

(Aus der physiol. Versuchsstation der k. k. böhm. techn. Hochschule in Prag.)

## Alkoholische Gährung im Thierorganismus und die Isolirung gährungserregender Enzyme aus Thiergeweben.

I. Theil.

Von

**Julius Stoklasa.**

Unter Mitwirkung

von

**F. Černý, Joh. Jelínek, Eugen Šimáček und Eugen Vitek.**

(Mit 2 Textfiguren.)

### V o r b e m e r k u n g e n .

Die anaërobe Athmung von Pflanzenorganen und ihre Beziehungen zur alkoholischen Gährung habe ich im verflossenen Jahre in Hofmeister's „Beiträgen“ (Bd. 3 Heft 11. 1903) behandelt.

Ich habe auf Grund der durchgeführten Bilanz des Chemismus in dieser Arbeit dargethan, dass der Verlust der Trockensubstanz nach erfolgter anaërober Athmung gleichkomme der vergohrenen Menge Saccharose in der Zuckerrübenwurzel, und dieselbe Erscheinung haben wir bei Kartoffelknollen und Erbsensamen beobachtet, woselbst der Verlust der Trockensubstanz vollständig dem vergohrenen Stärkequantum entspricht. Die Vergährung der Saccharose und der Stärke trat jedoch erst nach erfolgter Hydrolyse, und zwar der Saccharose durch Invertase und bei Kartoffeln und Erbsen nach erfolgter Hydrolyse der Stärke durch die Diastase, ein.

Es gelang uns auch thatsächlich, beide Enzyme zu isoliren und uns von ihrer Wirksamkeit zu überzeugen. Ein wichtiger Fortschritt dürfte die Isolirung eines gährungserregenden, der Buchner'schen Zymase analogen Enzyms aus verschiedenen

Pflanzenorganen sein, und zwar nicht bloss nach stattgehabter anaërober Athmung, sondern auch bei normal athmenden Pflanzen.

Es wurde bis heute in folgenden Pflanzentheilen gefunden:

1. In der Zuckerrübenwurzel; bei normaler und anaërober Athmung;
2. in den Knollen der Kartoffel; bei normaler und anaërober Athmung;
3. in Erbsensamen<sup>1)</sup>; bei normaler und anaërober Athmung;
4. in Keimlingen von Erbsensamen (*Pisum sativum*); bei normaler und anaërober Athmung;
5. in den Pflänzchen von *Pisum sativum* von 20 Tagen Entwicklung; bei normaler Athmung;
6. in den Keimlingen der Gerste; bei normaler und anaërober Athmung.

Die Isolirung des Enzyms erfolgte in nachstehend beschriebener Weise: Das frische Pflanzenmaterial, welches keinerlei Zersetzung durch Fäulniss aufweisen darf, wurde entweder zerrieben oder zerquetscht und der Saft aus der erhaltenen Masse bei einem Drucke von ca. 300 Atmosphären ausgepresst.

Dem gewonnenen Saft wird Alkohol und Aether zugesetzt, worauf sich ein an Eiweissstoffen reicher Niederschlag absetzt.

Auf 500 ccm des Saftes verwendeten wir 600—800 ccm eines Gemenges von Alkohol und Aether, und zwar 400—500 ccm Alkohol und 200—300 ccm Aether. Die über dem Niederschlag stehende Flüssigkeit wird sofort abgehebert und sodann der Niederschlag in dünnem Strahl in einen mit Aether gefüllten hohen Cylinder einfliessen gelassen. Der Niederschlag setzt sich nun schnell ab. Sodann wird der Aether abermals rasch abgezogen und der Niederschlag schleunigst mit Hülfe der Pumpe abfiltrirt und unverweilt im Vacuumtrockenapparate bei 25—30° C. getrocknet.

Die ganze Operation muss rasch durchgeführt werden, denn speciell durch längere Einwirkung des Alkohols und auch des Aethers sinkt das Gährungsvermögen des Enzyms in ungewöhnlichem Maasse.

---

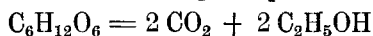
1) Aus Samen lässt sich das Enzym erst isoliren, wenn dieselben nach vorher erfolgter Sterilisation in sterilisirtem Wasser durch 48 Stunden aufgeweicht worden sind.

Die fein zerriebene, das gährungserregende Enzym enthaltende Masse wurde mit einer 10–15 %igen Glukose- oder Fructoselösung vermischt.

Sofort nach der Vermischung des unter einem Drucke von 250–300 Atmosphären aus dem Saft gewonnenen, das gährungserregende Enzym enthaltenden Pulvers mit der Glukose- oder Fructoselösung trat mehr oder minder starke Gährung ein, welche bei 30° C. sich als sehr lebhaft erwies.

Aus der folgenden Tabelle I ist der Gährungseffect von Enzymen verschiedener Provenienz nebst der Menge der das Enzym enthaltenden Masse sowie die Dauer der Gährung ersichtlich.

Der Mechanismus der Gährung entspricht der Gleichung:



$$\text{CO}_2 = 48,9$$

$$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH} = 51,1.$$

Auf 100 Theile  $\text{CO}_2$  entfallen 104,5 Theile Alkohol.

Aus der Tabelle ist zu ersehen, dass wir in der Mehrzahl der Fälle sehr annähernd dieses Verhältniss zwischen  $\text{CO}_2$  und  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  beobachtet haben.

Das der Buchner'schen Hefe-Zymase ähnliche Enzym existirt thatsächlich in der Pflanzenzelle, und zwar sowohl bei normaler als auch anaërober Athmung, und ist die Bildung desselben als eine Hauptfunction des Stoffwechsels anzusehen.

Es ist nicht zu bezweifeln, dass dasselbe in der Zelle eine alkoholische Gährung hervorruft, welche als der erste Act des Athmungsprocesses anzusehen ist.

Diese Erscheinung führte uns auf das Studium der anaëroben Athmung in der Thierzelle und zur Isolirung des die alkoholische Gährung in derselben bewirkenden glykolytischen Enzyms.

### L i t e r a t u r.

Seit der Zeit, wo Béchamps<sup>1)</sup> sich bestrebte, auf Grund zahlreicher Experimente Alkohol im thierischen Gewebe nachzuweisen, ist eine Reihe von Jahren verflossen, ohne dass dessen ursprüngliche Arbeit aus dem Jahre 1872 und auch die spätere aus dem Jahre 1879 eine grössere Beachtung gefunden hätten.

1) Die Belege und das gesammte Verzeichniss der Literatur werden am Ende des zweiten Theiles angeführt.

Tabelle I.

Enzym aus der Pflanzenzelle. Temperatur 25° C. Verwendet wurden stets 10 g des Enzyms.

Provenienz des isolirten Enzyms	Ver- wendete Menge in g	Lösung, in der die Gährung vor sich geht	Verwendetes Anti- septicum	Dauer der Gährung in Stunden	Gefundene Menge CO <sub>2</sub> in g	Gefundene Menge des C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH in g	Menge des gebildeten Alkohols für CO <sub>2</sub> = 100
1. Rübenzucker-Zymase	7,0	15 %ige Glukoselösung	—	84	0,97	0,95	97,7
2. "	6,0	15 %ige "	0,4 % Thymol	48	0,509	—	—
3. "	6,3	15 %ige Fructoselösung	—	48	0,49	0,53	108,1
4. "	8,5	10 %ige Glukoselösung	—	48	1,25	1,37	109,6
5. "	8,1	10 %ige "	—	64	0,45	0,54	120,0
6. "	8,6	10 %ige Fructoselösung	—	64	0,34	0,42	123,5
7. "	7,4	10 %ige Glukoselösung	—	48	0,515	0,534	103,6
8. Kartoffel-Zymase	10,0	10 %ige "	1 % Toluol	42	0,510	—	—
9. "	10,7	5 % Stärke	—	72	0,88	0,79	89,8
10. Erbsen-Zymase	8,3	15 %ige Glukoselösung	—	36	0,396	0,409	103,2
11. "	8,2	15 %ige Fructoselösung	—	48	0,387	0,427	110,3
12. "	7,0	5 % Stärke	1 % Toluol	36	0,300	—	—
13. Zymase aus gekeimter Gerste	8,2	10 %ige Glukoselösung	—	36	0,925	1,002	108,3

Man hielt allgemein dafür, dass es Bchamps bei seinen Versuchen nicht gelungen sei, Mikrobeninvasion zu vermeiden, und schrieb die Entstehung des vorgefundenen Alkohols der Thätigkeit der Mikroben zu.

E. Duclaux ussert sich uber die Arbeiten Bchamps in seinem berühmten Werke: „Traite de Microbiologie“, Tome III, in folgender Weise :

Les tissus végétaux sont-ils seuls à pouvoir présenter ces phénomènes? Il serait étonnant qu'il en fût ainsi. M. A. Bchamps a trouvé que l'urine et le lait contenaient de l'alcool. Il est vrai que l'expérience n'a pas grande valeur, celui de l'urine pouvant provenir de l'alimentation, et celui du lait de la présence presque constante, à l'intérieur de ce liquide d'un petit microbe producteur d'alcool que nous retrouverons plus tard. Mais M. J. Bchamps a trouvé de l'alcool dans un foie de mouton pesant 1,840 grammes et traité immédiatement après la mort, dans des cerveaux de moutons et de bœufs, traités encore chauds. A ces résultats, il ajoute la constatation de l'alcool dans le cerveau et les muscles d'une femme alcoolique morte de pneumonie, qui avait bu de l'alcool douze heures avant sa mort. Mais ce dernier fait est évidemment dénué de toute force probante. Les autres sont plus convaincants. Ils ne sont malheureusement pas assez multipliés; mais ils sont assez d'accord avec la conclusion générale de ce chapitre pour que nous ayons cru devoir les rapporter.

Nicht besser erging es anderen, später publicirten Arbeiten, in denen die Verfasser bemüht waren, selbst im Urin Alkohol nachzuweisen. Es sind dies namentlich die Untersuchungen von Rhmann, Lieben und Dupré.

Auch Rajewski, dessen Leistungen einen weiteren Fortschritt bedeuten, gelang der directe Nachweis des Vorhandenseins von Alkohol im Muskelgewebe und in der Leber nicht; denn die Jodoformreaction allein ist kein einwandfreies Argument für dessen Vorhandensein.

Beim Studium der thierischen Diastase, weiter der zuckerspaltenden Enzyme bei thierischen Oxydasen gelangte man vielfach dazu, die Existenz von Enzymen im Blute und Pankreas zu vermuthen, welche bei der Zersetzung der Glukose unter Entwicklung von CO<sub>2</sub> und Alkohol betheiligt wären.

Es war Claude-Bernard, welcher zuerst nachwies, dass der Zucker im Blute ungemein rasch verschwindet.

Das grösste Verdienst um die Bestätigung dieser Entdeckung erwarben sich Lépine, Barral und Harley. Insbesondere beschäftigt sich Lépine seit dem Jahre 1890 bis zum heutigen Tage,

wie seine letzten Arbeiten beweisen, mit den glykolytischen Erscheinungen im Blute. Er kam schon im Jahre 1895 zu der Vorstellung, dass die Glykolyse mit den Oxydationsprocessen nichts gemein habe, und er vermuthete, dass sie durch Fermente hervorgerufen werde, nicht nur im Blute, sondern auch im Pankreas. Die Resultate Lépine's werden in vielen Stücken von Abelous und Biarnés bestätigt.

Zahlreiche andere Forscher, wie Salkowski, Spitzer, Jaquet, Katsusaburo und Yamagiwa, vermuthen dagegen, dass die Zersetzung des Zuckers durch Oxydasen des Blutes und der Gewebe erfolgt.

Interessant ist die Annahme Spitzer's, dass bei der Glykolyse Sauerstoff absorbiert und Kohlendioxyd gebildet werde. Die Abwesenheit von Sauerstoff hat nach Spitzer Verhinderung der Glykolyse zur Folge, doch zeugt es von richtiger Beurtheilung, wenn er sagt, „dass die Glykolyse eine allgemeine Eigenschaft des Protoplasmas sämtlicher Organe ist“. Derselbe führt in seiner im Jahre 1897 publicirten Arbeit aus, dass die Oxydasen im Wesen Nucleoalbumine sind. Er fand auch, dass die Oxydationsenergie eines Organes der Menge des Nucleoalbumins proportional war.

Martin Jakoby folgert aus seinen Experimenten, dass die Aërooxydase und das glykolytische Ferment mit einander nichts gemein haben, und dass jedes selbstständig chemische Reactionen bewirke. Die Richtigkeit der Ansichten Jakoby's, der von dem fundamentalen Befunde ausgeht, dass die Leber eines an Diabetes mellitus zu Grunde gegangenen Menschen keine glykolytische Kraft mehr besass, dass dagegen ihre oxydative Kraft völlig normal war, wurde durch die Arbeiten Lépine's, Achard's und Weyl's zur Genüge bewiesen.

Mit den Erscheinungen der Glykolyse des Blutes und des Pankreas beschäftigten sich vor Allem Hahn, Arthus, Minkowski, Seegen, Pál, Sympton, Ssobolew, Scheremetjewski, Kraus, Hoppe-Seyler, Pierallini, Pavy, Laguesse, Schäffer, Dimare u. s. w.

Die letztgenannten Autoren: Laguesse, Schäffer und Dimare hatten die Vermuthung ausgesprochen, dass die Langerhans'schen Inseln im Pankreas in einer gewissen Beziehung zu dem Kohlehydrate-Stoffwechsel stehen.

Die Versuche Buchner's über die Hefezymase gaben in neuerer

Zeit der Forschung über die Glykolyse im Thierorganismus eine neue Richtung. Die von Buchner beschriebene Methode benutzte mit einer gewissen Modification Blumenthal zur Erzeugung des Presssaftes, in welchem er ein bedeutendes glykolytisches Vermögen feststellte. Bei der Zersetzung der Glukose fand er jedoch bloss  $\text{CO}_2$  und Wasser, Alkohol vermochte er nicht nachzuweisen.

Heute wissen wir, wie Umber operirt haben musste, dass er im Pankreasssaft die Glykolyse nicht constatiren konnte; die glykolytischen Enzyme im Pankreas sind nämlich gegen Antiseptica so empfindlich, dass darin der Grund des Misslingens zu suchen ist.

Oppenheimer schloss ganz richtig, dass die Möglichkeit der Existenz eines der Hefezymase analogen Enzyms bei den glykolytischen Processen im Thierorganismus nicht ausgeschlossen sei. Allerdings kam er bei seinen Experimenten zu keinen positiven Resultaten. Es ist noch zu betonen, dass auch von Lauder Brunton ein äusserst schwaches, glykolytisches Ferment in den Muskeln beschrieben worden ist.

In neuester Zeit resumirt Herzog in seiner Publication: „Liefert das Pankreas ein dextrosespaltendes, alkohol- und kohlensäurebildendes Enzym?“ seine Beobachtungen in folgenden Worten:

„Wenn wir die Ergebnisse der Versuche, wie sie oben mitgetheilt wurden, zusammenfassen, so müssen wir gestehen, dass eine feste Grundlage für die vorgebrachte Hypothese des Zuckerumsatzes im Thierkörper durch diese Experimente nicht gegeben ist. Trotz alledem können wir auch nicht zugeben, dass diese Experimente geradezu einen Beweis gegen diese Hypothese geliefert hätten; wir sind vielmehr der Ansicht, dass die angewandten Methoden noch zu wenig entwickelt sind, um eine künstliche Nachahmung der subtilen, complicirten enzymatischen Vorgänge, die hier in Frage kommen, zu gestatten.“

Aus dieser kurzen Uebersicht über den augenblicklichen Stand unserer Kenntnisse von der Glykolyse in thierischen Geweben ist ersichtlich, dass viele Autoren richtig die Existenz eines glykolytischen Enzyms im thierischen Gewebe voraussahen und die Möglichkeit nicht für ausgeschlossen hielten, dass diese Glykolyse eine alkoholische Gärung ist. Es sind namentlich die Versuche Blumenthal's und Herzog's, die hier in Betracht kommen. Insbesondere hat Blumenthal in seiner letztpublicirten Arbeit: „Ueber Organsafttherapie bei Diabetes mellitus“ nachgeforscht, ob in den Presssäften aus Leber und Pankreas glykolytische Wirkungen unter Ausschluss von Mikroben nachzuweisen wären. Die Verluste an Glukose con-

statirte er durch quantitative Analyse. Blumenthal hat tatsächlich glykolytische Erscheinungen im Pankreas und in der Leber, sehr schwache derartige Wirkungen in der Milz gefunden.

Blumenthal schreibt darüber in der eben citirten Arbeit:

„Versetzt man 1 ccm des Pankreaspresssaftes mit 10 ccm einer 10%igen Traubenzuckerlösung im Gährungsrohr, so ist nach 12—16 Stunden dasselbe völlig mit  $\text{CO}_2$  erfüllt, bei Milchzucker, Galaktose, Laevulose ist die  $\text{CO}_2$ -Bildung etwas schwächer, nach zwölf Stunden etwa  $\frac{3}{4}$  des Röhrchens; bei Arabinose  $\frac{1}{4}$  des Rohrs. 20 ccm Presssaft, mit Traubenzuckerwasser und Chloroform im Kolben versetzt, zeigten bei Beginn des Versuches 5,86 % Traubenzucker; nach 16 Stunden 3,99 %, nach 24 Stunden 3,63 %, nach 48 Stunden 3,51 %, nach 72 Stunden 3,48 %. Die Zuckerbestimmung geschah durch Wägung des reducirten Kupferniederschlags. Controlproben auf Agar und Zuckerlösung bei Beendigung des Versuches zeigten, dass keine Bakterienentwicklung stattgehabt hatte. Leberpresssaft, 1 ccm mit 10%iger Traubenzuckerlösung, zeigte nach 16 Stunden fast den halben Schenkel des Gährungsrohrs mit  $\text{CO}_2$  erfüllt. Milchzucker, Galaktose und Laevulose zeigten etwas schwächere  $\text{CO}_2$ -Entwicklung. Arabinose und Rhamnose zeigten nur geringe, aber deutlich wahrnehmbare  $\text{CO}_2$ -Bildung.

Milzpresssaft zeigte bei Traubenzucker in derselben Concentration knapp den vierten Theil des Röhrchens mit  $\text{CO}_2$  erfüllt, ebenso bei Milchzucker und Galaktose; bei Rhamnose nur ganz geringe  $\text{CO}_2$ -Bildung. Die Auspressungsversuche bei Milz gelangen nur unvollkommen, aus 250 g waren nur 25—35 ccm Flüssigkeit zu gewinnen.“

„Es kann hier nicht die Aufgabe sein, sämtliche Versuchsanordnungen ausführlich zu erwähnen; zumal es sich bei diesen Versuchen mehr darum handelte, therapeutisch wirksame Präparate zu finden, als genau die Intensität der glykolytischen Kraft festzustellen. Zu dem ersten Zweck genügten aber vorläufig die annähernd quantitativen Versuche.

Man wird nun fragen, welche Beweise ich dafür habe, dass die Presssäfte als solche in den angeführten Versuchen bisher wohl nicht so intensiv gesehene Glykose hervorriefen und nicht etwa zufällige hineingelange Hefen oder andere Pilze.

Die Zuckerlösungen waren steril; ebenso die Gährungskölbchen und sonstigen Gefäße, in denen die Glykolyse vorgenommen wurde. Sie waren stets durch Watte abgeschlossen. Die Presssäfte wurden auf Eis gehalten, theilweise mit Zusatz von Chloroform, welches aber nach 10—14 Tagen die Wirkung stark beeinträchtigte. Ich konnte also mit sterilen Zuckerlösungen und frischen, unter Chloroformzusatz aufgefundenen Presssäften eine fast ebenso intensive Wirkung in



sterilisirten Gefässen erzielten als mit Presssäften, denen kein Chloroform zugefügt war. Hierbei muss bemerkt werden, dass, wenn die Gährungsröhrchen Chloroform im Ueberschuss enthielten, eine  $\text{CO}_2$ -Entwicklung nur sehr schwach oder überhaupt nicht vorhanden war. Wiederholt wurden solche Proben, die sehr reichlich  $\text{CO}_2$ -Entwicklung zeigten, auf Zucker und Agar abgeimpft. Wuchsen Bakterien oder Schimmelpilze, so waren diese niemals im Stande, in Zuckerlösungen im Gährungskölbchen  $\text{CO}_2$ -Entwicklung zu veranlassen. Zusatz von Carbolsäure zum Presssaft hob dessen Wirkung auf; ebenso Sublimat. Ebenso hemmte Absperren des Luftzutritts durch Quecksilber ganz erheblich die  $\text{CO}_2$ -Bildung.

Im Gegensatz zu Lépine und im Einklang mit Spitzer fand ich das glykolytische Ferment durch Alkohol fällbar<sup>1)</sup>; der mit Aether behandelte Niederschlag gab ein trockenes Pulver, von dem einige Centigramm in sterilen Zuckerlösungen suspendirt die gleichen Wirkungen zeigte, wie der Presssaft. Lösungen des Alkoholniederschlages in physiologischer NaCl-Lösung, in verdünnten Alkalien oder Säuren, in denen stets nur Spuren sich lösten, zeigten keine  $\text{CO}_2$ -Entwicklung; nur die Suspensionen waren wirksam. Kochsalz in geringer Menge beeinträchtigte die  $\text{CO}_2$ -Entwicklung der Suspensionen nicht; geringe Mengen von Soda hemmten sie; die geringste Spur Säure hob sie auf (2 Tropfen 10% ige Essigsäure auf 15 ccm 10% ige Traubenzuckerlösung).“ So äussert sich Blumenthal wörtlich. Daraus ersehen wir, dass er sich über die Processe, welche bei der Glykolyse verlaufen, nicht ganz klar gewesen zu sein scheint; keine Gährung beobachtet und auch die Glykolyse nach ihren Fundamentalbegriffen nicht definirt hat. Dass eine alkoholische Gährung bei der Glykolyse stattfindet, davon hatte, nach dem hier Angeführten, Blumenthal offenbar keine Ahnung. Die Untersuchungen Blumenthal's, welche von Umber vollständig desavouirt und als Bakterienwirkung charakterisirt wurden, sind von der wissenschaftlichen Welt gänzlich ignorirt worden, bis meine eigenen Untersuchungen zur Publication gelangten, welche dann Blumenthal in seinem Laboratorium von Feinschmidt wiederholen liess.

Wir haben schon im Monate Januar und Februar vorigen

---

1) Die Dauer der Alkoholeinwirkung darf aber einige Stunden (!) nicht überschreiten.

Jahres eine vorläufige Mittheilung über die anaërobe Athmung von Thierorganen und über die Isolirung eines gährungserregenden Enzyms aus dem Thierorganismus in den „Berliner Berichten“ der deutschen chemischen Gesellschaft (Jahrgang XXXV, Heft 3) und im „Centralblatt für Physiologie“ vom 14. Februar 1903, Heft 3, publicirt und nachgewiesen, dass die anaërobe Athmung der Thierorgane eine alkoholische Gährung ist.

Es ist uns auch zuerst gelungen, die Enzyme zu isoliren, welche die anaërobe Athmung der höher organisirten Thiere bewirkten.

Wenn heute noch immer ein Prioritätsstreit über die Sicherstellung der glykolytischen Wirkung der aus Thierorganen hergestellten Presssäfte möglich ist, so kann dieser Streit bei Eingeweihten nur noch Verwunderung erregen. Haben wir doch selbst in unserer Arbeit über den anaëroben Stoffwechsel der höheren Pflanzen und seine Beziehung zur alkoholischen Gährung, welche Anfang Januar 1903 in Franz Hofmeister's „Beiträgen zur chemischen Physiologie und Pathologie“ Bd. III Heft 11 erschienen ist, und welche Monate vorher bereits der Redaction der genannten Fachzeitschrift fertig vorlag, nachgewiesen, dass wir mit den isolirten Enzymen gearbeitet und selbstverständlich auch die glykolytische Wirkung der Presssäfte dabei berücksichtigt haben. Aber noch mehr! Schon in der oben citirten Arbeit kündigen wir die neuesten Resultate unserer Untersuchungen in Betreff des gährungserregenden Enzyms auch aus der Thierzelle, also des isolirten Enzyms, an. Eine Isolirung der Enzyme und Constatirung ihrer concentrirten Wirkung auf Glukose und Saccharose und Nachweis der durch sie hervorgerufenen alkoholischen Gährung war aber bisher noch keinem Forscher gelungen, während die glykolytische Wirkung der Presssäfte wohl bisher vermuthet, aber der Nachweis der Alkoholbildung durch dieselben, wie wir in unseren Publicationen dargethan, ebenfalls vor unseren Untersuchungen nicht geglückt war.

Nach Publication unserer ersten Mittheilungen, und zwar sowohl in den „Berliner Berichten“ der Deutschen chemischen Gesellschaft als auch im „Centralblatt für Physiologie“ erschien eine Arbeit von A. Bach und F. Batelli („Degradation des hydrates de carbone dans l'organisme animal“), in welcher sich diese Forscher unserer,

auf zahlreichen Versuchen basirten Deduction, dass die anaërobe Athmung eine alkoholische Gährung sei, anschlossen.

Von besonderem Interesse für die in Rede stehende Frage ist ferner die Arbeit Angiola Borino's aus dem physiologischen Institute zu Turin, welche in der Arbeit: „Ueber die biochemische Thätigkeit der Nucleoproteiden in Bezug auf den respiratorischen Chemismus“ sich über unsere Untersuchungen in folgender Weise äussert:

Wir hatten die glykolytische Thätigkeit einiger Nucleoproteide und Nucleohistone nachgewiesen, besonders aber die der Nucleohistone der Leber, für welches Organ auch Stoklasa eine bedeutende Gährungsthätigkeit hervorhebt. Da ich im Laufe der vorliegenden Untersuchungen nachgewiesen hatte, dass in der durch die Nucleoproteide hervorgerufenen Glykolyse Alkohol und Kohlensäure gebildet werden, so lag es nahe, zu vermuthen, dass die von Stoklasa beobachtete Gährung, wenigstens zum Theile, den Nucleohistonen, resp. den Nucleoproteiden zuzuschreiben sei. Desshalb untersuchte ich, ob mit Alkohol und Aether auch die Nucleoproteide in wieder löslicher Form niedergeschlagen werden.

Aus dem wässrigen Auszuge der Nieren konnte ich nach der Ausscheidung der Nucleohistone durch Alkohol und Aether einen reichlichen, weissen, flockigen Niederschlag erhalten. Dieser löste sich leicht in Wasser, welchem wenige Tropfen einer alkalischen Lösung hinzugefügt wurden; wird die Lösung durch Essigsäure schwach angesäuert, so bildet sich der Niederschlag von Neuem; letzterer zeigt die Reactionen der Eiweisskörper; in 5 %iger Schwefelsäure durch langes Kochen gelöst, gibt er mit ammoniakalischer Silbernitratlösung den charakteristischen Niederschlag der Purinkörper. Es handelt sich also um ein Nucleoproteid, wesshalb man daraus schliessen muss, dass sich im Enzym von Stoklasa auch das Nucleoproteid befindet. Da dieses selbst glykolytische und fermentative Wirkung besitzt, so ist anzunehmen, dass im Organismus, wie auch im Enzym von Stoklasa die Gährungsthätigkeit nicht nur an Producte des zellularen Stoffwechsels (Enzyme im eigentlichen Sinne), sondern auch an einen oder an mehrere Körper, die am chemischen Bau des Protoplasmas und der Zelle theilnehmen (Plasmozyme von Herlitzka), gebunden ist.

Aus diesen Aeusserungen Borino's geht hervor, dass die Mitwirkung von Mikroben bei ihren Untersuchungen ganz ausgeschlossen

erscheint; führt sie doch in ihrer Abhandlung ausdrücklich an, dass sie bei voller Asepsis, und zwar unter Anwendung von 1% Salicylsäure und in einigen Fällen auch bei Zusatz von 1% Toluol, die durch die enzymatischen, mittelst Alkohol und Aether bewirkten Niederschläge hervorgerufene alkoholische Gährung thatsächlich nachgewiesen hat.

Otto Cohnheim hat es in der Arbeit: „Die Kohlehydratverbrennung und ihre Beeinflussung durch Pankreas“ versucht, unsere eigene Publication dadurch in ihrer Beweiskraft zu schwächen, dass er die von uns constatirte Enzymwirkung in Frage stellt und die von uns gefundenen Resultate der Thätigkeit der Bakterien zuschreibt. Er stützt seine Zweifel darauf, dass er behauptet, unsere Antisepticadosen seien unzulänglich gewesen, ferner, dass wir in einzelnen Fällen überhaupt keine Antiseptica verwendet haben, und schliesslich bezweifelt er überhaupt, dass die von uns namhaft gemachten thierischen Organe, und zwar jedes für sich, allein glykolytisch zu wirken im Stande sei.

Ich habe an einer anderen Stelle diese Behauptungen Cohnheim's nach allen drei Richtungen hin widerlegt und betone hier nur, dass Cohnheim thatsächlich die Wirkung von Fermenten im Pankreas und den Muskeln zugeben muss, weil er sie ja selbst gefunden; während er jedoch für seine Resultate, die im Wesen dieselben sind wie die meinigen, eine enzymatische Wirkung supponirt, will er sie bei den meinigen nicht gelten lassen und ihre Ursache als Bakterienwirkung hinstellen.

Eine solche Logik ist nicht gut einleuchtend, da doch die gleichen Wirkungen ähnliche Ursachen voraussetzen.

Auch die Arbeit von Rahel Hirsch: „Ueber die glykolytische Wirkung der Leber“ leidet unter dem gleichen Mangel wie jene Cohnheims. Sie sagt: „Das Ergebniss meiner Versuche lässt sich kurz dahin zusammenfassen, dass das Lebergewebe die Fähigkeit, Traubenzucker weitgehend chemisch zu verändern, hat, und dass diese Fähigkeit durch Pankreasgewebe mächtig gefördert wird.“

Betreffs der beiden Arbeiten, und zwar sowohl jener Cohnheim's als auch derjenigen von Rahel Hirsch, bemerke ich Folgendes: „Sie haben meine Arbeiten überhaupt nicht gelesen, sonst müssten sie denselben entnehmen, dass ich bei voller Asepsis gearbeitet habe, dass ich bei der Athmung der Thierorgane die aëroben und anaëroben

Bakterien berücksichtigte und die Gährung bei vollkommenen ausreichenden Quantitäten antiseptischer Dosen vor sich ging, was aus dem Wortlaute meines unter die Mitglieder desselben vertheilten Vortrages am Congresse für angewandte Chemie in Berlin 1903 klar hervorgeht. (Siehe Oesterr. Chemikerzeitung Nr. 13 vom 7. Juni 1903; „Zeit“, naturwissenschaftliche Beilage Nr. 252 vom 12. Juni 1903, und Wochenschrift für Brauerei, Heft Nr. 23 vom 7. Juni 1903.)

Von höchstem Interesse ist in dem ob meinen Mittheilungen entstandenen Streite die Arbeit von Feinschmidt, welche derselbe an der „Ersten medicinischen Klinik“ in Berlin ausgeführt und unter dem Titel: „Ueber das zuckerstörende Ferment in den Organen“ publicirt hat. In dieser Arbeit bestätigt er meine Untersuchungen ihrem vollem Umfange nach. Ihm ist es, wie uns, auch thatsächlich gelungen, durch das isolirte Enzym augenblickliche Gährung zu erzielen, welche von uns zuerst behauptete Erscheinung am meisten bestritten worden ist.

Es ist, wie schon erwähnt, Feinschmidt ebenfalls gelungen, die Enzyme aus Thierorganen zu isoliren, welche eine sofortige Gährung in einer Glukoselösung hervorriefen, und wo diese Gährung nicht sofort auftrat, liess sich eine deutlich wahrnehmbare Gährung höchstens schon nach sechs Stunden bei voller Asepsis, also bei Ausschluss jeglicher Bakterienwirkung, feststellen. Ausser durch diese Untersuchungen sind meine schon anfangs dieses Jahres publicirten Arbeiten durch Bach sowie Borino vollständig bestätigt.

Die Resultate der Untersuchungen Cohnheim's und Rahel Hirsch's krankten an dem Cardinalfehler, dass sie eine „Cooperation“ der verschiedenen Organe, dazu noch eine postmortale, mit Pankreas voraussetzen. Dabei entbehrt es einer gewissen, wenn man so sagen darf, wissenschaftlichen Absurdität nicht, dass Cohnheim diese „Cooperation“ zwischen Pankreas und Muskeln und Rahel Hirsch zwischen Pankreas und der Leber gefunden zu haben vermeinen. Sie haben beide Recht, denn jedes Organ weist, wie wir dargethan haben, ein glykolytisches Vermögen auf, — weil dasselbe schon jede Zelle besitzt —; sie haben aber auch beide Unrecht, weil die Theorie von einer postmortalen Cooperation eine völlig irrite ist!



## Methodisches.

### Die Anordnung der Apparate.

(Vgl. Fig. 1.)

Die benutzte Anordnung der Apparate war mit den nöthigen Abweichungen derselben, wie sie in der Abhandlung: „Der anaërobe Stoffwechsel der höheren Pflanzen und seine Beziehungen zur alkoholischen Gährung“ in Hofmeister's „Beiträgen“ Heft 11 beschrieben worden ist.

In den Cylindern *CC* befindet sich eine 5%ige Glukoselösung. Die Cylinder mit der Lösung wurden sterilisirt und im Incubationsstadium belassen. Die einzelnen Thierorgane wurden in einer 0,5%igen Sublimatlösung durch 30 Minuten sterilisirt, hierauf mit sterilisirtem Wasser abgespült und sofort unter Verwendung einer Flamme bei ihrer Eintragung in die Cylinder in die Glukoselösung getaucht. Durch diese Glukoselösung wurde jeden Tag durch zwei Stunden ein Strom von reinem Wasserstoffgas hindurchgetrieben. Der dem Kipp'schen Apparate entströmende Wasserstoff passirte zunächst die mit destillirtem Wasser beschickte Waschflasche  $H_2O$ , dann die U-Röhre  $CuO$ , welche Kupferoxyd enthielt, sodann eine mit concentrirter Natriumhydroxydlösung gefüllte Drechsel'sche Waschflasche  $NaOH$  und weiter eine ebensolche dritte und vierte *Ps*, *Ps*, welche eine alkalische Lösung von Pyrogallussäure (5 g Pyrogallussäure in 15 ccm Wasser und 120 g KOH in 80 ccm Wasser) enthielten, und schliesslich eine fünfte Flasche, welche mit 0,5%iger Sublimatlösung  $HgCl_2$  beschickt war.

Den 40—50 cm hohen Cylinder *C* von 7—8 cm Durchmesser schliesst ein gut dichtender Kautschukpfropfen, der 4 cm tief in den Cylinder hineinragt.

Durch den zwei Mal gebohrten Pfropfen führen zwei Glasröhren, von denen die zuleitende (*z*) bis nahe an die Oberfläche der Glukoselösung in den Cylindern reicht, während die ableitende (*a*) des Liebig'schen Kühlers *K* den unteren Rand des Pfropfens um 5 cm überragt. Sie stellen (wie aus Fig. 1 ersichtlich) die Verbindung mit zwei kleineren, 11 cm hohen Cylindern *CHgI*, *CHgII* von 5 cm Durchmesser her, die eine 4 cm hohe Quecksilberschicht enthalten. In den kleinen Cylinder, in den die Ableitungsröhre *a* führt, mündet eine knieartig gebogene, mit einem Ablasshahn versehene Röhre *r*, die in das Quecksilber eintaucht. Die in Quecksilber tauchenden Röhrentheile sind mit sterilisirter Baumwolle gefüllt. Dasselbe gilt von der in die kleinen Cylinder hineinragenden Mündung des Zuleitungs- und Ableitungsrohres *a* und *z*. Das Ableitungsrohr reicht bis in das Quecksilber des zweiten, kleineren Cylinders und ist ebenfalls mit sterilisirter Baumwolle gefüllt.

Ausser dem Rohre *a* münden, wie schon erwähnt, noch zwei andere, knieartig gebogene, mit Hähnen versehene Röhren *r* und *r*<sub>1</sub> in diesen Cylinder *CHgII*; die eine (*r*<sub>1</sub>) verbindet ihn mit den Absorptionsapparaten, während die andere (*r*) zum Heraustreiben des eventuell noch zurückgebliebenen Kohlendioxydes dient.

Die Gase passiren nach dem Austritt aus dem Cylinder  $CHgII$  zuerst einen Winkler'schen Absorptionsapparat ( $H_2SO_4$ ), der mit concentrirter Schwefelsäure gefüllt ist, dann ein 25 cm hohes, 2,5 cm weites U-Rohr ( $CuSO_4$ ) mit Kupfervitriolbimsstein, ferner ein zweites U-förmiges Rohr ( $CaCl_2$ ), welches Chlorcalcium enthält, das häufig erneuert wird. Das völlig getrocknete Kohlendioxyd passirt zuerst eine U-Röhre ( $Na_2CaO_2$ ), welche mit ausgeglühtem Natronkalk gefüllt ist, sodann den mit Kaliumhydroxyd (Lösung 2:3) gefüllten Geissler'schen Apparat. Um die aus diesem entweichende, ganz unbedeutende Menge Wasser und  $CO_2$  aufzufangen, sind weiter mit festem Kaliumhydroxyd und Calciumchlorid gefüllte U-Röhren ( $CaCl_2 + KOH$ ) vorgelegt. Weiter rückwärts befindet sich noch ein U-förmiges Schutzrohr, — dazu bestimmt, in der Luft enthaltenes Kohlendioxyd (und Feuchtigkeit) abzuhalten. Es ist mit Calciumchlorid und Kaliumhydroxyd gefüllt und mit dem Aspirator verbunden. Die beiden Apparate  $Na_2CaO_2$  sowie der Geissler'sche Apparat  $KOH$  und die Röhre  $CaCl_2 + KOH$  wurden vor und nach dem Durchleiten der Gase gewogen.

Die Cylinder ( $C$  und  $C$ ) sammt den Pfropfen sowie auch ein Theil der Röhren tauchten in einen kupfernen Thermostaten, der (wie aus Fig. 1 ersichtlich) mit zwei Thermometern und einem genauen Aetherthermoregulator sowie auf beiden Seiten mit Glasscheiben versehen ist, um die Vorgänge in den Cylindern verfolgen zu können. Die Cylinder sammt Stopfen und zugehörigen Röhren sowie der Kühler wurden sterilisirt.

Die Pfropfen der Cylinder wurden durch Uebergiessen mit geschmolzenem Paraffin völlig undurchlässig gemacht. Die oberen Oeffnungen des kupfernen Thermostaten wurden vollständig mit Watte verstopft, die mit Carbolsäure imprägnirt war.

## Analytische Methoden.

### Bestimmung des Alkohols.

Der Alkohol wurde in den Thierorganen, die für die Analyse in Breiform zur Verwendung gelangten, vor und nach dem Versuche bestimmt. Der abgewogene Brei, 30—40 g, wurde mit etwa 200 ccm Wasser vermengt, mit  $\frac{1}{10}$  Normalschwefelsäure sehr schwach angesäuert und der Destillation unterworfen. Das etwa 150 ccm betragende Destillat wurde sorgfältig mit Baryumhydroxyd neutralisirt, einer neuerlichen Destillation unterworfen und das Destillat in einer Menge von genau 50 ccm in einem gut calibrierten Pyknometer von Reischauer-Aubry gesammelt. Die aus dem specifischen Gewichte ermittelte Alkoholmenge wurde auf das Gesamtgewicht der Thierorgane vor bzw. nach dem Versuche umgerechnet.

Zur Bestimmung des Alkohols in den einzelnen Destillaten wurde auch die Jodoformreaction benutzt und weiter die Ausscheidung von Jodoformkrystallen nach Müntz vorgenommen. Bei diesem Verfahren wird dem Destillat krystallisirte Soda und etwas pulverförmiges Jod beigelegt; bei starkem Umrühren in der Abdampfschale, bei einer Temperatur von  $60^\circ C.$ , setzen sich hexagonale Krystalle von Jodoform an. Nach Duclaux kann man mit dieser Methode 20 mg Alkohol in 10 l Wasser bestimmen; freilich haben wir uns für die einzelnen Bestimmungen nicht mit dieser Methode nach dem Versuche begnügt, sondern den gebildeten Alkohol an einem grösseren Quantum ermittelt.



Die Thierorgane enthielten vor dem Versuche keinen Alkohol. Dass thatsächlich Aethylalkohol nach deren Verweilen unter einer Wasserstoffatmosphäre vorhanden war, stellten wir an einer grösseren Menge — 5—10 kg — verschiedener Thierorgane fest, welche, vollständig sterilisirt, etwa 10 Tage unter einer von einer Wasserstoffatmosphäre abgesperrten, sterilisirten Glukoselösung gehalten wurden.

Nach starker Gährung in dem sterilen Medium — denn es wurden keinerlei anaërobe Mikroorganismen in demselben constatirt — wurden aus der Glukoselösung, und zwar nach mehrfacher Destillation unter strenger Identificirung, 25—30 ccm Aethylalkohol abdestillirt.

Der Siedepunkt wurde mit 78—79° C. und das specifische Gewicht mit 0,798—0,8 g bei 15° C. gefunden.

Weiter wurde auch der Alkohol nach der Methode von Verley und Bölsing bestimmt („Berliner Berichte“ Bd. 34 III S. 3354). Diese Methode besteht darin, dass man 120 g Acetanhydrid mit 880 g Pyridin mengt. 25 ccm dieses Gemenges werden mit 25 ccm Wasser gemischt und mittelst Titration die durch die Wirkung des Wassers entstandene Essigsäure aus dem Acetanhydrid bestimmt.

Indicator: Phenolphthaleïn. Der Alkohol wird sodann in folgender Weise bestimmt: 25 ccm des oben angeführten Gemenges werden zu 5 ccm der Flüssigkeit hinzugegeben, in welcher man den Alkohol zu bestimmen hat, und durch eine Viertelstunde im kochenden Wasserbade erwärmt. Hierauf wird zu dem Gemenge ein Quantum von 25 ccm Wasser hinzugefügt und mittelst Titration abermals die Essigsäure bestimmt, welche frei geworden ist. Der Unterschied zwischen der Titration des blossen Gemenges und der Titration des Gemenges mit Alkohol gibt uns die Essigsäure an, welche an den Alkohol als Acetanäthyl gebunden erscheint. Selbstverständlich wurde der Alkohol in der Flüssigkeit bestimmt, welche nach mehrfacher, fractionirter Destillation in sehr concentrirtem Zustande vorhanden war; vorher, ehe man zu dieser Bestimmung schritt, wurde der Alkohol piknometrisch bestimmt.

#### Bestimmung des Kohlendioxyds.

In dem Brei der Thierorgane wurden weiter das Kohlendioxyd, und zwar vor und nach dem Versuche, bestimmt.

Im Kolbe'schen Apparate wurde das Kohlendioxyd durch Phosphorsäure frei gemacht, in Kalilauge absorhirt, aus dieser neuerdings durch Phosphorsäure ausgetrieben und sodann gewogen. Die

Bestimmung des Kohlendioxyds wurde nach der Methode Kolbe-Fresenius-Classen ausgeführt, wobei zu bemerken ist, dass sich vor dem Geissler'schen Absorptionsapparate drei U-förmige Röhren befanden, von welchen zwei mit Kupfervitriolbimsstein gefüllt waren, indes die dritte  $\text{CaCl}_2$  enthielt. Vor dem Versuche wurden in den einzelnen Thierorganen höchstens 0,05 %  $\text{CO}_2$  festgestellt; nach den Versuchen wurden 0,1—0,13 %  $\text{CO}_2$  (umgerechnet auf das ursprüngliche Gewicht der einzelnen Thierorgane) gefunden.

In der Glukoselösung, in welcher die bezüglichlichen Thierorgane gehalten wurden, ermittelten wir das Kohlendioxyd nach bekannten Methoden. Bemerkt muss werden, dass das Kohlendioxyd durch Phosphorsäure ausgetrieben und in den U-Röhren sowie im Geissler'schen Apparat gewogen wurde. Der Alkohol in der Lösung wurde nach der bereits erwähnten Methode bestimmt.

#### Nachweis, dass die alkoholische Gährung ohne Mitwirkung von Mikroben vor sich gegangen ist.

Nach Beendigung des Versuches haben wir uns stets durch Impfung in Bouillon und durch Gelatineplattenguss überzeugt, dass aërobe Bakterien nicht vorhanden waren. Wir haben auch neben dem Studium über das Vorhandensein der aëroben Bakterien auch die anaëroben Bakterien hinsichtlich ihrer Gegenwart verfolgt. Dabei haben wir die Methode Fränkel-Hueppe benützt und uns somit überzeugt, dass dieser Process unter völligem Ausschluss von Mikroben vor sich gegangen war.

Wir haben dabei nur solche Versuche in Betracht gezogen, welche eine Infection nicht aufwiesen, während diejenigen Versuche, bei welchen aërobe oder anaërobe Bakterien constatirt wurden, nicht berücksichtigt wurden.

Wir erwähnen aber ausdrücklich, dass alle Arten von Bakterien, deren Vorhandensein wir nach beendeter anaërober Athmung der Thierorgane nachweisen konnten, sich als unfähig erwiesen, in einem mit Glukoselösung gemischten sterilisirten Extract aus Fleisch alkoholische Gährung hervorzurufen.

Trotzdem die Versuche 5—7 Tage dauerten, behielten die Thierorgane ein vollkommen frisches Aussehen und zeigten nur einen leichten Geruch nach Alkohol, der übrigens auch in der Flüssigkeit stark zu verspüren war.

Sofern es sich nicht um die Sicherstellung einer genauen chemischen Bilanz handelte, wurden die betreffenden Organe sofort zu einem feinen Brei zerrieben und dieser im Gewichte von 2—3 kg mit dem gleichen Quantum ausgeglühten, scharfkantigen Sandes gemischt und diese Mischung in Portionen von 200—300 g in einer Zerreibungs-*vorrichtung* gut zerrieben, so dass die Zellen gründlich zerrissen wurden. Wir befolgten hierbei überhaupt die von Eduard Buchner bei der Darstellung der Hefezymase angewandte Methode, welche er namentlich in der neuesten Publication, „Zymasegährung“<sup>1)</sup>, Seite 60, genau beschrieben hat. Der Saft aus der teigförmigen Masse wurde unter einem Drucke von 300 Atmosphären ausgepresst. Die ganze Manipulation muss rasch und bei ziemlich niedriger Temperatur ausgeführt werden. Hier ist jedoch zu bemerken, dass die Temperatur nicht unter  $+1^{\circ}\text{C}$ . herabsinken darf, sonst zeigen die gewonnenen Enzyme eine sehr geringe Gährfähigkeit; insbesondere ist dies dann der Fall, wenn die Temperatur bei der Herstellung der Presssäfte unter  $-5$  bis  $-10^{\circ}\text{C}$ . herabgeht.

Zum Presssaft, welcher von Gewebetheilen und Zellen vollständig frei war, wurde absoluter Alkohol und Aether so lange hinzugefügt, als die Bildung eines Niederschlages wahrgenommen werden konnte.

Gewöhnlich wurde dasselbe Quantum Alkohol verwendet, als Saft zu dem betreffenden Experiment benutzt wird, worauf sofort Aether hinzugefügt wird. Z. B. auf 350 ccm Saft setzte man 350 bis 500 ccm Alkohol und dann sogleich unmittelbar 350—500 ccm Aether hinzu. Diese Fällung geschieht in hohen, engen Glaszylindern. Nach der Ausscheidung des Niederschlages und vorherigem Abgiessen des grössten Theiles der über demselben stehenden Flüssigkeit wird so viel Aether, als vorher Alkohol und Aether hinzugefügt worden war, aufgegossen. Der Aether und Alkohol werden von dem Sedimente rasch abgehebert und der Niederschlag sofort mittelst Saugpumpe filtrirt. Die ganze Operation muss in wenigen Minuten vollendet sein, da insbesondere durch eine, über einige Minuten dauernde Wirkung des Alkohols und Aethers das Enzym an Gährkraft ungemein einbüsst. Je schneller wir arbeiteten, eine desto grössere Gährungsenergie zeigte uns das Enzym. Nach der Filtration wurde der Niederschlag im Vacuumtrockenapparat

---

1) l. c. S. 60.

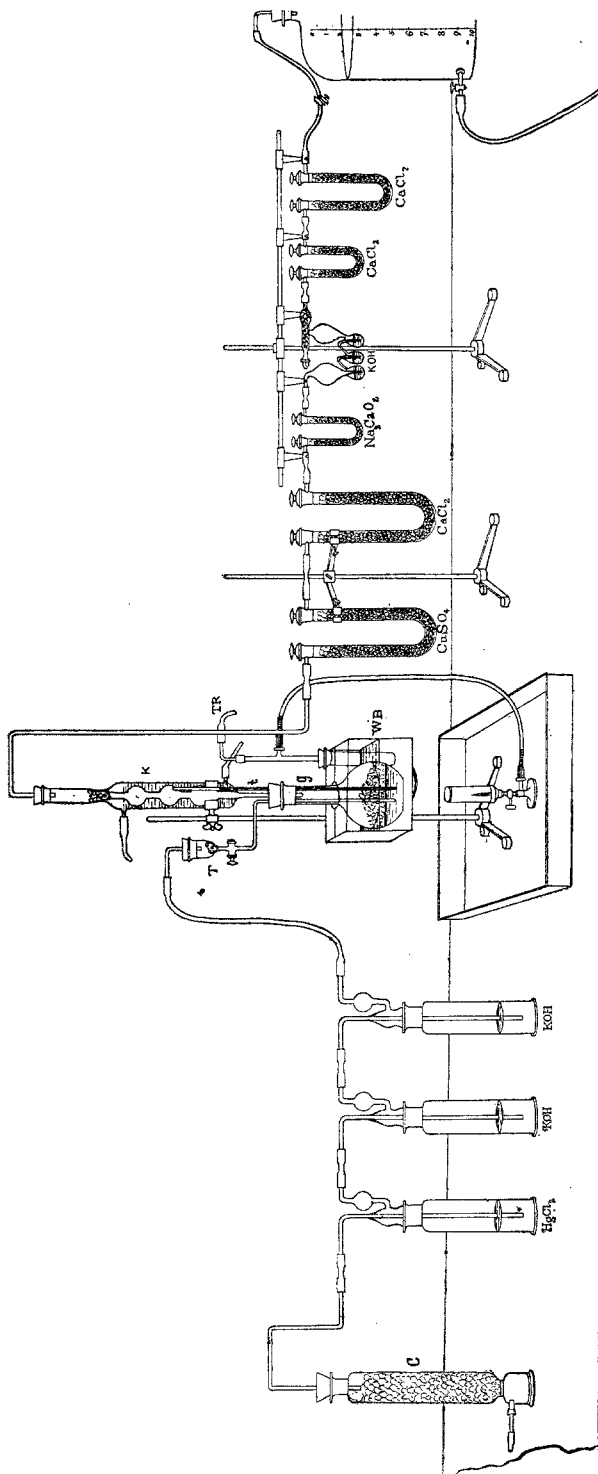


Fig. 2.

bei einer Temperatur von 25—30° C. getrocknet. Hierauf wurde die trockene, hornartige Substanz zu einem feinen Pulver zerrieben und sofort zum Studium der Gährung verwendet.

Die das gährungserregende Enzym enthaltenden Niederschläge sind von zweierlei Art, je nachdem sie aus dem unter einem Drucke bis 200 oder von 200 bis 300 Atmosphären gewonnenen Presssaft ausgeschieden wurden. Der Presssaft der ersten Art liefert wenig active Enzyme, und zwar solche, die erst nach 12 Stunden eine alkoholische Gährung hervorrufen; aus dem letzteren und namentlich aus dem unter einem Drucke von 250 bis 300 Atmosphären erzeugten Presssaft lassen sich Enzyme gewinnen, welche eine rasche und energische alkoholische Gährung hervorrufen.

Der pulverförmige Niederschlag wird behufs Studiums der Ghrwirkung in eine 10—15 %ige sterilisirte Glukose-, Fructose-, Galaktose-, Saccharose-, Maltose- oder Laktose- u. s. w. Lösung gethan. Zu Beginn unserer Versuche haben wir 100 ccm einer solchen sterilisirten Flüssigkeit verwendet; später zeigte sich, dass es vortheilhafter ist, bloss 50 ccm einer derartigen Kohlehydratlsung zu benutzen. Die Versuche mit dem die alkoholische Gährung hervorrufenden Enzym werden in folgender, auf der Abbildung 2 genügend veranschaulichter Weise durchgeführt: Durch den Hals eines Gasentwicklungskolbens *G*, welcher 500 ccm fasst, geht ein genaues Thermometer *t*, weiter eine Röhre mit einem cylindrischen Trichter *T* und schliesslich eine Gasabfhrungsrhre, welche mit einem Liebig'schen Khler *K* verbunden ist.

In dem Trichter *T* befindet sich ein Stckchen Thymol im Gewichte von 1—2 g. Der Khler ist mit zwei U-Rhren CuSO<sub>4</sub> und CaCl<sub>2</sub> grösseren Calibers, die mit Kupfervitriolbimsstein und Chlorkalcium gefllt sind, verbunden. Die Bestimmung des Kohlendioxyds wurde mit einigen Modificationen nach der Methode Kolbe-Fresenius-Classen durchgeführt, wie sie schon in der eingangs citirten früheren Abhandlung beschrieben wurde.

Die Luft, welche durch den Gasentwicklungskolben getrieben wurde, passirt zuerst einen mit sterilisirter Baumwolle gefllten Cylinder, dann die Sublimatlösung HgCl<sub>2</sub> und endlich die Lösung KOH. Der Entwicklungskolben *G* befindet sich in einem kupfernen Wasserbade *WB*, welches bis an den Hals des Kolbens heranreicht, und in welchem ein ausgezeichnet fungirender Aether-Thermoregulator *TR* angebracht ist. Der Vorgang im Kolben wurde un-

unterbrochen Tag und Nacht verfolgt. Nach Beendigung des Versuches haben wir uns stets überzeugt, ob in dem Kolben Mikroben vorhanden waren oder nicht, wiewohl dies schon das äussere Ansehen anzeigte — denn die Flüssigkeit war, namentlich bei Hinzugabe von 0,4—0,6 % Thymol, oberhalb des Niederschlages nach dem Abstehen stets wieder klar —, dass die Gährung ausschliesslich durch lösliche Fermente hervorgerufen war. Die bakteriologische Prüfung wurde in folgender Weise durchgeführt: Es wurde ein Gemisch aus 10—15 %iger Glukose-, Fructose- oder Galaktose- u. s. w. Lösung und dem zu prüfenden Enzym hergestellt, genau in dem Verhältnisse wie beim Hauptversuche. Die Mischung wurde sterilisirt und nach Beendigung des Gährprocesses etwa mit 2—5 ccm einer mittleren Probe aus dem zu controlirenden Kolben geimpft. Ausserdem haben wir in Bouillon geimpft und Petri'sche Platten gegossen. Wenn sich eine wahrnehmbare Bakterienentwicklung in der Bouillon zeigte, so wurde der ganze Inhalt mit 10 %iger Glukose-, Fructose- u. s. w. Lösung unter Zusatz des isolirten Enzympräparates gemischt. Ferner wurden die einzelnen Mikrobencolonien, die an den Platten angewachsen waren, darauf untersucht, ob sie eine alkoholische Gährung hervorzurufen im Stande wären. Die Herstellung und Fortzüchtung von Reinculturen der vorgefundenen Bakterien führten wir immer durch. Wir können nur erklären, dass, wenn schon Bakterien gefunden wurden, doch keine solche Art darunter war, die im Stande gewesen wäre, im Laufe der Beobachtungsdauer von 96 Stunden bei einer Temperatur von 37° C., eine Gährung der Glukose-, Fructose- u. s. w. Lösung hervorzurufen.

Dass wir es thatsächlich mit einem, alkoholische Gährung erregenden Enzym zu thun haben, davon konnten wir uns überzeugen, sobald wir der Flüssigkeit verschiedene Antiseptica, z. B. Kaliummetaarsenit, Toluol, Thymol und Sublimat, zusetzten. Für die alkoholische Gährung wurde die absolute Abwesenheit von Mikroben festgestellt.

Weiter lässt sich die Wirkung des Enzyms dadurch zeigen, dass es bei 30—37° C. augenblickliche Gährung der Glukoselösung hervorruft, dass ferner, wenn der Niederschlag mit einer geringen Menge Wassers bei 30—37° C. digerirt und die Flüssigkeit durch Kieselguhr filtrirt wird, in klarer, concentrirter Glukoselösung binnen 6—12 Stunden eine alkoholische Gährung eintritt. Ueber die Athmungsintensität der Reinculturen der Bakterien, welche wir bei

den Gährungsversuchen isolirt haben, und auch über die gefundene Menge des ausgeathmeten Kohlendioxyds in verschiedenartigen Nährstoffmedien werden wir später ausführliche Mittheilungen machen. Wir bemerken nur hier, dass bei Gegenwart von 0,4—0,6 % Thymol oder 1 % Toluol die Bakterien sich bei Gegenwart von activen und nicht-activen Enzymen und Kohlehydratlösungen nicht entwickeln können.

### Feststellung der chemischen Bilanz.

Zum Zwecke der Feststellung der vollständigen chemischen Bilanz bestimmten wir die Verluste an Glukose, Fructose, Galaktose u. s. w. nach erfolgter Gährung.

Wir wählten dabei folgenden Vorgang: Zwei gleiche Mengen des Enzymniederschlages wurden in zwei Kolben abgewogen, von welchen jeder 100 oder 50 ccm sterilisirter Glukose-, Fructose- oder Galaktose- u. s. w. Lösung enthielt. Einer der Kolben wurde zum Studium der alkoholischen Gährung verwendet, während der andere erhitzt und, kochend heiss, mit Enzym vermischt wurde. Beide Kolben enthielten somit die gleiche Menge Enzyms und Glukose u. s. w. Es wurde die Menge der Hexosen vor und nach dem Versuche bestimmt, und zwar erfolgte die Bestimmung der Glukose nach der Methode von Allihn, die der Fructose nach der Methode Sulc-Lehmann und die der Galaktose nach der Methode Steiger. Die Pentosen wurden nach der Methode Tollens-Kröber, die Saccharose und Maltose sowie die Laktose nach bekannten Methoden bestimmt.

Nicht unbemerkt dürfen wir lassen, dass die Bestimmung der erwähnten Kohlehydrate nicht nur in der Lösung, sondern auch im inactiven Enzym erfolgte, da wir zur Bilanz genaue Daten darüber besitzen wollten, wieviel an Kohlehydrat insgesamt im Gährkolben enthalten war. Es ist nämlich die Möglichkeit nicht ausgeschlossen, dass ein gewisses Quantum von Kohlehydraten im Enzym selbst prädisponirt sein könnte, obzwar wir dies nur selten constatirten.

### Ueber die anaërobe Athmung einzelner Thierorgane.

Die Organe wurden unter allen Cautelen der Antisepsis gleich nach der Tödtung den betreffenden Organismen entnommen und durch 30 Minuten in einer 0,5 % igen Sublimatlösung sterilisirt, dann in sterilisirtem Wasser gewaschen, in sterilisirte Cylinder gethan und die Eintragung derselben in die letzteren durch Verwendung der Flamme vor jeder Mikrobeninvasion möglichst geschützt. Die Cylinder

wurden mit sterilisirten, gut anliegenden Pfropfen, die mit den oben beschriebenen Apparaten verbunden waren, verschlossen und die Verschlussstellen sammt den Stopfen durch Uebergiessen mit geschmolzenem Paraffin völlig undurchlässig gemacht. Durch die Cylinder wurde reines Wasserstoffgas, und zwar zu 10 Liter innerhalb 24 Stunden, getrieben.

### Versuch 1.

Hundeherz. Trockengewicht nach dem Versuche 5,5 g in der Trockensubstanz. Zum Versuche wurde eine 5%ige Glukoselösung von 500 ccm verwendet. Das bei einer Temperatur von 37° C. abgespaltene Kohlendioxyd betrug:

Am 1. Tage (nach 24 Stunden)	0,0159 g
" 2. "	0,0559 "
" 3. "	0,1415 "
" 4. "	0,0773 "
" 5. "	0,0739 "
" 6. "	0,0577 "
" 7. "	0,0213 "
" 8. "	0,0120 "
" 9. "	0,0110 "
" 10. "	0,0031 "
	<u>0,4696 g</u>
CO <sub>2</sub> (in der Lösung gefunden)	0,2968 "
CO <sub>2</sub> (Summe des in 10 Tagen ausgeathmeten Quantums)	<u>0,7664 g</u>
Alkohol (in der Lösung gefunden)	0,9364 "

### Versuch 2.

Hundeherz. Trockengewicht nach dem Versuche 21 g. Temperatur 37° C., Volumen der verwendeten 5%igen Glukoselösung 500 ccm.

CO<sub>2</sub> abgespalten:

1. Tag (24 Stunden)	0,3263 g
2. "	0,5070 "
3. "	0,4345 "
4. "	0,2416 "
5. "	0,0751 "
6. "	0,0615 "
7. "	0,0533 "
8. "	0,0207 "
9. "	0,0140 "
10. "	0,0044 "
	<u>1,7384 g</u>
CO <sub>2</sub> (in der Lösung gefunden)	<u>0,2276 "</u>
CO <sub>2</sub> (im Ganzen in 10 Tagen entwickelt)	1,9660 g
Alkohol in der Lösung	2,4448 "



**Versuch 3.**

Hundeleber. Gewicht 36 g; 500 ccm 5%iger Glukose. Als Antisepticum wurde 1 % Toluol zugesetzt.

CO<sub>2</sub> in Gasform bei 37° C. abgespalten:

In 24 Stunden . . . . .	0,3080 g
„ 48 „ . . . . .	1,0202 „
„ 70 „ . . . . .	0,2465 „
	<u>1,5747 g</u>

**Versuch 4.**

Schweinshirn. Gewicht desselben 200 g bei Verwendung von 400 ccm 5 %iger Glukose. Als Antisepticum wurden 50 ccm 0,1 %iger Sublimatlösung zugesetzt.

CO<sub>2</sub> bei einer Temperatur von 37° C. abgespalten:

1. Tag . . . . .	0,4435 g
2. „ . . . . .	0,2007 „
3. „ . . . . .	0,3001 „
4. „ . . . . .	0,2578 „
5. „ . . . . .	0,1588 „
6. „ . . . . .	0,1080 „
7. „ . . . . .	0,0918 „
8. „ . . . . .	0,0232 „
	<u>1,5839 g</u>
CO <sub>2</sub> (in der Lösung und in der Versuchsmasse)	0,2700 „
CO <sub>2</sub> (in Summa in 192 Stunden entwickelt)	1,8539 g
Alkohol in der Lösung . . . . .	2,1200 „

**5.****Versuche mit Pankreas.**

Schweinepankreas im Gesamtgewichte von 260 g wurde in eine 5 %ige Glukoselösung getaucht.

Die constant erhaltene Temperatur betrug 37° C.

CO <sub>2</sub> in Gasform in 152 Stunden abgespalten . . . . .	0,719 g
CO <sub>2</sub> in der Lösung und in der Versuchsmasse gefunden . . . . .	<u>0,293 „</u>
Summa . . . . .	1,012 g
Alkohol in der Lösung . . . . .	0,927 „

Ein anderer Versuch mit Schweinepankreas wurde in grösserem Maassstabe, und zwar in einem geräumigen Cylinder, durchgeführt, um eine grössere Menge Alkohols zu gewinnen, dessen Siedepunkt und spezifisches Gewicht zu ermitteln waren.

Endlich schritten wir  
zu einem

## 6.

## Versuch mit Pankreas

im Gewichte von 2,2 kg, das bei einer Temperatur von 19° C. in 2,5 %ige Glukose getaucht wurde.

CO <sub>2</sub> (nach 120 Stunden in Gasform abgespalten) . .	2,214 g
CO <sub>2</sub> (in der Lösung und in der Versuchsmasse gefunden) . . . . .	<u>2,314 „</u>
CO <sub>2</sub> im Ganzen entwickelt . . . . .	4,528 g
Alkohol in der Lösung . . . . .	3,698 „

## 7.

## Versuch mit Muskeln vom Rind.

2430 g Rindfleisch wurden in eine 2,5 %ige Glukoselösung getaucht. Nach sieben Tagen — die Wärme hatte 17—19° C. betragen — wurden gefunden:

CO <sub>2</sub> in Gasform . . . . .	1,039 g
CO <sub>2</sub> in der Lösung und in der Versuchsmasse . . . . .	<u>1,276 „</u>
Summa . . . . .	2,315 g
Alkohol in der Lösung . . . . .	3,965 „

## Versuche mit Blut.

Rindsblut, sofort nach der Tödtung des Thieres aufgefangen, wurde mittelst Alkohols und Aethers gefällt und der so erhaltene Niederschlag rasch filtrirt und bei einer Temperatur von 36° C. getrocknet.

## I.

Wirkung des getrockneten und fein verriebenen Niederschlages aus Blut im Gewichte von 50 g in 400 ccm 5%iger Glukoselösung.

Als Antisepticum wurden 50 ccm 0,1%iger Sublimatlösung zugesetzt.

(Durch den Cylinder wurden täglich 6 Liter reinen Wasserstoffgases durchgetrieben.)

Entstandenes CO<sub>2</sub>:

Zahl der Stunden	CO <sub>2</sub>	Zahl der Stunden	CO <sub>2</sub>
24	0,3693 g	96	0,6248 g
48	0,5141 „	120	0,6420 „
72	0,6020 „	in der Lösung	0,2780 „
Im Ganzen entstandenes Kohlendioxydgas in 120 Stunden . . . .			0,9200 g
An Alkohol wurde gefunden . . . . .			1,3824 „
Menge des Alkohols für CO <sub>2</sub> = 100 . . . . .			150,2 „

## II.

Der aus dem Blute erhaltene Niederschlag, fein zerrieben, wurde im Gewicht von 50 g in eine 500 ccm betragende 5%ige Glukoselösung gethan.

(Durch den Cylinder wurden täglich 6 Liter kohlensäurefreie Luft hindurchgetrieben).

Als Antisepticum wurde 1% Toluol zugesetzt.

Entstandenes CO<sub>2</sub>:

Zahl der Stunden	CO <sub>2</sub>	Zahl der Stunden	CO <sub>2</sub>
24	0,4629 g	96	1,2136 g
48	0,9073 „	120	1,2608 „
72	1,1223 „		

Im Ganzen entwickelte sich an CO<sub>2</sub> in 120 Stunden 1,2608 g.

Der Alkohol wurde nicht bestimmt.

### III.

Der aus dem Blute ausgeschiedene Niederschlag, fein zerrieben, im Gewichte von 50 g wurde in 100 ccm einer 15%igen Glukoselösung gethan.

Als Antisepticum wurde 1% Toluol zugesetzt.

Das Blut selbst wurde vorher durch 24 Stunden in reinem Kolben bei 32° C. gehalten. Hierauf wurde eine Glukoselösung aufgegossen und der Kolben durch drei Tage bei einer Temperatur von 37° C. gehalten.

Entstandenes CO<sub>2</sub>:

Zahl der Stunden	CO <sub>2</sub>	Zahl der Stunden	CO <sub>2</sub>
24	0,1201 g	120	0,8988 g
48	0,2972 „	144	1,0808 „
72	0,4348 „	168	1,2319 „
96	0,6557 „	in der Lösung	0,0350 „

Im Ganzen entwickelte sich an CO<sub>2</sub> in 168 Stunden. . . . . 1,2669 g.

## Versuche mit Schweineblut.

### IV.

Wirkung des Blutes im Gewichte von 50 g in 400 ccm einer 5%igen Glukoselösung.

Hinzugefügt wurden 50 ccm 0,1 %iger Sublimatlösung.

Durch den Cylinder wurden täglich 6 Liter reinen Wasserstoffgases hindurchgetrieben.

Entstandenes CO<sub>2</sub>:

Zahl der Stunden	CO <sub>2</sub>	Zahl der Stunden	CO <sub>2</sub>
24	0,0220 g	96	0,5951 g
48	0,1817 „	120	0,7643 „
72	0,4259 „	144	1,0230 „
		in der Lösung	0,0748 „

Im Ganzen entwickelte sich an CO<sub>2</sub> in 144 Stunden . . . . . 1,0978 g

An Alkohol wurde gefunden . . . . . 0,5698 „

### V.

Wirkung des Blutes im Gewichte von 50 g in 400 ccm 5%iger Glukoselösung.

Hinzugefügt wurden 50 ccm einer 0,1 %igen Sublimatlösung.

Durch den Cylinder wurden täglich 6 Liter reinen Wasserstoffgases hindurchgetrieben.

Entstandenes  $\text{CO}_2$ :

Zahl der Stunden	$\text{CO}_2$	Zahl der Stunden	$\text{CO}_2$
24	0,0255 g	96	0,6636 g
48	0,2312 „	120	0,8960 „
72	0,4311 „	144	1,1370 „
		in der Lösung	0,0584 „

Im Ganzen entwickelte sich an $\text{CO}_2$ in 144 Stunden . . . . .	1,1954 g
An Alkohol wurden gefunden . . . . .	1,1144 „
Menge des Alkohols für $\text{CO}_2 = 100$ . . . . .	93,2 „

Die Gährung wurde bereits immer innerhalb 24 Stunden bei gewöhnlicher Temperatur ( $20^\circ \text{C.}$ ) wahrgenommen. Bei einer Temperatur von  $37^\circ \text{C.}$  wurde die Gährung beschleunigt und bereits nach 12 Stunden wahrgenommen. Innerhalb 24—48 Stunden war der Schaum an der Oberfläche in den Cylindern hoch gestiegen und erhielt sich zwei bis drei Tage; dann sank derselbe, und nach sieben Tagen war die Gährung gewöhnlich schon gering.

Wir betonen hier, dass wir nur diejenigen Versuche berücksichtigt haben, bei welchen die Glukoselösung oberhalb des betreffenden Thiergewebes während des ganzen Versuches klar geblieben ist und die Abwesenheit von aëroben und anaëroben Bakterien ausser allem Zweifel stand; waren aber solche Bakterien doch vorhanden, so wären diese nicht im Stande gewesen, in einem Gemisch von Thiergewebeextract in Glukoselösung eine Gährung hervorzurufen.

Das entweichende Gas war stets bloss Kohlendioxyd, wie wir nach bekannten Reactionen constatiren konnten.

Alkohol haben wir ebenfalls in grosser Menge durch Gährung von Muskelsubstanz in einer Glukoselösung gewonnen.

Der absolute Alkohol, der nach der Destillation mit kohlensaurem Kalk gewonnen wurde, wies einen Siedepunkt von  $78$  bis  $79^\circ \text{C.}$  bei einem Barometerstande von  $740$  und ein spezifisches Gewicht bei einer Temperatur von  $15^\circ \text{C.}$  von  $0,793$  bis  $0,805 \text{ g auf}$ . Aus der nachstehenden Tabelle ist das Verhältniss zwischen Alkohol und Kohlendioxyd ersichtlich. Wenn der Mechanismus der Gährung nach der Formel  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 = 2 \text{ CO}_2 + 2 \text{ C}_2\text{H}_5\text{OH}$  erfolgt, so entspricht das  $\text{CO}_2 = 48,9$ , der Alkohol  $= 51,1$ , so dass auf  $100$  Theile  $\text{CO}_2$   $104,5$  Theile Alkohol entfallen. Die folgende Tabelle zeigt, wie sich das Verhältniss zwischen  $\text{CO}_2$  und Alkohol kundgegeben hat.

Bezeichnung des Versuches.	Menge des bei der Gährung ent- standenen $\text{CO}_2$ in Gramm	Menge des $\text{CO}_2$ in der Lösung u. in der Versuchs- masse in Gr.	Gesammt- menge des $\text{CO}_2$ in Gramm	Menge des Alkohols in Gramm	Menge des Alkohols für $\text{CO}_2 =$ 100
1. Hundeherz	0,4696	0,2968	0,7664	0,9364	122,18
2. Hundeherz	1,7384	0,2276	1,9660	2,4448	124,4
3. Hundeleber	1,5747	—	1,5747	—	—
4. Schweinshirn	1,5839	0,2700	1,8539	2,1200	114,4
5. Schweine- pankreas	0,719	0,293	1,012	0,927	91,6
6. Schweine- pankreas	2,214	2,314	4,528	3,698	81,7
7. Muskeln vom Rind	1,039	1,276	2,315	3,965	171,2
I. Rindsblut	0,9200	—	0,9200	1,3824	150,2
II. Rindsblut	1,2608	—	1,2608	—	—
III. Rindsblut	1,2219	0,0350	1,2669	—	—
IV. Schweineblut	1,0230	0,0748	1,0978	0,5698	51,9
V. Schweineblut	1,1370	0,0584	1,1954	1,1144	93,2

Ueber den Charakter der Rohenzyme und ihre Reindarstellung werden wir im zweiten Theile Näheres mittheilen.