60^{\circ}0 \pm 0,3$ erhitzt $p_H = 5,4$	0	2,64	—	$k \cdot 10^4 = 12,3$
	30	2,33	13,0	Rel. = 39
	45	2,24	11,6	$k_C \cdot 10^3 = 9,2^1)$
	60	2,08	12,2	

1) Die Grundkonstante ist in diesem Falle nicht direkt beobachtet, ist aber aus dem Verhältnis der Grundkonstanten bei $p_H = 4,5$ in dieser und der vorigen Versuchsreihe berechnet ($38,6 \cdot \frac{35,0}{42,5} = 31,8$). Analog ist in der Versuchsreihe 12 verfahren.

Vorbehandlung	Minuten	Drehung	$k \cdot 10^4$	Berechnungen
---------------	---------	---------	----------------	--------------

Versuchsreihe 16. Inv.-Temp. 17°.

67. Nicht erhitzt PH = 3,1	0	2,64	—	$k \cdot 10^4 = 44,6$ Rel. = 100
	30	1,71	43,3	
	45	1,31	44,9	
	60	0,97	45,5	
	∞	-0,94		
68. 1 Std. zu 50° ± 0,2 erhitzt PH = 3,1	0	2,64	—	$k \cdot 10^4 = 36,5$ Rel. = 86 $k_C \cdot 10^3 = 1,45$
	30	1,84	36,7	
	45	1,51	36,5	
	60	1,23	36,2	
69. 1 Std. zu 55° ± 0,2 erhitzt PH = 3,1	0	2,64	—	$k \cdot 10^4 = 8,2$ Rel. = 18 $k_C \cdot 10^3 = 12,3$
	30	2,42	9,0	
	45	2,35	8,0	
	60	2,29	7,5	
70. Nicht erhitzt PH = 4,5	0	2,64	—	$k \cdot 10^4 = 48,1$ Rel. = 100
	30	1,63	48,0	
	45	1,24	47,8	
	60	0,89	48,5	
71. 1 Std. zu 55° ± 0,2 erhitzt PH = 4,5	0	2,64	—	$k \cdot 10^4 = 46,8$ Rel. = 97 $k_C \cdot 10^3 = 0,2$
	30	1,67	45,7	
	45	1,26	46,9	
	60	0,91	47,9	
72. 1 Std. zu 62° ± 0,2 erhitzt PH = 4,5	0	2,64	—	$k \cdot 10^4 = 14,9$ Rel. = 31 $k_C \cdot 10^3 = 8,5$
	30	2,29	14,7	
	45	2,11	15,3	
	60	1,98	14,8	

Versuchsreihe 17. Inv.-Temp. 15°.

73. Nicht erhitzt PH = 4,5	0	2,64	—	$k \cdot 10^4 = 33,5$ Rel. = 100
	30	1,91	32,7	
	45	1,57	33,8	
	60	1,27	34,5	
	∞	-0,96		
74. 1 Std. zu 55° ± 0,3 erhitzt PH = 4,5	0	2,64	—	$k \cdot 10^4 = 28,8$ Rel. = 86
	30	2,02	27,3	
	45	1,71	28,7	
	60	1,40	30,5	
75. 1 Std. zu 60° ± 0,3 erhitzt PH = 4,5	0	2,64	—	$k \cdot 10^4 = 12,3$ Rel. = 37
	30	2,35	12,0	
	45	2,21	12,2	
	60	2,05	12,8	

Vorbehandlung	Minuten	Drehung	$k \cdot 10^4$	Berechnungen
76. 1 g Hefe (SB II) an- statt der Enzym- lösung. Nicht er- hitzt $pH = 4,5$	0	2,64	—	$k \cdot 10^4 = 25,0$ Rel. = 100
	30	2,09	24,0	
	45	1,84	24,2	
	60	1,53	26,7	
77. 1 g Hefe. 1 Std. zu $55^{\circ}3 \pm 0,3$ erhitzt $pH = 4,5$	0	2,64	—	$k \cdot 10^4 = 23,5$ Rel. = 94 $kC \cdot 10^3 = 0,45$
	30	2,11	23,0	
	45	1,87	23,1	
	60	1,60	24,5	
78. 1 g Hefe 1 Std. zu $60^{\circ}1 \pm 0,2$ erhitzt $pH = 4,5$	0	2,64	—	$k \cdot 10^4 = 12,2$ Rel. = 49 $kC \cdot 10^3 = 5,2$
	30	—	—	
	45	2,24	11,3	
	60	2,04	13,1	

Versuchsreihe 18. Inv.-Temp. 16° .

79. Nicht erhitzte Hefe SB II (Trockensub- stanz 0,276 g) $pH = 4,3$	0	2,61	—	$k \cdot 10^4 = 40$ Rel. = 100
	30	1,79	38	
	45	1,41	40	
	60	1,05	42	
	∞	-0,94		
80. $\frac{1}{2}$ Std. auf $62^{\circ}5 \pm 0,1$ erhitzte Hefe SB II $pH = 4,3$	0	2,61	—	$k \cdot 10^4 = 18,4$ Rel. = 46 $kC \cdot 10^3 = 11,2$
	30	2,19	18,0	
	45	1,97	18,4	
	60	1,80	18,7	
81. Nichterhitzte Hefe H (Trockensubstanz 0,276 g) $pH = 4,3$	0	1,32 ¹⁾	—	$k \cdot 10^4 = 149$ Rel. = 100
	18	0,51	144	
	30	0,17	147	
	40	-0,05	155	
	∞	-0,47		
82. 1 Std. auf $55^{\circ}0 \pm 0,1$ erhitzte Hefe H $pH = 4,3$	0	1,32 ¹⁾	—	$k \cdot 10^4 = 142$ Rel. = 95 $kC \cdot 10^3 = 0,35$
	18	0,54	138	
	30	0,19	143	
	40	0,00	144	
83. $\frac{1}{2}$ Std. auf $62^{\circ}5 \pm 0,1$ erhitzte Hefe H $pH = 4,3$	0	1,32 ¹⁾	—	$k \cdot 10^4 = 97$ Rel. = 65 $kC \cdot 10^3 = 6,2$
	30	0,47	94	
	45	0,17	98	
	60	-0,04	102	

¹⁾ Im 5 cm-Rohr.

Vorbehandlung	Minuten	Drehung im 5 cm-Rohr	$k \cdot 10^4$	Berechnungen
---------------	---------	----------------------------	----------------	--------------

Versuchsreihe 19. Inv.-Temp. 16°.

84. Nicht erhitze Hefe H (Trockensubstanz 0,261 g) PH = 4,3	0	1,32	—	$k \cdot 10^4 = 68,6$ Rel. = 100
	30	0,65	68,0	
	40	0,47	70,0	
	50	0,35	67,8	
	∞	-0,47		
85. 1 Std. auf 60°0 ± 0,2 erhitzt PH = 4,3	0	1,32	—	$k \cdot 10^4 = 41,8$ Rel. = 61 $kc \cdot 10^3 = 3,6$
	30	0,88	40,7	
	40	0,76	40,8	
	50	0,61	43,8	

Versuchsreihe 20. Inv.-Temp. 15°.

86. Nicht erhitzt PH = 4,3	0	1,29	—	$k \cdot 10^4 = 61,0$ Rel. = 100
	20	0,87	59,6	
	30	0,68	61,7	
	40	0,53	61,6	
	∞	-0,47		
87. 75 Min. auf 57°4 mit Wasserstoff erhitzt PH = 4,3	0	1,29	—	$k \cdot 10^4 = 48,0$ Rel. = 79
	20	0,94	48,5	
	30	0,80	47,3	
	40	0,66	48,3	
88. 75 Min. auf 57°4 mit Luft erhitzt PH = 4,3	0	1,29	—	$k \cdot 10^4 = 51,0$ Rel. = 84
	20	0,93	49,5	
	33,5	0,73	50,2	
	40	0,61	53,3	
89. 1 Std. auf 59°9 mit Wasserstoff erhitzt PH = 4,3	0	1,29	—	$k \cdot 10^4 = 31,8$ Rel. = 52
	33,5	0,90	32,6	
	45	0,80	31,3	
	60	0,67	31,5	
90. 1 Std. auf 59°9 mit Luft erhitzt PH = 4,3	0	1,29	—	$k \cdot 10^4 = 35,2$ Rel. = 58
	33	0,86	37,0	
	45	0,77	34,0	
	60	0,62	34,7	

Vorbehandlung	Minuten	Drehung	$k \cdot 10^4$	$k \cdot 10^4$ Mittelw.
Versuchsreihe 21.				
91. Nicht erhitzte Saccharase aus Oberhefe PH = 4,5	0	2,64	—	40,3
	30	1,78	39,7	
	45	1,40	40,8	
	60	1,10	40,5	
	∞	—0,96		
92. Erhitzte Saccharase aus Oberhefe PH = 4,5	0	2,64	—	21,2
	30	2,16	21,0	
	45	1,93	21,3	
	60	1,72	21,3	
93. Erhitzte Saccharase aus Ober- und Unterhefe PH = 4,5	0	2,64	—	21,3
	30	2,15	21,3	
	45	1,93	21,3	
94. Erhitzte Saccharase aus Unterhefe PH = 4,5	0	2,64	—	3,3
	30	2,57	3,0	
	45	2,53	3,1	
	60	2,46	3,8	

Inversionstemperatur	Minuten	Drehung im 10 cm-Rohr (Verd. 1 : 2)	$k \cdot 10^4$	$k \cdot 10^4$ Mittelw.
Versuchsreihe 22. Polarisationsstemperatur 19°.				
95. 18° ± 0,1	0	2,64	—	40,3
	30	1,78	40,2	
	40	1,55	39,9	
	50	1,35	39,3	
	62	1,05	41,7	
	∞	—0,91		
96. 10° ± 0,2	0	2,64	—	23,9
	30	2,09	24,4	
	46	1,84	23,8	
	60	1,68	22,8	
	80	1,35	24,5	
	∞	—0,91		
97. 0° ± 0,3	0	2,64	—	11,8
	45	2,24	11,5	
	61	2,09	12,0	
	75	1,98	11,9	
	90	1,87	11,8	
	∞	—0,91		

Inversionstemperatur	Minuten	Drehung im 5 cm-Rohr	$k \cdot 10^4$	$k \cdot 10^4$ Mittelw.
----------------------	---------	-------------------------	----------------	-------------------------

Versuchsreihe 23. Polarisationsstemperatur 19°.

98. 20°0	0	1,32	—	44,8
	30	0,87	42,5	
	45	0,66	45,2	
	60	0,48	46,6	
	∞	-0,45		
99. 45°3 ± 0,3	0	1,30	—	155
	15	0,58	155	
	20	0,40	158	
	25	0,29	151	
	∞	-0,44		
100. 52°2 ± 0,3	0	1,30	—	188
	8	0,79	188	
	13	0,57	182	
	16	0,41	194	
	∞	-0,44		

Vorbehandlung	Minuten	Drehung	$k \cdot 10^4$	Berechnungen
---------------	---------	---------	----------------	--------------

Versuchsreihe 24. Inv.-Temp. 16°.

101. Nicht erhitzt PH = 4,5	0	1,32	—	$k \cdot 10^4 = 37,6$ Rel. = 100
	30	0,91	37,5	
	40	0,80	37,1	
	50	0,69	37,4	
	60	0,58	38,3	
	∞	-0,48		
102. 1/2 Std. auf 59°0 ± 0,3 erhitzt PH = 4,5	0	1,32	—	$k \cdot 10^4 = 23,8$ Rel. = 64 $kC \cdot 10^3 = 6,6$
	40	0,97	23,5	
	50	0,90	23,1	
	60	0,80	24,7	
103. 1 Std. auf 59°0 ± 0,3 erhitzt PH = 4,5	0	1,32	—	$k \cdot 10^4 = 18,0$ Rel. = 48 $kC \cdot 10^3 = 5,3$
	40	1,04	18,8	
	50	0,99	17,6	
	60	0,92	18,2	
	72	0,85	18,3	
104. 2 Std. auf 59°0 ± 0,3 erhitzt PH = 4,5	0	1,32	—	$k \cdot 10^4 = 14,4$ Rel. = 38 $kC \cdot 10^3 = 3,5$
	50	1,04	14,7	
	60	1,00	14,2	
	72	0,94	14,3	

Vorbehandlung	Minuten	Drehung im 10 cm-Rohr	$k \cdot 10^4$	Berechnungen
Versuchsreihe 25. Inv.-Temp. 19°.				
105. Nicht erhitzt PH = 4,5	0	2,64	—	$k \cdot 10^4 = 43,0$ Rel. = 100
	30	1,76	41,4	
	45	1,36	43,3	
	60	1,02	44,2	
	∞	-0,91		
106. 1/2 Std. auf 59°2 ± 0,2 erhitzt PH = 4,5	0	2,64	—	$k \cdot 10^4 = 27,4$ Rel. = 64 $kc \cdot 10^3 = 6,5$
	30	2,04	27,0	
	45	1,75	28,0	
	60	1,53	27,2	
107. 1 Std. auf 59°2 ± 0,2 erhitzt PH = 4,5	0	2,64	—	$k \cdot 10^4 = 22,3$ Rel. = 52 $kc \cdot 10^3 = 4,8$
	30	2,14	22,3	
	45	1,92	22,0	
	60	1,69	22,7	
108. 1 1/2 Std. auf 59°2 ± 0,2 erhitzt PH = 4,5	0	2,64	—	$k \cdot 10^4 = 19,3$ Rel. = 45 $kc \cdot 10^3 = 3,9$
	30	2,18	20,3	
	45	2,02	18,7	
	60	1,82	18,8	
109. 2 Std. auf 59°2 ± 0,2 erhitzt PH = 4,5	0	2,64	—	$k \cdot 10^4 = 17,1$ Rel. = 40 $kc \cdot 10^3 = 3,3$
	30	2,24	17,7	
	45	2,07	17,1	
	60	1,92	16,5	
Vorbehandlung	Minuten	Drehung im 5 cm-Rohr	$k \cdot 10^4$	Berechnungen

Versuchsreihe 26. Inv.-Temp. 16°.

110. Nicht erhitzt PH = 4,5	0	1,32	—	$k \cdot 10^4 = 89$ Rel. = 100
	20	0,72	88	
	30	0,51	87	
	40	0,32	88	
	51	0,14	91	
	∞	-0,48		
111. 1/2 Std. auf 59°0 ± 0,3 erhitzt PH = 4,5	0	1,32	—	$k \cdot 10^4 = 38,2$ Rel. = 43 $kc \cdot 10^3 = 12,3$
	20	1,02	39,6	
	30	0,89	39,5	
	40	0,80	37,1	
	51	0,69	36,7	

Vorbehandlung	Minuten	Drehung im 5 cm-Rohr	$k \cdot 10^4$	Berechnungen
112. 2 Std. auf $59^{\circ} \pm 0,3$ erhitzt PH = 4,5	0	1,32	—	$k \cdot 10^4 = 18,7$
	30	1,07	21,7	Rel. = 21
	45	0,99	19,6	$kC \cdot 10^3 = 5,7$
	60	0,93	17,7	
	76	0,89	15,6	
113. Nicht erhitzt PH = 4,5	0	1,32	—	$k \cdot 10^4 = 83$
	20	0,76	81	Rel. = 100
	30	0,55	81	
	43	0,29	86	
114. 1 Std. auf $59^{\circ} \pm 0,3$ erhitzt PH = 4,5	0	1,32	—	$k \cdot 10^4 = 21,7$
	30	1,06	22,6	Rel. = 26
	45	0,97	20,9	$kC \cdot 10^3 = 9,7$
	66	0,82	21,5	

Vorbehandlung	Minuten	Drehung	$k \cdot 10^4$	Berechnungen
---------------	---------	---------	----------------	--------------

Versuchsreihe 27. Inv.-Temp. 16° .

115. Nicht erhitzt Verd. 1 : 10 PH = 4,5	0	1,32	—	$k \cdot 10^4 = 40,2$
	30	0,89	39,5	Rel. = 100
	45	0,72	39,2	
	60	0,53	41,8	
	∞	—0,49		
116. 1 Std. auf $59^{\circ} \pm 0,3$ erhitzt. Verd. 1 : 10 PH = 4,5	0	1,32	—	$k \cdot 10^4 = 12,6$
	30	1,17	12,6	Rel. = 31
	45	1,10	12,6	$kC \cdot 10^3 = 8,4$
	60	1,03	12,7	
117. Nicht erhitzt Verd. 1 : 50 PH = 4,5	0	1,32	—	$k \cdot 10^4 = 44,8$
	30	0,84	44,8	Rel. = 100
	45	0,66	44,3	
	60	0,48	45,5	
118. 1 Std. auf $59^{\circ} \pm 0,3$ erhitzt. Verd. 1 : 50 PH = 4,5	0	1,32	—	$k \cdot 10^4 = 22,9$
	30	1,05	23,5	Rel. = 51
	45	0,94	22,9	$kC \cdot 10^3 = 4,9$
	60	0,84	22,5	
119. Nicht erhitzt Verd. 1 : 200 PH = 4,5	0	1,32	—	$k \cdot 10^4 = 42,6$
	30	0,88	40,7	Rel. = 100
	45	0,67	43,2	
	60	0,50	44,0	
120. 1 Std. auf $59^{\circ} \pm 0,3$ erhitzt. Verd. 1 : 200 PH = 4,5	0	1,32	—	$k \cdot 10^4 = 24,2$
	30	1,03	25,4	Rel. = 58
	45	0,92	24,3	$kC \cdot 10^3 = 4,1$
	60	0,83	23,0	

Vorbehandlung	Minuten	Drehung	$k \cdot 10^4$	Berechnungen
Versuchsreihe 28. Inv.-Temp. 19°.				
121. Nicht erhitzt Ohne Rohrzucker PH = 4,5	0	2,64	—	$k \cdot 10^4 = 42,4$ Rel. = 100
	30	1,79	40,0	
	40	1,47	43,5	
	51	1,22	43,6	
	∞	-0,91		
122. 1 Std. auf 60°0 ± 0,3 erhitzt. Ohne Rohr- zucker PH = 4,5	0	2,64	—	$k \cdot 10^4 = 19,3$ Rel. = 45 $kc \cdot 10^3 = 5,8$
	40	2,06	19,5	
	50	1,97	18,4	
	60	1,79	20,0	
	∞	-0,91		
123. Nicht erhitzt. Mit Rohrzucker PH = 4,5	0	2,39	—	$k \cdot 10^4 = 37,4$ Rel. = 100
	30	1,60	36,7	
	40	1,34	38,3	
	50	1,16	37,2	
	∞	-1,14		
124. 1 Std. auf 60°0 ± 0,3 erhitzt. Mit Rohr- zucker PH = 4,5	0	2,41	—	$k \cdot 10^4 = 23,8$ Rel. = 64 $kc \cdot 10^3 = 3,3$
	40	1,73	23,3	
	50	1,56	23,8	
	60	1,40.	24,3	
	∞	-1,14		
Versuchsreihe 29. Inv.-Temp. 19°.				
125. Nicht erhitzt Ohne Rohrzucker PH = 3,5	0	1,32	—	$k \cdot 10^4 = 38,6$ Rel. = 100
	30	0,90	39,0	
	45	0,76	36,5	
	60	0,56	40,3	
	∞	-0,49		
126. 1 Std. auf 52°5 ± 0,2 erhitzt. Ohne Rohr- zucker PH = 3,5	0	1,32	—	$k \cdot 10^4 = 9,7$ Rel. = 25 $kc \cdot 10^3 = 10,0$
	30	1,22	8,4	
	45	1,15	9,8	
	60	1,07	10,9	
	∞	-0,49		
127. Nicht erhitzt Mit Rohrzucker PH = 3,5	0	1,24	—	$k \cdot 10^4 = 38,2$ Rel. = 100
	30	0,80	40,4	
	45	0,66	37,3	
	60	0,52	36,8	
	∞	-0,57		
128. 1 Std. auf 52°5 ± 0,2 erhitzt. Mit Rohr- zucker PH = 3,5	0	1,25	—	$k \cdot 10^4 = 17,7$ Rel. = 46 $kc \cdot 10^3 = 5,6$
	30	1,05	16,9	
	45	0,93	18,7	
	60	0,86	17,5	
	∞	-0,57		

Zusammenfassung.

1. Für Saccharase aus Oberhefe wurde der Temperaturkoeffizient der Inversion bestimmt; bei der Acidität $p_H = 4,5$ hat im Gebiet $0-20^\circ$ die Konstante A der Arrheniusschen Temperaturformel den Wert 10500 ± 300 . Als Mittelwert für die enzymatische Inversion durch Saccharasen aus Ober- und Unterhefen im Temperaturgebiet $0-20^\circ$ kann $A = 10500 \pm 500$ angenommen werden. Im Gebiet $20-52^\circ$ wurde ein etwas kleinerer A-Wert (8800 ± 400) gefunden.
2. Die Inaktivierung der Saccharase verläuft nicht als monomolekulare Reaktion, sondern die Inaktivierungsgeschwindigkeit nimmt schneller ab, als es die Formel $k_C = \frac{1}{t} \ln \frac{k_a}{k_t}$ verlangt. Hierzu liegen Analogien, z. B. bei der Koagulation von Proteinen vor (Chick und Martin).

Zur Berechnung des Inaktivierungskoeffizienten k_C müssen deshalb die Versuchsbedingungen definiert werden, um die Ergebnisse verschiedener Untersuchungen vergleichbar zu machen. Folgende Bedingungen werden vorgeschlagen: Erhitzungszeit (bei optimalem p_H) 50 bis 70 Minuten. Enzymkonzentration wird so gewählt, daß bei Zimmertemperatur die Inversionskonstante unter Normalbedingungen (8 g Rohrzucker, $p_H = 4,5$) etwa den Wert $40 \cdot 10^{-4}$ bekommt. Durch den hieraus erhaltenen Wert von k_C und die Angabe der Erhitzungstemperatur ist dann die Temperaturempfindlichkeit der Saccharase festgelegt.

3. Die Inaktivierung der Oberhefe S B II wurde bei optimaler Acidität im Temperaturgebiet $50-65^\circ$ bestimmt. Bei der Temperatur 59° sinkt durch einstündige Erhitzung die Aktivität der Saccharase auf die Hälfte des Ausgangswertes; bei dieser Temperatur ist also die Inaktivierungskonstante $k_C = 5 \cdot 10^{-3}$.

4. Bestimmt man die Änderung von k_C mit der Temperatur für die Acidität $p_H = 4,5$, so ergibt sich die Konstante A der Arrheniusschen Temperaturformel, angewandt auf die Inaktivierung der Saccharase zu $101\,000 \pm 3000$.
5. Im Anschluß an diese Bestimmungen wurde die Inaktivierung der Saccharase bei den Aciditäten $p_H = 2,6$ bis $6,8$ im Temperaturgebiet $45-55^\circ$ festgestellt. Das Minimum der Temperaturempfindlichkeit liegt im Aciditätsbereich $p_H = 4-5$, also bei der optimalen Wirkung des Enzyms.

Die Konstante A der Arrheniusschen Temperaturformel ist in dem gleichen Gebiet, in welchem die Temperaturempfindlichkeit am kleinsten ist, also zwischen $p_H = 4$ und 5 , am größten; sie ist in Fig. 3 als Funktion von P_H dargestellt.

6. Die Saccharase aus der bei 25° vorbehandelten Unterhefe zeigt eine geringere Temperaturempfindlichkeit als die Saccharase aus unserer Oberhefe. Der Unterschied beträgt etwa 2° , d. h. die Saccharase aus Unterhefe kann bei gleicher Dauer der Erhitzung auf 2° höher erhitzt werden, um den gleichen Bruchteil ihrer Aktivität zu verlieren.

Die Temperaturkonstante A der Inaktivierung ist für beide Hefen die gleiche.

7. Die Temperaturempfindlichkeit der isolierten Saccharase ist von derjenigen der Saccharase in der Hefenzelle ein wenig verschieden. Die Zelle scheint eine kleine Schutzwirkung auszuüben, welche rund 1 Temperaturgrad ausmacht. Für die Inaktivierung der isolierten Saccharase wurde eine etwas größere Temperaturkonstante A gefunden als für das Enzym in der Zelle.
8. Die größere Stabilität unserer bei 25° vorbehandelten Unterhefe im Vergleich zur Oberhefe rührt nicht davon her, daß erstere Schutzstoffe enthält, welche die Inaktivierung hemmen. Denn durch Zusatz eines auf 60° erhitzten Saftes aus dieser Unterhefe wird die Stabilität der Oberhefe nicht vergrößert.

9. Die Schutzwirkung des Rohrzuckers wurde bei verschiedenen Aciditäten bestimmt.
-

Die Mittel zu dieser Untersuchung verdanken wir einer Schenkung von Herrn Direktor Ernst Sievert, dem wir auch an dieser Stelle unseren besten Dank aussprechen wollen.
