

104. Julius Stoklasa:
 Ueber Kohlehydratverbrennung im thierischen Organismus.

(Eingegangen am 29. December 1904.)

Wir haben schon an dieser Stelle Gelegenheit gehabt, über die Existenz glykolytischer Enzyme in der Thierzelle zu berichten, und wir führen im Folgenden einige Beispiele an, bei deren Studium wir einen Theil der Muskeln, ehe dieselben zur Herstellung des Presssaftes benützt wurden, hatten gefrieren lassen, worauf aus den betreffenden Muskeltheilen nach der von uns angegebenen Methode die Enzyme isolirt wurden.

In der nachstehenden Tabelle I sehen wir die Wirkung des Rohenzym, welches aus gefrorenen Muskeln vom Rind gewonnen wurde, während in der Tabelle II eine Darstellung der Wirkung der Rohenzyme, gewonnen aus Theilen derselben Muskeln, enthalten ist, aus welch' letzteren jedoch der Presssaft nach unserer Methode bei einer Temperatur von 2—6° hergestellt worden ist.

Vergleichen wir die Tabellen I und II mit einander, so sehen wir, dass nach der Tabelle I eine verhältnissmässig ganz geringe Quantität von Kohlensäure in 48 Stunden ausgeschieden wurde, während nach Tabelle II schon bei einer Einwirkung des Enzymes in der Dauer von 12 Stunden über 0.5—0.6 g Kohlensäure entwickelt worden sind.

Tabelle I.

Rohenzyme aus gefrorenen Muskeln.
 Verwendet wurden stets 10 g des Enzym. Temp. 37°.

No.	Art der Lösung, in der die Gährung erfolgte	Verwendetes Antisepticum	Menge der bei der Gährung entstandenen Kohlensäure in g		Gesamtmenge der Kohlensäure in g	Gesamtmenge der Milchsäure in g
			Zahl der Stunden			
			24	48		
I a)	50 ccm 15-proc. Glucose	1 pCt. Toluol	0.0079	0.0020	0.0099	0.214
II a)	50 ccm 15-proc. Glucose	1 » »	0.0049	0.0270	0.0319	0.136
III b)	50 ccm 15-proc. Glucose	1 » »	0.0035	0.0321	0.0406	0.086
IV b)	50 ccm 15-proc. Glucose	1 » »	0.0080	0.0107	0.0187	0.079

Tabelle II.

Rohenzym aus frischen, nicht gefrorenen Muskeln.
Die gefundenen Zahlen sind auf 10 g Rohenzym umgerechnet.

No.	Art der Lösung, in der die Gährung erfolgte	Verwendetes Antisepticum	Menge der bei der Gährung ent- standenen Kohlensäure in g				Gesamtmenge der Kohlensäure in g	Gesamtmenge des Alkohols in g	Gesamtmenge der Milchsäure in g	Gesamtmenge der Essigsäure in g	Verlust der Glucose	Anmerkungen
			12	24	48	72						
I.	50 ccm 15-proc. Glucose	1 pCt. Toluol	0.2424	0.4073	0.0940	0.0457	0.0437	0.9212	0.3804	0.3122	2.9200	Die hier ange- führten Zahlen um- fassen das Durch- schnittsergebnis dreier Kolben; die gefundenen Quanti- täten sind jedoch auf die Action von nur 10 g Roh- enzym umgerechnet.
II.	50 ccm 15-proc. Glucose	2 » »	0.2286	0.3730	0.0652	0.0386	0.0291	0.8061	0.0867	0.3182	2.4780	
III.	50 ccm 15-proc. Glucose	1 » »	0.1821	0.4153	0.0552	0.0435	0.0199	0.8348	0.3881	0.3002	1.9400	
IV.	50 ccm 15-proc. Glucose	2 » »	0.0166	0.1050	0.0857	0.0207	0.0184	0.2464	0.2101	0.1682	0.9840	
V.	50 ccm 15-proc. Glucose	1 » »	—	0.7123	0.2333	0.0558	0.0242	1.0256	0.9212	0.4113	2.5340	

Das Rohenzym, dargestellt aus gefrorenen Muskeln, hat in Glucoselösung niemals eine Gärung verursacht¹⁾.

Was die Milchsäure anbelangt, so sind zwischen den Angaben der beiden Vergleichstabellen zwar Differenzen, aber keineswegs solche von Bedeutung, vorhanden.

Um den Nachweis zu führen, dass die Gärung durch die die Milchsäurebildung verursachende Lactolase oder durch die die Alkohol- und Kohlendioxyd-Bildung bewerkstelligende Alkoholase und keineswegs durch Bakterien bewirkt worden ist, haben wir das nachfolgend beschriebene Experiment unternommen.

Tabelle III.
Controllversuche zu den in Tabelle II registrierten Versuchen.

No.	Art der Lösung, in der die Gärung erfolgte	Verwendetes Antisepticum	Menge der bei der Gärung entstandenen Kohlensäure in g			Gesamtmenge der Kohlensäure in g	Anmerkungen
			Zahl der Stunden				
			24	48	72		
I.	50 cem 15-proc. Glucose	1 pCt. Toluol	—	0.0014	0.0034	0.0048	Bakterien, welche eine merkliche Gärung hätten verursachen kön- nen, wurden nicht beobachtet.
II.	50 cem 15-proc. Glucose	1 » »	0.0043	0.0075	0.0047	0.0165	
III.	50 cem 15-proc. Glucose	1 » »	0.0085	0.0015	0.0062	0.0162	

Wir arrangierten mehrere Kolben in nachstehender Weise: Wir beschickten zunächst jeden derselben mit 50 cem einer 15-proc. Glucoselösung, denen 5 g des betreffenden Rohenzym zugesetzt wurden, worauf wir den Inhalt gut sterilisirten. In diese sterilisirten Kolben wurden unter Beobachtung aller Vorsichtsmaassregeln 10 cem des Inhaltes jener Kolben übergeimpft, welche nach absolvirter Gärung ihres Inhaltes durch die aus nicht gefrorenen Muskeln dargestellten Rohenzyme (laut Tabelle II) resultirten.

Wir haben derart nach den Versuchen 1, 2 und 5 (siehe Tabelle II) aus den betreffenden Kolben je 10 cem genommen und wieder in die frisch vorbereiteten, eben beschriebenen, sterilisirten Kolben übergeimpft. Die Resultate

¹⁾ Die Beschreibungen der Apparate, in welchen die Gärungsversuche ausgeführt wurden, sowie die analytischen Methoden sind ausführlich nicht nur in diesen Berichten 36, 622 u. 4058 [1903], sondern auch in den Arbeiten: »Alkoholische Gärung im Thierorganismus und die Isolirung gärungserregender Enzyme aus Thiergeweben« (Archiv für Physiologie, Bd. 101) und: »Ueber die Isolirung gärungserregender Enzyme aus Kuh- und Frauen-Milch« (Archiv für Hygiene, Bd. 50) enthalten.

zeigen uns, dass wir, trotzdem wir 10 ccm der Lösung benutzt haben, nur nach einer Wirkungsdauer derselben von 72 Stunden 5—16 mg gasförmig ausgeschiedener Kohlensäure gefunden haben.

Hier ist somit der schlagende Beweis dafür geliefert, dass die Gährung, wie wir uns wiederholt, im Vereine mit meinen Assistenten und Schülern, überzeugt haben, nur von Enzymen und nicht von Bacterien hervorgerufen worden ist, sodass ich alle Unterstellungen gegen die Accuratesse und Verlässlichkeit meiner Versuche entschieden zurückweisen kann.

Aus dem eben Gesagten wird es klar, warum Otto Cohnheim (Hoppe Seyler's Zeitschr. für physiolog. Chem. 42, Heft 4, 1904) bei seinen Versuchen nur geringe Mengen von Kohlensäure gefunden hat und mein Resultat der Hauptsache nach der Bacterienwirkung zuschreibt.

Nach diesen meinen Erörterungen ist es nämlich geradezu selbstverständlich, dass er keine bedeutenderen Kohlensäuremengen finden konnte, sobald er die zu verwendenden Thierorgane vorher gefrieren liess.

Auch der Einwand, dass eine 1—2-proc. Toluollösung zur verlässlichen Ausschliessung der Bacterieneinwirkung nicht genüge, ist durchaus nicht stichhaltig. Benutzt man nämlich hinreichend geräumige Kolben, in welchen die zum Versuch verwendete Menge von 50 ccm der 15-proc. Glucoselösung nur in dünner Schicht den Boden des Gefässes bedeckt, so genügen 1—2 pCt. Toluol zur Verhütung der Bacterienwirkung vollkommen, und dies um so mehr, wenn man nicht übersieht, den Versuchskolben fortwährend in Bewegung zu erhalten. Zu einem gleichen Befunde ist auch Buchner¹⁾ bei seinen Studien über die Zymasegährung gelangt, welcher bei seinen letzten Versuchen nie mehr als 1 pCt. Toluol verwendete.

Durch unsere weiteren Forschungen ist es uns gelungen, den Nachweis zu erbringen, dass der Abbau der Kohlehydrate mit der Bildung der Milchsäure und derjenigen des Alkohols und des Kohlendioxyds nicht abgeschlossen ist, sondern dass bei Sauerstoffzutritt auch immer Essigsäure entsteht. Wir haben ferner die Bildung von Ameisensäure nachgewiesen, was von besonderem Interesse ist.

Was die von uns benutzten Methoden der Bestimmung der Milchsäure, des Alkohols, der Essigsäure und Ameisensäure anbelangt, so habe ich auf diese schon in meinen früheren Arbeiten hingewiesen.

Ich erwähne hier nur noch, dass wir jetzt neue Methoden der Alkoholbestimmung ausgearbeitet haben, da die von uns früher angewendeten nicht hinreichend exact sind und für kleine Quantitäten nicht vollständig ausreichen. Die von uns früher benutzten Methoden, speciell jene

¹⁾ Diese Berichte 36, 634 [1903]; 37, 417 [1904].

von Verley, Bölsing und Nicloux gaben immer einigermaassen zu niedrige Resultate.

Betonen müssen wir, dass die für grössere Mengen von Alkohol von uns benutzte und modificirte Destillationsmethode, bei welcher der zu bestimmende Alkohol in dem gut kalibrierten Pyknometer von Reuschauer-Aubry gesammelt wird, genaue Resultate liefert.

Behufs Ausarbeitung unserer neuen Methode der Bestimmung kleiner Mengen Alkohols war es nothwendig, sich vorher der Lösung zweier Probleme zu unterziehen, und zwar galt es, einerseits den Alkohol derart zu oxydiren, dass es möglich wird, die Producte der Oxydation, d. i. den Aldehyd, die Essigsäure und das Kohlendioxyd quantitativ zu bestimmen, andererseits eine neue Methode zur Bestimmung kleiner Mengen Aldehyd auszuarbeiten.

Zur Oxydation des Alkohols benutzten wir in einem besonders construirten Apparate die Chromsäure: die Oxydationsproducte sammelten wir sodann in mittels Eis gekühltem Wasser unter Berücksichtigung der entweichenden Kohlensäure, welche letztere in Absorptionsapparaten zur gewichtsanalytischen Bestimmung aufgefangen wurde.

Zur Bestimmung des Aldehyds verwenden wir eine ammoniakalisch-alkoholische Silberlösung, welche schon von Spuren von Aldehyd reducirt wird. Das auf kaltem Wege ausgeschiedene Silber wird gesammelt, gewaschen, getrocknet und gewogen.

Eine zweite Methode der quantitativen Bestimmung kleiner Mengen Alkohols, bei welcher wir mehreren analytischen Bestimmungen ausweichen und die wir ebenfalls erprobt haben, besteht darin, dass wir den Alkohol bis zum Kohlendioxyd oxydiren und das letztere gewichtsanalytisch bestimmen. Diese Oxydation erfolgt in einem von uns besonders construirten Apparate.

Eine detaillirte Beschreibung unserer Methoden, die ich im Vereine mit meinem Assistenten Adolf Ernest ausgearbeitet habe, werden wir in einer besonderen Publication geben¹⁾.

Wenn die Gärung — bei vollem Luftzutritt — länger als 24 Stunden dauert, so können wir in dem entwickelten Gase neben Kohlendioxyd auch mit voller Sicherheit Wasserstoff nachweisen. Von dieser Thatsache der Wasserstoffentwicklung bei einer durch Enzyme hervorgerufenen Gärung einer Glucoselösung haben wir uns durch die bekannte gasometrische Methode überzeugt, wobei ich bemerke, dass die Gärung in dem modificirten Hansen-Pasteur'schen Kolben vorgenommen wurde.

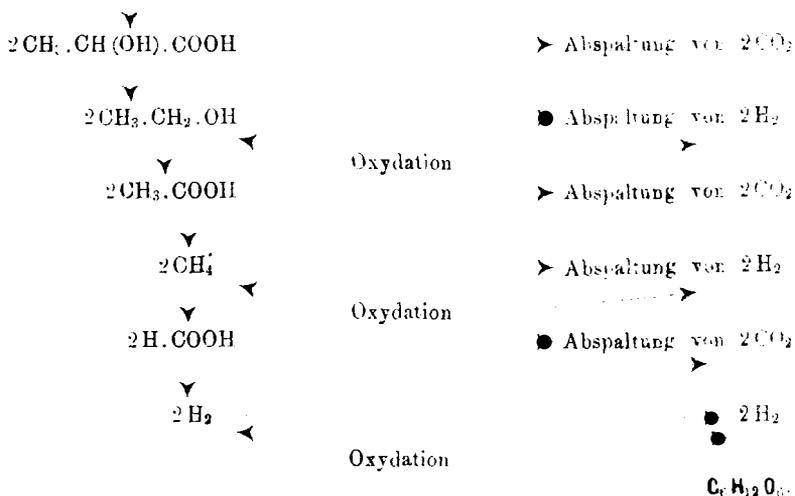
Der durch die Enzyme in statu nascendi entwickelte Wasserstoff wird in der lebenden Thierzelle zu Wasser oxydirt.

Auf Grund unserer Untersuchungen, bei welchen wir, wie gesagt, unumstösslich nachgewiesen haben, dass durch die Wirkung der Enzyme aus Muskeln, Leber und so weiter auf die Glucose Milchsäure,

¹⁾ Als Antisepticum wurden bei den Gährversuchen 1—2 pCt. Salicylsäure verwendet.

Alkohol, Essigsäure und Ameisensäure gebildet werden, und das bei einer solchen Gährung auftretende Gas als aus Kohlendioxyd und Wasserstoff bestehend von uns nachgewiesen wurde, können wir den Abbau der Kohlehydrate, welcher durch Enzyme in der Thierzelle hervorgerufen wird, durch das nachstehende hypothetische Schema charakterisiren.

Hypothetisches Schema des Abbaues der Glucose,
verursacht durch Athmungsenzyme.



Dieses hypothetische Schema hat auf Grund meiner Studien College Bach in Genf zusammengestellt.

Wir haben unter den in dem obigen hypothetischen Schema angeführten Abbauprodukten alle mit voller Sicherheit — bis auf das Methan, dessen Nachweis uns bis jetzt nicht gelungen ist — constatirt.

Wir verfolgen nun den Chemismus der Athmungsenzyme unermüdlich weiter und hoffen zuversichtlich, dass wir in dieses bisher so dunkle Gebiet noch mehr Licht zu bringen im Stande sein werden.

Namentlich äusserst interessant gestalten sich die Prozesse der obligaten Anaerobiotten, welche unsere Annahme hinsichtlich der im Protoplasma sich vollziehenden Prozesse vollkommen bestätigen.

Wir haben also zweierlei Arten von Athmungsenzymen vor uns. Die primären, die Lebensenergie unterhaltenden Prozesse im Protoplasma werden hervorgerufen 1. durch die Enzyme der Laetolase (welche die Milchsäurebildung verursacht), 2. durch die der Alkoholase (welche die Alkohol- und Kohlendioxyd-Bildung veranlasst).

Die secundären Producte, welche sich durch weitere Degradation der Abbauprodukte kennzeichnen, gehen nur bei Gegenwart von Sauerstoff vor sich, und es sind die Enzyme Acetolase und Formilase, welche den Abbau fortsetzen. Die gebildeten Spaltungsproducte, so weit sie noch oxydirbar sind, werden durch den hinzutretenden Sauerstoff der Luft zu Kohlendioxyd und Wasser verbrannt. Ueber den Charakter der beiden letztgenannten Enzyme werden wir in einer späteren Publication Näheres mitzuthellen in der Lage sein.

Chemisch-physiologische Versuchsstation der k. k. böhm. technischen Hochschule in Prag.

105. Otto Dimroth: Ueber eine neue Synthese
von Diazoaminoverbindungen.

4. Mittheilung über Synthesen mit Aziden¹⁾.

[Aus dem chem. Laboratorium der Universität Tübingen]

(Eingegangen am 28. Januar 1905.)

Zur Gewinnung von Diazoaminoverbindungen kam bisher im wesentlichen nur die von Peter Griess aufgefundene Synthese in Betracht. Sie gestattet vor allem, eine sehr grosse Anzahl der rein aromatischen Glieder dieser Körperklasse darzustellen. Fettaromatische Diazoaminoverbindungen dagegen können nur in beschränktem Umfang erhalten werden, denn es reagiren von den Aminen der Fettreihe zwar die secundären Basen stets normal mit Diazoniumsalzen, von den primären aber, wie H. Goldschmidt und Holm²⁾, sowie H. Goldschmidt und Badl³⁾ festgestellt haben, nur die Amine vom Typus des Benzylamins. Die Basen der Methylaminreihe dagegen treten sofort mit zwei Molekülen einer Diazoverbindung zu Bisdiazoaminokörpern zusammen. Solche Substanzen endlich, in welchen die Diazoaminogruppe beiderseits an aliphatische Kohlenwasserstoffreste gebunden ist, sind mit der Griess'schen Synthese nicht herstellbar und daher noch unbekannt.

Vor einiger Zeit habe ich über die ersten Anwendungen einer neuen synthetischen Methode kurz berichtet⁴⁾, welche, wie die weitere Untersuchung gezeigt hat, einen grösseren Geltungsbereich besitzt als die Griess'sche Reaction und auch dann zum Ziele führt, wo jene versagt.

¹⁾ Frühere Mittheilungen: Diese Berichte 35, 1029, 4041 [1902]; 36, 909 [1903]. ²⁾ Diese Berichte 21, 1016 [1888].

³⁾ Ebenda 22, 933 [1889].

⁴⁾ Diese Berichte 36, 909 [1903].