

Über die Bildung von Invertase in Hefen.

Von

H. Euler und D. Johansson.

Mit einer Kurvenzeichnung im Text.

(Aus dem biochemischen Laboratorium der Hochschule Stockholm.)

(Der Redaktion zugegangen am 9. Dezember 1911.)

Die Versuche, Hefe an Invertase anzureichern, bilden eine Fortsetzung unserer früheren Untersuchungen über die Anpassung der Hefe und die Bedingungen einer Veränderung ihres Enzymgehaltes.¹⁾ Sie verfolgen ferner einen praktischen Zweck, nämlich ein möglichst invertasereiches Ausgangsmaterial für die Gewinnung und Reindarstellung dieses Enzymes zu erhalten.

Was den Einfluß der Zucker auf die Bildung der Invertase angeht, so hatten die ersten Versuche ziemlich große Effekte geliefert, welche später nicht wieder erhalten wurden. Mit der in vorliegender Untersuchung angewandten Heferasse konnte eine Vermehrung der Invertase durch Kultivierung in Rohrzuckerlösung bezw. bei Abwesenheit von Traubenzucker nicht nachgewiesen werden. Die Frage, in welchen Hefen ein solcher Effekt eintritt, kann bis jetzt nicht allgemein beantwortet werden.

Vermutlich spielt der Eiweißgehalt, wie für den physiologischen Zustand der Hefe überhaupt (Delbrück), für die Enzymbildung eine ausschlaggebende Rolle. Man vergleiche hierzu die interessanten in der Versuchs- und Lehrbrauerei in Berlin gewonnenen Ergebnisse von F. Schönfeld, Mansfeld u. a., neuerdings zusammengestellt von F. Schönfeld und Hirt (Wochenschr. f. Brauerei, Bd. 28, S. 421, 1911).

Negative oder fast negative Ergebnisse in bezug auf den Einfluß der Zuckerart, auf die Bildung von Saccharase hat schon vor langer Zeit Fernbach²⁾ erhalten.

¹⁾ H. Euler u. B. af Ugglas, Diese Zeitschrift, Bd. 70, S. 279, 1911.

H. Euler u. S. Kullberg, Diese Zeitschrift, Bd. 71, S. 14, 1911.

²⁾ Ann. Institut Pasteur, Bd. 4, S. 654 u. ff., 1890.

Der gleiche Forscher fand auch, daß die stickstoffhaltige Nahrung einen bedeutenden Einfluß auf den Invertasegehalt der Hefe ausübt.

Wir übergehen die Versuche von Duclaux,¹⁾ Bourquelot²⁾ u. a., welche mit *Aspergillus* und *Penicillium* gearbeitet haben, und erinnern nur an die Untersuchung von E. Chr. Hansen³⁾ und von Klöcker,⁴⁾ welche zeigten, daß solche Hefen, welche von vornherein keine Invertase besitzen, dieses Enzym auch nicht durch Kultur in Rohrzuckerlösungen erlangen.

Effront⁵⁾ spricht sich über die Bildung von Invertase folgendermaßen aus:

«Ersetzt man in der Nährlösung den Rohrzucker durch ein direkt assimilierbares Kohlenhydrat, so dauert trotz dieser Veränderung die Sucraseabscheidung an. In diesem Falle erheischt die Ernährung der Hefe keineswegs die Gegenwart dieses Enzymes. Besitzt demnach die Natur des Zuckers keinerlei Einfluß auf die Sucraseabsonderung, so darf man daraus noch nicht schließen, daß diese Absonderung ganz allgemein abhängig von der Ernährungsweise der Zellen ist. Die Erfahrung hat im Gegenteil ergeben, daß die Sekretion von Diastase direkt zusammenhängt mit der Ernährungsweise, unabhängig allerdings von dem dargebotenen Kohlenhydrat. In Bierwürze kultivierte Hefen sondern weit größere Invertinmengen ab, als dies bei Hefen der Fall ist, welche lediglich in Zuckerlösungen gewachsen waren; die Absonderung von Sucrase wird in diesem Falle also begünstigt durch die stickstoffhaltigen Bestandteile des Malzes. So weiß man z. B. aus Erfahrung, daß bei Zugabe von Peptonen der Sucrasegehalt in Nährlösung zunimmt.» Effront gibt hier nicht an, in welcher Weise und von wem diese Erfahrungen gewonnen sind, und auffallend ist, daß er hier von dem Sucrasegehalt der Nähr-

1) *Traité de Microbiologie*, T. 2, p. 84, 1899.

2) *Compt. rend. Soc. Biol.*, 1893, S. 653.

3) *Medd. fra Carlsberg-Lab.*, Bd. 5, S. 1, 1900.

4) *Ebenda*, Bd. 5, S. 55, 1900.

5) *Die Diastasen*. Deutsche Übersetzung von Bücheler, Leipzig 1900, S. 74 u. ff.

lösung spricht, welche immer gering und dem Sucrasegehalt der Hefe selbst nicht proportional ist.

«Die stickstoffhaltigen Substanzen, fährt Effront fort, sind es nicht allein, welche auf die Abscheidung von Sucrase Einfluß ausüben. Leider kennt man die Bedingungen nur sehr unvollkommen, unter welchen die Bildung von Diastase begünstigt wird, und dennoch verdienen diese Bedingungen ein besonders eingehendes Studium; vermögen sie uns doch vom theoretischen Standpunkt aus recht gewichtige Aufschlüsse zu erteilen.»

Wir haben versucht, quantitative Aufschlüsse über die künstliche Bildung bzw. Vermehrung der Invertase zu erlangen, und haben dazu die folgende, durch frühere Versuche¹⁾ gegebene Methode gewählt. Die vorbehandelte Hefe wurde abgepreßt und in einer Rohrzuckerlösung aufgeschlemmt, und zwar 0,25 g Hefe in 25 ccm 16%iger Rohrzuckerlösung unter Zusatz von 0,5 ccm Chloroform. Nach verschiedenen Zeiten wird die Reaktion durch Zusatz von 5 ccm 0,2-normaler Natronlauge unterbrochen. Nach einiger Zeit wird die Flüssigkeit von den Hefezellen abfiltriert und im Polarisationsapparat bei 18° beobachtet. Die Drehung nach vollständig abgelaufener Reaktion wurde aus der Drehung der Ausgangslösung durch Multiplikation derselben mit dem Faktor 0,32 berechnet.

Die Vorbehandlung der Hefe (es kam ausschließlich Hefe H der hiesigen St. Eriks-Brauerei zur Anwendung) geschah in folgender Weise:

Etwa 3 g Hefe wurden in etwa 200 ccm einer Nährlösung eingeführt, welche per Liter enthielt:

0,25 g	MgSO ₄ ,
4	» Asparagin,
5	» KH ₂ PO ₄ ,
20	» Zucker.

Parallelversuche wurden angestellt einerseits mit Traubenzucker und anderseits mit Rohrzucker.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 71, S. 20, 1911.

I.

Vergleich zwischen der Einwirkung von Traubenzucker und Rohrzucker enthaltender Nährlösung.

Vorbehandelt 4 Stunden. — Temp. 17,6°.

Minuten	Nährlösung mit Rohrzucker		Minuten	Nährlösung mit Glukose	
	α	$k \cdot 10^4$		α	$k \cdot 10^4$
—	8,77	—	—	8,77	—
0	8,64	—	0	8,66	—
15	6,83	50	15	6,54	59
30	4,70	60	20	5,83	61
∞	— 2,81	—	30	4,60	63
			∞	— 2,81	—

Vorbehandelt 24 Stunden.
Temp. 18,2°.

Min.	Nährlösung mit Rohrzucker		Nährlösung mit Glukose	
	α	$k \cdot 10^4$	α	$k \cdot 10^4$
—	8,75	—	8,75	—
0	8,64	—	8,63	—
15	6,08	73	6,00	76
25	4,53	77	4,32	82
35	2,79	88	2,70	90
∞	— 2,80	—	— 2,80	—

Vorbehandelt 71 Stunden.
Temp. 17,2°.

Min.	Nährlösung mit Rohrzucker		Nährlösung mit Glukose	
	α	$k \cdot 10^4$	α	$k \cdot 10^4$
—	8,80	—	8,80	—
0	8,63	—	8,68	—
15	5,33	99	5,18	104
25	3,40	106	3,25	107,5
35	1,84	111	1,56	119
∞	— 2,82	—	— 2,82	—

Bei allen Versuchen wurden die aus der Drehung nach 50 Minuten berechneten Konstanten kleiner gefunden als die folgenden. Der Grund dieses Verhaltens ist bis jetzt noch nicht aufgeklärt. Als Wert für die Inversionsgeschwindigkeit wird demnach am besten das Mittel der beiden Konstanten für $t = 25^\circ$ und $t = 35^\circ$ gewählt. Reduziert man dieselben auf die Temperatur $17,2^\circ$ und auf die gleiche Menge der Trockenhefe, d. h. auf einen Gehalt der angewandten Hefe von 27% Trockensubstanz, so ergeben sich folgende Mittelwerte für die Inversionskonstanten.

Versuch I.
Temperatur 17,2°.

Dauer der Vorbehandlung Stunden	Glukose $k \cdot 10^4$	Rohrzucker $k \cdot 10^4$
0	24,5	24,5
4	55	48
24	78	76
71	105	102

Es zeigt sich also, daß die Vorbehandlung der Hefe mit Rohrzucker sicher keine Erhöhung des Invertasegehalts in Vergleich zu der mit Glukose behandelten Hefe hervorgerufen hat. Im Gegenteil liegen die letzteren Werte durchgehends etwas höher als die ersteren; worauf dies beruht, bleibt einstweilen unentschieden.

Hat also der Rohrzucker nicht den Einfluß auf die Bildung der Invertase, den man vom theoretischen Gesichtspunkte aus erwarten könnte, so zeigt sich anderseits ein sehr erheblicher Einfluß nahezu gleicher Art durch Vorbehandlung mit der eine von beiden Zuckerarten enthaltenden Nährlösung. Wie aus obiger Tabelle ersichtlich, stieg durch eine Vorbehandlung von 71 Stunden das Inversionsvermögen der Hefe auf das vierfache. Bei diesen Versuchen wurde, wie aus der Figur 1 ersichtlich ist, ein Maximum des Invertasegehalts nicht erreicht.

Wir haben deswegen noch eine zweite Versuchsreihe mit längerer Dauer der Vorbehandlung angestellt und es wurden bei dieser Serie für jede Dauer der Vorbehandlung Parallelversuche angestellt.

Frische Hefe. Temp. 17,2°			Vorbehandelt 20 Stunden. Temp. 17,2°.				
Minuten	α	$k \cdot 10^4$	Min.	Nährlösung mit Rohrzucker			
				I.		II.	
				α	$k \cdot 10^4$	α	$k \cdot 10^4$
—	8,65	—	—	8,72	—	8,72	—
0	8,52	—	0	8,60	—	8,60	—
15	7,64	23	15	6,10	72	6,09	72
25	6,57	33	25	4,68	73	4,39	80
35	5,62	35	35	3,22	79	3,09	82
∞	— 2,77	—	∞	— 2,79	—	— 2,79	—

Vorbehandelt 44 Stunden.
Temp. 17,2°.

Min.	Nährlösung mit Rohrzucker			
	I.		II.	
	α	$k \cdot 10^4$	α	$k \cdot 10^4$
—	8,72	—	8,72	—
0	8,55	—	8,54	—
15	5,62	86,5	5,67	85
25	3,77	95	4,05	88
35	2,35	98	2,52	94
∞	— 2,79	—	— 2,79	—

Vorbehandelt 91 Stunden.
Temp. 17,1°.

Min.	Nährlösung mit Rohrzucker			
	I.		II.	
	α	$k \cdot 10^4$	α	$k \cdot 10^4$
—	8,75	—	8,75	—
0	8,59	—	8,52	—
15	5,63	87	5,58	87
25	3,72	97	3,40	104,5
35	2,10	105	2,00	106
∞	— 2,80	—	— 2,80	—

Vorbehandelt 139 Stunden. — Temp. 17°.

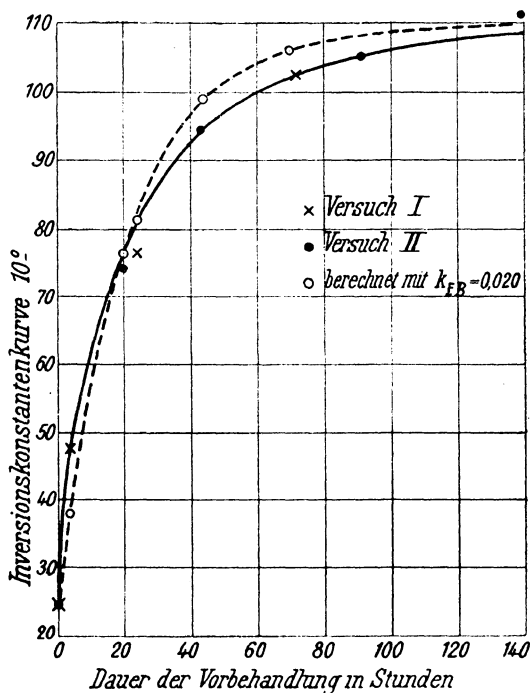
Minuten	Nährlösung mit Rohrzucker			
	I.		II.	
	α	$k \cdot 10^4$	α	$k \cdot 10^4$
—	8,78	—	8,78	—
0	8,63	—	8,64	—
15	5,31	99	5,16	104,5
25	3,43	105	2,76	121
35	1,70	109,5	1,42	123
∞	— 2,81	—	— 2,81	—

Versuch II.

Rohrzucker.

Dauer der Vorbehandlung Stunden	I. $k \cdot 10^4$	II. $k \cdot 10^4$
0	24,5	24,5
20	74	74
44	96,5	92,5
91	105	105
139	107	115

Die nebenstehende Figur I zeigt, daß auch nach 140 Stunden das Maximum des Inversionsvermögens noch nicht vollständig erreicht sein dürfte; die graphische Extraktion liefert den approximativen Wert 110. Der Verlauf des Zuwachses der Konstanten



ist recht regelmäßig, und man kann deswegen versuchen, trotz der nicht unerheblichen Versuchsfehler, welche den Konstanten anhaften, die Kurve durch eine Formel auszudrücken.

Die nächstliegende Annahme ist diejenige, daß in jeder Zeiteinheit der Zuwachs der En-

zymmenge die Differenz zwischen der zur Zeit t vorhandenen Enzymmenge (x) und der überhaupt erreichbaren (a), also der Differenz $a - x$ proportional ist. Aus der Differentialgleichung

$$\frac{dx}{dt} = k_{EB} (a - x)$$

ergibt sich dann in bekannter Weise durch Integration

$$k_{EB} = \frac{1}{t} \ln \frac{a}{a - x}$$

Setzt man für k_{EB} , die Enzym-Bildungskonstante, den Wert 0,020 ein, so stellt sich ein Vergleich zwischen den gefundenen und berechneten Werten für die Inversionskonstanten folgendermaßen dar:

Dauer der Vorbehandlung Stunden	k · 10 ⁴	
	Gefunden	Berechnet
0	24,5	24,5
4	48	38
20	74	76
24	76	81
44	94,5	98,7
71	102	106
∞	110	110

Der Verlauf der Sekretion von Enzymen aus den Schleimhäuten der Magenwand usw. ist durch die Pawlowsche Schule von Chigine u. a., ganz besonders aber durch die gründlichen Untersuchungen von London¹⁾ studiert; die eingehendste theoretische Bearbeitung dieser Versuche verdankt man Arrhenius.²⁾

Der Verlauf der Bildung von Enzymen ist dagegen, soweit wir wissen, bis jetzt nicht gemessen und berechnet worden.

Das Studium der Enzyymbildung wird im hiesigen Laboratorium in verschiedener Richtung fortgesetzt.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 45—60.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 63, S. 323, 1909.