

Ein einfacher Enzymversuch mit Hefe

Mikroskopiker sind Augenmenschen. Sie freuen sich an bizarren oder schönen Formen. In der Biologie aber steht hinter der Untersuchung der Gestalt die Frage nach der Funktion, der Aufgabe im lebenden Organismus. Eine morphologische (gestaltliche) Untersuchung muß zwangsläufig in eine physiologische (funktionelle) Fragestellung münden.

So wird der Mikroskopiker, der Hefezellen betrachtet, unweigerlich auch an Gärungsprozesse denken. Es reizt ihn, im Experiment einem grundlegenden biologischen Prozeß nachzuspüren.

Dr. Ulrich Kull demonstriert eine Versuchsanordnung, die sich auch für Schülerübungen sehr gut eignet.

Die Vergärung von Kohlenhydraten zu Alkohol durch Bäckerhefe gehört zu den besonders leicht zugänglichen Enzymreaktionen und wird daher schon lange zu Experimenten auf diesem Gebiet verwendet. Auch sei daran erinnert, daß es schon 1897, also in der Frühzeit biochemischer Forschung, dem Chemiker BUCHNER gelang, die Gärung mit Extrakt aus Hefe im zellfreien System durchzuführen¹. Damit war erwiesen, daß enzymatische Vorgänge nicht an lebende Zellen gebunden sind. Dadurch wurde auch die Auseinandersetzung zwischen PASTEUR und LIEBIG zugunsten der

Ansichten LIEBIGS entschieden. Quantitative Messungen der Gärung, beruhend auf der Bildung von Kohlendioxid, sind verschiedentlich beschrieben worden, erfordern aber einen — wenn auch bescheidenen — apparativen Aufwand. Nun hat neuerdings R. T. BOTTLE ein mit einfachsten Mitteln durchführbares Experiment beschrieben, dessen quantitative Auswertung gleichzeitig Einblicke in die allgemeinen Grundlagen enzymatischer Vorgänge ermöglicht, insbesondere in die Kinetik² solcher Reaktionen. Der Versuch kann auch in verschiedener Weise variiert werden. Die Kohlendioxidbildung während des Zuckerabbaus kann bei diesem Versuch innerhalb einer Stunde quantitativ im Meßzylinder verfolgt werden.

Vorschrift: Man mischt 5 g Glucose (Traubenzucker) und 2 g Kochsalz mit 100 g Mehl. Dann werden 7 g frischer Bäckerhefe in 120 ml Wasser aufgeschlämmt (am günstigsten bei einer Temperatur von 35 bis 40° C). Die hergestellte Hefedispersion rührt man nun gleichmäßig in das Mehl ein, so daß ein dünner Teig entsteht (Zeitpunkt $t = 0$), den man in einen 1 l-Meßzylinder gießt. Es ist nicht nötig, eine genau bemessene Menge Teig in den Meßzylinder zu bringen. Sobald die Oberfläche des Teigs eben ist, werden sein Volumen und die seit der Mischung verstrichene Zeit notiert.

Nun verfolgt man die Gärung durch Ablesen des Teigvolumens in Abständen von 3 bis 5 min, bis es durch Entweichen von Kohlendioxid etwa konstant bleibt oder sogar wieder abzunehmen beginnt. Bei Zimmertemperatur tritt dieser Vorgang nach etwa 1 Stunde ein. Die erhaltenen Meßwerte lassen sich bequem in einem Schaubild (Abszisse = Zeit, Ordinate = Volumen) darstellen (vgl. Bild 1). Das Kochsalz wurde zugegeben, um die eiweißspaltenden Fermente der Hefe zu hemmen. Durch ihre Tätigkeit wird das im Mehl enthaltene Klebereiweiß abgebaut und der Teig dadurch rascher für das Kohlendioxid durchlässig.

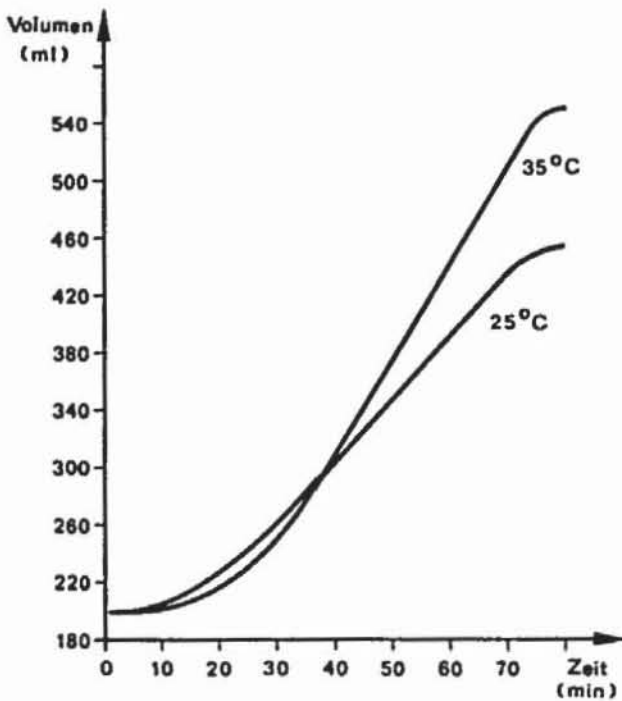


Bild 1: Volumenzunahme durch die Kohlendioxid-Entwicklung bei der Gärung in Abhängigkeit von der Zeit bei zwei verschiedenen Temperaturen.

Das Schaubild zeigt eine Kurve mit einer langsameren Anfangsphase der Volumenzunahme (Induktionsphase), die in einen geradlinigen Anstieg übergeht. Die schließlich eintretende Verzögerung der Zunahme ist durch den beginnenden Kohlendioxid-Austritt bedingt. Es darf angenommen werden, daß während der relativ kurzen Beobachtungszeit nur die freie Glucose vergärt und die Stärke des Mehles praktisch nicht angegriffen wird, so daß die Reaktion den Abbau des Zuckers widerspiegelt:



Diese Gesamtreaktion ist eine monomolekulare Reaktion, das heißt eine Moleküllart wird gespalten. Die Abnahme der Glucosekonzentration entspricht dabei der Zunahme der Konzentration an Kohlendioxid.

Dies gilt somit natürlich auch für die Zeitabhängigkeit der Konzentrationsveränderungen. Wie eine überschlägige Rechnung zeigt, werden aus 5 g Glucose durch vollständige Vergärung ca. 1,4 l Kohlendioxid gebildet. Eine Volumenzunahme von 500 ml entspricht also einem Umsatz von ca. 40%.

Die Vergärung der Glucose stellt allerdings keine einfache Enzymreaktion dar, sondern besteht aus einer Folge von mehr als 12 einzelnen Reaktionen mit jeweils eigenen Enzymen, die zum Teil in komplexem Wechselspiel miteinander stehen. Daher können die im Experiment erhaltenen Ergebnisse nicht die wahre Kinetik exakt widerspiegeln, auch nicht für den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Gesamtreaktion. Es handelt sich vielmehr um eine Art „Simulierung“ der Kinetik einer enzymatischen Reaktion. Daß es sich nicht um eine einfache Reaktion handelt, läßt sich aus dem Auftreten einer Induktionsphase ersehen.

Der geradlinige Anstieg des Volumens in Abhängigkeit von der Zeit zeigt, daß es sich um eine von der Konzentration des Substrates (Glucose) unabhängige Reaktion handelt. In der Reaktionskinetik wird dafür der Ausdruck „Reaktion nullter Ordnung“ gebraucht. Noch bequemer läßt sich dieser Mechanismus erkennen, wenn man in zwei Parallelversuchen die Substratkonzentration bei konstanter Temperatur variiert. Dazu mischt man einmal 4 g und einmal 8 g Glucose mit 100 g Mehl und arbeitet sonst wie angegeben. (Die maximale Glucose-Menge pro Versuchsansatz soll 10 g nicht überschreiten.) Zwischen den Steigungen der Geradenabschnitte der erhaltenen Schaubilder zeigt sich kein bedeutsamer Unterschied, das heißt die Reaktion ist von der Substratkonzentration unabhängig. Die Konzentrationszunahme des Kohlendioxids pro Zeiteinheit ist konstant und somit auch die Konzentrationsabnahme der Glucose. Die mathematische Formulierung einer solchen Reaktion nullter Ordnung, wie man sie häufig bei katalytischen Reaktionen antrifft, lautet:

$$-\frac{dC_{\text{Substrat}}}{dt} = \text{konstant,}$$

wie auch aus dem Schaubild zu entnehmen ist.

Eine gleichzeitige Durchführung des Versuches bei zwei verschiedenen konstant gehaltenen Temperaturen von 10° Unterschied (am besten 30° C und 40° C) und bei konstanter Substratkonzentration erlaubt die Bestimmung der Temperaturabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit (für eine Temperaturdifferenz von 10° C üblicherweise angegeben als Q_{10} -Wert) und damit auch eines groben Wertes für die Aktivierungsenergie der Gesamtreaktion. Dazu

werden an den erhaltenen Schaubildern (siehe Bild 1) die Steigungen der Geradenabschnitte festgestellt. Das Verhältnis der Steigungen zueinander ergibt den Q_{10} -Wert ($Q_{10} = m_2/m_1$). Die Aktivierungsenergie μ (oft auch mit q bezeichnet) läßt sich mit Hilfe dieses Wertes nach einer von Arrhenius angegebenen Gleichung berechnen:

$$\mu = \frac{4,574 \cdot \lg Q_{10}}{\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}} \quad [\text{cal}],$$

wobei T_1 und T_2 die Meßtemperaturen in absoluter Skala ($^{\circ}$ Kelvin) sind. Bei Enzymen kann wie bei anderen Katalysatoren die Aktivierungsenergie als Maß der katalytischen Aktivität aufgefaßt werden. Die katalytische Aktivität ist um so höher, je kleiner μ ist. So beträgt z. B. für die Spaltung von Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff ohne Katalysator die Aktivierungsenergie $\mu = 18$ kcal/mol, d. h. diese Energie ist aufzuwenden, um überhaupt eine Reaktionsbereitschaft bei den Wasserstoffperoxid-Molekülen auszulösen. Dann läuft die Reaktion spontan ab, da sie exotherm³ ist. Bringt man Platin als Katalysator in das Wasserstoffperoxid, so beträgt μ nur noch 11,7 kcal/mol. Für das Wasserstoffperoxid-spaltende Enzym Katalase liegt μ bei 5,5 kcal/mol, das heißt, dieser Katalysator ist wirksamer als Platin.



Bild 2: Bierhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) Sproßkette — drei Stadien der Zellsprossung (aus Kosmos-Lexikon der Naturwissenschaften).

Die Gärung mit zellfreiem Extrakt kann ebenfalls demonstriert werden. Dazu zerreibt man etwa 20–25 g Hefe mit wenig eisgekühltem Wasser und reinem Seesand (mit Säure gereinigt und gegläht) in einer eisgekühlten Reibschale, bis keine unverletzten Zellen mehr vorhanden sind (ca. 15 min). Dann wird der Hefe-Ansatz mit destilliertem Wasser von etwa 30 $^{\circ}$ C auf 120 ml verdünnt, vom schweren Sand abgossen und nach Vorschrift weiterverarbeitet. Die Volumenzunahme ist hier allerdings trotz der erhöhten Hefemenge geringer.

Eine andere Variante des Versuchs erhält man durch Änderung der Konzentration der

Hefe, das heißt des „Enzyms“, bei konstanter Temperatur. — Endlich soll darauf hingewiesen werden, daß auch das zu vergärende Substrat verändert werden kann. Alle Zucker, die von Hefe ohne Adaptationsphase vergärt werden, lassen sich verwenden, so neben Glucose vor allem Fructose (Fruchtzucker) und die Disaccharide Saccharose (Rohrzucker) und Maltose (Malzzucker). Dabei besteht die Möglichkeit, einmal gleiche Gramm-Mengen der Mono- und Disaccharide zu vergären und zum anderen bei gleicher molarer Konzentration⁴ zu arbeiten (5 g Hexose entsprechen in diesem Fall 9,5 g Disaccharid).

Wie die verschiedenen erwähnten Möglichkeiten zeigen, sind mit Hilfe dieses einfachen Enzymversuches eine ganze Reihe von Grundproblemen der Enzymologie experimentell zugänglich. Der Versuch dürfte daher für Übungen verschiedenster Art sehr geeignet sein.

Literaturhinweise:

1. BOTTLE, R. T.: Educ. in Chem., 4, 197–199 (1967).
2. DIXON, M. and E. C. WEBB: The Enzymes, Longmans Ltd., London (1964).
3. SNELL, F. M., S. SHULMAN, R. P. SPENCER and C. MOOS: Biophysical principles of structure and function, Addison-Wesley, Palo Alto (1965).

Erläuterungen:

¹ Enzyme: (Fermente) sind komplizierte organische Katalysatoren aus Eiweißstoffen, die von lebenden Zellen gebildet werden, aber auch außerhalb dieser Zellen wirken können. Im vorigen Jahrhundert unterschied man noch zwischen „geformten“ Fermenten, die nur innerhalb der Zelle wirksam sind, und zwischen „ungeformten“ Enzymen, die sich als Katalysatoren auch außerhalb der Zelle betätigen können. Diese Unterscheidung entfiel, als BUCHNER 1897 zeigte, daß auch die zellfreien Hefepreßsäfte noch Zucker zu Alkohol und Kohlensäure vergären können. Damit war bewiesen, daß Fermente (Enzyme) zwar in Organismen entstehen, daß sie aber sowohl inner- wie außerhalb der Zelle wirken können. BUCHNER erhielt für seine Arbeiten 1907 den Nobelpreis für Chemie.

² Kinetik: chemische Kinetik, ein Gebiet der physikalischen Chemie, das den zeitlichen Ablauf der chemischen Vorgänge als Funktion von Konzentration, Druck, Temperatur, Katalysatoren usw. beschreibt.

³ exotherme Reaktion: chemische Prozesse, bei denen nach außen Wärme abgegeben wird (z. B. fast alle Oxydationen). Das Gegenteil sind die endothermen Vorgänge, bei denen den reagierenden Stoffen Wärme von außen zugeführt werden muß.

⁴ molare Konzentration: 1 Mol eines Stoffes sind genausoviel Gramm, wie dessen Molekulargewicht beträgt. Eine 1-molare Rohrzuckerlösung erhält man z. B., wenn man 342 g Zucker mit Wasser auf 1000 g auffüllt (Molekulargewicht in Gramm/Liter).

Verfasser: Dr. Ulrich Kull, Botanisches Institut der Universität Stuttgart (TH), 7 Stuttgart-Ost, Cannstatter Str. 212.