

## Über die Anreicherung von $\beta$ -h-Fructosidase (Invertase) in untergäriger Bierhefe.

Von Privatdozent Dr. RUDOLF WEIDENHAGEN, Berlin.

(Eingeg. 28. Juni 1934.)

Vorgetragen in der Fachgruppe für organische Chemie auf der 47. Hauptversammlung des V. d. Ch. in Köln, am 25. Mai 1934.

Trotz der großen Fortschritte in den letzten Jahren auf dem Gebiete der Spezifitätsforschung der Carbohydrasen ist man der Frage nach dem Wirkungsmechanismus, der Enzyme und Substrate beherrscht, kaum näher gekommen. Vielleicht wird diese Frage überhaupt erst einer Beantwortung zugänglich sein, wenn es gelungen ist, die chemische Kennzeichnung eines kohlenhydratpaltenden Enzyms durchzuführen. Es scheint somit, daß die Spezifitätsforschung bei den Carbohydrasen zu einem gewissen Abschluß gekommen ist, und daß nunmehr wieder das Problem der präparativen Isolierung der aktiven Substanz in den Vordergrund gerückt ist. Hier besitzt nach wie vor die rohrzuckerspaltende  $\beta$ -h-Fructosidase<sup>1)</sup> der untergärigen Bierhefe die meisten Aussichten, da sie durch eine außerordentliche Beständigkeit ausgezeichnet ist und sich in idealer Weise von der lebenden Substanz trennen läßt. Eine erhebliche Erleichterung liegt ferner in der einfachen analytischen Wirksamkeitsbestimmung des Enzyms durch Messung des Spaltungsgrades beim Rohrzucker auf polarimetrischem Wege.

Eine dem heutigen Stande unserer Kenntnisse entsprechende Neubearbeitung der präparativen Chemie der Fructosidase muß zum Grundsatz haben, daß außerordentlich große Hefemengen zum Umsatz gebracht werden müssen. Gleichzeitig kann auf die seit langem bekannte Neuproduktion des Enzyms in der lebenden Hefezelle unter dem Einfluß gewisser stimulierender Bedingungen nicht verzichtet werden. Sie bildet sogar eine notwendige Voraussetzung für eine erfolgreiche Darstellung von Ausgangsmaterial, da allein durch diesen Prozeß von der Hefe selbst ein etwa zehnfach günstigeres Verhältnis von Fructosidase zu Trockensubstanz hergestellt wird. Die bisher geübten Verfahren haben sich jedoch für die Verarbeitung großer Hefemengen als nicht recht gangbar erwiesen. Gegenüber den ursprünglichen Verfahren von Euler<sup>2)</sup> bzw. Meisenheimer<sup>3)</sup> und Mitarbeitern durch Gärung bei hoher Zuckerkonzentration bedeutet zwar die Invertinreicherung in der Hefe durch Gärung bei minimaler Zuckerkonzentration in den Händen von Willstätter, Lowry und Schneider<sup>4)</sup> einen erheblichen Fortschritt. Während man früher mehrere Tage die stimulierende Behandlung ausführen mußte, genügte bei der neuen Methode eine nur 24stündige Stimulationsgärung. Aber auch hier war eine mehrfache Abtrennung der Nährösung von der Hefe für den Erfolg des Verfahrens notwendig. Diese macht sich bei der Verarbeitung großer Hefemengen außerordentlich unangenehm bemerkbar, zumal die Preßfähigkeit der Hefe bei der langdauernden Behandlung allmählich leidet.

<sup>1)</sup> Vgl. dazu im Fortschrittsbericht der physiologischen Chemie den Beitrag Weidenhagen, Carbohydrasen, diese Ztschr. 47, 451 [1934].

<sup>2)</sup> Euler u. Svanberg, Ztschr. physiol. Chem. 107, 286 [1919]. Svanberg, ebenda 109, 66 [1920].

<sup>3)</sup> Meisenheimer, Gambarjan u. Semper, Biochem. Ztschr. 54, 122 [1913]; 67, 364 [1914].

<sup>4)</sup> Ztschr. physiol. Chem. 146, 158 [1925].

Hier setzen unsere Untersuchungen ein, die zu einer neuen Methode der *Stimulationsgärung* geführt haben, die den gleichen Effekt in einem Arbeitsgang erreichen läßt. Darüber hinaus hat unser Verfahren aber Bedeutung für die Frage nach den physiologischen Bedingungen der Enzymneubildung überhaupt. Dieses Problem ist gerade im Zusammenhang mit der Anreicherung der Invertase von *H. v. Euler*<sup>5)</sup> und Mitarbeitern eingehend studiert worden, so daß die in diesen Arbeiten mitgeteilten Beobachtungen als Grundlage für unsere Überlegungen dienen konnten.

Aus einem umfangreichen Versuchsmaterial wurde von Euler und Cramér<sup>6)</sup> der Schluß gezogen, daß die Invertasebildung an diejenigen Bedingungen geknüpft ist, unter welchen eine Neubildung des Protoplasmas eintritt. Die Analogie zu den Verhältnissen der Protoplasmaneubildung wurde allerdings empfindlich gestört durch die Feststellung, daß die Hefe auf eine verstärkte Zufuhr von Sauerstoff durch Lüftung nicht nur nicht mit einer Enzymsteigerung, sondern sogar mit einer geringen Abnahme reagierte. Dieser Befund führte zusammen mit der Tatsache, daß auch keine Parallelität zwischen Invertase- und Zymasebeeinflussung festgestellt werden konnte, zur Aufgabe des Standpunktes, daß es sich bei der mehr spezifischen Stimulation der Fructosidase um eine generelle Steigerung der vitalen Kräfte der Zelle handele.

Wir gingen bei unseren Versuchen<sup>7)</sup> von dem Gedanken aus, daß eine Beziehung der Enzymreicherung zum Wachstum nur bestehen könne, wenn eine Steigerung des Enzymgehaltes unter solchen Bedingungen möglich ist, unter welchen die Hefezellen tatsächlich zur Vermehrung schreiten. Diese Bedingungen waren beispielsweise in dem sog. Lufthefeverfahren gegeben, vorausgesetzt, daß die Kohlenstoffquelle so weit herabgesetzt wurde, daß es nicht zu einer nennenswerten Vermehrung selbst kommen konnte. Diese Bedingungen wiederum waren in der Gärung bei minimaler Zuckerkonzentration gegeben. Die Kombination der starken Lüftung und der Gärung bei minimaler Zuckerkonzentration hat sich nun als außerordentlich erfolgreich erwiesen und zu einer so weitgehenden Verkürzung des ganzen Stimulationsvorganges geführt, daß bei Beobachtung aller Umstände in 8 bis 10 h und einem Arbeitsgang eine 10- bis 15fache Anreicherung der  $\beta$ -h-Fructosidase erzielt wird. Wir halten dabei diejenigen Bedingungen fest, unter welchen die Hefe beim Lufthefeverfahren gerade zur Vermehrung schreitet. Eine geringe Verstärkung der Kohlenstoffquelle führt bereits zu Hefezuwachs, bis schließlich bei großer Zuckergabe die Bedingungen des Lufthefeverfahrens selbst erreicht sind, bei denen nur noch Hefezuwachs und keine Enzymreicherung pro Trockensubstanz mehr stattfindet. Durch diese Feststellungen wurde

<sup>5)</sup> Ztschr. physiol. Chem. 1910—1918.

<sup>6)</sup> Ebenda 88, 444 [1913].

<sup>7)</sup> Vgl. die ausführliche Arbeit in der Ztschr. Ver. Dtsch. Zuckerind. Jg. 1934, im Druck.

gleichzeitig ein Einblick in den physiologischen Zustand der Hefe im Augenblick ihrer Vermehrung beim Lüftungsverfahren gewonnen. Die günstige Wirkung der Lüftung für die Invertaseanreicherung ist um so überraschender, als Euler und Cramér (l. c.) bei gleichartig gerichteten Versuchen einen vollen Mißerfolg hatten; anscheinend hat sich die angewendete Luftmenge noch unterhalb der günstigen Grenze befunden.

Für unsere Versuche diente untergärtige Bierhefe der Hochschulbrauerei Berlin. Allerdings war das Material nicht immer so gleichmäßig, wie es für die Durchführung der ganzen Arbeit wünschenswert gewesen wäre. Es wurde nämlich festgestellt, daß der Stimulationsgrad sehr stark von dem ursprünglichen Gehalt der Hefe an  $\beta$ -h-Fructosidase abhängt. Enzymarme Hefen lassen sich sehr gut stimulieren, enzymreiche weniger gut, ohne daß aber ein übereinstimmender Endwert erreicht würde. In den einzelnen Versuchsreihen wurde daher angestrebt, ein Versuchsmaterial von annähernd gleichem Enzymgehalt zu verwenden. Infolge der Versuchsdauer über mehrere Tage ließ sich dieses Prinzip selbst innerhalb einer Versuchsreihe nicht immer vollständig durchführen. Auf alle Fälle wurden dann aber immer möglichst gleichartige Hefen herangezogen. Die Resultate der einzelnen Versuchsreihen sind also auch nur mit diesen Einschränkungen untereinander vergleichbar, und die erreichten Stimulationsfaktoren liegen daher nicht immer in gleicher Höhe. Bei der Feststellung der optimalen Bedingungen konnte nur immer ein Faktor berücksichtigt werden, dabei mußten im Anfang die anderen häufig nach Vorversuchen geschätzt werden. Trotzdem haben sich die relativen Verhältnisse sehr gut übersehen lassen, und bei geplanter Abstimmung aller Faktoren ist es nunmehr ohne weiteres möglich, für jede Hefe eine 10- bis 15fache Stimulation ihres Fructosidasegehaltes in einem Arbeitsgang in 8 bis 10 h ohne jede Abtrennung der Nährlösung herauszuarbeiten. Wenn in den folgenden Tabellen die höchsten Stimulationswerte nicht immer erreicht sind, so liegt es daran, daß zur Aufarbeitung der Versuche in einer Arbeitsschicht die Stimulationsgärung noch unterhalb der optimalen Zeit (also unterhalb 8 bis 10 h) abgebrochen werden mußte.

Wie aus den folgenden Tabellen<sup>8)</sup> hervorgeht, hat sich für die einzelnen Faktoren der Stimulationsgärung: Luftmenge, Temperatur, Acidität, Zuckermenge, ein ausgesprochenes Optimum ergeben.

#### A. Einfluß der Luftmenge auf die Stimulation.

Nr. des Versuchs	44	45	46	47
Luftmengen in l pro h .	200	400	800	900
Fr-W vor Stimulation .	0,50	0,48	0,48	0,48
Fr-W nach Stimulation .	2,49	2,45	3,44	3,49
Stimulationsfaktor . . .	4,90	5,1	7,17	7,27
Hefezuwachs in % . . .	2,4	6,4	-0,9	-1,6

#### B. Abhängigkeit der Stimulation von der Temperatur.

Nr. des Versuchs	40	41	42	43
Temperatur . . . $^{\circ}$ C	40	30	20	10
Fr-W vor Stimulation .	0,46	0,46	0,46	0,46
Fr-W nach Stimulation .	0,99	3,30	1,15	0,89
Stimulationsfaktor . . .	2,15	7,17	2,50	1,93
Hefezuwachs in % . . .	6,6	10,7	21,4	6,5

<sup>8)</sup> Während des Vortrages waren die Zahlen der Tabellen als Kurven dargestellt.

#### C. Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Stimulation.

Nr. des Versuchs	48	49	50	51	52	53
pH . . . . .	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	8,0
Fr-W vor Stimulation .	0,46	0,50	0,50	0,50	0,46	0,43
Fr-W nach Stimulation .	2,16	3,90	3,42	3,54	3,04	2,11
Stimulationsfaktor . . .	4,7	7,8	6,8	7,1	6,6	4,9
Hefezuwachs in % . . .	15,1	5,3	8,1	4,4	14,2	13,1

#### D. Abhängigkeit der Stimulation von der Zuckermenge (Saccharose).

Nr. des Versuchs	74	75	76	77
Zuckermenge (Saccharose)g	60	120	180	240
Fr-W vor Stimulation .	0,43	0,39	0,47	0,43
Fr-W nach Stimulation .	2,45	4,12	3,05	2,21
Stimulationsfaktor . . .	5,7	10,6	6,7	5,1
Hefezuwachs in % . . .	7,1	7,9	9,9	24,0

Dagegen hat sich die Stickstoffgabe als verhältnismäßig bedeutungslos erwiesen. Auch ohne Zugabe von Stickstoff wurde bereits eine 5,5fache Stimulation erreicht. Es scheint also, als ob für die erste Neubildung der Fructosidase, falls dazu überhaupt Stickstoff benötigt wird, dieser von der Hefe aus ihrem eigenen Vorrat gedeckt wird. Interessante Resultate haben sich bei der Prüfung verschiedener Kohlenstoffquellen ergeben. Eine spezifische Wirkung hat sich in Übereinstimmung mit älteren Versuchen nur bei Verwendung von Zuckern gezeigt, wobei Saccharose und Fructose die höchsten Werte geliefert haben. Allerdings haben sich auch nichtzuckerartige Kohlenstoffquellen in manchen Fällen, wenn auch in sehr geringem Umfang, als Energielieferanten bei der Lüftungsstimulation wirksam erwiesen. Wenn man aber die Veränderungen der Hefetrockensubstanz heranzieht, so zeigt sich bei der Verwendung von Zuckern als Kohlenstoffquelle immer ein Gleichbleiben oder eine geringe Vermehrung bei der Ernte, während bei den nichtgärenden Kohlenstoffverbindungen immer eine Verminderung der Trockensubstanz zu beobachten war. Es ist also wohl anzunehmen, daß in diesen Fällen unter dem Einfluß der Lüftung und der damit einhergehenden Erhöhung des Stoffwechsels ein Abbau von Leibessubstanz erfolgt, so daß die Energie für die Fructosidaseneubildung auch aus diesen Prozessen herühren kann.

Zur Prüfung der Frage, welche physiologische Rolle die Luftwirkung bei der Enzymbildung spielt, war die Verwendung anderer Gase an Stelle von Luft geboten. Es wurden Stickstoff und reiner Sauerstoff geprüft. Mit Stickstoff ließ sich ein kaum nennenswert höherer Wert erzielen, als er etwa durch mechanisches Röhren der Lösung erreicht wird. Gleichzeitig trat aber wieder ein erheblicher Verbrauch von Zellsubstanz auf. Umgekehrt führte die Verwendung von Sauerstoff zu einer erheblichen Zellvermehrung, so daß auch hier notwendigerweise der erzielbare Stimulationsgrad wesentlich unter dem mit Luft liegt. Die spezifische Wirkung der Lüftung dürfte damit erwiesen sein. Diese besteht auch etwa keinesfalls darin, daß die bei der Gärung entstehenden Stoffwechselprodukte schneller fortgeführt werden, wie es z. B. im D. R. P. 585 992 durch Vakuumgärung erreicht wird, wenn auch diese Wirkung selbstverständlich mit spricht.

Für Mithilfe an der vorliegenden Arbeit bin ich Herrn L. Schriever zu Dank verpflichtet. [A. 84.]