

# Versuche zur Darstellung hochaktiver Saccharasepräparate.

## 2. Mitteilung<sup>1)</sup>.

Von

**Olof Svanberg.**

Mit 3 Figuren im Text.

(Aus dem biochemischen Laboratorium der Hochschule Stockholm.)

(Der Redaktion zugegangen am 13. Januar 1920.)

### Inhalt:

I. Die Vorbehandlung der Hefe S. 66. — II. Die Autolyse der Hefe und die Inversionsfähigkeit des Autolysesaftes S. 72. — III. Die Darstellung der Enzymlösungen 3F durch Alkoholfällung S. 75. — IV. Kaolinadsorption S. 85. — V. Quantitative Zusammensetzung der Enzymlösungen nach Kaolinbehandlung S. 86. — VI. Dialyseversuche S. 90. — VII. Zusammenfassung S. 92. — Beilagen S. 94.

### Neue Saccharasepräparate aus der untergärigen Hefe der Grönwalls-Brauerei.

Unsere früheren Versuche, hochaktive Saccharasepräparate aus in der Brauerei durch viertägige Vorbehandlung hochgezüchteter Hefe darzustellen, wurden in dieser Arbeit wiederholt und ergänzt. So wurden die bei der Vorbehandlung der Hefe gleichzeitig mit der Saccharasebildung auftretenden quantitativen Veränderungen der Gärungsenzyme, des Zymasegehalts der Zellen, festgestellt. Weiter wurde, um möglichst große Ausbeute an enzymreichem Material zu gewinnen, in der vor-

<sup>1)</sup> Die erste Mitteilung (H. Euler und O. Svanberg) befindet sich in dieser Zeitschrift Bd. 107, S. 269 (1919), auf die ich bezüglich der älteren Literatur, der Methoden sowie der rationellen Definitionen der Aktivität und der Inversionsfähigkeit hinweisen kann.

liegenden Arbeit die bei der Autolyse eintretende zeitliche Verteilung der Saccharasewirkung und Inversionsfähigkeit (Wirkung pro Gramm Trockensubstanz) zwischen Heferückständen und Autolysesaft messend verfolgt. Wir hatten nämlich bei unseren früheren Versuchen gefunden, daß die recht gleichmäßige Verteilung des Enzyms zwischen Hefebrei und Autolysesaft erst bei der fortschreitenden Autolyse nach der Verflüssigung der (abgepreßten) Hefe allmählich einsetzt<sup>1)</sup>. Die bei den Filtrationen der autolysierten Hefe erhaltenen Hefereste wurden in dieser Arbeit nochmals mit destilliertem Wasser extrahiert und die so gewonnenen Extraktionssäfte in derselben Weise wie die Autolysesäfte durch fraktionierte Alkohol-fällung einer ersten Reinigung unterworfen; die dabei erhaltenen Enzym-lösungen waren recht nahe von derselben Aktivität pro Gramm Trockensubstanz wie die aus den ersten bzw. zweiten Autolysesaftfraktionen erhaltenen Lösungen.

### I. Die Vorbehandlung der Hefe und die gleichzeitige Änderung des Saccharase- und Zymasegehaltes.

Es wurden wie bei der früheren Gelegenheit<sup>2)</sup> 80 l Rohhefe aus dem Gärkeller (etwa 20 kg abgepreßter, 30%iger Hefe entsprechend) während vier Tagen in der Brauerei bei den für die Saccharasebildung optimalen, hohen Temperaturbedingungen mit 100 l Würze und 50 kg Rohrzucker nach dem untenstehenden Schema vorbehandelt.

Die bei diesem Versuch erhaltene Ausgangshefe hatte bereits mehrere Gärungsführungen in der Grönwalls-Brauerei mitgemacht; sie stammte ursprünglich aus Hamburgerbryggeriet zu Stockholm. Bei dem früheren Versuch war die Hefe aus der St. Eriks-Brauerei bezogen worden.

#### Schema der Vorbehandlung der Hefe:

1. Tag.	100 l (ca. 15 %) Stammwürze,	10 kg Rohrzucker,	28°
2. "	0,75 kg Ammonphosphat,	15 " "	28°
3. "	0,75 " "	15 " "	26°
4. "	0,5 " "	10 " "	25°

<sup>1)</sup> Euler und Svanberg, loc. cit. S. 297.

<sup>2)</sup> Euler und Svanberg, Diese Zeitschr. Bd. 106, S. 201 (1919).

Die Acidität dürfte während der Vorbehandlung recht nahe mit den optimalen Aciditätsbedingungen der Saccharasebildung übereingestimmt haben. Die Acidität der Stammwürze betrug  $p_H = 5,68$ , das Ammonphosphat reagierte ganz leicht alkalisch,  $p_H$  etwa 7,5. Andererseits wurde das Säurebildungsvermögen der Hefe in Würze auch in drei Tagen nie größer als  $p_H = 4$  gefunden<sup>1)</sup>. Die Optimalbedingungen der Saccharasebildung werden aber durch  $p_H = 5$  bis  $p_H = 6$  definiert, aber noch bei  $p_H = 4$  bzw.  $p_H = 7$  tritt eine kräftige Enzymbildung von etwa 90 % der bei optimaler Acidität beobachteten ein<sup>2)</sup>.

Am Morgen jedes Tages der Vorbehandlung wurden die ausgegorenen Flüssigkeiten größtenteils abgehebert und der Bodensatzhefe kleine Proben entnommen, die unter Ermittlung der absoluten Zellenzahlen in der Thoma-Zeisschen Rechenkammer auf Inversions- und Gärungsvermögen quantitativ untersucht wurden.

Die Inversionsversuche wurden wie in unseren früheren Arbeiten bei  $18-18,5^\circ$  ausgeführt. 4,8 g Rohrzucker wurden in 49 ccm dest. Wasser + 10 ccm 4%iger  $KH_2PO_4$ -Lösung mit etwa 1 ccm Hefebrei invertiert. Wie früher wurden die Inversionskonstanten durch Polarisierung der von Zeit zu Zeit entnommenen und mit Soda vermischten Proben erhalten (zu 10 ccm 1-normal = 5% Sodalösung 10 ccm der Probe).

Die Zymaseversuche wurden in der folgenden Lösung ausgeführt:

- 6 g Rohrzucker,
- 10 ccm 4%ige  $KH_2PO_4$ -Lösung,  $p_H = 4,4^3)$ ,
- 120 ccm Wasser,
- 10 ccm Hefebrei.

Die Lösungen befanden sich in 300 ccm-Erlenmeyerkolben, die mit Kohlensäurebüretten verbunden waren. Die

<sup>1)</sup> Svanberg, Zeitschr. techn. Biol. Bd. 8 (2) Heft 1 (1920).

<sup>2)</sup> Euler und Svanberg, Diese Zeitschr. Bd. 106, S. 239 (1919).

<sup>3)</sup> Über die optimalen  $p_H$ -Bedingungen der Hefegärung vgl. Euler und Heintze, Svenska Vet.-Akad. Arkiv för Kemi, Bd. 7, No. 21 (1919), sowie Diese Zeitschr. Bd. 108, S. 165 (1919).

Kolben wurden bei der Gärung im Wasserthermostaten bei  $27^{\circ} \pm 0,2^{\circ}$  konstant gehalten und vor dem Zusatz der Hefe auf die richtige Temperatur gebracht. Sämtliche Gärversuche wurden mit drei Parallelproben ausgeführt, wobei sich die einzelnen Ablesungen nur um  $< 4\%$  von den Totalwerten unterschieden.

Es werden in der Tabelle unter Kubikzentimeter  $\text{CO}_2$  deshalb nur die Mittelwerte der drei Versuche mitgeteilt. Nach den Gärungen wurden die Zellenzahlen in der Weise ermittelt, daß von der Gärflüssigkeit 10 ccm mit 90 ccm  $\frac{1}{10}$  norm. Schwefelsäure vermischt wurden, worauf die Zellen in diesen Verdünnungen direkt unter dem Mikroskop gezählt wurden.

Die Resultate waren die folgenden:

Inversionsvermögen  
(Saccharasegehalt der Zellen).

Hefemenge bei dem Versuch; absolute Zellenzahl		Inversions- konstante, k		Nr. der Bei- lage	Inv. pro Zelle $\frac{\text{k} \cdot \text{g Zucker}}{\text{Zellenzahl}}$	Rel. Ver- stärkung
Ausgangshefe	0,190 $10^{10}$	29	$10^{-4}$	1	$7,3 \cdot 10^{-12}$	1
Nach 1 Tag Vorbehandlung	0,213 $10^{10}$	69	$10^{-4}$	2	$15,5 \cdot 10^{-12}$	2,1
Nach 2 Tagen Vorbehandlung	0,240 $10^{10}$	144	$10^{-4}$	3	$28,8 \cdot 10^{-12}$	3,95
Nach 3 Tagen Vorbehandlung	0,174 $10^{10}$	125	$10^{-4}$	4	$34,5 \cdot 10^{-12}$	4,7
Nach 4 Tagen Vorbehandlung	0,267 $10^{10}$	229	$10^{-4}$	5	$41 \cdot 10^{-12}$	5,6
0,1073 g der Haupt- menge	0,462 $10^9$	34,9	$10^{-4}$	6	$36,2 \cdot 10^{-12}$	5,0

Durch die Vorbehandlung haben wir also in dieser Arbeit eine Steigerung des Saccharasegehalts der Ausgangshefe auf das Fünffache erzielt<sup>1)</sup>.

<sup>1)</sup> Vgl. Diese Zeitschr. Bd. 107, S. 296.

Gärungsvermögen<sup>1)</sup>.  
(Zymasegehalt der Zellen.)

Dauer der Vorbehandlung	Absolute Zellenzahl	Gärdauer in Minuten	ccm CO <sub>2</sub> (Mittel)	Differenz	ccm CO <sub>2</sub> pro Stunde
Unvorbehandelt (Ausgangshefe)	3,4 10 <sup>10</sup>	0	0		
		15	34		
		30	111	77	
		45	194	83	
		60	277	83	
		75	359	82	
		Mittel: 81	324		
1 Tag	3,4 10 <sup>10</sup>	0	0		
		15	38		
		30	108	70	
		45	187	79	
		60	269	82	
		75	349	80	
		Mittel: 78	312		
2 Tage	3,2 10 <sup>10</sup>	0	0		
		15	39		
		30	92	(53)	
		45	157	65	
		60	229	72	
		75	305	76	
		90	382	77	
		105	459	77	
Mittel: 73	292				
3 Tage	3,0 10 <sup>10</sup>	0	0		
		15	43		
		30	96	(53)	
		45	155	69	
		60	219	64	
		75	283	64	
		90	350	67	
		105	412	62	
		120	478	66	
		Mittel: 65	260		
4 Tage	2,95 10 <sup>10</sup>	0	0		
		15	45		
		30	122	(77)	
		45	203	81	
		60	290	87	
		75	406	116	
		90	497	91	
		Mittel: 94	376		

<sup>1)</sup> Die Ausführung dieser Versuche verdanke ich Herrn Cand. phil. K. Sjöberg.

Dauer der Vorbehandlung	I Absolute Zellenzahl · 10 <sup>-10</sup>	II ccm CO <sub>2</sub> pro Stunde	II : I	Relative Verstärkung
Unvorbehandelt	3,4	324	95	1
1 Tag	3,4	312	92	0,97
2 Tage	3,2	292	91	0,96
3 Tage	3,0	260	87	0,92
4 Tage	2,95	376	127	1,34

Während durch die Vorbehandlung die Inversionsfähigkeit der Hefe stetig bis auf den 5,6-fachen Wert stieg, wurde das Gärvermögen nur auf das 1,34-fache erhöht, und zwar mit einem einzigen Sprung; wahrscheinlich handelt es sich betreffend der Veränderungen des Gärvermögens nur um eine ziemlich unreproduzierbare Wirkung der für die Hefe ungünstig hohen Temperatur.

Im allgemeinen bestätigen diese Zahlen das Ergebnis von Kullberg<sup>1)</sup>, welcher allerdings nur viel geringere Saccharasebildung erzielt hatte.

Andererseits muß hervorgehoben werden, daß die vorbehandelte saccharasereiche Hefe nicht in dem Sinne „gärungsmüde“ ist, wie wir wegen der überaus schnell einsetzenden Verflüssigung der bis etwa 30 % Trockensubstanz abgepressten Hefe früher angenommen haben<sup>2)</sup>. Diese sehr schnell und kräftig einsetzende Autolyse unserer vorbehandelten Hefe erinnert an das Resultat, das Euler mit Dernby<sup>3)</sup> nach einer ähnlichen Vorbehandlung der Hefe gewonnen hat, daß durch eine solche Vorbehandlung die Wirkung der protelytischen Hefenzyme, oder wenigstens eine Gruppe derselben, wesentlich ansteigt. Diese vorläufigen Resultate sollen bald näher studiert werden.

Euler und Kullberg<sup>4)</sup> berechneten in einer Arbeit das Verhältnis Inversionskonstante : Gärungskonstante bei lebenden Hefen, unter der Vor-

<sup>1)</sup> Kullberg, Diese Zeitschr. Bd. 92, S. 340 (1914).

<sup>2)</sup> Euler und Svanberg, Diese Zeitschr. Bd. 107, S. 297 (1919).

<sup>3)</sup> Euler und Dernby, Diese Zeitschr. Bd. 89, S. 408 (1914).

<sup>4)</sup> Euler und Kullberg, Diese Zeitschr. Bd. 71, S. 27 (1911).

aussetzung, daß die Gärung monomolekular erfolgt, was jedoch nur im Anfang der Gärung zutrifft, da die Kohlensäureentwicklung bei einer gegebenen Hefemenge innerhalb recht weiter Grenzen der Zuckerkonzentration geradlinig, d. h. mit konstanter Geschwindigkeit, vor sich geht. Für eine Stockholmer Brauhefe wurde von Kullberg gefunden:

	Inversionskonstante
	Gärungskonstante
bei 2 g ( 8%) Rohrzucker	170
bei 4 g (16%) Rohrzucker	90

Rechnen wir die in dieser Arbeit erhaltenen Zahlenwerte auf 2 g Zucker und die gleiche Hefemenge  $1 \cdot 10^{10}$  Zellen um, so erhalten wir für die unvorbehandelte Ausgangshefe:

$$\text{Inversionskonstante} = \frac{7,3 \cdot 10^{-12} \cdot 1 \cdot 10^{10}}{2} = 365 \cdot 10^{-4} \text{ bei } 18^\circ, \text{ entspr. etwa } 750 \cdot 10^{-4} \text{ bei } 27^\circ.$$

Gärungskonstante:

Zeit Min.	g unvergorener Zucker	Gärungs- konstante
0	2	
60	$2 - 2 \cdot \frac{324 \cdot 44}{3,4 \cdot 24000} = 2 - 0,35 = 1,65$	14,0 $10^{-4}$
120	$2 - 0,70 = 1,30$	(15,6 $10^{-4}$ )

Wir erhalten also für  $27^\circ$  und 2 g Zucker:

$$\frac{\text{Inversionskonstante}}{\text{Gärungskonstante}} = \frac{750}{14} = 54.$$

Das Verhältnis der Konstanten fiel also diesmal recht viel kleiner aus. Dies ist damit erklärlich, daß Euler und Kullberg im allgemeinen ungewöhnlich hohen Saccharasegehalt der Hefe fanden, während die Ausgangshefe in dieser Arbeit ein kleineres Inversionsvermögen zeigte, als dem normalen Saccharasegehalt der Brauereiunterhefe H entspricht<sup>1)</sup>. Andererseits haben wir es in dem vorliegenden Falle sicherlich auch mit einer besonders gärkräftigen Hefe zu tun.

Der Vorbehandlung der Hefe in der Brauerei wird dadurch eine Grenze gesetzt, daß sich die Hefe von Tag zu Tag in dem Gärgefäß immer schlechter absetzt — wahr-

<sup>1)</sup> Vgl.: „Saccharasegehalt und Saccharasebildung in der Hefe“, Euler und Svanberg, Diese Zeitschr. Bd. 106, S. 217 (1919).

scheinlich infolge eintretender Autolyse (vgl. oben) — ein Umstand, der die Ausbeute leicht wesentlich vermindern kann. Demnach war es notwendig, das Hochzüchten abubrechen, ehe ein wirkliches Maximum des Saccharasegehalts der Hefe erreicht worden war, und bot die Abpressung der Hefe aus der dünnflüssigen Suspension recht erhebliche Schwierigkeiten.

Es wurden diesmal 15,5 kg Hefe von 30,4% Trockensubstanzgehalt erhalten.

Ob Veränderungen in der Wahl der Stickstoffquelle während der Vorbehandlung in dieser Hinsicht weitere Fortschritte für die biologisch-präparative Saccharasebildung der Hefe mitführen können, ohne zugleich die Eigenschaften der aus der Hefe erhaltenen Autolysesäfte bzw. Extrakte in unvorteilhafter Richtung (wie verminderte Fällbarkeit des Enzyms, höherer Gehalt an Hefegummi oder proteolytische Enzyme usw.) zu beeinflussen, wurde noch nicht erörtert.

Wir sind Herrn Disponenten Karl A. Hagen sowie Herrn Braumeister A. Dessel bei Grönwalls Brauerei wieder für ihre freundliche Unterstützung zu Dank verpflichtet.

## II. Die Autolyse der Hefe und die Inversionsfähigkeit des Autolysesaftes.

Die auf 30,4% Trockengewicht in der Brauerei abgepreßte, vorbehandelte Hefe wurde in drei Portionen geteilt: A, B und C; (B und C gleich groß, A etwa 25% kleiner) und unter Zusatz von Toluol sich selbst der Autolyse bei Zimmertemperatur (15—16°) überlassen. Es trat sehr schnelle Verflüssigung der Hefe unter starkem Schäumen (Selbstgärung) ein, so daß bereits nach zwei Tagen eine kleine Probe eines klaren Autolysesaftes abfiltriert und untersucht werden konnte. Es wurde von Tag zu Tag der Saccharasegehalt (Inversionskonstante pro ccm bei 4,8 g Zucker, + 18,5° und  $p_H$ -Optimum) des Saftes und dessen Gehalt an Trockensubstanz quantitativ untersucht. Aus den diesbezüglichen Werten wurde die Inversionsfähigkeit des Extraktes pro g Trockensubstanz, also der Quotient

$$I_f = \frac{k \cdot g \text{ Zucker}}{g \text{ Trockensubstanz}}$$

berechnet. Aus  $I_f$  wurde die O'Sullivan-Tompsonsche Minutenzahl für „Nullrotation“ bei 4 g Zucker und 0,05 g Präparat und  $18,5^\circ$  berechnet aus der Formel

$$t = \frac{46,2}{I_f}; \pm 0^\circ = t \text{ Min.}$$

Die Resultate sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt worden:

Hefe-Saft	Autolyse-dauer Tage	Inversions-konstante von 1 ccm bei 4,8 g Zucker $k \cdot 10^4$	Nr. der Beilage	Trocken- substanz %	$I_f$	$\pm 0^\circ$ = t Min.
A	2	59	7	8,10	0,35	132
A	3	100	8	9,90	0,485	95
A	4	150	9	11,3	0,64	72
A	5	218	10	12,65	0,83	56
A	6	251	11	13,45	0,895	51,5
A	7	295	12	14,15	1,00	46
A	8	321	13	14,6	1,05	44
C	14	432	21	15,9	1,30	36
C	21	452	22	16,45	1,32	35

Die drei Figuren zeigen die zeitlichen Veränderungen des Saccharasegehalts, der Trockensubstanz und der Wirksamkeit

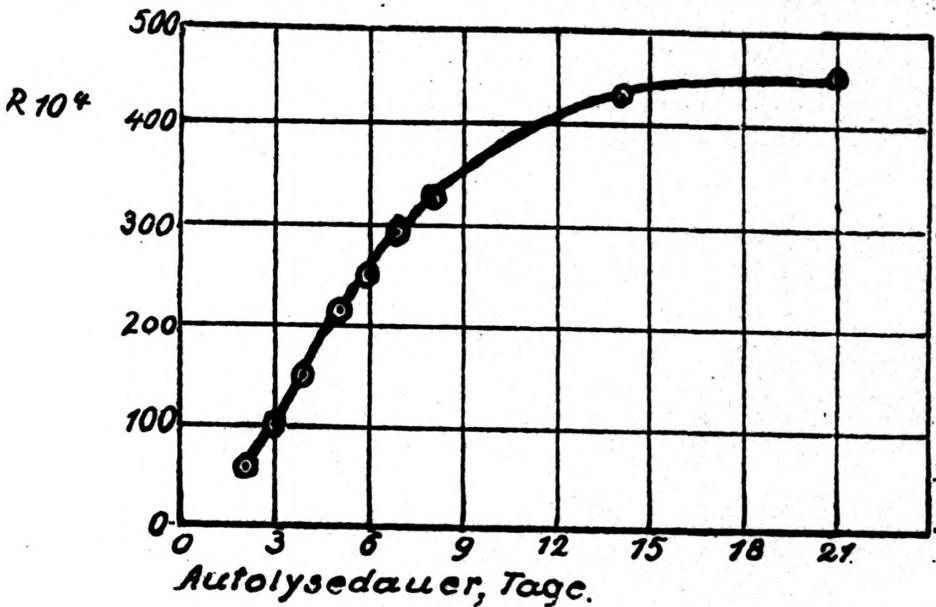


Fig. 1.

pro g Trockengewicht des Saftes während der Autolyse. Dem relativ langsamen Übergang des Enzyms aus dem Hefebrei in den Saft entspricht dessen großes Molekulargewicht und langsame Diffusion.

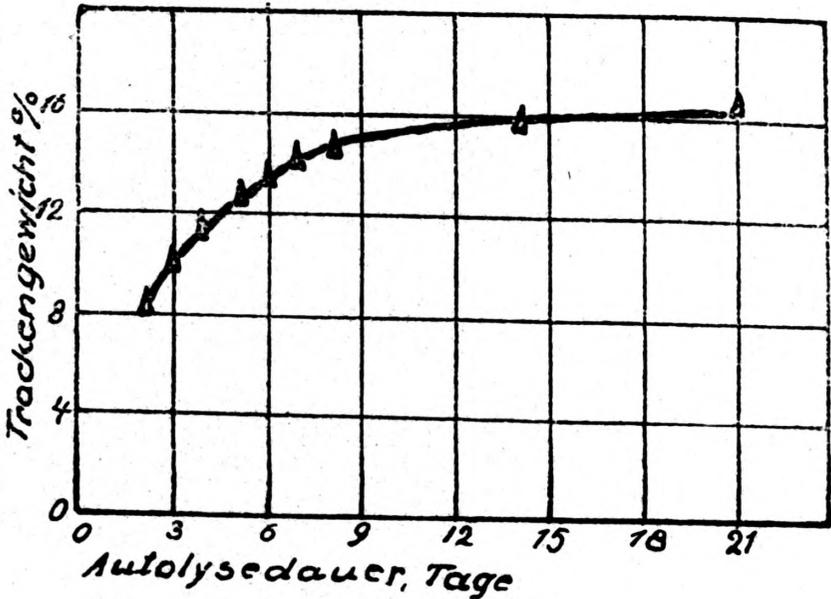


Fig. 2.

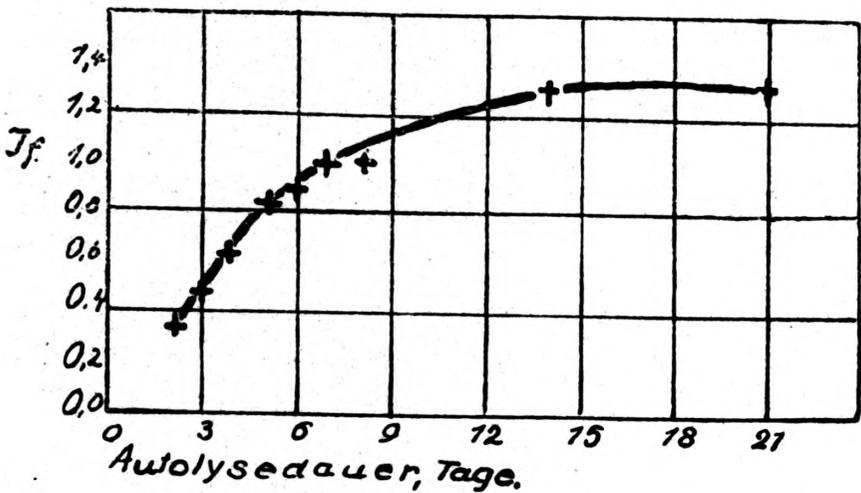


Fig. 3.

Um hier einen Hinweis auf die Effektivität der angewendeten Methodik der Saccharaseanreicherung der Hefe zu geben, soll bemerkt werden, daß schon der Autolysesaft unserer hochgezüchteten Hefe pro g Trockengewicht ebenso oder gar

stärker aktiv ist als die besten Präparate mehrerer älterer Forscher (O'Sullivan und Tompson:  $\pm 0^\circ = 25$  Min. bei  $20^\circ$ ; Mathews und Glenn:  $\pm 0^\circ = 35-50$  Min.) sowie unser aus der Oberhefe SB erhaltenes ältestes Präparat ( $\pm 0^\circ = 29$  Min. bei  $18^\circ$ ).

### III. Die Darstellung der Enzymlösungen 3F durch Alkoholfällung.

Wie in unserer früheren Arbeit wurde eine erste Reinigung des Enzyms durch fraktionierte Fällung der Autolysesäfte mit Alkohol vorgenommen.

#### Saft A.

Darstellung von 3F1, 3F2 und 3F3.

Nach achttägiger Autolyse wurde die erste Hauptmenge (A) der verflüssigten Hefe durch 26 doppelte Faltenfilter abfiltriert, wobei erhalten wurden:

500 ccm Autolysesaft, klar, dunkelbraun; Acidität  $p_H = 5,4$ . 1 ccm gab bei 4,8 g Zucker  $k = 0,0321$  (Beil. 13) Trockensubstanz 14,6% (reichliche Ausscheidung von Eiweiß bei Erhitzen)

$I_f = 1,05; \pm 0^\circ = 44$  Min.

Die breiigen Rückstände wurden mit 500 ccm destillierten Wassers verrührt.

1. 250 ccm des Autolysesaftes wurden direkt bei der ursprünglichen Acidität mit Alkohol bis 46% gefällt. Es entstand ein flockiger Niederschlag. Der größte Teil der Mutterlauge wurde abfiltriert, der Rest mit destilliertem Wasser (bis 20—25% Alkoholgehalt) aufgeschlemmt und, teilweise unter Rühren, extrahiert, worauf der saccharasehaltige Saft mit Alkohol bis 45% nochmals gefällt wurde. Der Niederschlag wurde abdekantiert und abgesaugt und in destilliertem Wasser gelöst. Dabei wurden erhalten:

252 ccm Wasserlösung 3F1. 1 ccm gab bei 4,8 g Zucker  $k = 0,0273$  (Beil. 24). Trockensubstanz 1,85%.

$I_f = 7,1; \pm 0^\circ = 6,5$  Min.

## Berechnung der Ausbeute.

	k · 10 <sup>4</sup>	Vol · k	Trockensubstanz	
			%	g
250 ccm Autolysesaft A . .	321	8,03	14,6	36,5
252 ccm Wasserlösung 3 F 1 .	273	6,89	1,85	4,65
	Ausbeute: 86%			

2. 235 ccm des Autolysesaftes wurden zur Prüfung der Alkoholfällbarkeit des Enzyms bei einer geringeren Acidität mittels 15 ccm 2-n. NaOH von  $p_H = 5,4$  bis  $p_H = 6,4$  gebracht. Der Saft wurde nun genau wie bei 1 mit Alkohol behandelt. Dieser Versuch fiel insofern negativ aus, als bei der natürlichen Acidität (5,4) des Saftes sowohl größere Enzymausbeute (bessere Fällbarkeit bzw. geringere Zerstörung) als weitgehendere Reinigung (größere Aktivität pro g Trockengewicht) erzielt worden war. Es wurden nämlich erhalten:

72 ccm Wasserlösung 3 F 2. 1 ccm gab bei 4,8 g Zucker  $k = 0,0203$  (Beil. 25). Trockensubstanz 1,95%.

If = 5,0;  $\pm 0^\circ = 9,25$  Min.

73 ccm Wasserlösung 3 F 3. 1 ccm gab bei 4,8 g Zucker  $k = 0,0304$  (Beil. 26). Trockensubstanz 3,60%.

If = 4,05;  $\pm 0^\circ = 11,4$  Min.

## Berechnung der Ausbeute:

	k · 10 <sup>4</sup>	Vol · k	Trockensubstanz	
			%	g
235 ccm Autolysesaft A . .	321	7,55	14,6	34,3
72 ccm Wasserlösung 3 F 2 .	203	1,46	1,95	1,40
73 ccm Wasserlösung 3 F 3 .	304	2,22	3,60	2,52
	Ausbeute: 3,68			
	, 49%			

Dieser Versuch zeigt also im Vergleich mit 1, daß es weniger vorteilhaft ist, die Saccharase bei  $p_H = 6,4$  als bei  $p_H = 5,4$  zu fällen. Bei einem weiteren Versuch (siehe Saft B) wurde ein vorteilhafteres Resultat durch Fällern bei  $p_H = 5,4$

als nach Säureausscheidung der Eiweißstoffe bei  $p_H = 4,45$  erhalten. Es ist also  $p_H$  etwa 5,4 die für die Alkoholfällung der Saccharase zweckmäßigste Acidität.

Es wurden mit der Wasserlösung 3F1 weitere Versuche angestellt, die Saccharase durch erneute Ausscheidung mit Aceton-Glyzerin sowie mit Alkohol und Alkohol-Äthylacetat zu reinigen (Darstellung der Lösungen 3F1, 2, 3F1, 3 und 3F1, 4). Dabei wurde aber nur das Resultat bestätigt, daß man „durch zwei aufeinanderfolgende Alkoholfällungen nach dieser Methode praktisch zu einer Grenze der Reinigung des Autolysesaftes kommt“<sup>1)</sup>.

### Saft A.

#### Darstellung von 3F $\alpha$ 3.

Die breiigen Heferückstände des vorigen Autolysesaftes wurden, wie erwähnt, mit 500 ccm destillierten Wassers verührt. Nach acht Tagen wurde eine kleine Probe filtriert und der Saft untersucht:

1 ccm Saft gab bei 4,8 g Zucker  $k = 0,0363$  (Beil. 14a). Trockensubstanz 13,8%.

$$If = 1,26; \pm 0^{\circ} = 37 \text{ Min.}$$

Die Hauptmenge wurde indessen erst nach 22 Tagen Extraktion filtriert:

750 ccm Extraktionssaft. 1 ccm gab bei 4,8 g Zucker  $k = 0,0352$  (Beil. 14b). Trockensubstanz 15,4%.

$$If = 1,10; \pm 0^{\circ} = 42 \text{ Min.}$$

Aus diesem Saft wurden durch fraktionierte Alkoholfällung dargestellt:

275 ccm Wasserlösung 3F $\alpha$ 3. 1 ccm gab bei 4,8 g Zucker  $k = 0,0716$  (Beil. 27). Trockensubstanz 5,15%.

$$If = 6,7; \pm 0^{\circ} = 6,9 \text{ Min.}$$

#### Berechnung der Ausbeute:

	$k \cdot 10^4$	Vol. $\cdot k$	Trockensubstanz	
			%	g
750 ccm Extraktionssaft A	352	26,4	15,4	115
275 ccm Wasserlösung 3F $\alpha$ 3	716	19,7	5,15	14
		Ausbeute: 75%		

<sup>1)</sup> Euler und Svanberg, Diese Zeitschr. Bd. 107, S. 282 (1919).

**Saft A.****Darstellung von 3F $\alpha$ 4.**

Die Hefereste A wurden nochmals gesammelt und mit destilliertem Wasser extrahiert. Nach 30 Tagen Extraktion wurden abfiltriert:

1150 ccm Saft A. 1 ccm gab bei 4,8 g Zucker  $k = 0,0194$  (Beil. 15).  
Trockensubstanz 10,95 %.

$I_f = 0,85; \pm 0^\circ = 54$  Min.

Durch zwei Alkoholfällungen wurden erhalten:

195 ccm Wasserlösung 3F $\alpha$ 4. 1 ccm gab bei 4,8 g Zucker  $k = 0,0830$   
(Beil. 28). Trockensubstanz 5,64 %.

$I_f = 7,05; \pm 0^\circ = 6,6$  Min.

**Berechnung der Ausbeute:**

	k · 10 <sup>4</sup>	Vol · k	Trockensubstanz	
			%	g
1150 ccm Saft A . . . . .	194	22,3	10,95	126
195 ccm Wasserlösung 3F $\alpha$ 4	830	16,2	5,65	11
	Ausbeute: 73 %			

**Saft B.****Darstellung von 3F $\beta$ 1 und 3F $\beta$ 2.**

Die Hauptmenge B wurde schon nach dreitägiger Autolyse filtriert:

1000 ccm Autolysesaft B. 1 ccm gab bei 4,8 g Zucker  $k = 0,00684$   
(Beil. 16). Trockensubstanz 8,63 %.

$I_f = 0,38; \pm 0^\circ = 122$  Min.

Dieser Saft war also ein besonders saccharasearmer Vorlauf. Es wurde also damit eine ganze erste Fraktion der leichtlöslichsten Extraktivstoffe ohne erhebliche Enzymverluste von der Hefe abgetrennt.

Die breiigen Rückstände wurden mit 1000 ccm destillierten Wassers verrührt (zur Darstellung von 3F $\alpha$ 1 und 3F $\alpha$ 2).

Die 1000 ccm des schwachen Saftes wurden zu den folgenden vergleichenden Versuchen verwendet:

1. Darstellung der Wasserlösung 3F $\beta$ 1. Das  $p_H$  des ursprünglichen Saftes betrug 5,5. Durch sukzessive Zusätze von

HCl wurde ein Niederschlagsoptimum bei  $p_H$  etwa = 4,5 festgestellt. 500 ccm des Saftes wurden in der von Meisenheimer<sup>1)</sup> bei Hefepreßsaft ausgenutzten Weise mit 31 ccm etwa 1-n HCl gemischt, wodurch die Acidität  $p_H = 4,45$  hervorgerufen wurde. Der Eiweißniederschlag wurde durch doppelte Faltenfilter entfernt, das Filtrat war anfangs ganz klar, trübte sich aber allmählich ziemlich stark — die Trübung wurde durch kleine Zusätze von HCl (in besonderen Proben) nicht mehr beschleunigt —. Durch 24stündige Adsorption mit Kaolin wurden die Eiweißstoffe gründlich entfernt, wobei ein bleibend klarer Saft erhalten wurde, der sich auch bei Erwärmen nur wenig trübte:

450 ccm enteiweißter Autolysesaft. 1 ccm gab bei 4,8 g Zucker  $k = 0,0059$  (Beil. 16 b). Trockensubstanz 7,22 %.

$$I f = 0,384; \pm 0^0 = 120 \text{ Min.}$$

Durch die Säureausfällung und die Kaolinadsorption war also ein erheblicher Anteil (8,63—7,22 %) der Trockensubstanz des Autolysesaftes entfernt worden, ohne aber daß sich gleichzeitig die Inversionsfähigkeit entsprechend verbesserte. Es waren mit andern Worten gleichzeitig Enzymverluste eingetreten ( $k$  von 68,5 bis  $59 \cdot 10^{-4}$  gesunken).

Aus dem enteiweißten Autolysesaft wurde durch zweimalige Alkoholfällung und Wiederauflösen die Wasserlösung 3 F  $\beta$  1 dargestellt:

150 ccm Wasserlösung 3 F  $\beta$  1. 1 ccm gab bei 4,8 g Zucker  $k = 0,0089$  (Beil. 29). Trockensubstanz 1,3 %.

$$I f = 3,29; \pm 0^0 = 14 \text{ Min.}$$

2. Zum Vergleich mit diesem ziemlich umständlichen Verfahren wurde aus 440 ccm des ursprünglichen, nicht enteiweißten Autolysesaftes die Saccharase mit Alkohol zweimal direkt ausgeschieden. Dieses Verfahren gab das folgende Resultat:

<sup>1)</sup> Meisenheimer, Gambarjan und Semper, Biochem. Zeitschr. Bd. 54, S. 109 (1913).

160 ccm Wasserlösung 3 F  $\beta$  2. 1 ccm gab bei 4,8 g Zucker  $k = 0,0077$   
(Beil. 30). Trockensubstanz 0,90 %.

$$I f = 4,1; \pm 0^0 = 11,3 \text{ Min.}$$

Das alte, von O'Sullivan und Tompson angegebene, direkte Alkoholfällungsverfahren scheint also — wenigstens wo es sich um Autolysesäfte handelt — besser geeignet als Meisenheimers.

### Saft B.

Darstellung von 3 F  $\alpha$  1 und 3 F  $\alpha$  2.

Den Verlauf der Saccharaseextraktion aus den Heferückständen B illustriert die folgende Tabelle:

Extraktionsdauer Tage	Inversions- konstante von 1 ccm bei 4,8 g Zucker $k \cdot 10^4$	Nr. der Bei- lage	Trocken- substanz %	I f	$\pm 0^0 = t \text{ Min.}$
12	476	17	15,45	1,48	31
16	465	18	16,1	1,39	33
16, zweimal gefällt, 3 F $\alpha$ 1	249	31a	2,0	6,0	7,7
22 (Hauptmenge 960 ccm)	468	19	17,5	1,28	36

Aus der Hauptmenge des Extraktionsstoffes wurde durch zwei Alkoholfällungen dargestellt:

375 ccm Wasserlösung 3 F  $\alpha$  2. 1 ccm gab bei 4,8 g Zucker  $k = 0,0751$   
(Beil. 31 b). Trockensubstanz 5,4 %.

$$I f = 6,7; \pm 0^0 = 6,9 \text{ Min.}$$

### Berechnung der Ausbeute:

	$k \cdot 10^4$	Vol $\cdot k$	Trockensubstanz	
			%	g
960 ccm Saft B	468	45	17,5	168
375 ccm 3 F $\alpha$ 2	751	28	5,4	20,2

Ausbeute: 62 %.

**Saft B.**

Darstellung von 3 F α 5.

Die Heferückstände B wurden noch einmal mit Wasser extrahiert, und zwar während 35 Tagen. Das Filtrieren (3 Tage in großen Trichtern) gab:

1000 ccm Extraktionssaft B. 1 ccm gab bei 4,8 g Zucker  $k = 0,0260$  (Beil. 20). Trockensubstanz 13,2 %.

$I f = 0,945; \pm 0^0 = 49$  Min.

Der zweite Extraktionssaft erhielt also pro ccm bedeutend weniger Saccharase als der erste. Durch fraktionierte Alkohol-fällung erhielten wir:

128 ccm Wasserlösung 3 F α 5. 1 ccm gab bei 4,8 g Zucker  $k = 0,1329$  (Beil. 32). Trockensubstanz 11,65 %.

$I f = 5,5; \pm 0^0 = 8,4$  Min.

Berechnung der Ausbeute:

	$k \cdot 10^4$	Vol · k	Trockensubstanz	
			%	g
1000 ccm Saft B	260	26	13,2	132
128 ccm 3 F α 5	1329	17	11,65	14,8

Ausbeute: 65 %.

**Saft C.**

Darstellung von 3 F 5.

Die dritte Hauptmenge (C) der autolysierten Hefe wurde erst nach 21 Tagen in Angriff genommen.

Autolysedauer Tage	Inversions- konstante von 1 ccm bei 4,8 g Zucker $k \cdot 10^4$	Nr. der Bei- lage	Trocken- substanz %	$I f$	$\pm 0^0 = t$ Min.
14	432	21	15,9	1,30	36
21 (Hauptmenge 1025 ccm)	452	22	16,45	1,32	35

Aus der Hauptmenge des Saftes wurden fraktioniert gefällt:

290 ccm Wasserlösung 3 F 5. 1 ccm gab bei 4,8 g Zucker  $k = 0,0843$

(Beil. 33). Trockensubstanz 6,4 %.

$I f = 6,2; \pm 0^{\circ} = 7,45$  Min.

Berechnung der Ausbeute:

	$k \cdot 10^4$	Vol. $k$	Trockensubstanz	
			%	g
1025 ccm Saft C	452	46,4	16,5	169
290 ccm 3 F 5	843	24,4	6,4	18,5

Ausbeute 53 %.

Saft C.

Darstellung von 3 F  $\alpha$  6.

Die Heferückstände des vorigen Autolysesaftes wurden 40 Tage mit destilliertem Wasser extrahiert. Es wurden erhalten:

1200 ccm Extraktionssaft C. 1 ccm gab bei 4,8 g Zucker  $k = 0,0267$

(Beil. 23). Trockensubstanz 15,2 %.

$I f = 0,845; \pm 0^{\circ} = 55$  Min.

Hieraus wurde durch zwei aufeinanderfolgende Alkoholfällungen dargestellt:

155 ccm Wasserlösung 3 F  $\alpha$  6. 1 ccm gab bei 4,8 g Zucker  $k = 0,1349$

(Beil. 34). Trockensubstanz 11,4 %.

$I f = 5,7; \pm 0^{\circ} = 8,1$  Min.

Berechnung der Ausbeute:

	$k \cdot 10^4$	Vol. $k$	Trockensubstanz	
			%	g
1200 ccm Saft C	267	32	15,2	183
155 ccm 3 F $\alpha$ 6	1349	21	11,4	17,6

Ausbeute 66 %.

## Übersicht der Ausbeuten der Alkoholfällung.

In dieser Tabelle sind angegeben:

Saccharase,  $k \cdot 10^4$  pro ccm, die monomolekulare Reaktionskonstante, welche 1 ccm in 60 ccm 8%iger Rohrzuckerlösung bei pH-Optimum und 18,5° hervorruft.

Volum  $\cdot k$  ( $k$ , bezogen auf die ganze Präparatmenge),  $k$  multipliziert mit dem Totalvolumen der Lösung. Bildet also einen Ausdruck für den Gesamt-Saccharasegehalt<sup>1)</sup>.

Trockensubstanz in %, sowie die gesamte Trockensubstanz der Lösungen in g.

If, die Aktivitätszahl pro g Trockengewicht:

$$\frac{k \cdot \text{g Zucker (4,8)}}{\text{g Substanz}}$$

$\pm 0^0 = t$  Min. O'Sullivan-Tompsonsche Minutenzahl, berechnet für:

4 g Zucker

0,05 g Enzymtrockensubstanz

18,5°,

$$t = \frac{46,2}{\text{If}} \text{ pH-Optimum.}$$

		Saccharase		Trockensubstanz		If	$\pm 0^0 = t$ Min.
		$k \cdot 10^4$	Vol. $\cdot k$	%	g		
Unvorbehand. Brauereihefe. 80 l Rohhefe							
Inv. pro Zelle:	$7,3 \cdot 10^{-12}$	rund 18	150	7,5	6000	0,12	400
Vorbehandelte Hefe. 15,5 kg							
Inv. pro Zelle:	$36,2 \cdot 10^{-12}$	„ 825	505	30,4	4700	0,515	90
Autolyse- u. Extraktionssäfte.							
Saft A.	500 ccm	321	16,05	14,6	73	1,05	44
	750 ccm	352	26,4	15,4	115	1,10	42
	1150 ccm	194	22,3	10,95	126	0,85	54
Saft B.	1000 ccm	68,5	6,85	8,63	86,3	0,38	122
	960 ccm	468	45	17,5	168	1,28	36
	1000 ccm	260	26	13,2	132	0,945	49
Saft C.	1025 ccm	452	46,4	16,5	169	1,32	35
	1200 ccm	267	32	15,2	183	0,45	55
Summe:			221		1052		

<sup>1)</sup> Vgl. die Angabe des „Menge-Wert-Produkts“ von Willstätter und Stoll, Ann. Bd. 416, S. 28 (1918).

		Saccharase		Trockensubstanz		I f	± 00 = t Min.
		k · 10 <sup>4</sup>	Vol · k	%	g ·		
Zweimal gefällt.							
3 F 1	252 ccm	273	6,89	1,85	4,65	7,1	6,5
3 F 2	72 ccm	203	1,46	1,95	1,40	5,0	9,25
3 F 3	73 ccm	304	2,22	3,60	2,52	4,05	11,4
3 F 5	290 ccm	843	24,4	6,4	18,5	6,2	7,45
3 F α 2	375 ccm	751	28	5,4	20,2	6,7	6,9
3 F α 3	275 ccm	716	19,7	5,15	14	6,7	6,9
3 F α 4	195 ccm	830	16,2	5,65	11	7,05	6,6
3 F α 5	128 ccm	1329	17	11,65	14,8	5,5	8,4
3 F α 6	155 ccm	1349	21	11,4	17,6	5,7	8,1
3 F β 1	150 ccm	89	1,3	1,3	1,95	3,3	14
3 F β 2	160 ccm	77	1,2	0,90	1,45	4,1	11,3
Summe:		139,4		108		Mittel: 6,2 7,45	

Aus dieser Übersicht ersehen wir u. a. folgendes:

Durch die Vorbehandlung der Hefe in der Brauerei ist die Saccharasemenge von 150 bis 505, also auf etwa 340 % der ursprünglichen Menge gesteigert worden. Gleichzeitig ist die Inversionsfähigkeit (Inv. pro Zelle) auf das Fünffache gestiegen.

Die Autolyse der Hefe und die nachfolgende fraktionierte Extraktion der Hefereste mit destilliertem Wasser gaben 7½ l Autolyse- und Extraktionssäfte, worin die Saccharasemenge (Volumen · k pro ccm) 221 = 44 % der gesamten Saccharasemenge der vorbehandelten Hefe vorhanden waren.

(In diesem Punkt haben wir also im Vergleich zu unserer früheren Arbeit einen Fortschritt gemacht, wo wir 21,5 % des Saccharasegehalts der Hefe in für weitere Reinigung verwertbarer Form erhielten.)

Die Alkoholfällungen gaben mit 63 % Ausbeute die Wasserlösungen 3 F, welche also 28 % des Saccharasegehalts der Hefe enthalten. Im Vergleich zu der Saccharasemenge der unvorbehandelten Hefe enthalten diese Wasserlösungen mit ihren 108 g Trockensubstanz beinahe ebensoviel — oder exakter 93 % — wie die 80 l Rohhefe der Brauerei mit 6 kg Trockengewicht.

Die Verbesserung der Aktivität pro g Trockengewicht, d. h. des Reinheitsgrades, geht aus der folgenden approximierten Zusammenfassung hervor:

	Rohhefe	Vorbehandelte Hefe	Autolysesaft	3 F zweimal gefällt
1 f . . .	0,12	0,5	1	6,2
0° Min. .	400	90	45	7,5

#### IV. Kaolinadsorption.

Die durch Lösen der Alkoholfällungen erhaltenen Enzymlösungen waren noch etwas trüb und wahrscheinlich etwas eiweißhaltig. Besonders mit Hinsicht auf unsere Vergiftungsversuche wurden die Hauptmengen unserer Saccharaselösungen mit Kaolin behandelt.

Das Kaolin war einmal mit 0,2-n. HCl, sodann mit destilliertem Wasser ausgekocht.

Zu jeder Saccharaselösung wurde ein dicker Brei, enthaltend etwa 20—30 g Kaolin, hineingerührt und nach ein bis zwei Tagen abfiltriert. Die Filtrate waren kristallklare Lösungen von schön goldgelber Farbe. Sie werden mit Toluol steril gehalten.

Die quantitative Definition der Lösungen nach der Kaolinadsorption ist in folgender Tabelle gegeben.

Lösung	1 ccm gibt bei 4,8 g Zucker $k \cdot 10^4$	Nr. der Beil.	Trockengewicht		1 f	$\pm 0^\circ$ , Min.
			%	g		
3 F 5	778	35	5,6	16,5	6,65	6,9
3 F $\alpha$ 2	648	36	4,6	19,0	6,75	6,85
3 F $\alpha$ 3	655	37	4,35	12,5	7,2	6,4
3 F $\alpha$ 4	730	38	4,95	7,7	7,1	6,5
3 F $\alpha$ 5	1440*)	39	10,65	11,2	6,5	7,1
3 F $\alpha$ 6	1410*)	40	10,9	17,6	6,2	7,45
			Summe:	84,5		
				Mittel:	6,75	6,85

\*) Infolge Verdunstens während der zweitägigen Filtration etwas größer als bei den nicht kaolinbehandelten Lösungen (siehe voriges Kapitel).

Durch die Kaolinadsorption wurde nur etwa 10% an Enzym verloren. Etwa ebensoviel wurde an Aktivität pro g Trockengewicht gewonnen.

### A n h a n g.

Saccharasedarstellung aus Hefepreßsaft. 100 g der frischen, in der Brauerei vorbehandelten und abgepreßten Hefe wurden mit Kieselgur, Sand und etwas Chloroform gerieben und fast zur Trockenheit gepreßt. Es wurden 55 ccm grauer, undurchsichtiger Saft gewonnen, welcher Hefeflocken noch enthielt und mit Kaolin geklärt wurde. Nach Absaugen des Kaolins wurde erhalten:

52 ccm hellgelber Saft. 1 ccm gab bei 4,8 g Zucker  $k = 0,0032$  (Beil. 41), entsprechend etwa 5% des Saccharasegehalts der verwandten Hefe. Trockensubstanz 1,1,%.  $1 f = 1,40$ ;  $\pm 0^\circ = 33$  Min.

Durch Alkohol-fällung wurde hieraus hergestellt:

32 ccm Lösung B. 1 ccm gab bei 4,8 g Zucker  $k = 0,0015$  (Beil. 42). Trockensubstanz 0,113%.  $1 f = 6,37$ ;  $\pm 0^\circ = 7,3$  Min.

Es wurde also auch in dieser Weise ein ziemlich hochaktives Präparat gewonnen, jedoch in sehr unbefriedigender Ausbeute.

Haltbarkeit der Saccharaselösungen bei Zimmertemperatur.

Die besonders große Haltbarkeit von Saccharasepräparaten ist schon früher hervorgehoben. Hier seien einige Zahlen, die wir an unseren älteren Wasserlösungen erhielten, mitgeteilt:

Januar—Februar 1919		Oktober 1919		
0,5 ccm gab bei 4,8 g Zucker		0,5 ccm	1 ccm	Mittel (für 0,5 ccm)
Lösung 3b	$k = 172$	158	$2 \times 154$	156
3H	265	283	$2 \times 253$	268

(Beilagen 43—46.)

## V. Quantitative Zusammensetzung der Saccharaselösungen nach Kaolinbehandlung.

### 1. Kohlenhydratgehalt.

Der größte Teil des Trockengewichts der Saccharaselösungen besteht aus Kohlenhydrat, dem Hefegummi. Die Er-

kennung des Hefegummi gelingt bekanntlich leicht mittels der speziellen Reaktion, Koagulation in alkalischer Kupferlösung. Den Hefegummi mittels dieses Reagens aus den Saccharaselösungen zu entfernen gelang uns aber nicht, zumal da der Gummi nicht in ammoniakalischer oder nur schwach alkalischer Kupferlösung ausfällt, sondern erst bei Gegenwart großer Mengen NaOH, wie z. B. in der Lösung von Bertrand, wo aber die Saccharase irreversibel zerstört wird<sup>1)</sup>.

Die quantitative Bestimmung der höheren Kohlenhydrate geschah durch Hydrolyse mit Schwefelsäure (die Saccharaselösungen reduzieren alkalische Kupferlösung auch in der Hitze nicht) und Reduktionsanalyse nach Bertrand<sup>2)</sup>.

5 ccm der betr. Lösung wurden mit etwa 15 ccm Wasser und 1 ccm konz. Schwefelsäure in einem 50 ccm-Meßkolben vermischt und 5 Stunden in einem siedenden Wasserbade gehalten. Nach dem Erkalten wurde zur Marke mit destilliertem Wasser verdünnt und je 10 ccm in 3 Zuckeranalysen nach Bertrand untersucht.

5 ccm 3 F 5 (Trockensubstanz 0,280 g) gaben durch Hydrolyse

5 · 39,3
38,8
<u>37,8 mg</u> Hexose, als Glukose berechnet.

Mittel: 38,6 oder 69% Glukose.

5 ccm 3 F α 2 (Trockensubstanz 0,230 g):

5 · 33,8
33,0
<u>33,8 mg</u>

Mittel: 33,5, 73% Glukose.

5 ccm 3 F 3 (Trockensubstanz 0,218 g):

5 · 32,2
32,5
<u>33,0 mg</u>

Mittel: 32,6, 74,8% Glukose.

<sup>1)</sup> Vgl. Euler und Svanberg, Diese Zeitschr. Bd. 107, S. 292 (1919).

<sup>2)</sup> Die Ausführung der Analysen verdanke ich Herrn Cand. phil. A. Hedelius.

Gleichzeitig haben wir den Kohlenhydratgehalt eines älteren Präparates, Trockenpräparat 3G, untersucht:

0,2478 g 3G gab durch Hydrolyse:

5 · 34,9

34,3

34,3 mg Zucker

Mittel: 34,5, 69,6% Glukose.

Folgende Übersicht zeigt übereinstimmende Kohlenhydratprozentage unserer ältesten Präparate:

	Glukose %	lf
Trockenpräparat A	63	1,00
„ H	61	3,38

Nach Euler und Fodor<sup>1)</sup> geben 3,2 g Hefegummi bei der Hydrolyse 3,73 g Hexosen, als Glukose berechnet. Der Hefegummigehalt würde demnach 86% der für Glukose gefundenen Prozentzahlen ausmachen.

In unseren neuen Saccharaselösungen mit den oben gefundenen Kohlenhydratgehalten 69–74,8% als Glukose beträgt der Hefegummigehalt pro g Trockengewicht demnach 59,5–64,5%.

## 2. Stickstoffbestimmungen.

Während die Kohlenhydratgehalte unserer sämtlichen Präparate ziemlich gleich waren, sind die Stickstoffbestimmungen recht verschieden ausgefallen.

Unsere älteren Präparate erhielten die folgenden Stickstoffmengen (nach Kjeldahl):

Trockenpräparat A 1,85% N

„ H 2,67% N

Wasserlösung 3G α 1 2,72% N pro g Trockensubstanz

(Nach Kaolinadsorption).

Unsere neuesten in dieser Arbeit definierten Enzymlösungen hatten einen höheren Stickstoffgehalt. Es wurden die kaolin-

<sup>1)</sup> Euler und Fodor, Diese Zeitschr. Bd. 72, S. 339 (1911).

behandelten Lösungen 3F5 und 3F $\alpha$ 2 untersucht, und zwar sowohl nach der gewöhnlichen als nach der Mikro-Kjeldahl-Methode Bangs<sup>1)</sup>).

Es ergaben die beiden Methoden übereinstimmende Resultate. In der folgenden Tabelle sind einige Analysen nach der Mikromethode zusammengefaßt worden.

1 ccm des Thiosulfats entspricht 1,333 mg N.

	Thiosulfat ccm	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ccm	Thiosulfat- verbrauch	mg N	Mittel
Blindprobe . . . . .	1,810	2,00	0	0	
0,50 ccm 3F5 . . . . .	0,868	2,00	0,942	1,255	1,269
0,50 ccm 3F5 . . . . .	0,848	2,00	0,962	1,282	
0,50 ccm 3F $\alpha$ 2 . . . . .	1,101	2,00	0,709	0,945	0,956
0,50 ccm 3F $\alpha$ 2 . . . . .	1,084	2,00	0,726	0,967	

0,50 ccm 3F5 enthält 28 mg Trockensubstanz: 4,53% N

0,50 ccm 3F $\alpha$ 2 „ 23 mg „ : 4,15% N

Die Stickstoffsubstanzen sind wahrscheinlich größtenteils als Aminosäuren vorhanden. Dies zeigt u. a. die größere

<sup>1)</sup> Beim Ausführen der Mikro-Kjeldahl-Analysen wurde hauptsächlich nach den Anweisungen Bangs gearbeitet. (Siehe Bang: Methoden zur Mikrobestimmung einiger Blutbestandteile, Wiesbaden.) Bang verwendet  $\frac{1}{200}$  n. Titrierflüssigkeit, was aber hier nicht zweckmäßig ist, da es sich meist um Stickstoffmengen von etwa 1 mg handelt.

Die Verbrennung nahm mit 1 ccm 96%iger Schwefelsäure bei Zusatz von 0,5 ccm 4%iger Kupfersulfatlösung (Bertrand 1) 2 Stunden in Anspruch.

In der Vorlage, einem Spitzglas von 50 ccm Volumen, wurden genau 2 ccm 0,1 n. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> abgemessen. Nach der Destillation wurden 2 ccm einer 5%igen Jodkaliumlösung und darauf 4 Tropfen einer 4%igen Kaliumjodatlösung zugefügt. Die Titration mit 0,1-n. Natriumthiosulfatlösung wurde erst 20 Minuten später ausgeführt, wobei die Titrierflüssigkeit einer 2 ccm-Mikrobürette entnommen wurde. Gegen Ende der Titration wurden einige Tropfen 1%iger Stärkelösung zugefügt. Ein recht scharfer Umschlag ist bei Zusatz von etwa  $\frac{1}{500}$  ccm Thiosulfatlösung wahrzunehmen.

Zur Titerstellung der Thiosulfatlösung wurde eine Lösung von Ammonchlorid benutzt, welche genau 1 mg NH<sub>3</sub> pro ccm enthält.

(Hedelius.)

Diffusibilität der Stickstoffsubstanz im Vergleich zu den übrigen Verunreinigungen des Enzyms (vgl. unten).

## VI. Dialyseversuche.

### 1. Mit Kollodiummembran.

Bei unseren früheren Arbeiten hatten wir gefunden, daß die Aktivität der Saccharasepräparate durch Dialyse in ganz dünnen Kollodiumhäutchen ziemlich leicht bis zu 30% gesteigert werden konnte. Die Lösungen nahmen aber bei diesen ersten Versuchen stark an Volumen zu, weshalb wir die Dialyse in dieser Arbeit in geschlossenem Gefäß (unter Selbstdruck) — gegen destilliertes Wasser, das öfters erneuert wurde — ausgeführt haben. Das Kollodiumhäutchen wurde nach Sörensen an einem Glaskragen befestigt, der mit einem gewöhnlichen Gummistopfen verschlossen wurde. Der Dialysator faßte 25 ccm und war ganz dicht, was durch Eintauchen im Wasser des mit Wasserstoffgas prall angefüllten kleinen Apparates geprüft wurde. Es wurden bei dieser Anordnung keine Volumveränderungen bei der Dialyse möglich.

#### Versuch 1.

Dialyse von 25 ccm Lösung 3Fα2.

36 Stunden.

	Saccharase k · 10 <sup>4</sup> pro ccm	Trockengewicht %	If	± 0° Min.
vor dem Versuch .	648	4,6	6,75	6,85
nach „ „ .	366 (Beil. 47)	1,95	9,0	5,1

Verbesserung: 33%.

#### Stickstoffgehalt des Trockengewichts

vor dem Versuch: 4,2% N

nach „ „ : nach Mikro-Kjeldahl 1,02 mg N

in 5 ccm, entsprechend: 1,05% N.

Dieser Versuch zeigt einen relativ großen Enzymverlust von 43%. Das gleiche gilt dem folgenden Versuch 2 (53% Saccharaseverlust).

**Versuch 2.**

Dialyse von 25 ccm Lösung 3F $\alpha$ 2.

48 Stunden.

	Saccharase k · 10 <sup>4</sup> pro ccm	Trockengewicht %	I f	0° Min.
vor dem Versuch .	648	4,6	6,75	6,85
nach „ „ .	305 (Beil. 48)	1,55	9,45	4,9

Verbe- serung: 40%.

**Stickstoffgehalt des Trockengewichts**

vor dem Versuch: 4,2% N

nach „ „ : nach Mikro-Kjeldahl 0,94 mg N

in 5 ccm, entsprechend: 1,21%.

Die dünnen Kollodiumhäutchen sind also bei dieser An- ordnung des Versuchs für das Enzym durchlässig. Die ziemlich große Verbesserung der spezifischen Inversionsfähigkeit ist nach den Stickstoffbestimmungen einem Vorandiffundieren der Stickstoffsubstanz zuzuschreiben<sup>1)</sup>.

**2. Filtration durch Chamberlandfilter.**

Es wurden 10 ccm der Lösung 3F $\alpha$ 2 durch das Mikro- Chamberland(Berkefeld-)Filter gesaugt. 1 ccm des Filtrats gab bei 4,8 g Zucker k = 0,0685, d. h. das Enzym passierte das Filter quantitativ. Dieser Versuch steht mit dem Resul-

<sup>1)</sup> Es wäre offenbar übereilt, hieraus den Schluß ziehen zu wollen, daß die Saccharase ein stickstofffreier Körper wäre. Die Widerstands- fähigkeit dieses Enzyms gegenüber den proteolytischen Enzymen deutet allerdings mit ziemlich großer Sicherheit darauf hin, daß es kein Eiweiß- körper ist, und das gleiche geht auch aus seiner einseitigen Wanderungs- richtung im elektrischen Stromfeld (Michaelis) sowie aus mancher seiner Fällungsreaktionen und Adsorptionsverhältnisse hervor. Solange wir aber von einem Enzympräparat nicht wissen, der wievielte Teil seiner Trockensubstanz wirklich aus Enzym besteht, können aus quantitativen Analysen dieser Art keine bindenden Beweise gemacht werden. Übrigens deuten mehrere Vergiftungserscheinungen darauf, daß die Saccharase ein stickstoffhaltiger Körper ist.

tat Holderers im Einklang, daß die Saccharase bei neutraler Reaktion das Chamberlandfilter ungeschwächt passiert. In saurer Lösung (neutral gegen Methylorange) soll aber nach Holderer die Saccharase vollständig unfiltrierbar sein und bei zwischenliegenden Aciditäten (gegen Methylorange unvollständig neutralisiert) soll die Filtrierbarkeit nur partiell sein<sup>1)</sup>. Ich habe dieses Resultat nicht bestätigen können, denn noch bei  $p_H = 3,8$  passierten 84% des Enzyms das Tonfilter. In dem äußeren Gefäß wurde jedoch keine Enzymanreicherung gefunden — die verschwundenen 16% des Enzyms wurden wahrscheinlich im Inneren des Filters absorbiert —, so daß das Verfahren für präparative Zwecke wenig lohnend scheint. Die Beobachtungen Holderers dürften auf dem Verhalten der Begleitsubstanzen seiner Enzymlösung, etwa von Eiweißstoffen, welche die Porosität des Filters bei steigender Acidität mehr und mehr beeinflussen, beruhen.

Der Hefegummi passierte das Chamberlandfilter sowohl bei  $p_H = 6,5$  als bei  $p_H = 3,8$ .

### VII. Zusammenfassung.

Es wurden in der Brauerei 80 l Rohhefe durch Vorbehandlung bei hoher Temperatur (28—25°) auf den fünffachen Saccharasegehalt gebracht und aus der vorbehandelten, abgepreßten Hefe durch Autolyse und Extraktion der Hefereste mit Wasser die Saccharase ausgelöst und durch Alkohol fraktioniert gefällt. Sämtliche Saccharaselösungen wurden noch mit Kaolin enteiweißt und gaben Enzymlösungen von der Inversionsfähigkeit pro g Trockengewicht

$$I_f = 6,2 - 7,2 \text{ (bei } 18,5^\circ) \\ (\pm 0^\circ = 7,45 - 6,4 \text{ Minuten).}$$

Die Enzymlösungen wurden durch Kohlenhydrat- und Stickstoffgehaltsangaben quantitativ charakterisiert.

Die Saccharase passierte Chamberlandfilter und Kollodium-

<sup>1)</sup> M. Holderer, C. r. Bd. 149, S. 1153 (1909); Bd. 150, S. 285 und 790 (1910).

membrane, eine Probe wurde aber durch Dialyse in solchen Membranen bis zum Reinheitsgrad

$$I_f = 9,45 (\pm 0^\circ = 4,9 \text{ Minuten}),$$

unter Verlust von 50% des Enzyms, verbessert. Dabei sank der Stickstoffgehalt von 4 bis 1,2%.

Mit der vorliegenden Arbeit haben wir freilich ein so aktives Präparat nicht erreicht wie bei einer früheren Darstellung ( $I_f = 12,82, \pm 0^\circ = 3,6$  Minuten), sind aber mit einer größeren Ausbeute (84 g Trockensubstanz) jetzt in der Lage, systematische Versuche über die Vergiftungs- und Regenerationserscheinungen der Saccharase anzustellen, sowie weitere Reinigungsmethoden des Enzyms zu prüfen<sup>1)</sup>.

<sup>1)</sup> Ein Teil unserer Arbeiten über Metallvergiftung (Ag und Hg) ist schon der Schwed. Akad. der Wissenschaften vorgelegt (Arkiv för Kemi Bd. 8, 1920), wird aber demnächst in ausführlicher Form auch an anderer Stelle erscheinen.

## Beilagen.

Nr.	Minuten	Drehung 1 dm-Rohr	k · 10 <sup>4</sup>	Bemerkungen
1	0	2,65		Vorbehandlung der Hefe Ausgangshefe 0,19 · 10 <sup>10</sup> Zellen Mittel: 29
	30	1,99	29	
	40	1,84	28	
	51	1,64	28	
	63	1,41	30	
	∞	-0,93		
2	30	1,38	64	1 Tag vorbehandelt 0,213 · 10 <sup>10</sup> Zellen Mittel: 69
	40	1,00	67	
	55	0,49	73	
	62	0,34	73	
3	20	0,90	146	2 Tage vorbehandelt 0,240 · 10 <sup>10</sup> Zellen Mittel: 144
	30	—	—	
	40	0,04	142	
	50	-0,38	(163)	
4	9 <sup>1</sup> / <sub>2</sub>	1,82	120	3 Tage vorbehandelt 0,174 · 10 <sup>10</sup> Zellen Mittel: 125
	15	1,44	119	
	18	1,20	126	
	20	1,00	134	
5	10	1,16	234	4 Tage vorbehandelt 0,267 · 10 <sup>10</sup> Zellen Mittel: 229
	15	0,70	228	
	18	0,50	222	
	20	0,30	232	
6	15	2,28	(32)	0,1073 g abgepreßte Hefe 0,462 · 10 <sup>9</sup> Zellen Mittel: 34,9
	20	2,12	35,0	
	30	1,90	34,0	
	45	1,58	34,2	
	60	1,24	36,3	
7	0	2,65		Autolyse- und Extraktionssäfte (1 ccm) A. Autolysedauer: 2 Tage Mittel: 59
	6	2,36	61	
	8	2,28	60	
	10	2,20	59	
	12	2,14	56	
	∞	-0,93		
8	7	2,11	101	3 Tage Mittel: 100
	8	2,07	96	
	10	1,92	100	
	12	1,78	101	
9	6	1,99	148	4 Tage Mittel: 150
	8	1,80	148	
	10	1,60	151	
	12	1,41	154	

Nr.	Minuten	Drehung 1 dm-Rohr	k · 10 <sup>4</sup>	Bemerkungen
10	8	1,48	215	5 Tage Mittel: 218
	10	1,22	222	
	12 <sup>1/2</sup>	0,99	216	
11	8	1,33	250	6 Tage Mittel: 251
	10	1,10	246	
	12	0,83	258	
12	8	1,20	282	7 Tage Mittel: 295
	10	0,89	294	
	12	0,60	308	
13	8	1,05	322	8 Tage Mittel: 321
	10	0,81	314	
	12	0,53	326	
14 a	8	0,95	350	8, 8 Tage Mittel: 363
	10	0,58	375	
	12	0,38	364	
14 b	8	0,99	340	8, 22 Tage Mittel: 352
	10	0,68	347	
	12	0,36	370	
15	8	1,58	193	8, 22, 30 Tage Mittel: 194
	10	1,36	194	
	12	1,16	195	
16	6	2,32	70	B. Autolysedauer: 3 Tage Mittel: 68,5
	8	2,22	70	
	10	2,16	67	
	12	2,06	67,5	
16 b	12	2,11	60	(Enteiweißt) Mittel: 59
	14	2,03	59	
	16	1,96	58	
17	8	0,60	462	3, 12 Tage Mittel: 476
	10	0,27	475	
	12	-0,01	492	
18	8	0,62	455	3, 16 Tage Mittel: 495
	10	0,29	468	
	12	0,04	473	
19	8	0,65	445	3, 22 Tage Mittel: 468
	10	0,29	468	
	12	-0,01	492	

Nr.	Minuten	Drehung 1 dm-Rohr	k · 10 <sup>4</sup>	Bemerkungen
20	∞	1,33	250	3, 22, 35 Tage Mittel: 260
	10	1,04	260	
	12	0,77	270	
21	∞	0,71	425	C. Autolysedauer: 14 Tage Mittel: 432
	10	0,36	444	
	12	0,17	428	
22	∞	0,66	441	21 Tage Mittel: 452
	10	0,37	440	
	12	0,03	477	
23	∞	1,29	260	21, 40 Tage Mittel: 267
	10	1,02	264	
	12	0,73	278	
24	0	2,65		Wasserpflösungen 3F (1 ccm) 3 F 1 Mittel: 273
	12	0,76	272	
	13	0,65	274	
	14	0,55	274	
	∞	-0,93		
25	8	1,54	203	3 F 2 Mittel: 203
	10	1,32	202	
	12	1,10	205	
26	8	1,13	300	3 F 3 Mittel: 304
	10	0,85	304	
	12	0,60	308	
27	4	0,91	725	3 F α 3 Mittel: 716
	5	0,69	688	
	6	0,37	734	
28	4	0,78	803	3 F α 4 Mittel: 830
	5	0,45	828	
	6	0,16	860	
29	12	1,88	89	3 F β 1 Mittel: 89
	14	1,78	87	
	16	1,63	91	
30	12	1,97	77	3 F β 2 Mittel: 77
	14	1,86	77	
	16	1,77	77	
31 a	8	1,36	242	3 F α 1 Mittel: 249
	10	1,10	246	
	12	0,82	260	

Nr.	Minuten	Drehung 1 dm-Rohr	k · 10 <sup>4</sup>	Bemerkungen
31 b	4	0,87	748	3 F α 2 Mittel: 751
	5	0,58	750	
	6	0,33	756	
32	3	0,57	1260	3 F α 5 Mittel: 1329
	4	0,10	1368	
	5	-0,18	1358	
33	4	0,75	824	3 F 5 Mittel: 843
	5	0,43	842	
	6	0,16	862	
34	3	0,53	1300	3 F α 6 Mittel: 1349
	4	0,09	1365	
	5	-0,20	1382	
35	0	2,65		Nach Kaolinadsorption (1 ccm) 3 F 5 Mittel: 778
	4	0,82	778	
	5	0,52	784	
	6	0,30	773	
	∞	--0,93		
36	4	1,05	645	3 F α 2 Mittel: 648
	5	0,77	649	
	6	0,53	650	
37	4	1,03	625	3 F α 3 Mittel: 655
	5	0,74	662	
	6	0,475	677	
38	4	0,93	715	3 F α 4 Mittel: 730
	5	0,61	715	
	6	0,32	760	
39	3	0,42	1410	3 F α 5 Mittel: 1440
	4	0,04	1420	
	5	-0,28	1480	
40	3	0,46	1370	3 F α 6 Mittel: 1410
	4	0,06	1395	
	5	-0,27	1470	
41	0	2,65		Saccharase aus Preßsaft 1 ccm Preßsaft Mittel: 32
	10	2,39	33	
	20	2,18	31	
	30	1,97	31	
	∞	-0,93		
42	30	2,29	15	1 ccm Lösung B Mittel: 15
	40	2,19	15	

Nr.	Minuten	Drehung 1 dm-Rohr	k · 10 <sup>4</sup>	Bemerkungen
43	8	1,72	164	Haltbarkeit 0,5 ccm W.-L. 3b Mittel: 158
	10	1,57	156	
	12	1,42	153	
44	4	1,80	295	1 ccm W.-L. 3b Mittel: 308
	5	1,56	316	
	6	1,40	312	
45	8	1,22	278	0,5 ccm W.-L. 3H Mittel: 283
	10	0,91	289	
	12	0,72	281	
46	4	1,38	475	1 ccm W.-L. 3H Mittel: 505
	5	1,07	506	
	6	0,78	535	
47	4	1,65	355	Dialyseversuche (1 ccm dialysierte Lösung) Versuch 1 Mittel: 366
	5	1,39	378	
	6	1,17	387	
48	4	1,78	303	Versuch 2 Mittel: 305
	5	1,61	298	
	6	1,39	313	