

weil polymerisirte Styrole der Reduction mit Natrium und Alkohol nicht fähig zu sein scheinen. .

Propylbenzol: In eine siedende Lösung von 10 g reinem Propenylbenzol in 120 ccm absoluten Alkohols wurden 12 g Natrium eingetragen. Nach Beendigung der Reaction wurde mit Wasser versetzt, die alkalische Lösung mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert und der Kohlenwasserstoff durch Ausäthern gewonnen. Sdp. 67—68° (i. D.) unter 15 mm Druck; 157.5° (i. D.) bei 765 mm. Das erhaltene Propylbenzol ist nahezu rein, denn es entfärbt weder Brom, noch reducirt es Permanganat in alkoholischer Lösung. Allenfalls kann man es durch Schütteln mit Permanganat und nochmalige Destillation von den letzten Spuren ungesättigter Kohlenwasserstoffe befreien. Ausbeute 7.6 g.

$$\left. \begin{array}{l} d_{40}^{150} = 0.8680 \\ n_D^{13} = 1.4984 \end{array} \right\} \begin{array}{l} C_{19}H_{12}(\frac{1}{3}). \text{ M.-R. } 40.22. \\ \text{Gef. } \quad \quad \quad \text{» } 40.52. \end{array}$$

Die Reaction wird im hiesigen Institute zur Darstellung einer Reihe *n*-propylirter und isopropylirter Benzolkohlenwasserstoffe benutzt. Auch *n*-Butyl- und *sec.*-Butyl-Benzole lassen sich so darstellen.

Heidelberg. Universitätslaboratorium.

### 118. Julius Stoklasa und F. Czerny: Isolirung des die anaërobe Athmung der Zelle der höher organisirten Pflanzen und Thiere bewirkenden Enzyms.

(Eingegangen am 31 Januar 1903.)

#### Vorbemerkungen.

Wir hatten Gelegenheit, nachzuweisen<sup>1)</sup>, dass die anaërobe Athmung eine alkoholische Gährung ist. Aus der detaillirten chemischen Bilanz der anaëroben Athmung von Zuckerrübenwurzeln, Kartoffeln und Erbsensamen geht hervor, dass die abgespaltene Menge des Kohlendioxyds und des Alkohols dem Verluste an Saccharose bei der Zuckerrübenwurzel und der Stärke bei Kartoffeln und Erbsensamen gleichkommt.

<sup>1)</sup> Eine detaillirte, ausführliche Arbeit erscheint ehestens unter dem Titel: »Der anaërobe Stoffwechsel der höheren Pflanzen und seine Beziehungen zur alkoholischen Gährung« in den »Beiträgen zur chemischen Physiologie und Pathologie etc.« von Franz Hofmeister (Strassburg), Heft 11, Bd. III Seite 460.

Das Quantum der gespaltenen Saccharose, welche durch die Einwirkung der Invertase in Invertzucker umgewandelt wurde (*d*-Glucose und *d*-Fructose), weiter das Quantum der zersetzten Stärke, welche durch die Einwirkung der Diastase in Glucose verwandelt wurde, kommen thatsächlich dem Verluste der Trockensubstanz gleich.

Alle unsere Versuche wurden in besonders construirten Apparaten durchgeführt, unter völligem Ausschluss von Mikroben; denn nur diejenigen Resultate unserer Beobachtungen wurden berücksichtigt, bei welchen mit absoluter Bestimmtheit durch Gelatineplattenguss sowie durch Impfung mit der Platinöse in Bouillon documentirt werden konnte, dass die Zuckerrübenwurzel, die Kartoffelknollen oder die Erbsensamen sich in einem Milieu befanden, in welchem keinerlei Bacterien, noch auch Hyphomyceten, sich befinden konnten. Es ist daher als gewiss anzusehen, dass der Process der anaëroben Athmung der Pflanzenzelle eine alkoholische Gährung ist. Der Mechanismus der alkoholischen Gährung ist in der Pflanzenzelle von der Art der in ihr vertretenen Kohlehydrate abhängig.

Aus all' den gefundenen Resultaten geht sehr klar hervor, dass der anaërobe Stoffwechsel der Pflanzen im Wesentlichen identisch ist mit der alkoholischen Hefegährung.

So wie bei der alkoholischen Hefegährung als Hauptproduct Kohlendioxyd und Aethylalkohol entstehen und die Nebenproducte nur in unbedeutendem Masse auftreten, so ergeben sich auch bei dem anaëroben Stoffwechsel der höheren Pflanzen Kohlendioxyd und Aethylalkohol als Hauptproducte, während Nebenproducte nur in unbedeutendem Maasse auftreten.

Wir finden ferner dasselbe quantitative Verhältniss zwischen Kohlendioxyd und Alkohol wie bei der alkoholischen Hefegährung.

#### *I. Isolirung des Enzyms aus Organen der höheren Pflanzen.*

Unsere Versuche führten uns weiter zur Isolirung der die alkoholische Gährung hervorrufenden Enzyme, also der der Buchner'schen Zymase ähnlichen Enzyme. Wir führten die Versuche durch und zwar in der Weise, dass wir den Saft, den wir unter einem Drucke von 300 Atmosphären aus Zuckerrübenwurzeln, Kartoffeln und Erbsen nach absolvirter anaërober Athmung derselben unter vollständigem Ausschluss von Mikroben der Selbstgährung überliessen, wobei als Antisepticum Toluol, Kalium-Metaarsenit und Sublimat hinzugefügt wurden, und zwar benützten wir auf 500 g Saft 5 g Toluol oder 10 g Metaarsenit oder 0.05 g Sublimat. In allen Fällen hatten wir Gelegenheit (d. i. in denjenigen, in welchen nach den Versuchen Mikroben nicht gefunden wurden), eine Selbstgährung zu beobachten, die Bildung

von Kohlendioxyd und Alkohol wahrzunehmen. Der Saft, welchen wir durch ein Chamberland-Bougie filtrirten, also von Mikroben vollständig befreit hatten, gohr ebenfalls, und es konnten als Spaltungsproducte Kohlendioxyd und Alkohol nachgewiesen werden.

#### Versuchsmethodik.

Zur Constatirung des der Zymase ähnlichen Enzyms benützten wir die modificirte Buchner-Albert'sche Methode, von deren Genauigkeit wir uns bei der Isolirung der Zymase aus verschiedenen Mikrobenarten überzeugten.

Die mittels destillirten Wassers gereinigten Zuckerrübenwurzeln (Kartoffeln, Erbsensamen) im Gewichte von 8—10 kg wurden mittels einer 0.5-procentigen Sublimatlösung durch 30—35 Minuten sterilisirt, abgespült und in Cylinder mit sterilisirtem Wasser getaucht, welche letztere in der Art arrangirt waren, dass die gasabführenden Röhren aus dem Cylinder in mit Quecksilber gefüllte kleinere Cylinder tauchten.

Durch den grossen, die obengenannten Versuchsobjecte jeweilig enthaltenden Cylinder wurde täglich reines Wasserstoffgas durch 2 Stunden hindurchgetrieben. Innerhalb 24 Stunden trat bei Zuckerrübenwurzeln und Erbsensamen, bei den Kartoffeln innerhalb 7—10 Tagen, energische Gährung ein, die sich durch starke Schaumbildung an der Oberfläche der Flüssigkeit im Cylinder kennzeichnete.

Nach 5—10 Tagen wurden die Zuckerrübenwurzeln (oder Kartoffeln, Erbsen) zerrieben, die so erhaltenen Breimassen mittels der hydraulischen Presse unter einem Drucke von 300 Atmosphären gepresst und die erhaltene Flüssigkeit durch Leinwand filtrirt. Dem durch Pressung gewonnenen, also nach vollzogener anaërober Athmung der oben genannten Versuchsobjecte aus diesen selbst unter einem Drucke von 300 Atmosphären gewonnenen Saft wurden in einem langen, engen Cylinder absoluter Alkohol und Aether hinzugefügt. Nach Abscheidung des dunklen Niederschlages (zumeist aus Eiweisstoffen bestehend, welche 3.5—5 pCt. Stickstoff enthielten), welche Operation in wenigen Minuten erfolgte, wurde die Flüssigkeit augenblicklich abgehebert und stets das abgezogene Quantum von Alkohol durch Aether ersetzt.

Nach Durchschüttelung mit Aether wurde die Flüssigkeit über dem Niederschlage abgezogen, in einem geräumigen Filter rasch filtrirt und in einem warmen Luftstrome von 25—30° schnell getrocknet. An Niederschlag wird verhältnismässig wenig gewonnen, da schleunig operirt und derselbe vom Alkohol und Aether durch rasche Decantation befreit werden muss.

Der Niederschlag enthielt keinerlei Zellen der einzelnen pflanzlichen Versuchsobjecte. Nochmals bemerken wir, dass die ganze Operation,

angefangen vom Zerreiben der respectiven Versuchsobjecte, bis zum Pressen und Ausscheiden des Breies mittels Alkohol und Aether schnell und bei möglichst niedriger Temperatur vorgenommen werden muss.

Das isolirte Enzym behält die gährungserregende Kraft nicht lange; schon nach 5 Tagen sinkt dieselbe, und nach 7 Tagen ist sie vollständig verschwunden. Die Energie des isolirten Enzyms ist umso grösser, in desto feiner vertheilter Form dasselbe mit Glucose, Fructose, Saccharose, Maltose oder Stärkekleister gemischt wird.

Das mit Glucose gemischte glykolytische Enzyme zeigte ein Gährungsvermögen, das sich namentlich in den ersten drei Stunden bei 30° am intensivsten bethätigte; nach 20 Stunden sank das Gährungsvermögen; innerhalb 62 Stunden war die Gährkraft gelähmt. Natürlich gestaltet sich das Verhältniss ganz anders bei Disacchariden und Polysacchariden, welche erst durch Hydrolyse in die vergärbare Kohlehydratform verwandelt werden müssen.

Digeriren wir den Niederschlag im Gewichte von 10 g mit einer kleinen Menge Wassers und zwar mit 100 ccm und filtriren wir durch Kieselguhr, so erhalten wir eine klare Flüssigkeit, welche, vermischt mit 10 g Glucose, augenblickliche, lebhaft Gährung hervorruft, ohne dass sich binnen 24 Stunden die Flüssigkeit trüben würde.

Das isolirte Enzym wurde mit einer 15-procentigen Lösung von Glucose, Saccharose, Fructose und Maltose und schliesslich mit Stärkekleister vermischt. Die Lösung wurde stets vorher ausgekocht und nach der Abkühlung mit dem abgewogenen (das Enzym enthaltenden) Niederschlage in dem Gasentwicklungskolben vermischt.

#### Versuchsanordnung und analytische Methoden.

Der Gasentwicklungskolben war mit dem Apparate zur Bestimmung der Kohlensäure verbunden, welcher nach Kolbe-Fresenius-Classen arrangirt war.

Vor den U-Röhren von grösseren Dimensionen, gefüllt mit Chlorcalcium und Kupfervitriol-Bimsstein befindet sich ein kleiner Apparat, System Winkler, gefüllt mit concentrirter Schwefelsäure. Der Gasentwicklungskolben wurde in ein ganz besonderes Wasserbad getaucht, in welchem sich ein genauer Aether-Thermoregulator befand. In dem Gasentwicklungskolben reichte das Thermometer bis in die Flüssigkeit.

Die Kohlensäure wurde aus der Flüssigkeit durch Luft vertrieben, welche vorher selbstverständlich aller Kohlensäure entledigt wurde. Die Reaction erfolgte bei einer Temperatur von 30—35°.

Nach dem Versuche wurde der Inhalt des Gasentwicklungskolbens auf 250 ccm verdünnt und in einer abgemessenen Menge das

Kohlendioxyd bestimmt, und zwar durch Austreiben mittels Phosphorsäure aus der kochenden Lösung; in einem zweiten Theile erfolgte die Bestimmung des Alkohols<sup>1)</sup>. Dass thatsächlich Aethylalkohol bestimmt wurde, davon überzeugten wir uns durch das Verhalten der einzelnen aufbewahrten Destillate bei der Bestimmung des Alkohols, und dann haben wir eine grössere Menge des isolirten Enzyms mit sterilisirter Glucose vergähren lassen. (Allerdings unter Ausschluss von Mikroben, welche selbst alkoholische Gährung hervorrufen.)

Wir haben auch thatsächlich nach mehrfacher Destillation 25 ccm Alkohol gewonnen, dessen specifisches Gewicht zwischen 0.799—0.8 bei 15° schwankte. Der Siedepunkt wurde mit 78—79° gefunden.

Um die Ueberzeugung zu erlangen, dass die alkoholische Gährung nur durch das Enzym hervorgerufen wurde, und zwar in einer Zeit von 24, maximal in 84 Stunden, haben wir folgenden Weg eingeschlagen: Ein Theil des isolirten Enzyms wurde in Kolben mit 15-procentiger Glucose vermischt und alles sterilisirt. Nach der Gährung (oder im Stadium der sehr schwachen Gährung), sobald der Versuch beendet war, nahmen wir Bouillon-Impfungen vor und gossen Petri'sche Platten. Ausserdem wurde ein Theil in einen Kolben geimpft, der eine Mischung des Enzymniederschlages und Glucose enthielt. Der Zweck dieser Beobachtungen war, sicherzustellen, dass:

- a) Die Gährung unter Ausschluss von Mikroben erfolgt ist und ausschliesslich durch das Enzym hervorgerufen wurde,
- b) falls Bacterien vorhanden waren, diese nicht das Vermögen hatten, die einzelnen Kohlehydrate in Gährung zu versetzen.

Ich bemerke, dass thatsächlich in einigen Fällen, wenn Thymol und Kaliummetaarsenit nicht hinzugesetzt wurden, — was namentlich dann geschah, wenn es sich darum handelte, den Alkohol zu bestimmen, — Bacterien in der Flüssigkeit innerhalb 48—84 Stunden nachgewiesen wurden; doch keine Species derselben war im Stande, Glucose, Fructose oder Stärkekleister in der Beobachtungsdauer, d. i. bis 84 Stunden, zu vergähren oder namhafte Zersetzung zu verursachen. Zu bemerken ist, dass sich unsere Beobachtungen auf eine Versuchsdauer von 24—48 Stunden beziehen. Innerhalb dieser Zeit sind Bacterien, wenn sie überhaupt vorhanden waren, nicht imstande, eine solche Gährung, wie sie von uns beobachtet wurde, hervorzurufen.

Im Uebrigen bemerke ich, dass bei der Vermischung des Enzyms mit Glucose oder Fructose **augenblickliche, stürmische Gährung**, insbesondere bei einer Temperatur von 30°, auftrat. Die Gäh-

<sup>1)</sup> Die Angaben über die Bestimmung des Alkohols sind angeführt in meiner oben citirten Arbeit in den »Beiträgen zur chem. Physiologie und Pathologie«.

rungsenergie der Enzyme verschiedener Provenienz, die wir beobachtet haben, geht aus den folgenden Resultaten unserer Experimente hervor.

### Resultate:

#### Gährungserrregendes Enzym aus der Zuckerrübe (*Beta vulgaris*).

Die fein zerriebene Masse von dunkler Farbe enthält an Gesamtstickstoff 3.53 pCt.

Der Niederschlag wurde im Kolben mit 15-proc. Glucoselösung vermischt, und zwar wurden auf etwa 6 g des Niederschlages 100 ccm 15-procentiger Glucoselösung verwendet. Als Antisepticum wurde der Lösung ein Körnchen Thymol zugefügt; der Kolben wurde in's Wasserbad versenkt und mit einer entsprechenden Einrichtung behufs Bestimmung des Kohlendioxyds versehen. Die Flüssigkeit begann augenblicklich zu gähnen. Innerhalb 48 Stunden wurden 0.93 g Kohlendioxyd gebildet.

Das Kohlendioxyd wurde durch Hindurchtreiben von kohlensäurefreier Luft durch die Flüssigkeit erhalten. Zur Abscheidung des gährungserrregenden Enzyms waren 2.5 L Flüssigkeit benutzt worden. Die Menge des Niederschlages war nur eine geringe, weil man rasch arbeiten und den Niederschlag von Alkohol und Aether durch rasche Decantation befreien musste.

Versuch 2. Es wurde im ganzen in derselben Weise wie im vorigen Versuche vorgegangen. In 2 Kolben wurden je etwa 5 g Niederschlag, welcher das der Zymase ähnliche Enzym enthalten musste, gebracht.

Als Antisepticum wurde wieder Thymol verwendet. Der Inhalt eines der Kolben wurde gründlich aufgeköcht. Beide Kolben wurden dann bei einer Temperatur von 28—30° unter den schon früher angeführten Cautelen belassen, der Niederschlag wurde mit einer 15-procentigen Glucoselösung übergossen und das Kohlendioxyd durch Hindurchtreiben von kohlendioxydfreier Luft ausgetrieben. Aus dem aufgeköchten Kolbeninhalte wurden im Laufe von 72 Stunden 0.006 g Kohlendioxyd gewonnen, während in dem Kolbeninhalte, der nicht aufgeköcht worden war, somit das unveränderte Enzym enthielt, 0.332 g Kohlendioxyd gefunden wurden.

Versuch 3. Der Versuch wurde in der oben näher beschriebenen Art wiederholt. Zur Ausscheidung wurden 1.2 L Saft benutzt. Der ausgeschiedene Niederschlag wurde in 50 ccm 15-procentiger Saccharoselösung gethan und mit Thymol versetzt. Es wurden durch den kohlendioxydfreien Luftstrom innerhalb 78 Stunden bei einer Temperatur von 30° 0.4938 g Kohlendioxyd ausgetrieben.

Versuch 4. Der Versuch wurde ganz genau unter den früheren Verhältnissen durchgeführt, es wurden ungefähr 6 g des Niederschlages in 100 ccm 15 proc. Glucoselösung gebracht. Es trat sofort energische Gährung ein. Binnen 2 Stunden wurde mittels Luftdurchleiten 0.15 g Kohlendioxyd erhalten.

Versuch 5. Gewonnen wurden an Niederschlag etwa 7 g, die mit 100 ccm 15-proc. Glucoselösung gemischt wurden. Der Mischung wurde 1.0 g

Kaliummetaarsenit hinzugefügt. Die Temperatur wurde zwischen 29° und 30° gehalten. Es wurden mittels Luftdurchleiten innerhalb 84 Stunden 0.97 g Kohlendioxyd erhalten. In der Lösung wurden 0.95 g Alkohol gefunden.

Versuch 6. 6 g Niederschlag wurden mit 100 ccm einer 15-proc. Glucoselösung vermischt. Es trat augenblicklich Gährung unter Kohlendioxydentwicklung ein. Bei 30° wurden innerhalb 48 Stunden im Ganzen gewonnen:

CO <sub>2</sub> . . . . .	0.635 g
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> .OH . . . . .	0.940 »

Das Kohlendioxyd wurde durch kohlendioxydfreie Luft ausgetrieben und im abgemessenen Theile auch in der Lösung bestimmt.

Versuch 7. Etwa 6 g Niederschlag wurden mit 100 ccm 15-proc. Fructoselösung gemischt. Es wurde nur eine eben wahrnehmbare Gährung erzielt. Bei 30° innerhalb 48 Stunden wurde im Ganzen gefunden:

CO <sub>2</sub> . . . . .	0.49 g
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> .OH . . . . .	0.53 »

Das Kohlendioxyd wurde abermals durch kohlendioxydfreie Luft ausgetrieben und im abgemessenen Theile auch in der Lösung bestimmt.

Versuch 8. Es wurden 10.0 g des Niederschlages benützt und mit 100 ccm 15-proc. Glucoselösung vermischt. Nach erfolgter Vermischung trat augenblickliche Gährung ein, die sich bei 30° steigerte. Bei einer Temperatur von 30° wurden nach 24 Stunden gefunden:

CO <sub>2</sub> (mit Luft ausgetrieben) . . . . .	1.1 g
CO <sub>2</sub> (in der Lösung) . . . . .	0.15 »
Summa . . . . .	1.25 g CO <sub>2</sub> .
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> .OH wurden gefunden in der Flüssigkeit . . . . .	1.37 »

Die Resultate dieser Beobachtungen lehren, dass hier ein chemischer Process vorliegt, bei dem Alkohol und Kohlendioxyd durch ein Enzym gebildet werden.

Was die Vergährbarkeit der einzelnen Kohlenhydrate durch die von uns isolirten Enzyme betrifft, so ist zu ersehen, dass der *d*-Glucose der Vorzug vor der *d*-Fructose zufällt. Die Saccharose wird erst nach vorhergehender Inversion durch die im Niederschlage enthaltene Invertase vergohren.

Dass die Fructose wie die Glucose vergährt, das hat uns bereits die Probe, die wir beim Chemismus der Athmung durchgeführt haben, gelehrt. Es schien interessant, festzustellen, ob nicht der Invertzucker, welcher sich nach vollzogenem Anaërobioseversuch findet, vielleicht zum grossen Theile aus Fructose besteht?

Wir gingen nach der neuen Methode von Neuberg<sup>1)</sup> vor, mittels welcher durch Methylphenylhydrazin bei Gegenwart von 50-proc. Essigsäure und Bildung des *d*-Fructosemethylphenylosazons (C<sub>12</sub>H<sub>26</sub>O<sub>4</sub>N<sub>4</sub>) die

<sup>1)</sup> Neuberg, Ueber die Isolirung von Ketosen, diese Berichte **35**, 959 [1902].

Isolirung der Ketose neben Aldose ausgezeichnet möglich ist. Ein auffällig grösseres Quantum der Fructose neben der Glucose haben wir dabei nicht beobachtet.

Bereits heute halten wir uns für berechtigt, auf Grund der gesammten Beobachtungen und weil die Reaction bei der Vermischung des isolirten Enzyms mit Glucose eine so energische war, mit voller Sicherheit zu schliessen, dass es uns gelungen ist, das der Zymase ähnliche Enzym (die Rübenzymase) zu isoliren und seine Wirkungen festzustellen.

Gährungserregendes Enzym aus Kartoffelknollen  
(*Solanum tuberosum*).

Der gelbgraue Niederschlag bildete eine hornartige Substanz, welche zu einem feinen Pulver zerrieben wurde.

Versuch 1. 15.56 g der pulverförmigen Masse wurden benutzt und mit 100 cem 15-procentiger Glucose vermischt. Als Antisepticum wurden 2 g Kaliummetaarsenit verwendet.

Es entstand augenblickliche Gährung, welche sich innerhalb weniger Stunden zu stürmischer Gährung steigerte. Innerhalb 48 Stunden wurden bei einer Temperatur von 28–30° gefunden:

CO <sub>2</sub> . . . . .	0.540 g
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> .OH . . . . .	0.740 »

Versuch 2. 15.7 g des pulverförmigen Enzyms wurden mit Kartoffelstärkekleister vermengt. Die Temperatur wurde auf 28–30° gehalten. Die Gährung trat erst nach 24 Stunden ein, und zwar erst durch Einwirkung der Diastase. Die Stärke wurde in Dextrin und Maltose und schliesslich in Glucose verwandelt. Nach 84 Stunden wurden gefunden:

CO <sub>2</sub> . . . . .	0.88 g
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> .OH . . . . .	0.79 »

Die Gährung trat nach 24 Stunden sehr stürmisch ein.

C. Gährungserregendes Enzym aus Erbsensamen  
(*Pisum sativum*).

Gelbliches Sediment, welches nach der Trocknung eine hornartige Substanz darstellte.

Versuch 1. Die pulverförmige Masse wurde in einem Gewichte von 11.25 g mit 100 cem 15-procentiger Glucoselösung vermischt. Es entstand augenblickliche Gährung. Innerhalb 24 Stunden bei einer Temperatur von 28–30° wurden gefunden:

CO <sub>2</sub> . . . . .	0.396 g
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> .OH . . . . .	0.409 »

Versuch 2. Die pulverförmige Substanz wurde in einem Gewichte von 8.0 g mit 100 cem 15-procentiger Fructose gemischt. Die Flüssigkeit gohr alsbald nach der Vermengung mit dem Enzyme. Innerhalb 48 Stunden bei einer Temperatur von 30° wurden gefunden:

CO <sub>2</sub> . . . . .	0.337 g
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> .OH . . . . .	0.427 »

Ist ein gahrungserregendes Enzym in der normal athmenden Pflanze nachzuweisen?

Von grossem Interesse ist entschieden die Frage, ob in der normal athmenden Zelle das Protoplasma gahrungserregende Enzyme secernirt. Wir haben bisher Gelegenheit gehabt, die Existenz von Enzymen nach erfolgter anaerobischer Athmung nachzuweisen, und wir haben angenommen, dass bei dieser Athmungsart sich das glykolytische Enzym in der Zelle ansammelt. Durch die von uns nun diesbezüglich vorgenommenen Untersuchungen sind wir factisch in die Lage versetzt, ein solches glykolytisches Enzym in allen normal athmenden Pflanzentheilen nachzuweisen.

a) Gahrungserregendes Enzym aus Erbsenpflanzchen (*Pisum sativum*).

Der in sterilem Wasser gereinigte und in einer 0.1-proc. Sublimatlösung neuerlich gewaschene Erbsensamen wurde in geräumigen Schüsseln bei vollem Luftzutritt keimen gelassen. Die 20 Tage alten Keimlinge wurden zerrieben und der Saft unter einem Drucke von 300 Atmosphären aus denselben ausgepresst. Mit dem erhaltenen Saft wurde wie oben verfahren. Der gewonnene Niederschlag bildete nach dem Trocknen eine gelbbraune Masse, welche zu einem Pulver zerrieben und sofort zum Versuche benutzt wurde. Von der Masse wurden 2.8 g abgewogen und mit 50 ccm Glucoselösung vermengt. Es entstand augenblickliche Gährung. Wir fanden bei einer Temperatur von 28—30°:

CO <sub>2</sub> . . . . .	0.384 g
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> .OH . . . . .	0.423 »

Damit ist der Beweis erbracht, dass auch die keimenden Pflanzen das Enzym enthalten, welches die alkoholische Gährung verursacht.

b) Gahrungserregendes Enzym in der Zuckerrubenwurzel (*Beta vulgaris*).

Es wurden unverletzte Wurzeln ausgewählt, mit Wasser gewaschen und zerrieben und der Saft aus dem Brei unter einem Drucke von 300 Atmosphären ausgepresst. Der weitere Vorgang vollzog sich in der bereits geschilderten Weise. Der Niederschlag war von derselben Beschaffenheit, wie er aus dem Saft von Wurzeln gewonnen war, welche vorher der anaeroben Athmung unterworfen worden waren.

1. Versuch. Es wurde der trockne Niederschlag in Pulverform im Gewichte von 8.13 g verwendet und mit 15-proc. Glucoselösung gemischt. Es entstand augenblickliche Gährung. Innerhalb 48 Stunden wurden bei einer Temperatur von 28—30° gefunden:

CO <sub>2</sub> , gewonnen mittels Durchtreiben von Luft	
durch die Flüssigkeit . . . . .	0.395 g
CO <sub>2</sub> , ausgetrieben aus der Flüssigkeit . . . . .	0.060 »
	Summe . . . . . 0.455 g
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> .OH . . . . .	0.54 »

2. Versuch. Verwendet wurden 8.67 g und gemischt mit 15-proc. Fructoselösung. Es wurde augenblickliche, mässige Gährung beobachtet. Innerhalb 48 Stunden wurden insgesamt bei einer Temperatur von 28—30° gefunden:

CO <sub>2</sub> . . . . .	0.34 g
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> .OH . . . . .	0.42 »

Aus all' den angeführten Ergebnissen geht das interessante Factum hervor, dass das gährungsregende Enzym in der Pflanzenzelle schon bei normaler Athmung vorhanden ist, und dass das Protoplasma der Zelle bei normaler Athmung das gährungsregende Enzym secernirt.

### Beobachtungsergebnisse.

Aus der Reihe von Versuchen geht hervor, dass, sobald das glykolytische Enzym mit Glucose und Fructose vermischt worden war, augenblickliche Gährung eingetreten ist. Der Gährprocess zeigte sich bei Glucose und Fructose in bedeutenderem Masse nach 24 Stdn. Dann sank er rapid und binnen 62 Stdn. war er vollständig beendet, wie aus den folgenden Ziffern ersichtlich ist: Es wurden 10 g Rübenenzym in Pulverform abgewogen und mit 100 ccm 15-procentiger Glucoselösung vermengt. Als Antisepticum wurde ein Körnchen Thymol verwendet. Die Temperatur betrug 28—30°.

An Kohlendioxyd wurden producirt:

innerhalb 3 Stunden . . . . .	0.112 g
» 6 » . . . . .	0.063 »
» 9 » . . . . .	0.032 »
» 12 » . . . . .	0.023 »
» 24 » . . . . .	0.172 »
» 48 » . . . . .	0.043 »
» 52 » . . . . .	0.012 »
» 65 » . . . . .	0.006 »
Summa . . . . .	0.463 g
in der Flüssigkeit wurden gefunden . . . . .	0.052 »
im Ganzen daher abgespalten . . . . .	0.515 g
an C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> .OH wurden gefunden . . . . .	0.534 »

Der Mechanismus der alkoholischen Gährung ausgedrückt durch die Gleichung:



erfordert aus 100 g Glucose

CO <sub>2</sub> . . . . .	48.9
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> .OH . . . . .	51.1

100 g Kohlendioxyd erfordern 104.5 g Alkohol. In der folgenden Tabelle werden wir das Verhältniss zwischen dem entstandenen Kohlendioxyd und Alkohol kennen lernen.

Provenienz des erzeugten Enzyms	Nummer des Versuches	gefundene Menge CO <sub>2</sub> g	gefundene Menge C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> .OH g	Menge des gebildeten Alkohols für CO <sub>2</sub> = 100
Rüben-Zymase	1.	0.97	0.65	97.9
»	2.	0.635	0.94	148.0
»	3.	0.49	0.53	108.1
»	4.	1.25	1.37	109.6
»	5.	0.45	0.54	120.0
»	6.	0.34	0.42	123.5
»	7.	<b>0.515</b>	<b>0.53</b>	103.9
Kartoffel-Zymase	8.	0.540	0.740	137.0
»	9.	0.88	0.79	89.8
Erbsen-Zymase	10.	0.396	0.409	103.2
»	11.	0.387	0.427	110.3
»	12.	0.384	0.423	110.2

Aus den angeführten Versuchen ist uns der Schluss gestattet, dass das gährungsregende, der Buchner'schen Zymase ähnliche Enzym in der pflanzlichen Zelle sich thatsächlich vorfindet.

Wie wir uns neustens überzeugt haben, lässt sich dasselbe auch aus den Blättern und Blüthen isoliren. Insbesondere das in den Blättern enthaltene, eine alkoholische Gährung hervorrufende Enzym zeichnet sich, im Gegensatze zu den in den Wurzeln, Blüthen und Früchten enthaltenen Enzymen, durch das grösste Gährungsvermögen aus.

Eine interessante Analogie besteht zwischen der Pflanzen- und Thier-Zelle.

Lassen wir verschiedene Thierorgane, wie etwa Herzen, Nieren, Lungen u. s. w., unter Beobachtung aller Cautelen der Asepsis in einer 5-procentigen Glucoselösung, in einer Wasserstoffatmosphäre anaërob athmen, dann beobachten wir bereits am zweiten Tage bei einer Temperatur von 37° eine energische, alkoholische Gährung, besonders bei Lunge und Leber.

Zerreiben wir die diversen Thierorgane sofort nach Schlachtung des betreffenden Thieres in feine Theile und pressen wir den Saft unter einem Drucke von 300 Atmosphären aus, dann sind wir im Stande, auf die oben beschriebene Weise, und zwar durch Ausscheidung mittels Alkohol-Aethers, Enzyme zu isoliren, welche sich durch eine ungewöhnliche Gährungsenergie auszeichnen.

Ich führe hier einige Beispiele an:

#### I. Aus Rindfleisch isolirtes Enzym:

Das Fleisch wurde sofort nach der Schlachtung im Gewichte von 5 kg verwendet.

Es wurden 10 g des Enzyms in Pulverform verwendet und in 100 ccm 15-procentiger Glucoselösung gethan. Es entstand nach Verlauf einer Stunde energische Gährung. Die Temperatur wurde auf 37° erhalten.

An Kohlendioxyd, mittels Luft ausgetrieben, wurden gefunden:

innerhalb 12 Stunden . . . . .	0.53 g
» 24 » . . . . .	0.21 »
» 36 » . . . . .	0.13 »
» 42 » . . . . .	0.04 »
» 52 » . . . . .	0.03 »
Summa . . . . .	0.94 g
In der Lösung wurden gefunden CO <sub>2</sub> . . . . .	0.07 »
daher an gesammtem CO <sub>2</sub> . . . . .	1.01 g
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> .OH . . . . .	1.16 »

### II. Enzym isolirt aus Rindfleisch.

Das Fleisch wurde wieder sofort nach Schlachtung des Rindes im Gewichte von 5 kg verwendet. Es wurden 7.5 g des Enzyms in Pulverform abgewogen und in 100 ccm 15-procentiger Glucoselösung gethan. Die Temperatur wurde auf 37° erhalten. Die Flüssigkeit begann augenblicklich zu gähren.

Innerhalb 52 Stdn. wurden insgesamt gefunden:

CO <sub>2</sub> . . . . .	1.38 g
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> .OH . . . . .	1.45 »

### III. Enzym isolirt aus Rindslungen.

Die Lunge wurde sofort nach der Schlachtung des Rindes in einem Gewichte von 3 kg verwendet. Es wurden 10 g des pulverförmigen Enzyms abgewogen und in 100 ccm 15-procentiger Glucoselösung gethan. Die Temperatur wurde auf 37° erhalten. Es entstand sofortige energische Gährung.

An Kohlendioxyd wurde gefunden:

innerhalb 12 Stunden . . . . .	1.19 g
» 24 » . . . . .	0.53 »
» 32 » . . . . .	0.53 »
» 48 » . . . . .	0.66 »
» 52 » . . . . .	0.12 »
Summa . . . . .	3.03 g
In der Lösung wurde gefunden CO <sub>2</sub> . . . . .	0.058 g
daher in Summa CO <sub>2</sub> . . . . .	3.088 g
in der Lösung wurde gefunden C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> .OH . . . . .	3.201 »

Berücksichtigen wir nun die Menge des gebildeten Alkohols, für CO<sub>2</sub> = 100, so zeigt sich uns das Verhältnis

im Falle I . . . . .	100: 114.8
» » II . . . . .	100: 105.1
» » III . . . . .	100: 103.9

## IV. Enzym aus Fleisch.

Es wurde vollkommen fettfreies Fleisch im Gewichte von 5 kg und zwar gleich nach der Schlachtung benutzt.

Das gewonnene Enzym wurde im Gewichte von 10 g in Pulverform benutzt und mit 100 ccm einer 15-procentigen Glucoselösung vermischt. Als Antisepticum wurde ein Körnchen Thymol verwendet.

Innerhalb 48 Stunden wurde an Kohlendioxyd 0.932 g gefunden.

Aus diesen wenigen Proben unserer Experimente, in welchen stetig fortgeschritten wird, ist zu ersehen, dass das gährungserregende, der Buchner'schen Zymase ähnliche Enzym in der Thierzelle existirt.

Unsere Versuche wurden auch mit verschiedenen Theilen der Organe nicht nur des Rindes, sondern auch des Hundes und der Gans durchgeführt. Unsere Beobachtungen müssen auf uns den Eindruck machen, dass es uns gelungen ist, Enzyme, und zwar sowohl in der pflanzlichen, als auch in der Thierzelle zu isoliren, welche die anaërobe Athmung hervorrufen. Die anaërobe Athmung steht somit, wie man annehmen kann, in genetischem Zusammenhange mit der normalen Athmung.

Die Versuche, betreffend die Isolirung des reinen gährungserregenden Enzyms, sowie die Versuche über die Gährthätigkeit des Enzyms in verschiedenen Kohlehydraten, verbunden mit einer vollständigen chemischen Bilanz, werden wir ehestens schildern.

(Physiologische Versuchsstation der k. k. böhmischen technischen Hochschule in Prag.)

119. Eduard Buchner und Jakob Meisenheimer:  
Enzyme bei Spaltpilzgährungen.

[Vorläufige Mittheilung

aus dem chem. Laboratorium der Landwirthschaftl. Hochschule zu Berlin.]

(Vorgetragen in der Sitzung von Hrn. E. Buchner.)

Nachdem die alkoholische Gährung des Zuckers durch Hefezellen als Wirkung eines von den Organismen producirten Enzymes erkannt war, lag die Vermuthung nahe, dass es sich auch bei den Bacteriengährungen um das Auftreten ähnlicher, von der Lebensthätigkeit abtrennbarer Stoffe handelt. Es empfiehlt sich aber, streng auf dem Boden der Thatsachen zu bleiben, und wir haben es deshalb für dringend geboten erachtet, den Nachweis von Gährungsenzymen bei Bacterien auf experimentellem Wege zu versuchen. Während von der Bierhefe unbegrenzte Mengen aus den Brauereien zur Verfügung