

Über Hefelipase

Von

GEORG GORBACH und HANS GÜNTNER

Aus dem Biochemischen Institut der Technischen Hochschule in Graz

Vorstand Prof. F. FUHRMANN

(Mit 5 Textfiguren)

(Vorgelegt in der Sitzung am 12. Mai 1932)

Die Lipasen und die Esterasen der Mikroorganismen sind vielfach Gegenstand von Untersuchungen gewesen. Dabei ergab sich allgemein, daß sie vielmehr zur Spaltung von Estern niederer Fettsäuren als zur Spaltung natürlicher Fette befähigt sind. Während zwar über die Esterasen und Lipasen der Bakterien auch modernere Untersuchungen nicht fehlen, sind diese Enzyme bei Hefen kaum untersucht. Unter den wenigen Veröffentlichungen darüber ist die Arbeit von MICHAELIS und NAKARAHARA¹ bemerkenswert, die über die p_{H} -Abhängigkeit der Wirkung von Esterasen aus Bierhefe Aufschluß gibt. Die Butyrinspaltung wurde unter Anwendung von Puffern und mit Hilfe der stalagnometrischen Methode bei $p_{\text{H}} = 5.8 - 6.2$ optimal gefunden. Wir haben uns mit der Ermittlung der Spalteigenschaften der aus Bier- und Preßhefen gewonnenen Lipasen näher beschäftigt. Zur Messung der Lipasewirkung benutzen wir titrimetrische Methoden, welche unter Zuhilfenahme von Mikrobüretten und genauester Einhaltung der Versuchsbedingungen so weit verfeinert werden konnten, daß auch kleine Spaltungswerte noch auswertbar wurden.

Versuchstechnik.

Die Messung der enzymatischen Fettspaltung führten wir, wie folgt, aus:

In einem Erlenmeyerkolben von 50 cm^3 Inhalt wird eine bestimmte Menge Hefe (1 g) eingewogen und mit 2 cm^3 $\frac{1}{2}$ molarem Phosphatpuffergemisch von der gewünschten Wasserstoffionenkonzentration (meist entsprechend $p_{\text{H}} = 6.8$) versetzt. Um eine gute Verteilung der Hefe im Puffergemisch zu erreichen, setzten wir

¹ L. MICHAELIS und Y. NAKAHARA, Z. Immunitätsforsch. I, Orig., 36, 1923, S. 449.

zuerst nur einen Teil des Puffers zu und verrieben damit die Hefe mit Hilfe eines Glasstempels zu einem gleichmäßigen Brei. Die am Glasstempel anhaftenden Hefereste werden mit einem Stückchen Filtrierpapier abgewischt und der Probe samt dem Filtrierpapier beigegeben. Dann kommt die auf 2 cm^3 noch fehlende Puffermenge hinzu. Durch einfaches Schütteln des Kölbchens mit der Hand erhält man eine gute Verteilung der Hefe im Puffer. Nach einstündigem Stehen ist die Lipase der Hefe durch die Einwirkung des $\frac{1}{2}$ molaren Puffers freigelegt und für die Wirkungsbestimmung bereit. Die Kölbchen werden zu diesem Zwecke austariert und 2.5 g feinstes Olivenöl (Extra vierge, Firma Meinel) durch tropfenweises Zuließenlassen aus einer Pipette rasch zugeetzt. Sofort nach der Zugabe des Öles schütteln wir das Gemisch drei Minuten auf der Schüttelmaschine und erzielen auf diese Weise eine innige Durchmischung der Hefe mit Öl und Puffer. Diese feine Emulsion läßt man nun reagieren. Nach Ablauf der Reaktionszeit, die normal 40 Minuten beträgt, wird die Reaktion durch Zugabe von 20 cm^3 Äthylalkohol unterbrochen und die Probe mit halbnormaler alkoholischer Kalilauge titriert. Zur Titration verwendeten wir Mikrobüretten, die halbe Zehntel Kubikzentimeter abzulesen und Hundertstel zu schätzen erlauben. Als Indikator diente Phenolphthalein. Während und besonders gegen Ende der Reaktion muß die Probe kräftig geschüttelt werden, da die anfängliche Rotfärbung dabei sofort verschwindet und erst bei bleibender Rosafärbung vergleichbare und richtige Titrationswerte erhalten werden. Um eine Konstanz der Titrationswerte innerhalb einer Versuchsreihe zu erreichen, wurde die Rosafärbung der folgenden Probe mit jener der vorausgehenden verglichen und auf gleiche Färbung aller Proben titriert. Der auf diese Weise erhaltene Titrationswert ist jedoch zu hoch, da durch die Einwirkung des starken Puffers die Hefe autolysiert wird und die dabei entstehenden Säuren mittitriert werden. Aus diesem Grunde wurde jedem Versuch eine Blindprobe beigegeben, welche das Puffergemisch und die Hefe, aber kein Öl enthielt. Diese Blindprobe wird zugleich mit der eigentlichen Probe titriert und der Verbrauch an alkoholischer Lauge von jenem der Probe in Abzug gebracht. Die so erhaltene Differenz stellt unter Berücksichtigung der freien Fettsäuren des Öles, welche von Zeit zu Zeit erneut bestimmt werden müssen, ein Maß für die Lipasewirkung vor.

Die *prozentuelle Fettspaltung* wurde mit Hilfe folgender Formel berechnet:

$$\text{Prozent-Fettspaltung} = \frac{(N - N_1) (56 \cdot 1.100 F)}{2 \cdot 5 (V_s - S_s)}$$

In derselben bedeuten N die zur Neutralisation der freien Fettsäuren nach der Spaltung notwendigen Kubikzentimeter Lauge, N_1 die zur Neutralisation von 2.5 g Öl erforderlichen Kubikzentimeter KOH, F den Faktor der Lauge, S_s die Säurezahl und V_s die Verseifungszahl.

Die in den Tabellen angegebenen Werte beziehen sich einerseits auf die abgepreßte nasse Hefe und andererseits auf die Trockensubstanz derselben.

Die *Trockensubstanz* wurde bei normaler Hefe durch Trocknung bei 105° im Trockenschrank nach zwölf Stunden ermittelt. Die verfetteten Hefen trockneten wir im FAUST-HEIMSCHEN Gebläseschrank bei 40°, um eine Veränderung des Fettes hintanzuhalten und eine genaue Bestimmung des Fettgehaltes möglich zu machen. Bei Lipaseversuchen ist es nach Ablauf der Reaktionszeit üblich, durch Zusatz von Äther und Alkohol die Reaktion zu unterbrechen, wodurch man gleichzeitig eine Lösung der Fettsäuren herbeiführt, die erst dann titrierbar sind. Durch eingehende Versuche konnten wir zeigen, daß der Zusatz von Alkohol allein genügt, um richtige Werte zu erhalten. Die Beigabe des Äthers bringt keine Erhöhung, sondern sogar eine Verminderung der Werte.

Versuche.

Die folgenden Versuche führten wir mit verschiedenen Hefen aus. Wir verwendeten hauptsächlich Bier- und Preßhefen. Letztere wurden in der handelsüblichen Packung eingekauft, während uns die Bierhefe von der Brauerei Reininghaus zur Verfügung gestellt wurde. Der erhaltene Wert für die Ölspaltung ist in den Tabellen für die feuchte Hefe und außerdem auf die Trockenhefe berechnet angegeben. Infolge des wechselnden Wassergehaltes der Hefen können nur die auf den Trockengehalt der Hefen berechneten Lipasewerte untereinander verglichen werden.

I. Kinetik der Hefelipasespaltung.

1. p_H -Abhängigkeit.

In erster Linie interessierte uns der Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Reaktionsgeschwindigkeit der lipati-

sehen Verseifung. Wir verwendeten zu diesen Versuchen Ottakringer Preßhefe und studierten die Ölsplattung mit Phosphatgemischen von wechselnder Wasserstoffionenkonzentration.

Tabelle 1.

Nr. d. Vers.-R.	Olivenöl in g	Reaktionszeit in Stunden	Reaktionstemperatur in Graden	$\frac{1}{2}$ mol. Puffergemisch		p_H	% Spaltung	
				KH_2PO_4	K_2HPO_4		Ottakringer Preßhefe 1 g	Trockenhefe (ber.) 1 g
I	2.5	3	20	19	1	5.4	0.87	3.0
				16	4	6.1	3.04	10.5
				13	7	6.6	4.92	17.5
				7	14	7.0	4.68	16.2
				1	20	7.8	4.16	14.3
II	2.5	18	20	19	1	5.4	1.64	5.6
				16	4	6.1	2.58	9.0
				13	7	6.6	3.34	11.5
				7	14	7.0	2.34	8.8
				1	20	7.8	2.99	10.3

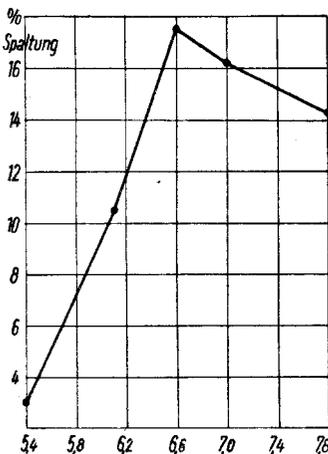


Fig. 1.

Die Tabelle 1 enthält die Versuchsergebnisse, welche bei Verwendung von zwei verschiedenen Hefeproben erhalten worden sind. Die optimale Verseifung liegt bei $p_H = 6.6$, wenn sich auch ab und zu in Einzelversuchen das Optimum bei $p_H = 6.8$ einstellt. Die Zusammenstellung zeigt ferner, daß im allgemeinen bei der Erhöhung der Wasserstoffionenkonzentration die Verseifungsgeschwindigkeit stärker herabgesetzt wird als bei der Verminderung derselben. Die Schaulinie der Fig. 1 läßt diese Verhältnisse sehr deutlich erkennen. In dieser graphischen Darstellung trägt die Abszisse die p_H -Marken.

2. Zeitlicher Verlauf der lipatischen Verseifung.

Durch zahlreiche Versuche wurde die Reaktionszeit ermittelt, nach welcher die lipatische Verseifung ihr Ende erreicht hat. Bei den anfänglichen Proben wählten wir Reaktionszeiten von mehreren Stunden. Es hat sich jedoch ergeben, daß die Spaltung des Öles schon nach relativ kurzer Zeit beendet ist. So erhielten wir mit Ottakringer Preßhefe, welche sich nach unseren Erfahrungen als lipasereich erwies, unabhängig davon, ob die Reaktionszeiten 50 Minuten oder eine Stunde und 50 Minuten betragen, eine 9·5%ige Spaltung.

Tabelle 2.

Nr. d. Vers.-R.	Olivennöl in g	p_H	Reaktionstemperatur in Graden	Reaktionszeit in Minuten	% Spaltung	
					Ottakringer Preßhefe 1 g (Trst. 29%)	
					feucht	trocken (berechnet)
I	2·5	6·8	20	3	2·22	7·7
				8	2·40	8·3
				20	2·87	9·9
				40	3·87	13·3
II	2·5	6·8	20	3	0·23	0·8
				8	0·52	1·9
				20	2·40	8·3
				40	2·93	10·1

Über den Verlauf der Ölspaltung innerhalb des kurzen Zeitintervalls orientieren die Ergebnisse in Tabelle 2, welche mit zwei Hefeproben erhalten worden sind. Die in Fig. 2 gegebene graphische Darstellung dieser Resultate läßt erkennen, daß die Verseifung in den ersten Zeiten linear verläuft, später aber gehemmt erscheint.

3. Hefemenge und Reaktionsgeschwindigkeit.

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in Tabelle 3 zusammengefaßt, deren Werte die Grundlage für die graphische Darstellung der Fig. 3 bilden.

Tabelle 3.

Olivenöl in g	pH =	Reaktionstemperatur in Grad	Reaktionszeit in Stunden	Hefemenge in g	% Spaltung	
					Ottakringer Preßhefe 1 g (Trst. 29%)	
					abgepreßt	trocken (berechnet)
2.5	6.8	20	6	0.5	0.70	2.4
				1.0	4.22	14.5
				2.0	6.97	24.0

Daraus ist ersichtlich, daß der doppelten Hefemenge *nicht* die doppelte Verseifungsgeschwindigkeit entspricht. 0.5 bis 1 g Hefe ergeben größere, 1 bis 2 g kleinere Geschwindigkeitswerte,

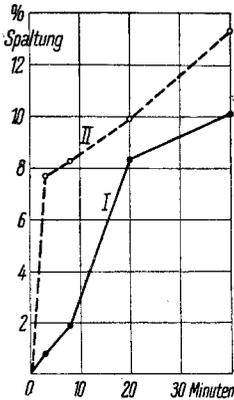


Fig. 2.

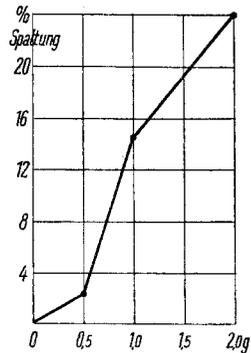


Fig. 3.

als sie entsprechend der angewandten Hefemenge erwartet werden könnten. Deshalb führten wir alle weiteren Versuche mit einem Gramm Hefe durch.

Reaktionstemperatur und Reaktionsgeschwindigkeit.

Für diese Versuche dienten Ottakringer Preßhefe und Reininghaus-Bierhefe. Die Temperatur wurde während der Reaktionszeit durch Einhängen der Proben in ein Wasserbad konstant gehalten.

Die Ergebnisse mit beiden Hefearten sind in der Tabelle 4 niedergelegt, während sich die graphische Darstellung der Fig. 4 auf die Bierhefe bezieht.

Tabelle 4.

Hefemenge in g	Olivenöl in g	$p_H =$	Reaktionszeit in Minuten	Reaktions-temperatur in Graden	% Spaltung			
					Ottakringer Preßhefe (Trst. 29 %)		Reininghaus-Bierhefe (Trst. 33 %)	
					abgepreßt	trocken (berechn.)	abgepreßt	trocken (berechn.)
1	2·5	6·8	40	10	1·90	6·6	1·68	5·0
				20	2·07	7·2	1·82	5·5
				25	—	—	1·85	5·9
				30	2·73	9·4	2·34	7·1
				35	—	—	1·93	5·9
				40	1·49	5·2	1·68	5·1
				50	1·46	5·1	1·10	3·3
				60	0·76	2·7	0·88	2·7

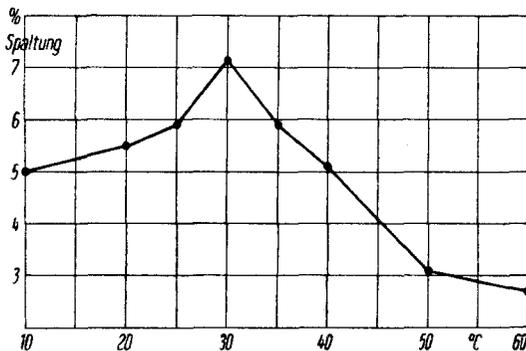


Fig. 4.

Sowohl die Untersuchungen mit Preßhefe als auch die mit Bierhefe zeigen, daß die Hefelipase ein ausgeprägtes Temperatur-optimum bei 30° besitzt. Die Fig. 4 veranschaulicht den bei verschiedenen Temperaturen erhaltenen Verseifungsgrad für Reininghaus-Bierhefe nach 40 Minuten Reaktionszeit. Die Fettspaltung steigt mit Erhöhung der Temperatur langsam an, erreicht bei 30° das Optimum und fällt bei höheren Temperaturen rasch ab. Bei 50° und 60° sind nur mehr kleine Spaltungswerte zu erhalten. Diese Temperaturen schädigen die Hefelipase offenbar stark in ihrer Wirkung.

II. Der Lipasegehalt verschiedener Hefen.

Die Versuche über die Kinetik der Hefelipase haben gezeigt, daß die unter gleichen Bedingungen erhaltenen Ölspaltungswerte bei Bier- und Preßhefen differieren. Wir konnten ferner feststellen, daß selbst der Lipasegehalt einer und derselben Hefe in verschiedenen Hefeproben ziemlichen Schwankungen unterliegt. Die Züchtungsbedingungen und der Reinheitsgrad der Hefe scheinen für ihren Lipasegehalt von Bedeutung zu sein. Durch eine große Anzahl von Messungen ermittelten wir den durchschnittlichen Lipasegehalt von Bier- und Preßhefen. Als Maß diente die von einem Gramm der Hefe in 40 Minuten bei 20° und $p_H = 6.8$ bewirkte Spaltung des Olivenöles. Aus den erhaltenen Werten errechneten wir in ähnlicher Weise wie WILLSTÄTTER und WALDSCHMIDT-LEITZ die Phytolipase-Einheiten für 1 g Trockenhefe. Die so erhaltenen Durchschnittswerte sind in der Tabelle 5 zusammengefaßt.

Tabelle 5.

Nr. d. Vers.-R.	Hefemenge in g	Olivenöl in g	Reaktionstemperatur in Graden	Reaktionszeit in Minuten	$p_H =$	Hefeart	Durchschn. % Spaltung (auf Trockenhefe ber.)	Phytolipase-Einheiten
1	} 1	2.5	20	40	6.8	Ottakringer Preßhefe ..	12.7	1.7
2						Mauthner-Preßhefe	10.2	1.5
3						Reininghaus-Preßhefe ..	9.9	1.3
4						Reininghaus-Bierhefe ..	8.8	1.2
5						Reininghaus-Reinzuchthefe.....	11.8	1.6

Aus ihnen geht hervor, daß die Preßhefen einen höheren Lipasegehalt als die Bierhefen aufweisen. Die größte Menge zeigt die Ottakringer Preßhefe. Die Reinzuchthefer der Brauerei Reininghaus ist weitaus lipasereicher als die Betriebshefe dieser Brauerei.

III. Lipasegehalt künstlich verfetteter Hefen.

Anschließend haben wir Untersuchungen über den Lipasegehalt *künstlich* verfetteter Bierhefen angestellt und die verseifende

² R. WILLSTÄTTER und WALDSCHMIDT-LEITZ, Z. physiol. Chem. 134, 1924, S. 161.

Wirkung solcher Hefen mit fortschreitender Verfettung verfolgt. Nach noch nicht veröffentlichten Methoden verfettete Hefen haben HALDEN und KUNZE in liebenswürdiger Weise zur Verfügung gestellt. Nach ihrer Methode wurde die Verfettung durch Züchten der Hefe in alkoholischer Atmosphäre erreicht. Nach bestimmten Tagen der Fetтанreicherung wurde der Lipasewert solcher Hefen nach unserer Methode gemessen. Die Versuchsergebnisse sind in der Tabelle 6 für Reinzucht-Bierhefe mitgeteilt.

Tabelle 6.

Hefeart	Nr. d. Vers.-R.	Trockengehalt der Hefe in %	Hefemenge in g	Olivenöl in g	$p_H =$	Reaktionstemperatur in Graden	Reaktionszeit in Minuten	Tage d. Verfett.	% Spaltung	
									feucht	trocken (berechnet)
Reinighaus-Reinzuchthefer	1	18·5	1	2·5	6·8	24	40	0	2·18	11·8
	2	19·5	1	2·5	6·8	24	40	4	1·29	6·7
	3	12·9	1	2·5	6·8	24	40	6	2·13	16·5
	4	28·3	1	2·5	6·8	24	40	8	2·16	7·6

Aus den erhaltenen Resultaten ergibt sich, daß die Wirkung der Lipase in die ersten Tage der Verfettung fällt und dann nach sechs Tagen das Maximum erreicht, welches weit über der Norm liegt. Das mikroskopische Bild dieser Hefen zeigte in den ersten Tagen eine starke Zunahme des Hefefettes. Zwischen dem vierten und sechsten Tag hat sich an diesem Bild kaum etwas geändert, obwohl in diesem Zeitabschnitt der Lipasewert stark ansteigt und am sechsten Tag eine Zunahme der Wirkung um 42% festzustellen ist, wenn man den Wert für die normale Hefe als Berechnungsgrundlage nimmt.

Die Tabelle 7 enthält die Resultate, welche wir bei Wiederholung ihrer Versuche mit *Betriebshefe* erhielten. Bei diesem Versuche wurde außerdem noch der Fettgehalt bestimmt. Die Fettwerte in der Tabelle beziehen sich auf das Fett in der Hefetrockensubstanz. Aus der Tabelle 7 geht hervor, daß der *Lipasegehalt* der Betriebshefe bis zum vierten Tage der Verfettung erhalten bleibt, während der *Fettgehalt* in dieser Zeit um 8% zugenommen hat. Nach dem vierten Tage steigt der Lipasegehalt und hat am siebenten Tag den Wert der normalen Hefe weit überschritten. Die Fettmenge ist dabei nur um 0·4% gestiegen. Nach dem siebenten Tag

fällt die Lipasewirkung stark, während der Fettgehalt kräftig ansteigt. Nach dem neunten Tag verändert sich der Lipasegehalt kaum mehr. Auch der Fettgehalt ist zwischen dem neunten und elften Tag der Verfettung gleichgeblieben.

Tabelle 7.

Hefeart	Nr. d. Vers.-R.	Trockengehalt der Hefe in %	Hefemenge in g	Olivenöl in g	$p_H =$	Reaktionstemperatur in Graden	Reaktionszeit in Minuten	Tage d. Verfett.	Fettgehalt in % des Trockengew.	% Spaltung	
										feucht	trocken (berechnet)
Reinigungs-Betriebshefe	1	27.3	1	2.5	6.8	20	40	0	2.0	1.64	6.0
	2	23.7	1	2.5	6.8	20	40	4	9.8	1.49	6.3
	3	26.5	1	2.5	6.8	20	40	7	10.2	2.81	10.6
	4	32.0	1	2.5	6.8	20	40	9	16.0	1.17	3.7
	5	36.7	1	2.5	6.8	20	40	11	15.8	1.26	3.4

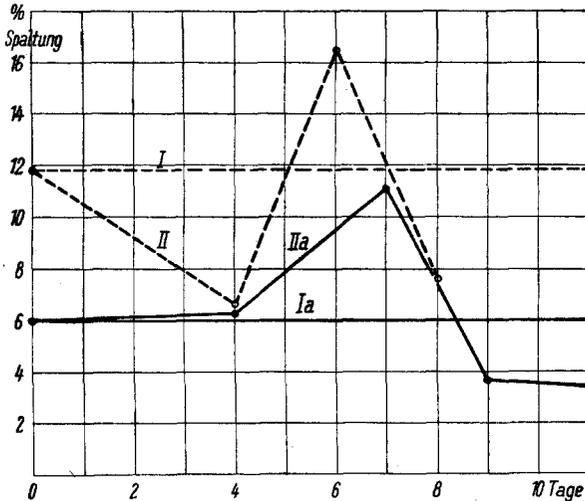


Fig. 5.

Die Ergebnisse der Tabelle 7 dienen den Schaulinien der Fig. 5 zur Unterlage. I und Ia entsprechen der normalen bzw. künstlich verfetteten Reinzuchtheife und II und IIa der normalen bzw. verfetteten Betriebsheife.

Fig. 5 zeigt, daß die Resultate, welche wir mit Betriebsheife und Reinzuchtheife erhalten haben, gut übereinstimmen. Die Maxima

der Lipasewirkung bekommt man nach sechs bis sieben Tagen der Verfettung. Die Art des Nährbodens bei der Verfettung spielt nach unseren Erfahrungen anscheinend keine Rolle. Man erhält auf Würze-Agar, synthetischen Agarnährböden (mit 10% Lävulose, 1% KH_2PO_4 , 0, 2% MgSO_4) und auf nährstofflosen Unterlagen dieselben Erfolge.

IV. Freilegung der Hefelipase und ihre Empfindlichkeit gegen Gifte.

Bei den Versuchen dieser Arbeit haben wir die Hefelipase mit *Phosphatgemischen* freigelegt. Durch einfaches Aufschlänmen der Hefe in diesen erhält man nach einstündiger Einwirkung des Puffergemisches gute Lipasewerte. Im folgenden sind die Versuche mitgeteilt, welche wir zur Ermittlung der optimalen Einwirkungszeit des Puffers angestellt haben.

Tabelle 8.

Olivenöl in g	$p_{\text{H}} =$	Reaktionstemperatur in Graden	Reaktionszeit in Minuten	Einwirkungszeit d. $\frac{1}{2}$ mol. Puffergem. in Stunden	% Spaltung	
					Ottakringer Preßhefe 1 g (Trst. 29%)	
					feucht	trocken (berechnet)
2·5	6·8	19	40	1	3·75	12·9
				2	3·45	11·9
				4	3·28	11·3
				6	3·28	11·3
				24	2·57	8·9

Aus den Werten der Tabelle 8 geht hervor, daß eine einstündige Einwirkung des Puffers zur Freilegung der Hefelipase genügt, da ein längeres Verweilen der Hefe in dem Puffergemisch die lipatische Verseifung herabsetzt.

Eine weitere Möglichkeit zur Freilegung des Enzyms aus der Hefe besteht in der *Autolyse der Hefezelle*. Diese Methode, welche von WILLSTÄTTER³ und seiner Schule weitgehend ausgebaut wurde, hat sich zur Gewinnung wirksamer Enzympräparate vielfach bewährt und wurde von uns für die Lipasegewinnung herangezogen. Durch die Abtötung der Hefe mit starken Zellgiften

³ R. WILLSTÄTTER, Untersuchungen über Enzyme 2, 1928, Springer, Berlin.

und die darauf einsetzende Autolyse wird auch die Lipase wie andere Fermente aus ihrer Verankerung in der Zelle gelöst und durch die Zellwand an das umgebende Wasser abgegeben. Für die Darstellung wirksamer Lipasepräparate ist nun die Kenntnis jenes Zellgiftes wichtig, welches ohne wesentliche Schädigung der Wirkung eine weitgehende Freilegung der Lipase gestattet. Wir verwendeten als Zellgifte *Chloroform*, *Äther*, *Toluol* und *Azetessigester*. Durch Zugabe von 0.3 cm^3 dieser Gifte zu 1 g abgepreßter Hefe töteten wir die Zellen und überließen sie während einer Stunde der Autolyse, welche durch zeitweiliges Rühren beschleunigt wurde. Nach dieser Zeit war der anfänglich feste Brei dünnflüssig geworden. Die autolysierte Hefe wurde entweder gleich zur Bestimmung der Lipase verwendet oder vorerst im FAUST-HEIMSOHEN Trockenapparat vom Zellgift befreit.

Die Fettspaltungswerte, welche wir ohne und mit Entfernung des Zellgiftes erhielten, sind in der Tabelle 9 wiedergegeben.

Tabelle 9.

Hefeart und Menge	Einwirkung des Zellgiftes i. St.	Olivenöl in g	Reaktionstemperatur in Graden	Reaktionszeit in Minuten	pH	Freilegung der Lipase durch	Spaltung in % (auf Trst. berechnet)	
							ohne Entfettung des Zellgiftes	mit Entfettung des Zellgiftes
Ottakinger Preßhefe 1 g (Trockengehalt 29%)	1	2.5	20	40	6.8	$\frac{1}{2}$ mol. Phosphat-Puffergemisch	12.9	—
						Chloroform	12.1	13.7
						Äther	11.3	12.7
						Toluol	7.9	13.0
						Azetessigester	4.4	5.8

Vergleicht man die Werte dieser Tabelle, welche ohne Entfernung des Zellgiftes erhalten worden sind, so findet man, daß im Vergleich zur Lipasewirkung, welche man in der von uns geübten Weise mit Phosphatgemischen als Freilegungsmittel erhält, alle untersuchten Gifte eine Minderung der Lipasewirkung herbeiführen. Diese Schädigung der Wirkung ist bei Chloroform am geringsten. Azetessigester führt die größte Schwächung der Hefelipase herbei. Entfernt man das Gift nach der Autolyse, werden sämtliche Lipasewerte höher. Es sind dann sowohl Chloroform wie Äther und Toluol zur Freilegung der Hefelipase gut brauchbar.

Der Lipasewert bei Chloroform als Zellgift übersteigt sogar jenen, welchen man mit Phosphatgemischen erhält. Aus diesen Untersuchungen geht daher hervor, daß Chloroform zur Autolyse zwecks Lipasegewinnung am geeignetsten ist.

Im Anschluß an diese Untersuchungen haben wir auch den Versuch unternommen, durch Autolyse der Hefe allein wirksame Lipaseextrakte zu gewinnen. Die besten Extrakte wurden unter Zusatz von konzentriertem Glycerin zum unverdünnten Hefeautolysat erhalten. Die Wirkung solcher Extrakte, bezogen auf das Trockengewicht der Hefe, betrug ein Viertel bis ein Sechstel. Wählt man aber die Reaktionszeit länger, erhöht sich der erhaltene Spaltungswert beträchtlich. So erhielten wir aus Ottakringer Preßhefe einen Lipaseextrakt, der nach 40 Minuten Reaktionszeit eine Spaltung von 1·28% zeigte, nach 24 Stunden eine solche von 12·2%. Dabei entsprach 1 cm^3 des Extraktes 1 g der abgepreßten Hefe. Die Versuche über die Gewinnung wirksamer Lipaseextrakte sind keineswegs abgeschlossen, weshalb später darüber eingehend berichtet werden soll.

Zusammenfassung.

1. Die Hefelipase besitzt ein ausgesprochenes Wirkungsoptimum bei $p_H = 6·6$ bis $6·8$.
2. Die optimale Reaktionszeit beträgt 40 Minuten, sofern die Hefe unmittelbar zur Lipasebestimmung Verwendung findet.
3. Durch die Erhöhung der Hefemenge erhöht sich auch die Reaktionsgeschwindigkeit der lipatischen Verseifung; doch ist die pro Zeiteinheit erhaltene Spaltung des Öles der Hefemenge nicht proportional.
4. Die optimale Temperatur für die Hefelipase liegt bei $30^\circ C$. Höhere Reaktionstemperaturen schädigen die Hefelipase in ihrer Wirkung. Bei 50 und 60° sind nur mehr kleine Spaltungswerte zu erhalten.
5. Die Untersuchungen der verschiedenen Bier- und Preßhefen hat ergeben, daß die Preßhefen lipasereicher als die Bierhefen sind. Ebenso erweist sich die Reinzuchtheife bedeutend wirksamer als die Betriebshefe.
6. Durch künstliche Verfettung von Reinzucht-Bierhefen und Betriebshefen kann der Lipasegehalt gesteigert werden. Die Zunahme beträgt nach sechs bis sieben Tagen der Verfettung bis zu 42%, wenn der Lipasegehalt der Ausgangsheife als Berechnungsgrundlage dient.

7. Zellgifte, wie Chloroform, Äther, Toluol und Azetessigester, schädigen die Hefelipase. Die Wirkung des Fermentes wird durch Chloroform wenig und durch Azetessigester am stärksten beeinträchtigt. Bei Entfernung des Zellgiftes nach Abtötung der Hefe sind mit Ausnahme des Azetessigesters alle untersuchten Gifte zur Autolyse brauchbar. Am geeignetsten hat sich Chloroform erwiesen.

8. Durch Autolyse der Hefe allein können bei Zusatz von Glycerin wirksame Lipaseextrakte erhalten werden.
