

Über Fermentlähmung.

Von

L. Lichtwitz.

Mit drei Kurvenzeichnungen im Text.

(Aus der medizinischen Klinik und dem landwirtschaftlich-bakteriologischen Institut zu Göttingen.)

(Der Redaktion zugegangen am 19. März 1912.)

Als Fermentlähmung bezeichnet Tammann¹⁾ den Zustand, in den ein Ferment durch die Einwirkung der von ihm gebildeten Stoffe gerät. Nur in diesem Sinne soll hier Fermentlähmung verstanden werden.

Tammann hat in seinen Untersuchungen gezeigt, daß ungeformte Fermente durch die Anwesenheit der Reaktionsprodukte in eine inaktive Modifikation übergehen. Diese Fermentlähmung ist reversibel. Nach Entfernung der Produkte erlangt das Ferment seine Aktivität wieder.

Beobachtungen bei der Hemmung der Harnstoffbildung nach Harnstoffzufuhr im Stoffwechsel von Mensch und Hund führten zu der Frage, ob die Fermentlähmung die Anwesenheit des Produktes (Harnstoff) überdauert.²⁾

Tammann macht keine Mitteilungen über die Zeit, durch die die Fermente mit den Reaktionsprodukten in Berührung waren. Diese Zeit ist auch belanglos, wenn die bisher gültige Auffassung zu Recht besteht, daß Ferment und Produkte eine reversible Bindung, in der das Ferment unwirksam ist, eingehen. Außer der Konzentration der Produkte könnte aber gerade

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 16, S. 271, 1892.

²⁾ L. Lichtwitz, Über chemische Gleichgewichte und Endzustände im Stoffwechsel, Diese Zeitschrift, Bd. 77, S. 402, 1912.

die Dauer ihrer Berührung mit dem Ferment die bleibende Lähmung bedingen.

Untersuchungen an Fermentlösungen schienen zu der Entscheidung der Frage der Lähmungsdauer ungeeignet, weil es schwer, wenn nicht unmöglich ist, das Ferment quantitativ und in voller Aktivität aus der Lösung wieder zu gewinnen.

Ich habe daher Versuche an der lebenden Hefe angestellt, bei denen mich Herr Prof. A. Koch, Direktor des landwirtschaftlich-bakteriologischen Instituts, durch seinen Rat und durch die Hilfsmittel seines Instituts unterstützte.

Die Untersuchungen galten der Frage, ob die Hefe nach einer Züchtung in invertzuckerhaltigen Nährlösungen eine Abnahme der Invertasewirkung, die einer geringeren Fermentbildung oder einer weniger aktiven Modifikation des Fermentes entsprechen würde, erfährt. Die Versuche wurden in drei verschiedenen Anordnungen angestellt.

I.

Methodik. Vom April bis Juli 1911 wurde Hefe (Reinkultur der Weinhefe Rasse «Oppenheimer Kreuz») in zwei Reihen gezüchtet. In der Reihe a enthielt die Nährlösung (Hefewasser) 10% Rohrzucker, in Reihe b 10% Invertzucker. Der Invertzucker bestand in allen Versuchen aus einer Mischung gleicher Teile Dextrose (Kahlbaum) und Lävulose (Schering). Mit diesen beiden Hefen wurden, nachdem sie so längere Zeit gezogen waren, große Kulturen angelegt, die die bei den einzelnen Versuchen vermerkten Mengen von Rohrzucker, Invertzucker oder Mischungen beider enthielten. Nach der Impfung wurden die Kolben mit einem Gärventil verschlossen. Der Verlauf der Gärung, die im Brutzimmer bei 25° erfolgte, wurde durch die Gewichtsabnahme, die der produzierten Kohlensäure entspricht, festgestellt. Nach Beendigung der Gärung oder nach ihrer Unterbrechung wurde in einem Teil der Versuche die Zahl der Hefezellen festgestellt (durch Zählung in der Thoma-Zeisschen Kammer), sodann die Hefe steril durch Zentrifugieren oder durch Absaugen mit einer Tonkerze von der Nährlösung getrennt und bis zum Verschwinden der Reduktionsproben im Filtrat mit sterilem Wasser gewaschen. Sodann wurde die Hefe mit sterilem Wasser auf ein gleiches Volumen aufgefüllt, mit einer sterilen Rohrzuckerlösung versetzt und in einen Wasserthermostaten gebracht. Die Hefen, die verglichen werden sollten, wurden gleichzeitig verarbeitet und untersucht. In diesen Rohrzuckerlösungen wurde die Inversionsgeschwindigkeit bestimmt, indem nach

bestimmten Zeiten Proben mit der Pipette entnommen, mit 3 ccm 2.5%iger Natronlauge versetzt, 1 Minute gekocht und filtriert wurden. Nach einigen Stunden wurde dann die Drehung bestimmt.

Bei den Hefen, die schlecht invertierten, wurde die Beobachtung mitunter länger fortgeführt. Es mußte dann die Gärung, die eintrat, einen Fehler bewirken. Wie sich aus den Protokollen ergeben wird, ist dieser Fehler belanglos, weil die kürzeren Zeiten, in denen die Gärung nicht störte, zur Beurteilung der Reaktionsgeschwindigkeit ausreichen.

Versuch 1.

a) 1100 ccm Hefewasser mit 60% Rohrzucker.

b) 1100 ccm Hefewasser mit 10% Rohrzucker und 50% Invertzucker. Impfung am 21. VII.

Verlauf der Gärung.

a		b	
Datum	CO ₂ g	Datum	CO ₂ g
25. VII.	40.0	—	—
26.	62.0	26. VII.	3.0
27.	78.8	27.	30.5
28.	90.1	28.	57.8
29.	98.5	29.	80.5
31.	106.2	31.	112.3

Bei b mußte einmal nachgeimpft werden. Die Gärung fing langsamer an, war aber am 31. VII. ebensoweit wie bei a.

Zahl der Hefezellen.

In 1 cmm sind Hefezellen

bei a 524

bei b 534,4.

Die gewaschene Hefe wurde mit 30 ccm sterilem Wasser aufgenommen und mit 80 ccm 10%iger Rohrzuckerlösung versetzt. Die Lösungen waren vorgewärmt. Die Inversion erfolgte bei 38°. Die Polarisation bei 20—21°.

Verlauf der Inversion.

Hefe a			Hefe b		
Minuten	Drehung	$k \cdot 10^{-4}$	Minuten	Drehung	$k \cdot 10^{-5}$
0	+ 4.55	—	0	+ 4.62	—
49	+ 2.46	86,88	32.5	verunglückt	—
85	+ 1,40	86,86	81.5	+ 3,81	17,52
155	+ 0.21	81,94	147.5	+ 3,03	20,35
206.5	— 0,55	85,09	200	+ 2,56	13,58
—	—	—	348.5	+ 1,45	20,89

Die Reaktionskonstante wurde nach der Gleichung der monomolekularen Reaktion

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

berechnet.

Versuch 2.

Es werden 4 Kulturen von je 1000 ccm Hefewasser angesetzt.

a und b enthalten 10% Rohrzucker.

c und d enthalten 10% Rohrzucker und 20% Invertzucker.

a und c werden mit der in Rohrzuckernährlösungen, b und d mit der in Invertzuckerlösungen gezüchteten Hefe geimpft (25./IX.).

Es enthalten also

- a Rohrzucker und Rohrzuckerhefe
- b „ „ Invertzuckerhefe
- c Invertzucker „ Rohrzuckerhefe
- d „ „ Invertzuckerhefe.

Verlauf der Gärung.

a		b		c		d	
Datum	CO ₂ g	Datum	CO ₂ g	Datum	CO ₂ g	Datum	CO ₂ g
29. IX.	38,55	29. IX.	37,40	29. IX.	56,90	29. IX.	57,10
30.	44,30	30.	44,00	30.	72,80	30.	74,70
2. X.	46,00	2. X.	45,90	2. X.	85,50	2. X.	86,50
				4.	90,30	4.	92,10

Zahl der Hefezellen nicht festgestellt.

Die Hefe wurde in 50 ccm sterilem Wasser aufgeschwemmt und mit 50 ccm einer ca. 10%igen Rohrzuckerlösung versetzt. Vorwärmung wie bei 1. Inversion bei 36°. Polarisation bei 19°.

Verlauf der Inversion.

a			b			c			d		
Min.	Drehung	k · 10 ⁻³	Min.	Drehung	k · 10 ⁻³	Min.	Drehung	k · 10 ⁻³	Min.	Drehung	k · 10 ⁻³
0	+3,68	—	0	+3,66	—	0	+3,81	—	0	+3,83	—
15,5	+2,41	19,39	15	+1,51	39,0	14	+3,70	15,63	14	+3,79	5,4
39	+0,82	22,68	40	+0,49	26,47	27	+3,58	17,23	28,5	+3,70	9,4
69,5	0,06	20,84	69	-0,39	26,05	42,5	+3,49	15,33	44	+3,61	13,00
						58	+3,40	12,19	60	+3,41	14,54
						81	+3,10	18,53	83	+3,31	12,95
						165	+2,11	24,96	167	+2,49	18,40
						240	+0,84	30,54	241,5	+1,55	24,68

Versuch 3.

Es wurden 4 Kulturen von je 1000 ccm Hefewasser angesetzt.

Es enthielt Glas a 100 g Rohrzucker

b 500 »

c 100 » » + 40 g Invertzucker

d 100 » » + 100 » »

Die Lösungen wurden am 16. XI. 11. mit der gleichen Hefe geimpft.

Die Kolben a und c hatten fast die berechnete CO₂-Menge (46 g CO₂ von 100 Hexose) geliefert. Im Kolben b waren 265 g Hexose vergoren. Die Lösung mußte 143 g Alkohol enthalten, also ca. 14%, eine Konzentration, die die weitere Gärung hemmt. Kolben d hätte nach vollendeter Gärung 95 g CO₂ geliefert. Die Gärung ging bis zum 21. X. schnell, dann mit auffallender Langsamkeit vorstatten.

Verlauf der Gärung.

Datum	a CO ₂ g.	b CO ₂ g	c CO ₂ g	d CO ₂ g
17. X.	0,95	0,20	1,45	1,15
18. 9h	13,25	14,50	11,90	16,50
6h	21,55	24,10	18,60	27,20
19. 9h	30,35	39,80	25,60	38,80
6h	35,25	48,00	29,80	43,60
20. 9h	39,65	60,90	35,80	45,60
6h	41,65	67,00	38,90	46,60
21.	43,65	76,99	43,30	48,00
22.	44,95	96,15	49,80	51,10
23.	45,60	105,30	53,60	53,70
24.	45,95	111,70	56,60	55,85
25.	46,20	116,20	59,10	58,50
26.	46,25	118,60	60,90	60,50
27.	46,55	119,85	62,00	62,90
28.	46,65	120,60	62,75	64,95
29.	—	121,05	63,45	67,40
30.	—	121,30	63,75	69,30
31.	—	121,70	—	71,10
1. XI.	—	—	—	72,65
2.	—	—	—	74,15
3.	—	—	—	75,90
5.	—	—	—	77,90

Gärung nicht
beendet

Von diesem Verlauf der Gärung wird unter II die Rede sein.

Zahl der Hefezellen.

Volumen der Lösungen	Hefezellen im Kubikmillimeter	Hefezellen in der Kultur
a 1035 ccm	13 400	1388.10 ⁷
b 1280 »	835	1070.10 ⁷
c 1075 »	10 150	1092.10 ⁷
d nicht gezählt.		

Verlauf der Inversion.

Die Hefen wurden in 50 ccm Wasser aufgeschwemmt. Diese Aufschwemmungen wurden in zwei Teile geteilt. Mit jedem Teil wurde ein Inversionsversuch vorgenommen.

Für die erste Inversion (3 α) wurden 25 ccm Hefeaufschwemmung mit 50 ccm ca. 9%iger Rohrzuckerlösung versetzt.

a			b			c			d		
Min.	Drehung	k · 10 ⁻⁴	Min.	Drehung	k · 10 ⁻⁴	Min.	Drehung	k · 10 ⁻⁴	Min.	Drehung	k · 10 ⁻⁴
0	+ 3,84	—	0	+ 3,75	—	0	+ 3,89	—	0	+ 3,87	—
30	+ 3,51	22	29,5	+ 2,83	68,4	29	+ 3,75	8,0	27,5	+ 3,80	4,9
49	+ 3,24	25,6	49	+ 2,00	88,4	48,5	+ 3,50	16,4	47	+ 3,75	4,8
61,5	+ 2,91	32,8	61,5	+ 1,51	97,2	61,0	+ 3,30	19,9	60	+ 3,65	7,2
75	+ 2,68	34,6	74,5	+ 1,14	99,6	74	+ 3,00	25,7	72,5	+ 2,93	27,8
91,5	+ 1,34	73,6	91,5	+ 0,63	107,9	91	+ 1,84	56,2	89,5	+ 2,60	31,7

Für die zweite Inversion (3 β) wurden 25 ccm Hefeaufschwemmung mit 50 ccm ca. 26%iger Rohrzuckerlösung versetzt.

a			b			c			d		
Min.	Drehung	k · 10 ⁻⁴	Min.	Drehung	k · 10 ⁻⁴	Min.	Drehung	k · 10 ⁻⁴	Min.	Drehung	k · 10 ⁻⁴
0	+ 11,59	—	0	+ 11,87	—	0	+ 11,43	—	0	+ 11,41	—
15,5	+ 11,32	9,7	14	+ 11,48	17,9	13,5	+ 11,37	2,9	12,5	—	—
25,5	—	—	24,5	+ 11,05	21,7	23,5	+ 11,14	8,1	22,5	+ 11,36	1,5
41	+ 10,98	9,8	39,5	+ 10,50	23,1	38,5	+ 10,87	9,7	38	+ 11,05	6,1
64	+ 10,60	10,4	62,5	+ 9,66	23,9	61	+ 10,47	10,7	61	+ 11,00	4,4
82	+ 10,30	10,6	80	+ 8,95	25,6	79,5	+ 10,10	11,5	78,5	+ 10,75	5,6

Aus diesen Versuchen ergibt sich als Hauptresultat, daß die in Invertzuckerlösung gewachsenen Hefen eine geringere Invertasewirkung haben als die Hefen, die in reinem Rohrzucker gewachsen waren. Die Schwächung der Invertasewirkung ist abhängig von der Konzentration des Invertzuckers.

Die Reaktionskonstanten sind gegen die der Rohrzuckerhefe bei 4% Invertzucker (Versuch 3α Hefe c) auf $\frac{2}{3}$

10%	(Versuch 3α Hefe d)	ca. $\frac{1}{4}$
20%	(Versuch 2c)	$\frac{1}{20}$
20%	(Versuch 2d)	ca. $\frac{1}{15}$
50%	(Versuch 1)	$\frac{1}{40}$

vermindert.

Diese Versuche sind miteinander vergleichbar, weil die Inversion bei der gleichen Rohrzuckerkonzentration vorgenommen wurde.

In Versuch 3β stand die Rohrzuckerkonzentration zu der Fermentmenge in einem ungünstigen Verhältnis. Die geringere Invertierungskraft von Hefe c (4% Invertzucker) macht sich hier nur in der Verzögerung der Inversion geltend, die auch Tammann¹⁾ bei Anwendung geringer Invertasemengen beobachtet hat. Diese Verzögerung des Inversionsanfangs ist auch bei 3β Hefe d (10% Invertzucker) deutlich. Die Reaktionskonstante bleibt aber hinter der der Vergleichskultur a um 50% zurück.

Es erscheint überhaupt unstatthaft, bei dem Versuch 3α und β von einer Reaktionskonstanten zu sprechen. Die Geschwindigkeiten nehmen mit fortschreitender Reaktion ständig zu, eine Erscheinung, die auch V. Henri²⁾ beobachtet und Kullgren³⁾ als positive Autokatalyse gedeutet hat. Da die Invertasewirkung durch geringe Mengen Säure begünstigt wird, so wäre es wohl möglich, daß hier bei Anwendung lebender Hefe die geringe Menge Kohlensäure, die sich bei diesem Versuch etwa nach einer halben Stunde zu bilden begann, als Katalysator wirkte. Diese Annahme aber ist irrig. Bei Hefe b (gezogen in 50%iger Rohrzuckerlösung) war nämlich keine Spur von Gärung eingetreten, und doch nahm die Reaktionsgeschwindigkeit ständig zu. Diese Hefe bewirkte nach Zusatz von einer kleinen Menge Phosphat Gärung. Die Ursachen der

¹⁾ l. c., S. 312 u. 313.

²⁾ Zeitschr. f. physikal. Chemie, Bd. 39, S. 194, 1901.

³⁾ Zeitschr. f. physikal. Chemie, Bd. 41, S. 407, 1902.

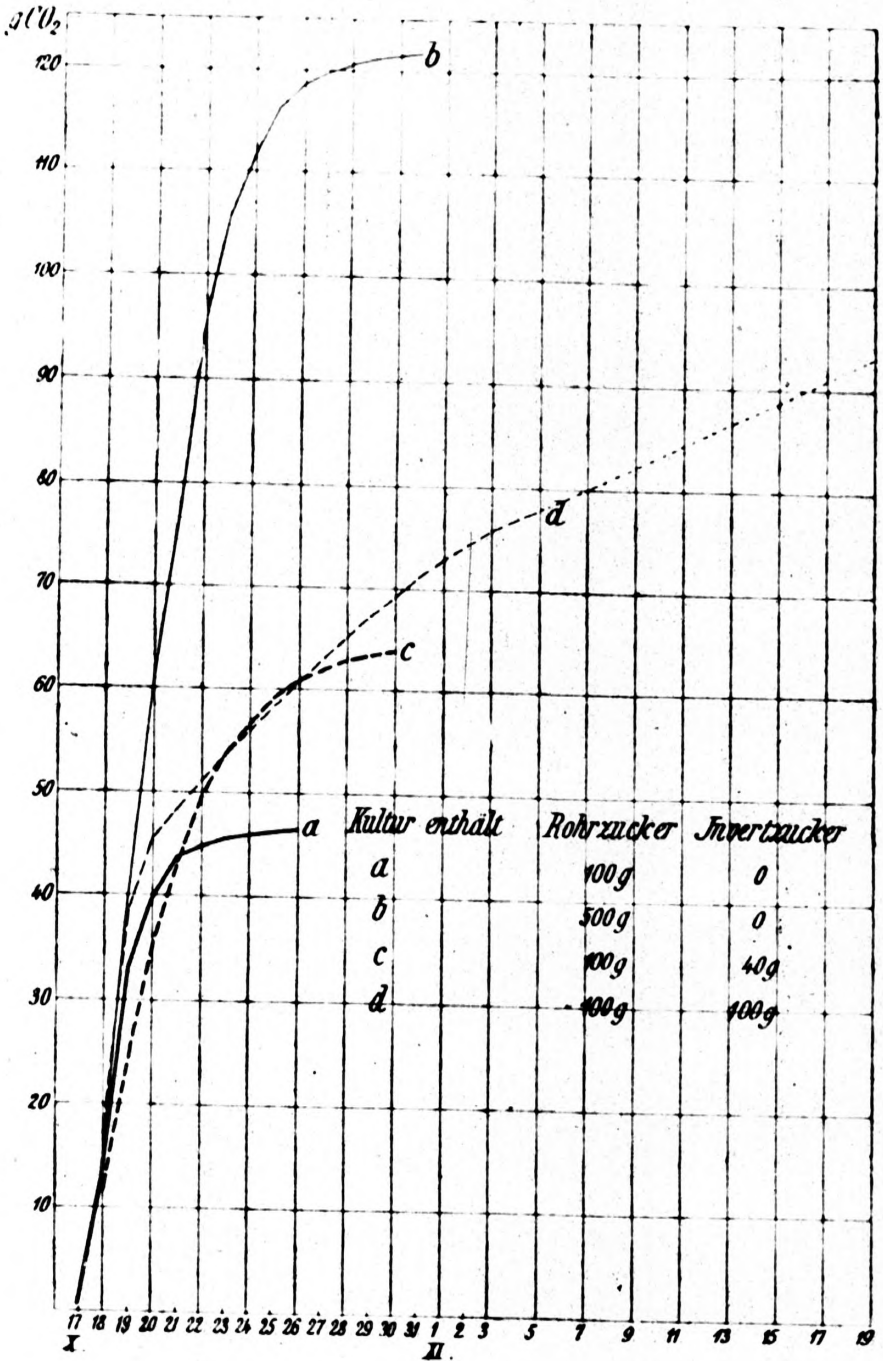
Reaktionsbeschleunigung bleiben also unklar. Die Beurteilung des Versuches wird dadurch nicht berührt.

Die starke Abnahme der Invertasewirkung bei Hefen, die in Invertzuckerlösungen gewachsen waren, ist nicht verursacht durch ein schlechteres Wachstum der Hefe. Die Hefezahlen in Versuch 1 sind völlig identisch. Starke Erhöhungen der Konzentration wie bei 3 b (50%) bewirken ein schlechteres Wachstum der Hefe. Die Invertasewirkung dieser Kultur ist aber trotz der geringeren Zahl der Hefezellen größer als die von Hefe 3 a (gewachsen in 10%iger Rohrzuckerlösung). Diese Beobachtung stimmt mit Befunden anderer Autoren überein, auf Grund deren ich die Versuche so angeordnet habe, daß nie Hefe in reinen Invertzuckerlösungen gezüchtet wurde, sondern daß die Kulturen denselben Rohrzuckerzusatz erhielten wie die Vergleichslösungen.

In Versuch 2 wurden die in einer größeren Reihe von Generationen gezüchteten Hefen (Rohrzuckerhefe und Invertzuckerhefe) einmal in dasselbe Medium (a und d) und zweitens in das fremde (Invertzuckerhefe in Rohrzuckerlösung und Rohrzuckerhefe in Invertzuckerlösung, b und c) geimpft, um zu sehen, ob die Eigenschaft der schwächeren Invertasewirkung der Zelle fest anhängt und vererbbar ist, oder ob sie sich schon in einer Kultur nach dem Medium richtet, in dem die Hefe wächst. Der Versuch zeigt, daß die Eigenschaft der schwächeren Invertasewirkung nicht vererbbar ist, sondern daß die Invertasewirkung der Hefe dem Nährboden entsprach, in dem die Hefe wuchs. Die Reaktionskonstanten in diesem Versuch (a und b) (c und d) stimmen gut überein. Bei d (Invertzuckerhefe in Invertzucker) zeigt sich wieder die Verzögerung des Inversionanfangs. Ob es gelingt, bei längerer Fortzüchtung die Eigenschaft der Invertaseschwächung vererbbar zu machen, bleibt offen.

II.

Die Beobachtung des Gärungsverlaufes bei Versuch 3 führte zu einer zweiten Anordnung, durch die sich gleichfalls die bleibende lähmende Wirkung, die der Invertzucker auf die Invertase ausübt, zeigen ließ.



Kurve II.

In dieser Kurve und in den folgenden ist auf der Abszisse die CO_2 in Gramm, auf der Ordinate die Zeit in Tagen (bzw. in Stunden) verzeichnet. Die Gärung verläuft bei a und b in normaler Weise, in der Hauptphase geradlinig. Gegen Schluß der Gärung biegt die Kurve ziemlich scharf um, da die letzten Zuckerreste immer langsam vergoren werden. Die Kurve c ver-

läuft etwas weniger steil, ihr Knick ist nicht so scharf. Bei d besteht eine scharfe Knickung nach einer CO_2 -Produktion von 46 g. Bis zu diesem Punkte verläuft die Linie steil aufrecht, zusammen mit den anderen. Von der Knickung an verläuft die Gärung außerordentlich langsam, so daß trotz ihres höheren Zuckergehaltes die CO_2 -Produktion vom 24.—26. X. unter der von Kultur c liegt. Die Gärung behält diesen Verlauf bei. Die Beobachtung reicht nur bis zum 5. X. Die Gärung würde bei Beibehaltung dieser zweiten Geschwindigkeit erst am 18.—19. XI. ihr Ende erreicht haben. Dieser Gärungsverlauf ist nicht verursacht durch die hemmende Wirkung des gebildeten Alkohols, der (vgl. Kurve b) erst bei einer viel höheren Konzentration die Gärung hemmt, und auch nicht durch Art und Menge der Hefe. Dann könnte nicht die Anfangsgärung in der normalen Weise erfolgen. Der Grund der Störung wird deutlich aus dem Orte der Knickung. Die 100 g Invertzucker, die die Kultur enthält, liefern 46 g CO_2 . Bis zu diesem Punkt ist die Gärung schnell verlaufen. Die dort beginnende Verlangsamung kann nur darin liegen, daß die Invertierung des Rohrzuckers, d. h. die Bildung der gärfähigen Hexosen, erst nach Beseitigung des primär zugesetzten Invertzuckers begann und dann mit einer sehr geringen konstant bleibenden Reaktionsgeschwindigkeit verlief. Die Hemmung der Inversion durch den anwesenden Invertzucker würde dem von Tammann¹⁾ gefundenen Gesetze entsprechen. Die kleine Reaktionsgeschwindigkeit, die nach Vergärung des Invertzuckers für die ganze Dauer des Versuches bestehen bleibt, würde bedingt sein durch die bleibende Fermentlähmung, wie sie durch die Versuche I demonstriert ist.

Da bei dem Gärungsverlauf der Versuche 1 und 2 wegen des hohen Invertzuckergehaltes diese Knickung der Kurve nicht zum Ausdruck kommen konnte, war es zuvor notwendig, an einer großen Reihe zu sehen, ob der im Versuch 3 beobachtete Befund konstant ist.

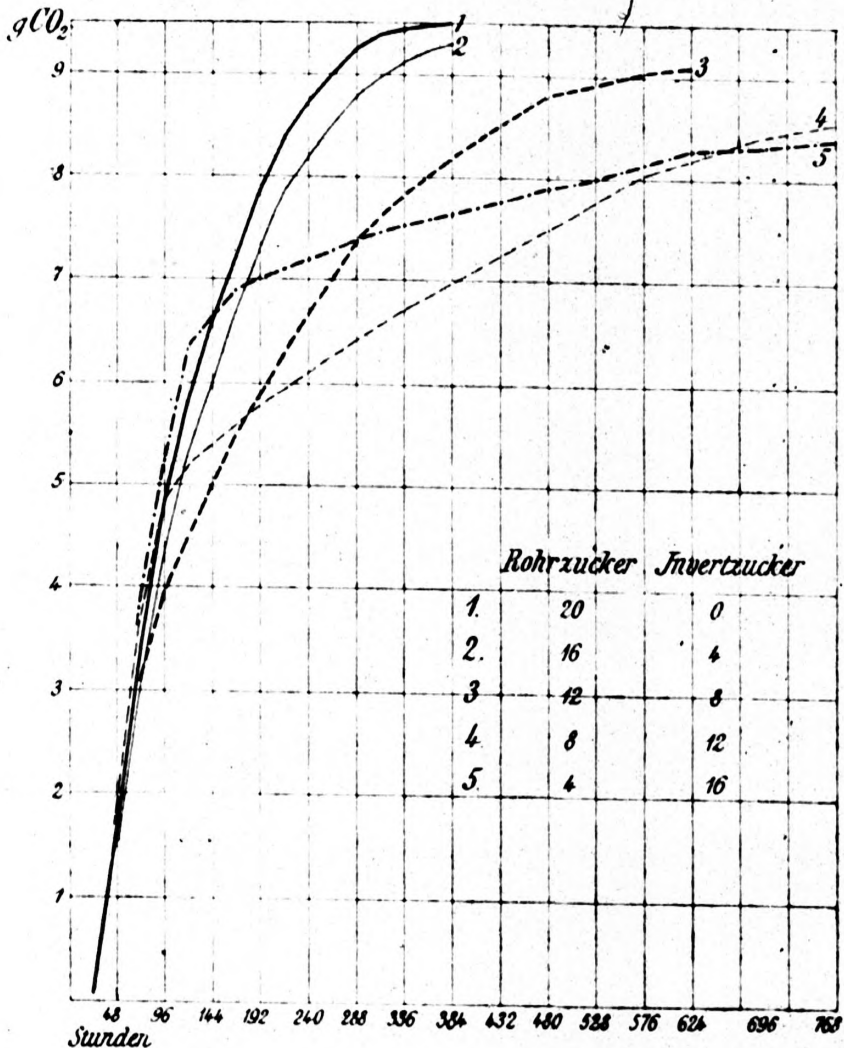
Versuch 4.

Es wurden daher 28 Gärversuche von je 100 ccm Hefewasser angesetzt. Jede Kultur enthielt 20 g Zucker, und zwar nur Rohrzucker

¹⁾ l. c.

oder nur Invertzucker und Mischungen beider in verschiedenen Verhältnissen. Zum Vergleich wurde auch die Vergärung reiner Dextrose und reiner Lävulose beobachtet. Die Verteilung der Zucker wird aus dem Kopf der nachfolgenden Tabelle S. 140 u. 141 deutlich. Der etwas größere Wassergehalt von Dextrose und Lävulose sowie die Gewichtsvermehrung, die durch die Inversion des Rohrzuckers eintritt, wurde nicht berücksichtigt. Die Kulturen I—XIII wurden mit in Rohrzucker gewachsener, die Kulturen XIV—XXVIII mit der gleichen Menge in Invertzucker gezogener Hefe geimpft. Die folgende Tabelle gibt Aufschluß über den Verlauf der Gärung.

In der Kurve b ist der durchschnittliche Gärungsverlauf der Kulturen, die den gleichen Zuckerzusatz enthielten, dargestellt. Der Übersichtlichkeit halber sind die Kurven der Invertzucker-, Dextrose- und Lävuloselösungen nicht aufgezeichnet. Aus der Tabelle geht hervor, daß die Gärung dieser Lösungen ein wenig rascher verläuft, als die vom Rohrzucker, aber eine Kurve von genau dem gleichen Typus gibt wie dieser.



Kurve b.

Versuch 4

		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	XVI	XVII	XVIII	XIX	XX	XXI	XXII	XXIII	XXIV	XXV	XXVI	XXVII	XXVIII	
Zeit	Tag	Std.																												
Rohrzucker . . .		20	20	16	16	12	12	8	8	4	0	0	0	0	20	20	16	16	12	12	8	8	4	4	0	0	0	0	0	
Dextrose		0	0	2	2	4	4	6	6	8	10	10	20	0	0	0	2	2	4	4	6	6	8	8	10	10	20	20	0	
Lävulose		0	0	2	2	4	4	6	6	8	10	10	0	20	0	0	2	2	4	4	6	6	8	8	10	10	0	0	20	
27. X. 6h		24	0,10	0,05	0,05	0,13	1,08	0,05	0,05	0,00	0,10	0,05	0,25	0,05	0,05	0,10	0,05	0,00	0,00	0,05	0,00	0,00	0,05	0,02	0,00	0,10	0,10	0,00		
28. 10h a. m.		40	1,15	1,05	1,02	1,15	1,15	1,22	1,10	1,10	1,10	1,10	0,93	1,33	0,85	1,08	1,15	1,10	1,05	1,00	1,13	1,28	1,07	0,95	1,15	0,97	0,85	1,20	1,10	1,00
6h p. m.		48	1,65	1,55	1,37	1,62	1,60	1,77	1,70	1,75	1,73	1,75	1,60	1,95	1,45	1,65	1,68	1,65	1,58	1,70	1,70	1,80	1,75	1,57	1,75	1,62	1,55	1,80	1,60	1,70
29. 10h a. m.		64	2,90	2,93	2,55	2,80	2,77	2,95	3,15	3,25	3,30	3,25	3,20	3,50	3,00	2,90	2,95	2,72	2,58	2,85	2,85	3,20	3,13	3,15	3,25	3,25	3,05	3,12	3,05	3,25
6h p. m.		72	3,50	3,50	3,00	3,25	3,17	3,32	3,75	3,80	3,85	3,90	3,85	4,15	3,65	3,35	3,45	3,05	2,90	3,10	3,30	3,65	3,62	3,67	3,85	3,90	3,62	3,65	3,57	3,75
30. 10h a. m.		88	4,55	4,45	3,90	4,18	3,83	3,77	4,50	4,65	5,03	5,12	5,02	5,20	4,80	4,35	4,45	4,00	3,83	3,80	3,80	4,42	4,42	4,95	5,02	5,08	4,87	4,73	4,60	4,90
6h p. m.		96	4,90	4,85	4,25	4,55	4,00	3,97	4,83	4,88	5,43	5,50	5,53	5,62	5,20	4,75	4,85	4,35	4,18	3,97	3,95	4,65	4,75	5,40	5,45	5,50	5,35	5,10	5,00	5,30
31. 10h a. m.		112	5,70	5,62	5,00	5,30	4,45	4,32	5,20	5,20	6,10	6,45	6,45	6,60	6,15	5,50	5,55	5,12	4,88	4,40	4,40	5,00	5,10	6,10	6,15	6,40	6,25	5,90	5,88	6,10
6h p. m.		120	6,00	5,92	5,30	5,58	4,53	4,49	5,30	5,30	6,35	6,85	6,85	7,00	6,45	5,80	5,92	5,45	5,15	4,55	4,55	5,05	5,17	6,35	6,35	6,78	6,57	6,33	6,27	6,45
1. XI. 6h a. m.		144	6,75	6,70	6,05	6,40	5,10	4,92	5,55	5,45	6,72	7,55	7,60	7,85	7,20	6,53	6,68	6,15	5,85	5,05	5,05	5,13	5,38	6,68	6,73	7,47	7,35	7,17	7,25	7,30
2.		168	7,47	7,30	6,73	6,95	5,53	5,35	5,75	5,63	6,85	8,20	8,10	8,40	7,70	7,13	7,20	6,85	6,50	5,45	5,50	5,25	5,48	6,90	6,85	8,15	7,85	7,93	8,02	7,78
3.		192	8,05	7,85	7,30	7,57	6,00	5,82	6,00	5,83	7,00	8,25	8,35	8,60	8,10	7,78	7,90	7,45	7,20	5,97	5,95	5,48	5,62	7,05	7,03	8,50	8,22	8,43	8,45	8,20
4.		216	8,55	8,35	7,85	8,10	6,42	6,27	6,22	6,05	7,15	8,38	8,45	8,65	8,30	8,30	8,40	7,90	7,70	6,40	6,37	5,60	5,85	7,13	7,07	8,62	8,35	8,60	8,60	8,35
5.		240	8,93	8,70	8,17	8,33	6,72	6,70	6,37	6,18	7,22	8,45	8,50	8,70	8,35	8,60	8,70	8,22	8,05	6,70	6,72	5,70	5,97	7,25	7,15	8,62	8,38	8,60	8,60	8,40
6.		264	9,20	8,94	8,60	8,65	7,12	6,97	6,65	6,40	7,30	8,55	8,55	8,70	8,40	8,97	9,08	8,58	8,48	6,95	7,05	5,85	6,15	7,40	7,23	8,70	8,40	8,65	8,70	8,50
7.		288	9,37	9,15	8,82	8,92	7,40	7,32	6,90	6,60	7,40	8,55	8,60	8,80	8,45	9,25	9,27	8,80	8,80	7,42	7,35	6,00	6,32	7,50	7,30	8,70	8,40	8,65	8,70	8,55
8.		312	9,47	9,30	9,05	9,07	7,65	7,62	7,08	6,75	7,47	—	8,60	8,80	9,35	9,40	9,00	8,97	7,68	7,60	6,10	6,45	7,55	7,35	—	—	—	—	8,55	
9.		336	9,50	9,32	9,10	9,12	7,83	7,82	7,17	6,90	7,52	—	—	—	9,40	9,45	9,00	9,10	7,88	7,80	6,15	6,58	7,60	7,40	—	—	—	—	—	
11.		384	9,60	9,40	9,30	9,32	8,28	8,32	7,57	7,27	7,65	—	—	—	9,45	9,55	—	9,30	8,27	8,17	6,40	—	7,75	7,48	—	—	—	—	—	
13.		432	9,60	9,40	9,30	9,35	8,50	8,59	7,90	7,50	7,73	—	—	—	9,48	9,55	9,20	9,33	8,60	8,40	6,62	7,07	7,90	7,55	—	—	—	—	—	
15.		480	—	—	—	—	8,78	8,87	8,23	7,80	7,93	—	—	—	—	—	—	—	8,83	8,75	6,35	7,40	8,07	7,75	—	—	—	—	—	
17.		528	—	—	—	—	8,93	8,97	8,40	8,05	7,98	—	—	—	—	—	—	—	8,90	8,85	7,10	7,60	8,17	7,80	—	—	—	—	—	
19.		576	—	—	—	—	9,05	9,07	8,65	8,25	8,02	—	—	—	—	—	—	—	9,10	8,97	7,35	7,85	8,35	7,90	—	—	—	—	—	
21.		624	—	—	—	—	9,15	—	8,75	8,47	8,25	—	—	—	—	—	—	—	9,10	9,03	7,50	8,10	8,47	8,05	—	—	—	—	—	
24.		696	—	—	—	—	9,15	—	8,87	8,65	8,35	—	—	—	—	—	—	—	—	9,08	7,82	8,23	8,55	8,20	—	—	—	—	—	
27.		768	—	—	—	—	—	—	9,05	8,70	8,45	—	—	—	—	—	—	—	—	9,10	7,95	8,45	8,65	8,30	—	—	—	—	—	

I—XIII geimpft mit «Rohrzuckerhefe»

XIV—XXVIII geimpft mit «Invertzuckerhefe».

Tabelle und Kurve zeigen, daß die Vergärung von Rohrzucker-Invertzuckergemischen in derselben Weise verlaufen ist wie in Versuch 3.

20 g des hier angewandten Invertzuckers liefern 8,56 CO₂. Wenn die Knickung in der Gärungskurve dadurch bedingt ist, daß der zugesetzte Invertzucker schnell, der Rohrzucker wegen der Lähmung der Invertase langsam vergärt, so muß die Änderung der Geschwindigkeit nach oder kurz vor der Beendigung der Vergärung des Invertzuckers erfolgen. Das ist der Fall, wie folgende Tabelle zeigt.

Kurve	g Invertzucker	= g CO ₂	Die Knickung erfolgt bei g CO ₂
2	4	1,73	—
3	8	3,46	3,15—4,00
4	12	5,19	4,85
5	16	6,92	6,30

Wie bei dem Versuch 3c liegt auch hier die Grenze der Wirkung des Invertzuckers auf die Invertase bei einer Konzentration von 4‰.

Versuch 5.

In der gleichen Anordnung wurde eine zweite Serie von 14 Kulturen angesetzt, in denen die Menge des Rohrzuckers nach der des entstehenden Invertzuckers berechnet war. Es sollte hier neben der Wirkung des Invertzuckers auch die von Dextrose und von Lävulose beobachtet werden. Zur Impfung wurde eine nicht vorbehandelte Hefe verwandt.

Der Durchschnitt der Parallelversuche ergibt Kurve c auf S. 144.

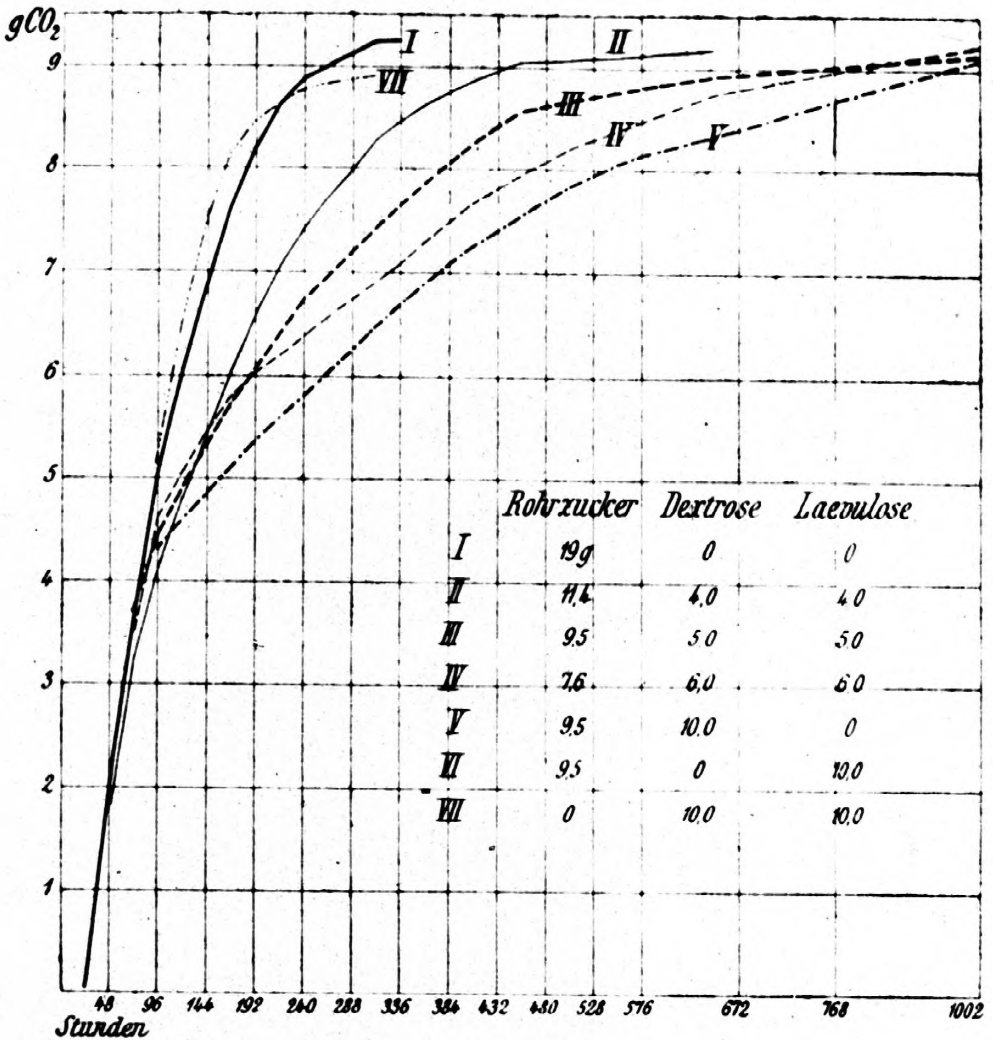
Das Resultat dieses Versuches gleicht dem des vorigen völlig. Die Knickung der Kurven tritt auch bei Rohrzucker-Dextroselösungen und bei Rohrzucker-Lävuloselösungen ein. Der Vergleich des Ortes der Knickung mit der CO₂-Menge, die der gärfähige Zucker liefert, ergibt folgende Gegenüberstellung.

Zu Kurve c.

Kurve	Zucker	g CO ₂	Die Knickung erfolgt bei g CO ₂
II	8 g Invertzucker	3,58	3,23
III	10 „ „	4,46	4,17
IV	12 „ „	5,36	4,63
V	10 „ Dextrose	4,46	4,42
VI	10 „ Lävulose	4,46	4,32

Tabelle.

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	
Rohrzucker g .	19	19	11,4	11,4	9,5	9,5	7,6	7,6	9,5	9,5	9,5	9,5	0	0	
Dextrose g . .	0	0	4,0	4,0	5,0	5,0	6,0	6,0	10,0	10,0	0	0	10,0	10,0	
Lävulose g . .	0	0	4,0	4,0	5,0	5,0	6,0	6,0	0	0	10,0	10,0	10,0	10,0	
Datum	Std.														
18. XI.	48	0,10	0,03	0,04	0,08	0,50	0,05	0,04	0,05	0,08	0,35	0,01	0,02	0,05	0,05
19.	72	2,05	1,83	1,70	1,98	2,77	2,12	1,70	1,97	1,55	2,55	1,83	1,75	1,98	1,75
20.	96	3,93	3,55	3,07	3,38	4,00	3,69	3,44	3,72	3,47	4,04	3,30	3,45	3,75	3,51
21.	120	5,23	4,85	4,07	4,20	4,45	4,49	4,54	4,72	4,38	4,45	4,18	4,45	5,25	5,18
22.	144	6,23	5,85	4,87	4,78	4,78	5,02	5,07	5,02	4,50	4,72	4,68	5,03	6,53	6,56
23.	168	7,08	6,65	5,52	5,33	5,07	5,57	5,42	5,47	4,73	4,97	5,18	5,62	7,42	7,51
24.	192	7,86	7,40	6,17	5,93	5,33	6,12	5,87	5,75	5,00	5,29	5,53	6,15	8,10	8,25
25.	216	8,40	8,00	6,75	6,46	5,62	6,57	6,04	5,95	5,20	5,55	5,81	6,57	8,43	8,51
26.	240	8,81	8,35	7,22	6,83	5,90	7,32	6,25	6,10	5,38	5,82	6,13	6,98	8,55	8,68
27.	264	9,08	8,65	7,65	7,23	6,13	7,57	6,42	6,32	5,60	6,07	6,33	7,32	8,70	8,81
28.	288	9,23	8,80	7,97	7,48	6,25	7,87	6,52	6,42	5,70	6,25	6,50	7,60	8,75	8,88
29.	312	9,28	8,95	8,15	7,76	6,50	8,14	6,79	6,67	5,95	6,57	6,78	7,85	8,80	8,93
30.	336	9,45	9,05	8,52	8,08	6,75	8,35	7,00	6,87	6,15	6,79	6,95	8,02	8,87	8,95
1. XII.	360	9,45	9,05	8,64	8,28	6,97	8,55	7,17	7,00	6,27	6,99	7,10	8,17	—	8,98
2.	384	—	—	8,79	8,48	7,20	8,92	7,40	7,22	6,48	7,27	7,38	8,45	—	—
4.	432	—	—	9,02	8,75	7,60	9,17	7,74	7,60	6,83	7,67	7,65	8,65	—	—
6.	480	—	—	9,12	8,93	7,95	9,20	8,07	7,84	7,10	7,97	7,83	8,80	—	—
8.	528	—	—	9,12	9,00	8,17	—	8,30	8,12	7,37	8,24	8,08	—	—	—
11.	600	—	—	9,05	8,35	—	—	8,60	8,39	7,70	8,59	8,41	—	—	—
14.	672	—	—	9,13	8,68	—	—	8,79	8,67	7,95	8,77	8,58	—	—	—
18.	768	—	—	9,30	8,78	—	—	9,02	8,87	8,33	8,99	8,80	—	—	—
28.	1008	—	—	—	—	9,05	—	9,22	9,17	8,80	9,37	9,03	—	—	—



Kurve c.

Die Kurve VI ist nicht ausgezogen. Sie fällt fast genau mit der Kurve III zusammen.

Ob die stärkere Hemmung der Invertase durch Dextrose, die in diesem Versuch hervortritt, auf einer Gesetzmäßigkeit oder auf einem Zufall beruht, bedarf weiterer Untersuchung.

III.

Es blieb noch übrig, den Verlauf der Invertierung während der Gärung in solchen Kulturen direkt zu ermitteln.

Versuch 6.

1000 ccm Hefewasser + 190 g Rohrzucker und 1000 ccm Hefewasser + 95 g Rohrzucker + 100 g Invertzucker wurden mit 1 ccm einer frischen Hefekultur geimpft. Die CO_2 -Produktion wurde gemessen. Zu gleichen Zeiten wurden Proben von je 50 ccm steril entnommen.

In diesen Proben wurde nach Austreibung des Alkohols, Entweissung durch Bleiessig und Fällung des Bleies mit Natriumsulfat die Drehung und durch Titration nach Bertrand der Gehalt an Invertzucker ermittelt. Aus der Kohlensäureproduktion wurde die Menge des in der Lösung verbliebenen Zuckers und damit die Menge des mit den Analysenproben entnommenen Zuckers berechnet.

a) Verlauf der Gärung.

Datum	Std.	A. Rohrzucker			B. Rohrzucker + Invertzucker		
		g CO ₂	Vergoren = g Zucker	g Zucker mit den Analysen- proben entnommen	g CO ₂	Vergoren = g Zucker	g Zucker mit den Analysen- proben entnommen
11. XII.	6h	0 ¹⁾	0	8,96	0	0	8,96
13.	9h	39 ²⁾	5,45	11,83	8,40	6,95	15,12
14.	10h	64 ³⁾	20,40	44,30	6,80	25,10	54,60
15.	10h	88 ⁴⁾	33,05	71,8	5,40	35,95	77,8
16.	4h	118 ⁵⁾	45,65	99,4	3,9	42,40	92,0
17.	10h	—	52,20	113,5	2,3	44,65	96,9
18.	10h	160 ⁶⁾	58,15	126,5	1,0	47,40	103,0
19.	10h	—	63,25	137,25	0,5	50,48	109,7
20.	10h	208 ⁷⁾	67,60	147,00	—	53,68	117,0
22.	—	256 ⁸⁾	71,05	154,6	—	57,53	125,0
25.	—	328 ⁹⁾	74,75	162,5	—	63,28	137,6
28.	—	400 ¹⁰⁾	75,65	164,5	—	66,73	145,0
1. I.	—	—	75,95	165,0	—	69,48	150,8
8.	—	—	76,00	—	—	69,98	152,0
17.	—	—	Summa	165,0	37,26	70,88	154,1
5. II.	—	—	—	37,26	—	72,08	155,8
				202,26			50,42
							Sa. 50,42
							206,22

1) bis 10) bedeuten Probeentnahmen.

Die Berechnung des Gesamtzuckers ist, wie die Tabelle zeigt, mit einem Fehler¹⁾ behaftet, der aber für die Beurteilung

¹⁾ Die Berechnung des Zuckers aus der CO₂-Produktion ist nicht genau. Außerdem wurde Invertzucker titriert, während die Tabelle nach Bertrand für Dxtrose aufgestellt ist. Diese Fehler kommen in der Bilanz zum Ausdruck.

des ganzen Versuches ohne Belang ist. Diese Bilanz hat nur den Zweck, darzutun, daß nach 88 Stunden die Kultur B durch Gärung und Analysenproben mehr wie 100g Zucker abgegeben hat.

b) Verlauf der Inversion.

A. Rohrzucker					B. Rohrzucker + Invertzucker				
Stun- den	Nr. der Ana- lysen- probe	Dre- hung	% redu- zieren- der Zucker	$k \cdot 10^{-4}$	Stun- den	Nr. der Ana- lysen- probe	Dre- hung	% redu- zieren- der Zucker	$k \cdot 10^{-4}$
0	1	+ 15.60	1,38 ¹⁾	—	—	1	+ 5,84	8,71	—
39	2	+ 12.98	2,83	34,79	—	2	+ 5,45	7,14	—
64	3	+ 9.09	1,81	59,06	—	3	+ 5,87	3,57	—
88	4	+ 6.73	1,52	63,63	—	4	+ 7,47	1,54	—
118	5	+ 4.26	1,45	67,36	30	5	+ 6,61	0,494	30,24
160	6	+ 1.95	0,655	67,41	72	6	+ 5,00	0,648	39,81
208	7	+ 0.59	0,450	62,15	120	7	+ 3,76	0,457	39,08
256	8	+ 0.25	0,185	52,94	168	8	+ 2,83	0,513	37,60
328	9	+ 0.12	0,075	42,07	240	9	+ 1,45	0,221	38,98
400	10	+ 0.10	0,0197	—	312	10	+ 0,59	0,180	37,41
					408	11	+ 0,20	0,150	32,43

Die Konstante ist nach der Formel der monomolekularen Reaktion, in dieser die Zeit in Stunden berechnet. Bei B wurde als Nullpunkt der Zeit der Termin der 4. Probeentnahme (88 Stunden nach der Impfung) angesetzt, da zu dieser Zeit eine der zugesetzten Invertzuckermenge entsprechende Menge Zucker durch die Gärung und die Analysenproben aus der Kultur heraus war.

Bei A erfolgte die Inversion mit einer zuerst geringeren Geschwindigkeit, wohl bedingt durch die Menge der Hefe, deren Wachstum in dieser Zeit noch nicht beendet war. Dann wird die Reaktionsgeschwindigkeit konstant, bleibt aber so klein, daß eine Anhäufung von Invertzucker in der Lösung nicht zustande kommt. Die Vergärung hält mit der Invertierung gleichen Schritt.

¹⁾ Dieser Invertzucker ist durch das Sterilisieren der Lösung entstanden.

Bei B erfolgte die Gärung im Anfang bis zu der Frist von 88 Stunden schneller als bei A. Dann tritt, wie aus Tabelle a ersichtlich, eine plötzliche Abnahme der Gärungsgeschwindigkeit ein (Knickung der Kurve). In diesen ersten 4 Tagen nimmt die Konzentration des Invertzuckers stetig und schnell ab, während die Rechtsdrehung am 4. Tage einen beträchtlichen Anstieg zeigt. Dieses Maximum der Drehung entspricht, wie der Vergleich von Tabelle a und b zeigt, der Knickung der Gärungskurve. Zu dieser Zeit ist der Invertzucker aus der Lösung verschwunden, die Rechtsdrehung des Rohrzuckers tritt jetzt schärfer hervor. Und jetzt erst beginnt die Inversion des Rohrzuckers und verläuft mit einer geringeren Geschwindigkeit als bei A, sodaß auch hier, wie in den Versuchen sub II, die Gärung eine erheblich längere Zeit in Anspruch nimmt.

Es sei ausdrücklich hervorgehoben, daß bei diesen Versuchsanordnungen (II und III) die Invertierung nur dann den geschilderten Verlauf nimmt, wenn mit einer kräftig gärenden Hefe geimpft wird, und die Gärung prompt verläuft.

Wird ein solcher Versuch statt mit Hefewasser mit einer Nährsalzlösung angesetzt, in der die Gärung langsam erfolgt, so geht die Invertierung des Rohrzuckers schon vor der Vergärung des Invertzuckers vor sich.

IV. Schlußbemerkungen.

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß die Invertasewirkung lebender Hefe durch Invertzucker geschwächt wird, und daß diese Fermentlähmung auch nach Fortschaffung des Invertzuckers (durch Auswaschen oder durch Vergärung) anhält.

Der Stillstand von Fermentreaktionen (Endzustand) ist bisher hypothetisch so gedeutet worden, daß das Ferment und die Produkte, die es bildet, eine unwirksame reversible Verbindung eingehen, nach deren Dissoziation das Ferment seine Aktivität wiedergewinnt.

Diese Annahme stimmt mit dem Ergebnis der hier mitgeteilten Versuche nicht überein. Wir müssen schließen, daß die Produkte des fermentativen Prozesses in den hier an-

gewandten Konzentrationen eine für die Dauer dieser Versuche bleibende lähmende Wirkung auf das Ferment haben, die auch nach Entfernung der Produkte bestehen bleibt, also nicht nur durch eine Bindung des Fermentes an die Produkte bedingt sein kann, sondern ihren Grund in einer Beeinflussung des Fermentes selbst haben muß.

Ich glaube, daß es wohl erlaubt ist, das Ergebnis dieser Versuche auf die Frage und Annahme zu beziehen, die ihren Ausgangspunkt gebildet haben. Die Steigerung der Ammoniakausscheidung, die nach Zufuhr großer Mengen Harnstoff eintreten und die Anwesenheit des Harnstoffs im Körper überdauern kann, darf jetzt als ein Analogon des Vorgangs der Invertaselähmung durch Invertzucker aufgefaßt werden.

Dieses Prinzip der Fermentlähmung wird sich unschwer auf eine große Reihe von Prozessen anwenden lassen. Davon soll aber hier nicht weiter die Rede sein. Ich möchte nur erwähnen, daß der Begriff der Fermentermüdung bereits von Brugsch und Schittenhelm ihrer bekannten Theorie der Gicht zugrunde gelegt ist, und daß ich¹⁾ diese Schwächung der Fermente des Nucleinsäureabbaues auf die Anwesenheit der Harnsäure (des Endproduktes) im Blute des Gichtikers zurückgeführt habe. Aus dieser Annahme ergibt sich eine zwanglose Vereinigung der beiden Gichttheorien (der «Nierengicht» und der «Stoffwechselgicht»).

Die starke und anhaltende Lähmung der Invertase durch große Invertzuckerkonzentrationen stellt aber nur den äußersten Fall eines Vorganges dar, der bei kleinen Konzentrationen in feinsten Abstufungen und in reversibler Weise verlaufen kann. Die bereits erwähnten Harnstoffversuche zeigen, daß die Harnstoffbildung nach wenigen Tagen wieder normal ist. Und einen Einblick in das normale Geschehen gewährt besonders der Versuch 6 A: Die Kultur stellt ein in sich geschlossenes System dar, in dem das Hefewachstum zu einer durch Volumen und Zuckerkonzentration gegebenen Zahl von Zellen führt, in dem lebhafte Stoffwechselforgänge vor sich gehen, und aus dem

¹⁾ Verhandl. d. D. Kongresses für innere Medizin. Wiesbaden 1911, S. 488 (Diskussionsbemerkung).

ein Stoffwechselendprodukt (CO_2) ständig ausgeschieden wird. Zum Abbau des Rohrzuckers gehören zwei Fermente. Und im Organismus gibt es wohl keinen Vorgang, der nur eines Fermentes bedürfte. Wir haben oft ein ganzes System von Fermenten, von denen ein jedes das Produkt des vorhergehenden als Substrat übernimmt. In dem kurzen System Rohrzucker-(Invertase)-Invertzucker-(Zymase)-Alkohol + CO_2 herrscht, wie der Versuch 6 zeigt, eine strenge Ordnung. Die Invertase arbeitet nicht schneller wie die Zymase, sodaß es nie zu einer Anhäufung von Invertzucker kommt, zu einer Konzentration, die den weiteren Verlauf der Invertierung hemmen könnte. Die gleiche Ordnung scheint in allen normalen Stoffwechselsystemen zu herrschen. So erfolgt der Prozeß der Zuckerbildung aus dem Glykogen und der Zuckerverbrennung im Organismus mit einer großen Konstanz im Zuckergehalte des Blutes.

Die Ordnung, die in diesen Systemen herrscht, kann nicht anders erklärt werden als dadurch, daß die Fermentprodukte das Ferment in einer spezifischen Weise beeinflussen, sodaß bei höherer Konzentration der Produkte (nach einer Periode der Aktivität des Fermentes) das Ferment gehemmt und inaktiver wird. Diese Inaktivierung ist in der Breite der physiologischen Konzentrationen der Fermentprodukte leicht reversibel. Man kann sich also den Fermentprozeß als einen rhythmischen Vorgang denken, der (abgesehen von der Ausscheidung der letzten Produkte aus dem System) seine Schwingung in sich selbst, durch seine eigenen Produkte ordnet.

Göttingen, Februar 1912.