Über die spezifische Natur von Saccharase und Raffinase.

Von

Richard Willstätter und Richard Kuhn.

(Mit 1 Abbildung.)

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

(Der Redaktion zugegangen am 29. April 1921.)

Bei der Darstellung von Hefeauszügen und von Invertin sollte eine der ersten Aufgaben die Kennzeichnung der Lösungen und Präparate in enzymatischer Hinsicht sein, also die Untersuchung, welches Schicksal die zuckerspaltenden Enzyme der Hefe neben der Saccharase bei der Bildung von Lösungen, von Adsorbaten, von Elutionen haben und welche von diesen Enzymen in dem sogenannten Invertin noch enthalten sind. Diese bisher unbeantwortete Frage hängt mit einer zweiten ungelösten Frage eng zusammen. Es ist unbestimmt, welche enzymatischen Wirkungen dem Rohrzucker hydrolysierenden Enzym sonst noch zukommen und welche Fruktosidspaltungen anderen spezifischen Hefeenzymen zuzuschreiben sind. Da Invertin namentlich für Raffinose starkes Spaltungsvermögen zeigt, nach E. Bourquelot und M. Bridel¹⁾ mehr als für Gentianose, Stachyose u. a., so untersuchen wir fürs erste, ob Raffinose von Saccharase selbst oder von einem spezifischen Enzym hydrolysiert wird.

Es wird bisher zumeist angenommen, daß die Hydrolyse von Raffinose und Saccharose von demselben Enzym bewirkt

¹⁾ Compt. rend. Bd. 152, S. 1060 (1911).

werde; E. Fischer¹⁾, A. Bau²⁾, E. Bourquelot³⁾, H. E. Armstrong⁴⁾, C. S. Hudson⁵⁾ vertraten diese Auffassung. Sie gründet sich darauf, daß die Saccharose ein Bestandteil des Raffinosemoleküls ist. Damit lassen sich aber Beobachtungen über tierisches Invertin nur unter der Voraussetzung in Einklang bringen, daß es verschiedene Invertine gibt. Nach W. Pautz und J. Vogel⁶⁾ und E. Fischer und W. Niebel⁷⁾ wird durch den Dünndarm des Hundes und des Pferdes die Raffinose nicht gespalten. „Das Rohrzucker spaltende Enzym des Dünndarms ist also“ — nach E. Fischer und W. Niebel — „zweifelloos mit dem Invertin der Hefe nicht identisch.“ Für diese Folgerung entfällt die Stütze, wenn sich die Hydrolyse von Rohrzucker und Raffinose auf verschiedene Enzyme zurückführen läßt.

Es genügt aber nicht, mit E. Fischer in verschiedenen Organismen verschiedene Invertine und verschiedene Maltasen anzunehmen, auch mit dem Vorkommen verschiedener Hefinvertine und verschiedener Raffinasen in Hefen müßte man rechnen. P. Lindner⁸⁾ hat nämlich gefunden, daß *Monilia candida* Hansen und eine gewisse Hefe (Nr. 602 aus Danziger Jopenbier) Rohrzucker vergärt, Raffinose aber unversehrt läßt, daß andererseits *Schizosaccharomyces octosporus* Beijerinck und Hefe Nr. 370 (aus einem sizilianischen Traubenmost) Raffinose, aber nicht Rohrzucker vergärt.

¹⁾ E. Fischer und W. Niebel, Sitzungsber. d. preuß. Akad. 1896, S. 73; E. Fischer, Diese Zeitschr. Bd. 26, S. 60 (1898).

²⁾ Wochenschr. f. Brauerei Bd. 17, S. 698 (1900).

³⁾ Journ. Pharm. et Chim. [6] Bd. 16, S. 578 (1902); E. Bourquelot und M. Bridel, Compt. rend. Bd. 149, S. 361 (1909) und Bd. 152, S. 1080 (1911).

⁴⁾ H. E. Armstrong und W. H. Glover, Proc. Roy. Soc., B, Bd. 80 S. 312 (1908); siehe auch E. F. Armstrong, The simple Carbohydrates and the Glucosides, 3. Aufl., London 1919, S. 111.

⁵⁾ Journ. Am. Chem. Soc. Bd. 36, S. 1566 (1914); C. S. Hudson und T. S. Harding, Journ. Am. Chem. Soc. Bd. 37, S. 2193 (1915).

⁶⁾ Zeitschr. f. Biologie Bd. 32, S. 304 (1895).

⁷⁾ Sitzungsber. d. preuß. Akad. 1896, S. 73.

⁸⁾ Wochenschr. f. Brauerei Bd. 17, S. 713 (1900).

Zu anderen Anschauungen kam H. Bierry¹⁾ in seinen Untersuchungen über die zuckerspaltenden Enzyme wirbelloser Tiere. Er nimmt neben dem Rohrzucker spaltenden Invertin ein auf alle d-Fruktoside, also auf Stachyose, Gentianose, Raffinose und auch auf Rohrzucker wirkendes Enzym, die Lävulopolyase, an. Es soll sich nicht um ein besonderes Ferment, sondern „um eine Spezies derselben Gattung Invertin“ handeln, „weil in allen Fällen, wo wir einen auf die genannten Polyosen aktiven Verdauungssaft angetroffen haben, derselbe auch Saccharose zu invertieren vermochte.“ Diese Anschauung wird indessen den Angaben P. Lindners über *Schizosaccharomyces octosporus* und Hefe Nr. 370 nicht gerecht und läßt auch die Mitteilung von L. Marino und G. Fiorentino²⁾ unberücksichtigt, daß von den Enzymen des Malzes Raffinose ganz abgebaut (also über Melibiose hinweg), Rohrzucker aber nicht angegriffen wird.

Um die Wirkung des Invertins auf die beiden Zucker zu vergleichen, ermitteln wir Vergleichszeitwerte für Saccharase und Raffinase unter den Bedingungen der Maltasebestimmung von R. Willstätter und W. Steibelt³⁾. Dieselbe Enzymmenge im nämlichen Volumen Lösung wirkt bei 30° auf äquivalente Mengen der Zucker ein mit der Besonderheit, daß für jede einzelne Hydrolyse die optimale Wasserstoffzahl eingestellt wird. Für die Raffinosespaltung finden wir das Wirkungsoptimum wie für die Rohrzuckerhydrolyse bei $p_H = 4$ bis 5. Eine Anzahl von Invertinpräparaten, deren Reinheitsgrade z. B. durch die Zeitwerte 4,8 bis 0,86 nach C. O'Sullivan und F. W. Thompson und nach H. v. Euler ausgedrückt werden, ergeben für den Quotienten

$$\frac{\text{Zeitwert für Raffinase}}{\text{Zeitwert für Saccharase}}$$

genau übereinstimmende Werte, nämlich 11,3. Daraus folgt, daß Saccharase und Raffinase, wenn es sich um zwei Enzyme

¹⁾ Compt. rend. Bd. 148, S. 949 (1909); Biochem. Zeitschr. Bd. 44, S. 415, 426, 446 (1912).

²⁾ Gazz. chim. ital. Bd. 36, II, S. 395 und zwar S. 409 (1906).

³⁾ Diese Zeitschr. Bd. 111, S. 157 und zwar S. 169 (1920).

handelt, in den Löslichkeitsverhältnissen, in der Beständigkeit und im Verhalten gegen Adsorptionsmittel die größte Ähnlichkeit zeigen und keine Handhabe zu irgend einer Fraktionierung bieten. Es steht damit wesentlich anders bei den übrigen zuckerspaltenden Enzymen. Zum Beispiel verschwindet Maltase aus neutralen Hefeauszügen nach einiger Zeit durch Zersetzung, während Melibiase dem Invertin durch eine große Reihe von Operationen zu folgen vermag und manchmal noch in Invertinpräparaten von hoher Reinheit enthalten ist.

Das Verhältnis der beiden enzymatischen Hydrolysen ist schon früher von H. E. Armstrong und W. H. Glover¹⁾ bestimmt worden. Ihre Arbeit, die eine andere Absicht verfolgt als die vorliegende Untersuchung, bringt nicht einen Vergleich der Wirkungsquotienten mit verschiedenem enzymatischen Material; sondern H. E. Armstrong und Glover ließen nur eine nicht näher bestimmte Invertinlösung, noch ohne Berücksichtigung der Wasserstoffionenkonzentration, auf die beiden Zucker einwirken, um aus dem Verhältnis der Reaktionsgeschwindigkeiten wie aus der verschieden raschen Spaltung der Zucker durch Mineralsäuren Schlußfolgerungen auf die sterischen Verhältnisse im Zuckermolekül zu ziehen, von denen seine Hydrolyse abhängt. Armstrong und Glover fanden mit käuflicher Raffinose das Verhältnis 1 : 3,8, mit gereinigter 1 : 5,4 für die Zeiten 50%iger Hydrolyse von Rohrzucker und Raffinose.

Mit den Zeitwertquotienten der Invertinpräparate vergleichen wir das Verhältnis der beiden enzymatischen Wirksamkeiten an Hefen selbst, und zwar an melibiasefreien, also obergärigen Hefen, da durch einen Gehalt an Melibiase die Bestimmung gestört würde. Zwei Brennereihefen, die in ihrem Enzymgehalt weit differieren, eine dänische und eine österreichische, gaben fast den gleichen Quotienten, nämlich 5,1 und 5,4, also Werte, die sich vom Wirkungsverhältnis der Präparate wesentlich unterscheiden. Daraus allein wäre schon zu schließen, daß trotz der Übereinstimmung von Präparat zu Präparat Saccharase und Raffinase verschiedene Enzyme sind.

¹⁾ Proc. Roy. Soc., Ser. B, Bd. 80, S. 312 (1908).

Dies ergibt sich noch deutlicher beim Vergleich verschiedener Hefen, also nach derselben Methode, mit der R. Willstätter und W. Steibelt in einer voranstehenden Arbeit die Nichtidentität von Maltase und α -Glukosidase nachgewiesen haben. Die reine Brennerihefe Rasse XII des Berliner Institutes für Gärungsgewerbe gab z. B. den Quotienten 12,3, in ihr ist also, auf dieselbe Menge Saccharase bezogen, fast 2,5 mal weniger Raffinase enthalten als in den schon angeführten Oberhefen.

Die Spaltung des Rohrzuckers und der Raffinose ist also spezifischen Enzymen zuzuschreiben. Es wäre noch möglich, daß der Rohrzucker nicht durch Saccharase allein, sondern außerdem noch durch Raffinase hydrolysiert würde, also von einer Lävulopolyase im Sinne von Bierry, allein das Vorkommen von Hefen, die Raffinose, aber nicht Rohrzucker vergären, macht diese Anschauung sehr unwahrscheinlich.

Da unsere besten Invertinpräparate (z. B. das Präparat Nr. 2 der Tabelle 4 vom Zeitwert 0,86) auch andere höhere Zucker, z. B. Stachyose spalten, so wird durch vergleichende Bestimmungen der Wirkungsquotienten, z. B. der Raffinase und Stachyase, zu entscheiden sein, ob die Hydrolyse der höheren Fruktoside ein spezifisches Enzym für jeden einzelnen Fall erfordert.

Die Kennzeichnung einer Hefe in enzymatischer Hinsicht ist durch die Vergleichszeitwerte ihrer wichtigsten enzymatischen Fähigkeiten gegeben, z. B.:

Zeitwert für:	Maltase	α -Glukosidase	Saccharase	Raffinase
Dänische Oberhefe (21. II. 21)	162	252	0,52	2,65
Berl. Hefe XII (26. II. 21)	227	225	1,26	15,6
Berl. Hefe M (26. I. 21)	13400	∞	2,62	19,7

Das Verhältnis dieser Zeitwerte erlaubt natürlich keine Schlußfolgerung auf das Verhältnis der Mengen der entsprechenden Enzyme. Aber da die Enzyme, wie aus den bekannten Reaktionsgeschwindigkeiten hervorgeht, in weit höherem Maße

spezifische Reagentien für den Polyosenabbau sind als die Mineralsäuren, so werden keine so großen Unterschiede zwischen Menge und Wirkung auf verschiedene Zucker vorkommen wie bei den Säuren. Nach den Untersuchungen von E. F. Armstrong und R. J. Caldwell¹⁾ über „The sucroclastic action of acids as contrasted with that of enzymes“ wird die relative Leichtigkeit, mit der die Spaltung durch Säuren erfolgt, durch folgende Zahlen ausgedrückt:

1 für Laktose, 1,27 für Maltose, 0,17 für α -Methylglukosid, 1240 für Rohrzucker, 1040 für Raffinose.

Gleichen hydrolytischen Wirkungen auf die einzelnen Zucker werden nicht entfernt so verschiedene Konzentrationen der Enzyme wie der Mineralsäuren entsprechen.

Bestimmungsmethode.

Die Spaltung der Raffinose in Melibiose und Fruktose verfolgen wir polarimetrisch. Gemäß den für die Bestimmung von Invertin und Maltase aufgestellten Bedingungen wird als Zeitwert die Anzahl Minuten ermittelt, welche 0,5 g Trockengewicht von Hefe oder Enzympräparat brauchen würden, um bei 30° und optimalem pH in 25 ccm 2,061 g $C_{18}H_{32}O_{16} \cdot 5H_2O$ zu 50% zu spalten. Die vollständige Hydrolyse liefert 2,5% ige Fruktoselösung. Die günstige Wasserstoffzahl (= 4,5) wird durch Zusatz von 1 ccm 20% iger NaH_2PO_4 -Lösung eingestellt.

Die Raffinose hatten uns teils Herr Prof. Dr. Edm. O. von Lippmann in Halle a. S. und teils die Direktion der Zuckerraffinerie Hildesheim in freundlichster Weise zur Verfügung gestellt. Das Präparat gab in 8% iger Lösung übereinstimmend mit den Angaben der Literatur $[\alpha]_D^{20} = +104,4^\circ$. Im 2-dm-Rohr beträgt die Anfangsdrehung der Bestimmungslösung (nach Verdünnen wie im Versuche mit $\frac{1}{4}$ Vol. 2n-Sodalösung²⁾) 13,71°, nach der Spaltung in Melibiose + Fruktose

¹⁾ Proc. Roy. Soc., Ser. B, Bd. 73, S. 526 (1904) und Bd. 74, S. 195 (1905).

²⁾ Ebenso wurde die Bestimmungslösung für Saccharase zum Sistieren mit $\frac{1}{4}$ Vol. Soda versetzt; da in der voranstehenden Arbeit von Willstätter und Steibelt mit $\frac{1}{5}$ Vol. Soda verdünnt wurde, sind die Drehungsabnahmen in den beiden Arbeiten nicht übereinstimmend.

7,18°. Bei Verwendung von untergärrigen Hefen und von Enzympräparaten aus ihnen kann die Melibiose der weiteren Hydrolyse durch die von E. Fischer und P. Lindner¹⁾ sowie von A. Bau²⁾ entdeckte Melibiase anheimfallen; für die vollkommene Aufspaltung in Fruktose, Glukose und Galaktose berechnet sich der Endwert der Drehung auf + 1,70°.

Ein melibiasefreies Invertinpräparat vom Zeitwert 4 diente zur Bestimmung der geeigneten Wasserstoffionenkonzentration. Die folgende Tabelle 1 zeigt, daß ein breites Gebiet von p_H 4 bis 5 optimal ist und daß der günstigste Punkt mit dem Optimum der Saccharasewirkung³⁾ praktisch zusammenfällt.

L. Michaelis und H. Davidsohn⁴⁾ haben in ihrer exakten Untersuchung über „Die Wirkung der Wasserstoffionen auf das Invertin“ angenommen, „daß bei jeder der optimalen Wasserstoffzahl nicht entsprechenden Acidität nur ein Bruchteil des vorhandenen Ferments in wirksamer Form zugegen ist“.

Die Kurve, welche diesen Bruchteil ($\varphi : \Phi$) als Funktion von $-\log[H^+]$ darstellt, wird neuerdings von L. Michaelis und M. Rothstein⁵⁾ als Dissoziationsrestkurve einer Säure

¹⁾ Wochenschr. f. Brauerei Bd. 12, S. 959 (1895); dieses Enzym hat allerdings E. Fischer als identisch mit Maltase betrachtet (Diese Zeitschr. Bd. 26, S. 60 und zwar S. 80 [1898]).

²⁾ Wochenschr. f. Brauerei Bd. 12, S. 1062 (1895) und Bd. 20, S. 560 u. 575 (1903); Chemikerzeitg. Bd. 19, S. 1873 (1895).

³⁾ S. P. L. Sørensen, Biochem. Zeitschr. Bd. 21, S. 131 und zwar S. 256 (1909); L. Michaelis und H. Davidsohn, Biochem. Zeitschr. Bd. 35, S. 386 (1911).

⁴⁾ Biochem. Zeitschr. Bd. 35, S. 386 (1911).

⁵⁾ Biochem. Zeitschr. Bd. 110, S. 217 (1920).

Tabelle 1.

Wirkungsoptimum der Raffinase.

(30°; Puffer: Sørensen'sche Standardlösungen.)

Puffer (2,5 ccm auf 25)	p _H (ange- nähert)	nach 90 Minuten		nach 120 Minuten	
		Drehungs- abnahme °	Spaltung %	Drehungs- abnahme °	Spaltung %
2,2 ccm 0,1 mol. Na-citrat + 7,8 ccm 0,1 n HCl . . .	1,5	3,09	47,5	3,69	56,6
3,5 ccm 0,1 mol. Na-citrat + 6,5 ccm 0,1 n HCl . . .	2,5	3,64	55,8	4,17	64,0
4,0 ccm 0,1 mol. Na-citrat + 6,0 ccm 0,1 n HCl . . .	3,0	3,84	58,9	4,46	68,4
5,6 ccm 0,1 mol. Na-citrat + 4,4 ccm 0,1 n HCl . . .	4,0	4,13	63,3	4,71	72,2
10 ccm $\frac{n}{5}$ Na-acetat + 5 ccm $\frac{n}{5}$ Essigsäure .	5,0	4,18	64,1	4,83	74,0
1,2 ccm $\frac{1}{15}$ mol. Na ₂ HPO ₄ + 8,8 ccm $\frac{1}{15}$ mol. KH ₂ PO ₄	6,0	3,83	58,7	—	—
3 ccm $\frac{1}{15}$ mol. Na ₂ HPO ₄ + 7 ccm $\frac{1}{15}$ mol. KH ₂ PO ₄	6,5	3,29	50,5	3,91	60,0
6,2 ccm $\frac{1}{15}$ mol. Na ₂ HPO ₄ + 3,8 ccm $\frac{1}{15}$ mol. KH ₂ PO ₄	7,0	2,41	37,0	2,92	44,8
8,5 ccm $\frac{1}{15}$ mol. Na ₂ HPO ₄ + 1,5 ccm $\frac{1}{15}$ mol. KH ₂ PO ₄	7,5	0,94	14,4	1,26	19,4
9,4 ccm $\frac{1}{15}$ mol. Na ₂ HPO ₄ + 0,6 ccm $\frac{1}{15}$ mol. KH ₂ PO ₄	8,0	0,61	9,4	0,88	13,5
10 ccm 1% NH ₃ + 0,3145 g NH ₄ Cl	9,2	—	—	0,07	(1,0)

betrachtet, die aus Invertin + 1 Mol. Saccharose besteht. Es wäre daher eine andere Abhängigkeit der Raffinosespaltung vom p_H sogar für den Fall zu erwarten, daß sie durch Saccharase selbst bewirkt wird, da ja die Dissoziationskonstanten der Verbindungen aus ein und demselben Enzym mit verschiedenen Substraten ungleich sein sollten. Die nebenstehende Figur zeigt, daß der logarithmische Parameter unserer Kurve etwa — 6,8 beträgt, nahezu übereinstimmend mit den genauen Messungen von Michaelis, der für Saccharase — 6,7 fand. Dagegen ist der langsame Abstieg der Kurve im stärker sauren Gebiet auffallend.

Auch in den anderen Voraussetzungen der Bestimmung gleichen sich Raffinase und Saccharase. Proportionalität von Reaktionsgeschwindigkeit und Enzymmenge trifft für die Spaltung der Raffinose in demselben Bereich von 1:40 zu wie nach H. v. Euler und O. Svanberg¹⁾ für die Rohrzuckerinversion.

Versuch 1. Die Enzymlösung war ein Auszug aus dänischer Brennerhefe, die wir mit 2 Teilen Wasser unter Zusatz von Toluol $4\frac{1}{2}$ Tage der Autolyse überließen. Das Filtrat wurde nach dem Klären mit Kaolin aufs vierfache verdünnt. Es war frei von Melibiase, denn die Bestimmungslösung zeigte nach 18stündiger Wirkung bei $30^\circ \alpha = 7,32^\circ$, nach 28 Stunden $\alpha = 7,22^\circ$.

Versuch 2. Angewandt wurde die 0,1% ige Lösung eines Invertinpräparates (vom Zeitwert 4, Nr. 5 der Tabelle 4) aus untergäriger Bierhefe (Löwenbräu München), das nach dem Adsorptionsverfahren von R. Willstätter und F. Racke gewonnen war. Das Präparat schien nichts mehr von der Melibiase der angewandten Hefe zu enthalten. Die Bestimmungslösung besaß nämlich bei $p_H = 4,5$ nach 24 Stunden $\alpha = 7,35^\circ$ und nach 30 Stunden $\alpha = 7,23^\circ$, in einer anderen Probe bei $p_H = 6,5$ nach 25 Stunden $\alpha = 7,23^\circ$.

Tabelle 2.
Enzymkonzentration und Umsatz.

Nr.	Enzym- menge (ccm in 25)	Zeit	Drehungs- abnahme	Spaltung	Zeit	Drehungs- abnahme	Spaltung
		Min.	°	%	Min.	°	%
1	0,25	400	1,62	24,8	600	2,28	34,9
	0,5	200	1,67	25,6	300	2,33	35,7
	1,0	100	1,67	25,6	150	2,37	36,3
	2,5	40	1,71	26,2	60	2,41	36,9
	5,0	20	1,71	26,2	30	2,41	36,9
	10,0	10	1,70	26,0	15	2,38	36,5
2	2,5	60	3,21	49,2	90	3,89	59,6
	5,0	30	3,15	48,3	45	3,86	59,2
	7,5	20	3,11	47,7	30	3,90	59,8

¹⁾ Diese Zeitschr. Bd. 107, S. 269 und zwar S. 275 (1919).

Die Kinetik der Raffinasewirkung haben schon H. E. Armstrong und W. H. Glover¹⁾ untersucht und gefunden, daß die Spaltung der Raffinose durch eine Invertinlösung aus Oberhefe wie durch Säuren monomolekular verläuft. Dieses Ergebnis bestätigt sich auch unter den Bedingungen unserer Bestimmung, wie sich aus der Tabelle 3 ergibt. Von den beiden Versuchen, die wir mit den schon für die Tabelle 2 verwendeten Enzymlösungen vornahmen, stimmt der mit Raffinaselösung aus Brennereihefe ausgeführte (Nr. 1) für streng monomolekularen Verlauf zwischen 30 und 60% Spaltung. Daher benützt man für Oberhefen und Lösungen daraus zur Umrechnung des jeweils beobachteten Spaltungsgrades auf 50% Hydrolyse die theoretische Kurve. Bei Versuch 2 mit Invertinpräparat fiel $k \cdot 10^5$ zwischen 30 und 70% Spaltung von 381 auf 344, vielleicht infolge langsamer Zersetzung von Enzym, dessen Empfindlichkeit mit dem höheren Reinheitsgrad zugenommen hatte. Die aus Versuch 2 abgeleitete Kurve liegt den Bestimmungen der Präparate zugrunde.

Tabelle 3.
Kinetik der Raffinasewirkung. (30°)

Zeit Min.	1. Versuch			2. Versuch		
	Drehung °	Spaltung %	$\frac{10^5}{t} \log_{10} \frac{a}{a-x}$	Drehung °	Spaltung %	$\frac{10^5}{t} \log_{10} \frac{a}{a-x}$
0	13,71	0,0	—	13,71	0,0	—
10	13,26	6,9	310	13,13	8,9	404
20	12,76	14,5	340	12,50	18,5	445
30	12,30	21,6	352	12,12	24,4	404
45	11,67	31,3	362	11,58	32,6	381
60	11,14	39,4	362	11,07	40,5	376
80	10,55	48,4	359	10,50	49,2	367
110	9,80	60,0	362	9,83	59,4	356
150	—	—	—	9,17	69,5	344
160	9,00	72,1	346	—	—	—
200	—	—	—	8,65	77,5	324
220	8,35	82,1	340	—	—	—
260	—	—	—	8,10	85,9	327
∞	7,18	100,0	—	7,18	100,0	—

¹⁾ Proc. Roy. Soc., Ser. B, Bd. 80, S. 312 und zwar S. 317 (1908).

Verhältnis zwischen Saccharase- und Raffinase- wirkung von Invertinpräparaten.

Für die Prüfung des Verhältnisses zwischen Rohrzucker- und Raffinosespaltung standen einige Invertinpräparate zur Verfügung, die in Arbeiten von R. Willstätter mit F. Racke und mit J. Graser auf verschiedenen Wegen gewonnen waren.

Das 1. Beispiel der Tabelle 4 ist ein Präparat vom Zeitwert 4,8, das durch Adsorption mit Aluminiumhydroxyd gereinigt war; ein Jahr nach der Darstellung untersucht, erwies es sich frei von Melibiase. Es ergab den Quotienten 11,2, genau denselben fanden wir in dem zweiten Beispiel der Tabelle, nämlich dem gleichen Präparat, das eine weitere Reinigung durch Adsorption mit Kaolin (vergl. R. Willstätter und F. Racke, I. Abh.¹⁾ Abschnitt C, III, 1. Beispiel) auf den Zeitwert 0,86 gebracht hatte. Auch die anderen Invertinpräparate, soweit sie frei von Melibiase waren, führten zu genau dem gleichen Quotienten, so das 3. Beispiel der Tabelle, ein analog dargestelltes Invertin, dessen Zeitwert 0,7 bei einer weiteren Behandlung mit Uranacetat (Willstätter und Racke, I. Abh., Abschn. B, VIII) infolge teilweiser Zersetzung auf 1,96 zurückgegangen war, ferner zwei durch die beiden Adsorptionsverfahren gereinigte und zwar von Frl. J. Graser frisch dargestellte Präparate, eines von sehr geringem Melibiasegehalt und dem Zeitwert 1 (Nr. 4) und ein melibiasefreies vom Zeitwert 4 (Nr. 5). Das Beispiel 7 der Tabelle ist ein melibiasehaltiges Präparat vom ungünstigen Zeitwert 12,5, das nur durch Aluminiumhydroxyd gereinigt war.

Mit diesen Präparaten ähnlicher Darstellungen werden noch zwei auf ganz andere Weise gewonnene Invertinpräparate verglichen. Das Beispiel 8 der Tabelle, ein schwach melibiasehaltiges Invertin vom Zeitwert 2,3 (aus einer Lösung vom Zeitwert 0,98 durch Eindunsten erhalten), stammte aus einem bei neutraler Reaktion (Willstätter und Racke, Abschn. A, IX, 2) gewonnenen Hefeauszug und war nach einem später zu beschreibenden Verfahren durch Fällung mit Bleiacetat und

¹⁾ Ann. d. Chem., im Druck.

Adsorption mit Aluminiumhydroxyd gewonnen. Endlich das Beispiel 9 war von Willstätter und Racke (II. Abh., B, II) durch fraktionierten enzymatischen Abbau der Hefe dargestellt; es verdankte den Zeitwert 1,4 der Adsorption mit Tonerde, Kaolin und nochmals Tonerde. Es wies einen sehr deutlichen Gehalt an Melibiase auf, der den niedrigeren Quotienten 9,3 der Raffinase- und Saccharasewirkung erklärt.

Es ist bemerkenswert, wie konstant bei einer langen Reihe verschiedenartig ausgeführter Operationen, welche die Möglichkeit einer Fraktionierung bieten, das Verhältnis der beiden enzymatischen Wirkungen bleibt. Bei der Entfernung der Eiweißkörper aus wäßrig-acetoniger Lösung, die nicht ohne Verlust von Enzym stattzufinden pflegt, bei der Adsorption mit verschiedenen Mitteln, bei der Elution aus den Adsorbaten, beim Fällen mit organischen Lösungsmitteln, bei den öfters unter beträchtlichem Enzymverlust ausgeführten Vornahmen der Dialyse und des Eindampfens ist keine Anreicherung einer Enzymkomponente eingetreten. Die bei der Zerlegung der Tonerde- und Kaolinadsorbate angewandten Reagentien, wie Ammoniak, Natriumkarbonat, sekundäre Phosphate, wirken freilich unspezifisch als alkalische Mittel. Eher erschien als spezifisch die von R. Willstätter und F. Racke (Abh. I, Abschn. B, VIII, 3) beschriebene Zerlegung des Invertinadsorbates in Aluminiumhydroxyd durch Rohrzucker. Wir prüften deshalb, ob sich dabei eine Verschiebung des Quotienten der beiden Zeitwerte erzielen läßt.

1. Versuch. Vom Präparat 5 der Tabelle wurden 38 mg aufgelöst und mit einer zur Adsorption nicht ausreichenden Menge Aluminiumhydroxyd aufgenommen. Das mittels der Zentrifuge abgetrennte und gewaschene Adsorbat brachten wir zur Bestimmung auf 50 ccm.

- a) Saccharasewirkung. 2 ccm Adsorbat in 50 ccm Bestimmungslösung bewirkten in 26 Min. $2,78^\circ$ Drehungsabnahme. Daher Zeit der halben Hydrolyse 31,8 Min.
- b) Raffinasewirkung. 10 ccm Suspension bewirkten in 50 ccm Raffinoselösung in $63\frac{1}{2}$ Min. $3,06^\circ$ Drehungsabnahme. Daher halbe Hydrolyse nach 70 Min.

Tabelle 4.

Quotienten der Raffinase- und Saccharasezeitwerte von Invertinpräparaten. (30°; Enzymmengen für Rohrzucker- und für Raffinosespaltung im Verhältnis 1:5.)

Nr.	Präparat	Wir- kung auf	Ver- suchs- zeit Min.	Dreh- ungs- ab- nahme °	Spal- tung %	Zeit der halben Hydro- lyse Min.	Quo- tient
1	Präp. nur durch $\text{Al}(\text{OH})_3$ gerein., Zeitw. 4,8; frei von Melibiase	Rohrz. Raffin.	60 111	3,55 3,08	54 47	54,5 121,5	} 11,2
2	Dass. Präp., weiter d. Kaolinads. gerein., Zeitw. 0,86, frei von Melibiase	Rohrz. „ Raffin. „	32 44,5 60 71,5	4,17 5,12 3,63 4,01	63,5 78 55,5 61,5	23,5 22 51 50,5	} 11,2
3	Ebenso gerein., dann mit Uranac. behandelt, Zeitw. 1,96	Rohrz. „ Raffin. „	28,5 50 58 108	2,33 3,64 2,22 3,46	35,5 55,5 34 53	43,5 44 101 99	
4	Gerein. durch d. Ads.-Verf., Zeitw. 1, sehr schwach melibiasehaltig	Rohrz. Raffin.	47,5 70	5,04 3,81	77 58,5	24 54,5	
5	Gerein. nach den Ads.-Verf., Zeitw. 4, frei von Melibiase	Rohrz. „ Raffin. „	30 48,5 60 110	2,80 4,07 2,64 3,88	42,5 62 40,5 59,5	36 36,5 81 82,5	} 11,3
6	Gerein. nach den Ads.-Verf., Zeitw. 1,8	Rohrz. „ Raffin. „	32 52,5 52 96	2,29 3,50 2,04 3,15	35 53,5 31 48,5	50 48,5 102 101,5	} 10,3
7	Nur durch $\text{Al}(\text{OH})_3$ gerein. Präp. vom Zeitwert 12,5, melibiasehaltig	Rohrz. „ Raffin. „	35 50 40 65,5	2,89 3,84 1,99 2,79	44 58,5 30,5 43	41 41 80 81	} 9,8
8	Gerein. mit Bleiac. und durch $\text{Al}(\text{OH})_3$, Zeitwert 2,3, wenig Melibiase enthaltend	Rohrz. Raffin.	22 65,5	2,77 3,56	42 54,5	27 57,5	} 10,6
9	Präp. aus frakt. enzym. Hefeabbau, durch Ads.-Verf. gerein., Zeitw. 1,4, melibiasehaltig	Rohrz. Raffin.	26,5 59	3,75 3,98	57 61	22,5 42	} 9,3

Die übrige Adsorbatsuspension (38 ccm) spülten wir in einen 100 ccm-Kolben, versetzten sie mit 50 ccm 32% iger Rohrzuckerlösung und füllten zur Marke auf. Nach 30 Minuten zentrifugierte man die gebildete Elution ab und unterwarf nach zweimaligem Waschen mit Wasser den Rückstand, auf 35 ccm gebracht, wieder beiden Bestimmungen. Er wies von Saccharase noch 22, von Raffinase ebenfalls 22% auf.

- a) Saccharasewirkung. 5 ccm Suspension in 50 ccm bewirkten in $151\frac{1}{2}$ Min. $5,80^\circ$ Drehungsabnahme. Zeit der halben Hydrolyse 52,2 Min.
- b) Raffinasewirkung. 20 ccm Suspension in 50 ccm bewirkten in 166 Min. $3,54^\circ$ Drehungsabnahme. Halbe Hydrolyse 148 Min.

Der Quotient der Saccharase- und Raffinasezeitwerte war im Adsorbat 1:11,2, im rückständigen Aluminiumhydroxyd nach der Rohrzuckerelution 1:11,3.

2. Versuch. Aus Kopenhagener Brenneriehefe wurde durch rasche Autolyse bei Gegenwart von Toluol in $4\frac{1}{2}$ Tagen eine Invertinlösung erhalten, die man zur Klärung mit 10% Kaolin behandelte. Das Filtrat ergab den Quotienten der Wirkungswerte 1:5,3. Aus der Lösung adsorbierten wir mit einer nicht ganz ausreichenden Menge Aluminiumhydroxyd das Enzym, um das Adsorbat wie beim 1. Versuch mit Rohrzucker zu eluieren.

Bestimmung des Adsorbates.

- a) Saccharasewirkung. 2 ccm Adsorbatsuspension in 50 ccm Rohrzuckerlösung bewirkten in 22 Min. $2,36^\circ$ Drehungsabnahme, in 46 Min. $4,20^\circ$. Zeit der halben Hydrolyse 33 und 33 Min.
- b) Raffinasewirkung. 5 ccm Adsorbat in 50 ccm Raffinoselösung bewirkten in 38 Min. $1,95^\circ$ Drehungsabnahme, in 57 Min. $2,74^\circ$. Halbe Hydrolyse 73,5 und 72,5 Min.

Nach dem Eluieren analysierten wir wieder die noch enzymhaltige Tonerde.

- a) Saccharasewirkung. 5 ccm Suspension in 50 ccm bewirkten in 35 und $47\frac{1}{2}$ Min. $2,77^\circ$ und $3,60^\circ$ Drehungsabnahme. Zeit der halben Hydrolyse 43 und 42 Min.
- b) Raffinasewirkung. 20 ccm Suspension in 50 ccm bewirkten in 54 und 68 Min. $3,31^\circ$ und $3,86^\circ$ Drehungsabnahme. Halbe Hydrolyse 53 und 53 Min.

Im Adsorbat waren Saccharase und Raffinase anfangs mit dem Zeitwertquotienten 1:5,5 enthalten, nach dem Eluieren enthielt das Aluminiumhydroxyd noch $41\frac{1}{2}\%$ der Saccharase und $45\frac{1}{2}\%$ der Raffinase entsprechend dem Quotienten 1:5,0. Es ist also eine schwerlich über die Bestimmungsfehler hinausgehende kleine Verschiebung, kaum eine geringe Anreicherung (10%) der Raffinase erfolgt.

Auch bei der Bildung von Invertinlösungen durch Autolyse der Hefe gehen Saccharase und Raffinase ohne Änderung des Zeitwertquotienten in Lösung. Der Melibiasegehalt der untergärigen Hefe, von der unsere Invertinpräparate herkommen, hindert den Vergleich von Hefe und Präparaten hinsichtlich der Raffinosespaltung. Deshalb vergleichen wir in einer melibiasefreien Hefe, der dänischen Brennerihefe, und in der aus ihr gebildeten Autolysenflüssigkeit den Quotienten der beiden Enzymwirkungen.

Die Hefe wird im folgenden Abschnitt durch die Invertin- und Raffinasezeitwerte 0,52 und 2,65, also den Quotienten 5,1 gekennzeichnet. Die in 2 Tagen gebildete Autolysenflüssigkeit, mit Kaolin geklärt, ergab bei einer Enzymausbeute von etwa 3% für die Raffinase- und Invertinzeitwerte den Quotienten 5,5. Der in $4\frac{1}{2}$ Tagen gewonnene Hefeauszug enthielt nach dem Klären mit Kaolin 20% vom Enzym und entsprach dem Quotienten 5,3 der Raffinase- und Saccharasezeitwerte.

80 g Hefe mit 160 g Wasser unter Toluolzusatz autolysiert.

Auszug nach $2\frac{1}{2}$ Tagen.

- a) Saccharasebestimmung. 2 ccm bewirkten in 50 ccm in 78 Min. $3,45^\circ$ Drehungsabnahme; Zeit der halben Hydrolyse 73,5 Min.
- b) Raffinasebestimmung. 10 ccm bewirkten in 78 Min. $3,21^\circ$ Drehungsabnahme; Zeit der halben Hydrolyse 80,5 Min.

Auszug nach $4\frac{1}{2}$ Tagen.

- a) Saccharasebestimmung. 0,25 ccm bewirkten in 50 ccm in 79 Min. $3,08^\circ$ Drehungsabnahme; Zeit der halben Hydrolyse 85,5 Min.
- b) Raffinasebestimmung. 1,25 ccm bewirkten in 60 Min. $2,41^\circ$ Drehungsabnahme; Zeit der halben Hydrolyse 91 Min.

Die Werte, deren Fehler etwas größer sein können wie oben, differieren so wenig untereinander und vom Quotienten

der Hefe selbst, daß von einer Verschiebung des Verhältnisses nicht gesprochen werden kann.

Saccharase- und Raffinasewirkung einiger obergäriger Hefen.

An einigen Brennereihefen, die in der voranstehenden Abhandlung von R. Willstätter und W. Steibelt auf den Gehalt an Maltase und α -Glukosidase geprüft und in einer nachfolgenden hinsichtlich des Gärvermögens untersucht wurden, vergleichen wir die Wirkung auf Rohrzucker und Raffinose. Die Hefen weisen große Unterschiede auch im Gehalt an den hier in Betracht kommenden Enzymen auf. Die dänische Brennereihefe, die wir der Gefälligkeit des Herrn Prof. A. Jörgensen verdanken, ist an Invertin 24-, an Raffinase 25mal reicher als die Stadlauer Spiritushefe. Im Quotienten der beiden Enzymwirkungen stimmen aber die enzymreichste und enzymärmste der untersuchten Hefen gut überein. Dagegen differieren sie und ihre Auszüge wie auch die Adsorbate daraus von den beschriebenen Invertinpräparaten derart, daß die Spaltung der beiden Zucker nicht auf ein und dasselbe Enzym zurückgeführt werden kann. Eine entscheidende Bestätigung für dieses Ergebnis wird beim Vergleich weiterer Heferassen (Tabelle 5) gewonnen, der zu sicheren Ausschlägen im Quotienten

$$\frac{\text{Zeitwert für Raffinase}}{\text{Zeitwert für Saccharase}}$$

führt. Vor allem kommt die reine Brennereihefenrasse XII des Berliner Instituts für Gärungsgewerbe in Betracht, die 2,4 mal weniger Invertin und fast 6 mal weniger Raffinase als die Kopenhagener Oberhefe enthält. Der Quotient der Zeitwerte wird hier fast $2\frac{1}{2}$ mal ungünstiger für Raffinase als bei der dänischen Hefe. Bei der Rasse II des Berliner Instituts hingegen finden wir den Quotienten wieder gleich (5,1, mit Auszug aus Trockenhefe bestimmt) wie bei der Kopenhagener Hefe.

Tabelle 5.

Quotienten der Raffinase- und Saccharasezeitwerte
obergüriger Hefen.

Nr.	Hefe (Trockengew. %)	Wirkung auf	g Frisch- hefe in 25 ccm	Ver- suchs- zeit Min.	Dreh- ungs- ab- nahme °	Spal- tung %	Ver- gleichs- zeit- wert	Quo- tient
1	Brennereihefe Kopenhagen 21. II. 21 (21,6)	Rohrz. " Raffin.	0,05 0,25	20 35,5 41,5	2,82 4,38 4,51	43 66,5 69	0,52 2,65	5,1
2	Spiritushefe Stadlau 25. II. 21 (30,3)	Rohrz. Raffin.	0,125 0,375	60 95	1,48 1,31	22,5 20	12,1 65	5,4
3	Brennereihefe Rasse XII 26. II. 21 (25,0)	Rohrz. " Raffin.	0,125 0,375	30 43 52	4,25 5,28 2,31	65 80,5 35,5	1,26 15,6	12,3
4	Brennereihefe M 26. I. 21 (22,2)	Rohrz. " Raffin. "	0,125 0,375	31 43 39,5 60	2,30 3,08 1,31 2,21	35 47 20 34	2,62 19,7 16,9	7,5 6,5
5	Branntweinhefe Sinner 3. III. 21 (28,0)	Rohrz. " Raffin. "	0,125 0,375	34,5 49 56 83	2,50 3,36 1,71 2,63	38 51 26 40,5	3,36 26,3 23,5	7,8 7,0

Eine Nebenerscheinung, die bei einigen Raffinasebestimmungen der Tabelle auffällt, ist das Sinken der Zeitwerte während der Bestimmungsdauer. Gleiches ist öfters bei Maltase und im voranstehenden auch bei α -Glukosidase beobachtet worden. Wie in jenen Fällen dürfte die Verbesserung der Raffinasezeitwerte als Enzymbildung im Laufe der Versuche zu deuten sein. Noch deutlicher zeigt sich diese Erscheinung im folgenden Versuch, in dem die Zeitwerte sehr genau bestimmt sind, da die beobachteten Spaltungen in den mittleren Teil der Reaktionskurve fallen.

Hefe von Sinner. Nach $52\frac{1}{2}$, 85, 110 Minuten betrug die Spaltung 34, 50, 61% entsprechend Zeiten halber Hydrolyse von 91, 85 und 78 Minuten. Das Sinken des Zeitwerts entspricht einem Zuwachs an Enzym von 15%.

Die Zeitwertbestimmung wurde stets unter Toluolzusatz in kurzen Zeiten ausgeführt. Bei der Einwirkung der lebenden Hefe auf Raffinose im langdauernden Gärversuch sind die Bedingungen für die Raffinasebildung günstiger. Wir beobachteten unter diesen Umständen ein fast gleiches Ansteigen von Raffinase und Invertin. Hier ist daran zu erinnern, daß H. v. Euler¹⁾ und seine Mitarbeiter im Laufe ausgedehnter Studien über Enzymbildung z. B. bei der Hefezüchtung in asparaginhaltiger Rohrzuckerlösung nicht sowohl einem spezifischen Invertinzuwachs als einer allgemeinen Erhöhung der vitalen Prozesse, einer allgemeinen Enzymbildung freilich mit sehr ungleicher prozentischer Zunahme der betreffenden Enzymwirkungen begegneten²⁾.

Für unseren Versuch diente die Brennerihefe von Sinner. Beim Vergären von Rohrzucker unter Zusatz von Pepton war bei ihr keine Enzymvermehrung eingetreten. Mit 5 g der Hefe (Nr. 5 der Tabelle) ließen wir 1 l 10%ige Raffinoselösung unter Zusatz von 1 g Pepton bei 25° 36 Stunden gären; ein Teil der Fruktose blieb übrig. Die Hefe wurde mit der Zentrifuge abgetrennt und nach sorgfältigem Waschen zu einem Trockengehalt von 28,2% abgepreßt. Für die Bestimmung brachten wir 2 g der Hefe unter Zusatz von etwas Toluol auf 50 ccm.

- a) Saccharasebestimmung. 5 ccm bewirkten in 50 ccm Rohrzuckerlösung in 54 Min. $3,91^\circ$ Drehungsabnahme entsprechend 43,5 Min. Zeit für halbe Hydrolyse.
- b) Raffinasebestimmung. 15 ccm bewirkten in 50 ccm in 71 Min. $2,53^\circ$ und in 98 Min. $3,39^\circ$ Drehungsabnahme. Daher Zeit der halben Hydrolyse 101 und $92\frac{1}{2}$ Min.

¹⁾ Chemie der Enzyme, 2. Aufl., München und Wiesbaden 1920, 10. Kap., S. 284.

²⁾ H. v. Euler und H. Meyer, Diese Zeitschr. Bd. 79, S. 274 (1912) und zwar S. 298.

Der Zeitwert für Raffinase war von 26,3 bzw. 23,5 verbessert zu 17,1 und 15,6, der Vergleichszeitwert der Saccharase 2,45 anstatt 3,36. Der Quotient der Enzymwirksamkeiten betrug nach der Zunahme 7,0 und 6,4 statt der Anfangswerte 7,8 bis 7,0.