

Über Maltaselösungen aus Hefe.

Von

R. Willstätter, Tr. Oppenheimer und W. Steibelt.

Mit 1 Abbildung.

(Mitteilung aus dem Chemischen Laboratorium der Bayerischen Akademie
der Wissenschaften in München.)

Der Redaktion zugegangen am 28. Juni 1920.

Zur Isolierung der Maltase aus Hefe ist es nach den Angaben aller Forscher, die über das Enzym gearbeitet haben, nötig, die Hefe zuerst zu trocknen und dann mit Wasser zu behandeln. Diese Methode, Lösungen der Maltase darzustellen, ist von C. J. Lintner¹⁾, von E. Fischer²⁾, von A. Croft Hill³⁾ angegeben worden. Zwischen Saccharase und Maltase wird allgemein ein Unterschied angenommen: die Saccharase gewinnt man aus abgepreßter Bierhefe durch Ausziehen mit Wasser unter Zusatz z. B. von Toluol, die Maltase stets nach vorangegangener sorgfältiger Trocknung. Freilich ist es bekannt, daß von lebender Hefe auch Saccharase nicht abgegeben wird, aber sie diffundiert leicht aus der Zelle nach der Abtötung der Hefe durch das antiseptische Mittel. Daß unter denselben Bedingungen kein auf Maltose wirkender Auszug entsteht, wird auf die Schwerlöslichkeit der Maltase⁴⁾ oder darauf zurückgeführt, daß dieses Enzym vielleicht an Protoplasmabestandteile

¹⁾ Zeitschr. f. ges. Brauwesen 1892, 106; C. J. Lintner und E. Kröber, Ber. d. D. chem. Ges. Bd. 28, S. 1050 (1895).

²⁾ Ber. d. D. chem. Ges. Bd. 27, S. 3479 (1894); Bd. 28, S. 1429 (1895); Diese Zeitschr. Bd. 26, S. 60 und zwar S. 74 (1898).

³⁾ Journ. Chem. Soc. Bd. 73, S. 634 (1898) und 83, 578 (1903).

⁴⁾ C. J. Lintner, Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen 1894, 414; C. J. Lintner und E. Kröber, Ber. d. D. chem. Ges. Bd. 28, S. 1050, 1053 (1895).

fest gebunden vorkommt oder daß bei unversehrter Zellhülle seine Diffusion nach außen gehindert ist¹⁾.

Der Unterschied zwischen Saccharase und Maltase dürfte indessen darauf beruhen, daß in der Hefe nach ihrer Abtötung z. B. durch Chloroform oder Toluol durch enzymatische Vorgänge Bildung von Säure eintritt, durch welche die Maltase zerstört wird, etwa in dem Maße, wie sie in wäßrige Lösung übergeht. Jedenfalls gelingt es uns, aus frischer Bierhefe starke Maltaselösungen durch Behandlung mit Wasser unter Zusatz von Toluol bei Zimmertemperatur darzustellen, wenn man die auftretende Säure mit Ammoniak neutralisiert. Natürlich gibt auch getrocknete Hefe nach diesem Verfahren der Neutral-extraktion mindestens ebenso wirksame Lösungen als nach den Angaben der Literatur. Diese Maltaselösungen aus Bierhefe enthalten wie alle in der Literatur auch Saccharase; die Aufgabe, beide Enzyme zu trennen, ist noch zu lösen.

Hinsichtlich ihrer Wirksamkeit sollen die Maltaselösungen nach dem Vorbild der von C. O'Sullivan und F. W. Tompson²⁾ sowie von H. Euler und seinen Mitarbeitern³⁾ gegebenen Saccharasedefinition gekennzeichnet werden. Die Hefen und die Maltaselösungen werden durch die Zeit in Minuten bestimmt, die 1 g getrocknete Hefe oder die dieser Menge entsprechende Enzymlösung braucht, um bei 30° 2,5 g Maltose (Hydrat) zur Hälfte zu hydrolysieren, wenn diese mit 30 mg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ und 22,5 mg KH_2PO_4 in 50 ccm enthalten sind.

Proportionalität von Enzymmenge und Umsatz.

Für die Saccharasewirkung, die dem Gesetz der monomolaren Reaktion folgt, besteht auch zwischen Enzymkonzentration und Reaktionsgeschwindigkeit Proportionalität, die experimentell

¹⁾ E. Fischer, Diese Zeitschr. Bd. 26, S. 60 u. zwar S. 75 (1898).

²⁾ Journ. Chem. Soc. Bd. 57, S. 834 u. zwar S. 866 (1890).

³⁾ H. Euler, E. Lindberg und K. Melander, Diese Zeitschr. Bd. 69, S. 152, 157 (1910); H. Euler und S. Kullberg, Diese Zeitschr. Bd. 73, S. 335 (1911); H. Euler und O. Svanberg, Diese Zeitschr. Bd. 107, S. 269 (1919).

von O'Sullivan und Tompson¹⁾, dann von C. S. Hudson²⁾ und neuerdings in einem Bereich der Enzymmengen von 1 : 40 von H. Euler und O. Svanberg³⁾ bestätigt wurde. Wie die Reaktion der Maltase nicht mit demselben Zeitgesetz in Übereinstimmung gebracht werden konnte, so war es auch fraglich, ob für sie jene Proportionalitätsbeziehung gilt. Ch. Philoche⁴⁾ hat sie allerdings schon bei Takamaltase mit Enzymmengen von 1 : 5 bestätigt gesehen, und bei Hefemaltase haben L. Michaelis und P. Rona⁵⁾ mit Fermentmengen, die im Verhältnis von 3 : 2 : 1½ : 1 standen, approximativ gezeigt, daß die Zeiten gleichen Umsatzes sich umgekehrt wie die Fermentmengen verhalten. Wegen der Wichtigkeit für die Analyse der Maltasepräparate wurde die Proportionalität nun mit Ausdehnung des Bereiches genauer geprüft.

Die Hydrolyse der Maltose verfolgten wir mit der polarimetrischen Methode, die uns hier genauer schien als die Bestimmung auf Grund des Reduktionsvermögens. Die Maltoselösung wurde mit wechselnden Mengen der neutralen Hefeauszüge versetzt unter Einstellung der nach L. Michaelis und P. Rona⁶⁾ optimalen spurweise sauren Reaktion ($p_{\text{H}} = 6,1$ bis 6,8); wir fanden dementsprechend am günstigsten einen Gehalt von einem Zehntel Phosphatmischung, die aus gleichen Teilen 0,90% iger KH_2PO_4 und 1,20% iger $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ -Lösung bestand. Die 10% igen Lösungen von wasserhaltiger Maltose wurden mit einem Gehalt von 20% dieses Puffers bei 30° im Meßkolben bereitet und die erforderlichen Proben von 25 ccm mit Enzymlösung und Wasser von derselben Temperatur aufs doppelte Volumen gebracht. Bei Beendigung der Versuche entnahmen wir 25 ccm der 30° warmen Versuchslösung und trugen sie unter Berücksichtigung der Auslaufzeit in 5 ccm 2n-Soda ein.

¹⁾ Journ. Chem. Soc. Bd. 57, S. 834 und zwar S. 847 (1890).

²⁾ Journ. Am. Chem. Soc. Bd. 30, S. 1564 und zwar S. 1574 (1908).

³⁾ Diese Zeitschr. Bd. 107, S. 269 und zwar S. 275 (1919).

⁴⁾ Journ. chim. phys. Bd. 6, S. 213, 355 (1908).

⁵⁾ Biochem. Zeitschr. Bd. 57, S. 70 und zwar S. 78 (1913).

⁶⁾ Biochem. Zeitschr. Bd. 57, S. 70 (1913) und L. Michaelis, Die Wasserstoffionenkonzentration, Berlin 1914 (J. Springer) S. 71.

Die Anfangsdrehung der Versuchslösung nach dem Verdünnen mit jener Sodamenge betrug $10,80^\circ$, die Enddrehung bei vollkommener Spaltung würde $4,40^\circ$ betragen.

Tabelle 1.
Enzymkonzentration und Umsatz.
(5%ige Maltoselösung; 30° .)

Enzymmenge ccm in 50	Zeit (Min.)	Drehungsabnahme ($^\circ$)	Maltosespaltung (%)
5	120	3,03	47,3
10	60	3,03	47,3
2,5	240	2,70	42,3
10	60	2,61	40,9
2	150	2,19	34,2
5	60	2,20	34,4
10	30	2,21	34,5
2,5	180	2,24	35,0
15	30	2,14	33,5

Im Bereich von 1 : 5 oder 6 hat sich genaue Proportionalität von Enzymmenge und Umsatz ergeben.

Der zeitliche Verlauf.

Während nach Philoche¹⁾ bei der Maltosespaltung durch Takaenzym die Konstante der monomolaren Reaktion mit fortschreitender Zeit ansteigt, wird der entgegengesetzte Gang bei Hefemaltase in den Arbeiten von Lintner und Kröber und von E. F. Armstrong²⁾ beobachtet; auch in einer eingehenden Untersuchung von R. O. Herzog³⁾ ist keine einfache Beziehung zwischen Zeit und Umsatz zutage getreten. In unseren Versuchen, die wir vornahmen, um nach dem Vorbild von O'Sullivan und Tompson jeweils beobachtete Maltosespaltungen auf den nämlichen Grad der Spaltung beziehen zu können, war der

¹⁾ l. c. ²⁾ Proc. Roy. Soc. Bd. 73, S. 500, 516, 526 (1904).

³⁾ In C. Oppenheimer, Die Fermente, IV. Aufl., Bd. II, S. 987 (Leipzig 1914).

Gang von k aus $\frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-x}$ merkwürdig verschieden. In den beiden Versuchen der Tabelle 2 und der Figur (S. 2) fiel $10^4 k$ bis auf etwa ein Viertel, nämlich von 213 auf 46 im Bereich von 20 bis 75% Spaltung und von 213 auf 68 bei 20 bis 64% Spaltung. In zwei andern Versuchsreihen sank hingegen die Konstante nur auf etwa den halben Wert, nämlich zwischen 28 und 69% Maltosehydrolyse von 220 auf 100 und zwischen 20 und 56% Spaltung von 144 auf 69. Diese Abweichungen werden wohl durch hemmend wirkende Beimischungen bedingt sein.

Tabelle 2.

Zeitlicher Verlauf der Maltasewirkung.

(30°; 5%ige Maltose.)

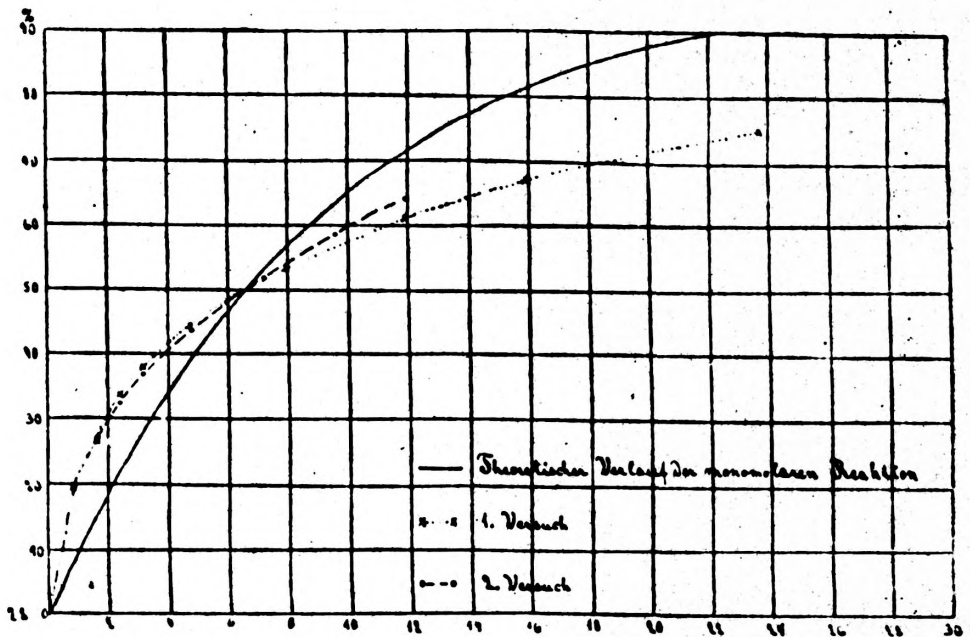
Zeit (Minuten)	1. Versuch (9 ccm Enzym- lösung A in 100)		2. Versuch (10 ccm Enzym- lösung B in 100)	
	Drehungs- abnahme	Umsatz (%)	Drehungs- abnahme	Umsatz (%)
10	1,23	19,2	1,23	19,2
20	1,72	26,9	1,72	26,9
30	2,16	33,8	2,05	32,0
40	2,41	37,7	2,35	36,8
60	2,81	44,0	2,80	43,7
80	3,13	49,0	—	—
90	—	—	3,34	52,2
100	3,41	53,2	—	—
120	—	—	3,76	58,8
150	3,92	61,2	4,09	64,0
200	4,25	66,4	—	—
300	4,78	75,0	—	—

Darstellung von Maltaselösungen.

Da bei der Herstellung von Maltaselösungen die beiden Vorgänge: Diffusion des Enzyms aus der Hefezelle und seine Zerstörung durch zugleich entstehende Säure einander entgegenwirken, so ist die Schädigung entweder durch Alkali-zusatz in dem Maße der Säureproduktion oder durch ein im

Überschuß zugefügtes unlösliches Neutralisationsmittel zu vermeiden.

88 g gewaschene und abgepreßte untergärrige Hefe der Löwenbrauerei in München wurden unter Zusatz von Toluol mit 132 ccm Wasser (entsprechend 20 g Trockenhefe + 200 ccm Wasser) angeschüttelt. Die Flüssigkeit reagierte zunächst neutral, mitunter 50 Minuten lang, manchmal ist schon nach 5 bis 6 Minuten die Reaktion deutlich sauer. Bei den verschiedenen Hefeproben sind erheblich differierende Alkalimengen erforderlich und auch etwas verschiedene Mengen je nach der



Weise und Häufigkeit des Neutralisierens. Am besten ist es, häufig neutrale Reaktion auf Lackmus durch vorsichtigen Zusatz von verdünntem Ammoniak herzustellen, was bei einer Extraktionsdauer von 6 Stunden z. B.

nach 6 20 55 130 180 360 Minuten

0,6 0,3 12,6 10,5 3,6 4,9 ccm 1%iges Ammoniak, also im ganzen 32,5, in einem andern Beispiel 41,8 ccm erforderte. Bei längerer Dauer der Extraktion genügte es, weiter zunächst alle 2 bis 3 Stunden, dann mit größeren Pausen die immer geringere Säureproduktion unschädlich zu machen; in den folgenden 18 Stunden waren z. B. noch 5,8 ccm erforderlich, in weiteren 2 Tagen z. B. je 1 ccm 1%iges Am-

moniak. Bequemer und annähernd ebenso günstig ist es, die Flüssigkeit durch Zusatz von Magnesiumkarbonat oder dgl. konstant bei fast neutraler Reaktion zu erhalten. Dagegen entstehen viel schwächere Enzymlösungen, wenn man die Hefe unter anfänglichem Zusatz bestimmter Mengen von Alkali extrahiert, wie Croft Hill bei Verarbeitung getrockneter Hefen vorschreibt; z. B. lieferten 88 g Hefe unter den angegebenen Bedingungen in 6½ Stunden eine Lösung, die 16,2% Maltosespaltung ergab, gegenüber 3,9% Spaltung bei analoger Extraktion mit 132 ccm 0,1% iger Natronlauge.

Die abfiltrierten Maltaselösungen, worin p_H nach der Indikatorenmethode von S. P. L. Sørensen¹⁾ = 6,6 gefunden wurde, blieben beim Stehen neutral; die Zeitwerte betragen in den ersten Versuchen (Nr. 1—4 der Tabelle 3) nach 6 Stunden Extraktion 260 bis 120, nach anderthalb Tagen etwa 50 Minuten, in späteren Versuchen, nachdem das Neutralisationsverfahren ausgearbeitet war, z. B. in Nr. 5, nach ein-tägiger Extraktion 20 Minuten.

Tabelle 3.
Zeitwerte der Maltaselösungen aus Frischhefe.

Nr.	Extraktionsdauer (Stunden)	1%ige NH_3 f. 88g Hefe (ccm)	Drehungsabnahme (°)	Maltosespaltung (%)	Zeitwert (Minuten)
1	1½	23,3	0,16	2,5	1950
	19	34,8	2,10	32,8	78
2	6	37,4	1,18	18,5	260
	30	42,6	2,49	38,9	53
3	6	41,8	1,16	18,2	260
	30	47,3	2,40	37,6	57
4	6	32,5	1,80 in 30 Min. 2,37 in 60 Min.	28,2 in 30 Min. 37,0 in 60 Min.	123 131
	32	38,3	2,71	42,3	44
5	6	37,8	1,90	29,7	95
	24	41,8	3,82	59,7	20
	48	41,8	4,05	63,1	17
	72	41,8	4,05	63,0	17

¹⁾ Biochem. Zeitschrift Bd. 21, S. 131 (1909).

Eine solche Maltaselösung (Beispiel 5 der Tab. 3) aus einer den Zeitverhältnissen gemäß nicht besonders günstigen Frischhefe verglichen wir mit den von Croft Hill beschriebenen besten Lösungen der Literatur aus getrockneter Hefe. Unter den analytischen Bedingungen von Hill bewirkte 1 ccm unserer Enzymlösung mit 20 ccm 2%iger Maltose bei 30° in 40 Minuten 69,5% Spaltung gegenüber 29% bei Croft Hill¹⁾.

Um Maltase aus getrockneter Hefe zu bereiten, ist es unnötig, die Hefe, wie Hill angegeben hat, durch stufenweises längeres Erhitzen bis auf 100° oder durch Aufbewahren im Vakuum über Schwefelsäure²⁾ vorzubereiten. Lufttrockene Hefe gibt dieselbe Ausbeute. 20 g Trockenhefe werden mit 200 ccm Wasser und mit Toluol angeschüttelt; die Flüssigkeit reagiert sauer, und in diesem Fall wird zur Neutralisation sofort ein bedeutender Teil der überhaupt erforderlichen Alkalimenge verbraucht, z. B. war zur neutralen Reaktion auf Lackmus hinzuzufügen:

nach	0	2	5	9	25	Stunden
	16,0	1,2	1,9	2,4	1,6	ccm 1%iges Ammoniak.

Die Maltaselösung wird am besten nach etwa 1 tägigem Stehen abfiltriert; die Zeitwerte einiger Darstellungen aus Trockenhefe verzeichnet die Tabelle 4.

Mit derselben Hefeprobe und einer Extraktionsdauer von 2 Tagen haben wir mit 0,1%iger Natronlauge nach Croft Hill und nach dem Neutralisationsverfahren Vergleichsversuche ausgeführt und die Wirkungswerte der verschiedenen Maltaselösungen unter den Bedingungen von Hill übereinstimmend gefunden.

Die Extrakte zeigen öfters beim Stehen, indem ein Niederschlag sich absetzt, einen kleinen Zuwachs an Wirksamkeit. Im übrigen erwiesen sich viele solche auf Lackmus neutrale toluolhaltige Lösungen tagelang fast unverändert haltbar, was

¹⁾ Journ. Chem. Soc. Bd. 73, S. 634, 636 (1898).

²⁾ Journ. Chem. Soc. Bd. 73, S. 634, 636 (1898) und Bd. 83, S. 578, 581 (1903).

Tabelle 4.

Neutralauszüge von Maltase aus Trockenhefe.

Nr.	Extraktionsdauer (Stunden)	1%iges NH ₃ f. 20 g Hefe (ccm)	Drehungsabnahme (°)		Maltosespaltung (%)		Zeitwert (Min.)
			in 30 Min.	in 60 Min.	in 30 Min.	in 60 Min.	
1	18	23,6	2,41	—	37,7	—	55
	48	27,6	2,20	—	34,4	—	77
2	6	17,6	—	2,83	—	44,3	78
	22	21,2	—	3,14	—	49,0	62
	29	21,2	—	3,19	—	49,8	60
3	2	17,5	—	2,37	—	36,9	121
	5	19,4	—	3,04	—	47,5	66
	9	21,8	—	3,04	—	47,5	66
	25	23,4	—	2,87	—	44,9	77
4	1	18,6	1,61	—	25,1	—	140
	19	23,2	2,22	—	34,6	—	77
5	15	24,2	2,42	—	37,8	—	55
6	5	—	2,05	—	32,0	—	82

zahlenmäßig am Beispiel einer durch 18stündiges Extrahieren hergestellten Maltaselösung gezeigt werden soll.

7 Std. aufbewahrt;	Drehungsabnahme 2,41°;	Maltosespaltung 37,6%.
55 "	" "	2,31°; " 36,0%.
79 "	" "	2,20°; " 34,5%.
103 "	" "	2,10°; " 32,8%.

Die Lösungen werden von Kaolin geschwächt. Es wird also, wie L. Michaelis und P. Rona¹⁾ gefunden haben, „Maltase von Kaolin sehr merklich adsorbiert“, aber die Maltase scheint im Adsorbat nicht haltbar zu sein.

¹⁾ Biochem. Zeitschr. Bd. 57, S. 70 und zwar S. 82 (1913).