

Über die glykolytischen Enzyme im Pflanzenorganismus.

Von

Julius Stoklasa

unter Mitwirkung von

Adolf Ernest und Karl Chocenský.

Mit einer Tafel.

(Aus der chemisch-physiologischen Versuchsstation an der k. k. böhm. techn. Hochschule in Prag.)

(Der Redaktion zugegangen am 3. Dezember 1906.)

I.

Von meinen zahlreichen Untersuchungen über die anaërobe Atmung der verschiedenen Samenpflanzen, welche in unserer Versuchsstation unter Mitwirkung meiner Assistenten und Schüler binnen 5 Jahren ausgeführt worden sind, will ich heute folgendes berichten:

Bei allen Versuchen bedienten wir uns besonders konstruierter Apparate¹⁾ und beobachteten alle Kautelen der Asepsis. Überdies berücksichtigten wir nur diejenigen Resultate, bei welchen wir mit untrüglicher Sicherheit uns durch Gelatineplattenguß sowie durch Impfung mit der Platinöse in Zuckerbouillon überzeugt haben, daß sie unter völligem Ausschluß

¹⁾ Siehe: «Der anaërobe Stoffwechsel der höheren Pflanzen und seine Beziehung zur alkoholischen Gärung von Julius Stoklasa, Joh. Jelínek und Eugen Vítek, Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie, Zeitschrift für die gesamte Biochemie, herausgegeben von Franz Hofmeister, Bd. III, Heft 11, Braunschweig 1903»; ferner: «Alkoholische Gärung im Tierorganismus und die Isolierung gärungserregender Enzyme aus Tiergeweben», erster Teil von Julius Stoklasa unter Mitwirkung von F. Černý, Joh. Jelínek, Eugen Šimáček und Eugen Vítek, Archiv für die gesamte Physiologie, Bd. 101, Bonn 1904.

von Mikroben durchgeführt wurden und daß also die Zuckerrübenwurzeln (*Beta vulgaris*), die Kartoffeln (*Solanum tuberosum*), Gurken (*Cucumis sativus*), Bohnen (*Phaseolus vulgaris*), Wicken (*Vicia sativa*) und Äpfel (*Pirus Malus*) sich in einem vollends bakterien- und hyphomycetenfreien Milieu befanden. Auch hinsichtlich der anaeroben Bakterien haben wir uns nach der Methode Fränkl-Hueppe von ihrer völligen Abwesenheit überzeugt. Daher können wir mit absoluter Bestimmtheit erklären, daß der Prozeß der anaeroben Atmung der Pflanzenzelle eine unter Milchsäurebildung vor sich gehende alkoholische Gärung ist, deren Mechanismus in der Pflanzenzelle von der Art der in ihr vertretenen Kohlehydrate abhängig ist. Aus allen gefundenen Resultaten geht sehr klar hervor, daß der anaerobe Stoffwechsel der Samenpflanzen im wesentlichen identisch ist mit der alkoholischen Hefegärung.

Wir finden ferner dasselbe quantitative Verhältnis zwischen Kohlendioxyd und Alkohol wie bei der alkoholischen Hefegärung.

Bevor ich noch zur Isolierung der glykolytischen Enzyme schreite, führe ich in übersichtlicher Zusammenstellung die Resultate der anaeroben Atmung der verschiedenen Organe der Samenpflanzen an.

Es ist hierbei zu bemerken, daß die Pflanzenorgane auf der Oberfläche sehr sorgfältig gereinigt wurden und durch 30 Minuten in einer 0,5^o/₁₀igen Sublimatlösung sterilisiert, dann in sterilisiertem Wasser gewaschen, in sterilisierten Zylinder getan und die Eintragung derselben in die letzteren durch Verwendung der Flamme vor jeder Mikrobeninvasion möglichst geschützt wurden.

Die Zylinder wurden mit sterilisierten, gut anliegenden Pfropfen, die mit den in meinen zitierten Arbeiten beschriebenen Apparaten verbunden waren, verschlossen und die Verschlusstelle samt den Pfropfen durch Übergießen mit geschmolzenem Paraffin völlig undurchlässig gemacht. Durch die Zylinder wurde reines Wasserstoffgas und zwar zu 10 Liter innerhalb 24 Stunden getrieben.

Was die analytischen Methoden zur Bestimmung von Milchsäure, Alkohol und Kohlendioxyd anbelangt, so sind die-

selben in meiner vorliegenden Arbeit über die Isolierung der Enzyme beschrieben.

Und nun gelangen wir dazu nachzuweisen, daß tatsächlich bei der anaëroben Atmung der Zuckerrübe etc. Milchsäure entsteht. Diese Versuche wurden mit großen Quantitäten von Zuckerrübe, sowie Gurken, Kartoffeln und Bohnen ausgeführt.

Die Pflanzenorgane wurden genau sterilisiert und in steriles destilliertes, durch Kochen von Luft befreites Wasser getaucht. Die Pflanzenorgane der genannten Samenpflanzen enthielten vor dem Versuche bloß minimale Mengen von Milchsäure.

Nach starker Gärung in dem sterilen Medium — denn es wurden keinerlei Mikroorganismen in denselben konstatiert — wurde sowohl aus dem Wasser, als auch aus den Pflanzenorganen durch Destillation Alkohol ausgetrieben. Zu dem Kolbeninhalt, bestehend aus dem Brei der Pflanzenorgane und aus dem Wasser, in welchem sich die betreffenden Pflanzenorgane befanden, wurde Kaliumcarbonat bis zur alkalischen Reaktion zugesetzt und hierauf der Alkohol abdestilliert.

Nach Austreibung des Alkohols wurde sodann die Lösung mit Phosphorsäure angesäuert und die flüchtigen Fettsäuren mit Dampf ausgetrieben.

Nach Austreibung der flüchtigen Fettsäuren mit Dampf wurde hierauf in dem Kolbeninhalt die Milchsäure nach A. Partheil bestimmt.

Die Milchsäure wurde durch zwei Tage mittels reinen Äthers ausgeschüttelt, welcher letzterer in einen frischen Kolben zusammengeworfen wurde. Nach vollständiger Ausschüttelung der Milchsäure wurde der Äther abdestilliert. Der Rest wurde sodann mittels kalten Wassers über einem kleinen Filter in ein Fraktionskölbchen abgeschweift, durch KOH neutralisiert und bis zur Trockene im Wasserbade abgedampft. Hierauf wurde das Fraktionskölbchen mit einem Nitrometer nach Lunge (enthaltend eine 5%ige KOH-Lösung) verbunden, durch Hinzusetzung von konzentrierter H_2SO_4 und schwachem Anwärmen die Reaktion eingeleitet und das sich entwickelnde Kohlenoxyd im Nitrometer aufgefangen.

Man wäscht das entwickelte Gas mit Kalilauge, um schweflige Säure und Kohlendioxyd zu entfernen, und liest nach erfolgtem Ausgleich von Temperatur und Druck das Volumen des entstandenen Kohlenoxyds ab. Die auf 0° und 760 mm Druck reduzierten Kubikzentimeter Kohlenoxyd ergeben, mit 0,0012507 multipliziert, das Gewicht des erhaltenen Kohlenoxyds, aus dem man die Milchsäure nach der Gleichung $\frac{\text{CO}}{28} : \frac{\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3}{90,06} =$ gefundene Menge : x durch Multiplikation mit 3,216 findet. Von der Gegenwart der Milchsäure haben wir uns in einem größeren Versuche überzeugt und zwar derart, daß wir die klare Lösung nach der Gärung mit Schwefelsäure ansäuerten und mit Äther ausschüttelten.

Der Rückstand liefert ein lösliches Bleisalz, welches sodann in Zinklaktat übergeführt wird. Das Zinklaktat wird hierauf in verdünntem Alkohol umkrystallisiert und dann analysiert. Durch die Uffelmanssche Reaktion wurde tatsächlich die Milchsäure nachgewiesen.

Wir benützten weiters zum Milchsäurenachweis die vorzügliche Methode von H. Behrens und zwar durch Bildung von Kobalto-Baryumlaktat. Die Formel $(\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3)_2 \text{Zn} + 3 \text{ aqua}$ verlangt 21,99 Zn und wir haben durch einige Versuche 21,0 bis 22,1 Zn gefunden.

Bemerkenswert ist noch, daß die Destillate mit Alkohol einer mehrfachen Destillation unterworfen wurden, wobei jedesmal entweder aus der sehr schwach sauren oder sehr schwach alkalischen Lösung die Destillation vorgenommen wurde.

Zur Ansäuerung des Destillates wurde $\frac{1}{10}$ -Normalschwefelsäure, zur Alkalisierung dagegen Kaliumcarbonat verwendet.

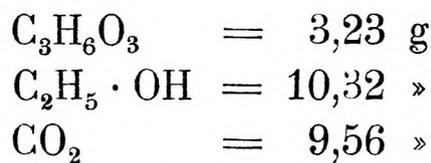
Nach sechsfacher Destillation unter strenger Identifizierung wurde ca. bis 20—25 ccm Äthylalkohol abdestilliert. Der Siedepunkt wurde mit 78—79° C. und das spezifische Gewicht mit 0,792 bis 0,798 bei 15° C. gefunden.

Äußerst interessant erwies sich die Verfolgung des Prozesses bei den verschiedenen Pflanzenorganen, wo überall die Milchsäure quantitativ, wie bereits erwähnt, nach der Methode von A. Partheil bestimmt wurde.

Ich betone hier nochmals ausdrücklich, daß wir vor der anaëroben Atmung in den Organen der Samenpflanzen bloß minimale Mengen von Milchsäure nachweisen konnten.

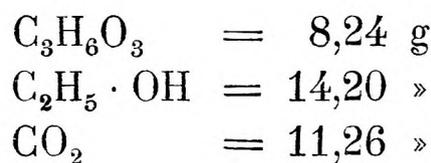
Wir haben durch mehrere Versuche konstatiert, daß tatsächlich bei der anaëroben Atmung der verschiedenartigen Organe der Samenpflanzen Alkohol und Kohlensäure Hauptprodukte sind und nebenbei sich immer eine gewisse Menge Milchsäure bildet.

1 kg Zuckerrübenwurzel, berechnet auf Trockensubstanz, entwickelt innerhalb 100 Stunden insgesamt bei anaërober Atmung bei einer Temperatur von 22° C.:

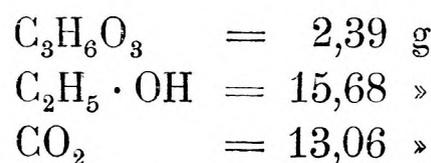


welche Quantitäten sowohl in der Lösung als auch in der Wurzel gefunden wurden.

Wir haben weiters konstatiert, daß 1 kg der Gurkenmasse in der Trockensubstanz binnen 100 Stunden der anaëroben Atmung nach mehreren Versuchen bei einer Temperatur von 20° C. ergab:



Zum Schlusse führe ich noch die gefundenen Daten der anaëroben Atmung der Erbsensamen an: 1 kg der Erbsensamen auf Trockensubstanz berechnet ergibt innerhalb 100 Stunden bei einer Temperatur von 25° C.:



Es verdient ganz besonders erwähnt zu werden, daß die Versuche nur mit gut sterilisierten Gurken, Zuckerrüben und Erbsensamen angestellt worden sind und daß die Lösung in dem Zylinder, in welchem die anaërobe Atmung vor sich ging, immer rein und niemals getrübt war.

Weiters führe ich die noch nicht publizierten analytischen Resultate der anaëroben Atmung verschiedener Organe der Samenpflanzen an (Siehe Tabelle I, II, III, IV und V).

Tabelle I.

Anaerobe Atmung der *Beta vulgaris*. Temperatur 20—22° C.

Nr. des Versuches	Dauer des Versuches Tage	Gewicht der Rübe g	Gewicht der Trockensubstanz g	Gewicht der Saccharose g	Ausgas- CO ₂ g	Gebildeter Alkohol g	Summe des Alkohols und des CO ₂ g	Alkohol und CO ₂ auf Saccharose umgerechnet g	Verlust an Trockensubstanz nach dem Versuche g	Verlust an Saccharose nach dem Versuche g	Menge des gebildeten Alkohols für CO ₂ = 100	Anmerkung		
4	5	218,8	—	—	1,5460	1,7537	3,2997	—	—	—	113,4			
5	6	352,9	—	—	1,0221	1,2071	2,2292	—	—	—	118,1			
6	25	364,3	—	—	0,7396	0,7982	1,5378	—	—	—	107,9	Rübe in 0,05% Sublimatlösung		
1	8	351,3	85,0393	59,8828	3,5160	4,2631	7,7791	7,3901	5,7732	6,78	6,7023		11,19	121,2
2	10	423,9	99,0968	66,3802	3,2930	3,3506	6,6436	6,3114	7,4928	7,56	8,1644		12,29	101,7
3	21	413,0	90,4379	59,7685	5,552	5,4704	11,022	10,470	1,16103	12,83	8,7335	14,61	98,5	

Tabelle II.

Anaërobe Atmung der Knollen von *Solanum tuberosum*.
Temperatur 22—24° C.

Nr. des Versuches	Dauer des Versuches Tage	Gewicht der Kartoffel vor dem Versuche g	Gewicht der Trockensubstanz g	Ausgeatmetes CO ₂ g	Gebildeter Alkohol g	Menge des gebildeten Alkohols für CO ₂ = 100
5	7	210,5	64,7	2,846	2,33	81,9
6	6	230,3	68,2	2,953	3,24	109,7
7	7	215,6	60,2	2,630	3,02	114,8

Tabelle III.

Anaërobe Atmung der Frucht von *Pirus Malus*.
Temperatur 22—24° C.

Nr. des Versuches	Dauer des Versuches Tage	Gewicht der Frucht vor dem Versuche g	Gewicht der Trockensubstanz g	Ausgeatmetes CO ₂ g	Gebildeter Alkohol g	Menge des gebildeten Alkohols für CO ₂ = 100
9	5	216,8	34,56	1,26	1,54	122,2
11	5	320,4	56,0	2,63	3,24	123,2
13	6	272,9	40,26	1,38	1,08	78,3
14	6	280,3	45,32	1,64	1,48	90,2

Tabelle IV.

Anaërobe Atmung der Samen von *Phaseolus vulgaris*.
Temperatur 20—21° C.

Nr. des Versuches	Dauer des Versuches Tage	Gewicht der Samen vor dem Versuche g	Gewicht der Trockensubstanz g	Ausgeatmetes CO ₂ g	Gebildeter Alkohol g	Menge des gebildeten Alkohols für CO ₂ = 100
19	6	205,3	176,3	5,32	5,68	106,7
20	7	210,4	180,6	5,84	6,06	103,7
21	6	107,8	92,5	2,34	2,06	88,0
22	6	98,2	84,2	1,98	1,96	98,9

Aus den hier angeführten Resultaten geht in der Mehrzahl hervor, daß der anaërobe Stoffwechsel der verschiedenartigen Organe der Samenpflanzen im wesentlichen identisch ist mit der alkoholischen Gärung.

II.

Um die Intensität der aëroben und anaëroben Atmung erfrorener Pflanzenorgane festzustellen, haben wir uns der Abtötungsmethode durch niedrige Temperatur von W. Palladin, S. Kostytschew, Fräulein T. Krasnosselsky usw. bedient.¹⁾

In einen großen Zylinder von 1 Liter Inhalt wurden die abgewogenen, frischen, reinen, ganzen (nicht zerriebenen) Pflanzenorgane gebracht, mittels Kautschukpfropfen verschlossen und in einem Gefäß mit Kältemischung 24 Stunden belassen. Die durchschnittliche Temperatur während der vorerwähnten Zeit betrug — 18° bis — 25° C. Der Frierprozeß verlief in einem kalten Zimmer einer Prager Eisanstalt. Die erfrorenen Pflanzenorgane wurden sodann in andere sterile Zylinder von gleichem Inhalt geschafft und mit 15 g Toluol benetzt.

Den hohen Zylinder von 7—8 cm Durchmesser schließt ein gut dichtender Kautschukpfropfen, der 4 cm tief in den Zylinder hineinragt.

Durch den zweimal gebohrten Pfropfen führen zwei Glasröhren, von denen die zuleitende bis zum Boden des Zylinders reicht, während die ableitende des Liebigschen Kühlers den unteren Rand des Pfropfens um 5 cm überragt.

Die Gase passieren nach dem Austritt aus dem Zylinder zuerst einen Winklerschen Absorptionsapparat, welcher sich in einem eiskalten Gefäß befindet, um die Toluoldämpfe, welche sich in dem Liebigschen Kühler nicht kondensiert haben, aufzufangen, ferner zwei 25 cm hohe, 2,5 cm weite U-Röhren

¹⁾ W. Palladin, Die Arbeit der Atmungsenzyme der Pflanzen unter verschiedenen Verhältnissen, Diese Zeitschrift, Bd. XLVII, Heft 4, 5 und 6, 1906.

mit Kupfervitriolbimsstein, weiters ein drittes U-förmiges Rohr, welches Chlorcalcium enthält, das häufig erneuert wird. Das völlig getrocknete Kohlendioxyd passiert zuerst eine U-Röhre, welche mit ausgeglühtem Natronkalk gefüllt ist, sodann den mit Kaliumhydroxyd gefüllten Geißlerschen Apparat. Um die aus diesem entweichende ganz unbedeutende Menge Wasser und CO_2 aufzufangen, sind weiter mit festem Kaliumhydroxyd und Calciumchlorid gefüllte U-Röhren vorgelegt. Weiter rückwärts befindet sich noch ein U-förmiges Schutzrohr, dazu bestimmt, in der Luft enthaltendes Kohlendioxyd (und Feuchtigkeit) abzuhalten. Es ist mit Calciumchlorid und Kaliumhydroxyd gefüllt und mit dem Aspirator verbunden. Die oben erwähnten U-Röhren sowie der Geisslersche Apparat wurden vor und nach dem Durchleiten der Gase gewogen. Natürlich wurde bei der anaëroben Atmung der Wasserstoff aus den Absorptionsapparaten durch CO_2 -freie Luft ausgetrieben.

Die Pfropfen der Zylinder wurden durch Übergießen mit geschmolzenem Paraffin völlig undurchlässig gemacht.

Um den Nachweis zu liefern, daß in dem Absorptionsapparat keine Toluoldämpfe vorhanden waren, wurde nach Abwiegen desselben CO_2 -freie Luft durch die Absorptionsapparate durchgeleitet, und sodann die Apparate nochmals abgewogen. Durch den Zylinder wurde per Stunde 1 l keim- und kohlendioxydfreie Luft, oder eventuell reiner Wasserstoff hindurchgeleitet.

Unsere hier deutlich beschriebenen Versuche wurden mit Zuckerrübe (*Beta vulgaris*) und mit Kartoffel (*Solanum tuberosum*) ausgeführt und zwar ließen wir separat die Wurzel und separat das Blattwerk gefrieren. Von den Kartoffeln benützten wir die Knollen.

Aus den angeschlossenen Tabellen VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII und XIII ist die Atmungsintensität der gefrorenen Organe haarklar ersichtlich.

Zu diesen hier angeführten Versuchen ist noch zu bemerken, daß wir das ausgeatmete Kohlendioxyd so lange bestimmten, bis die Menge auf ca 1 mg gesunken ist.

I. Versuch.

Tabelle VI.

Versuche mit Zuckerrübe.

Nach 92 Vegetationstagen.

Gewicht des erfrorenen Blattwerkes = 112 g

Trockengewicht = 14,15 »

Luftstrom. — Temperatur 22—24° C.

Dauer des Versuches in Stunden	CO ₂ in mg	Menge des CO ₂ in mg auf 100 g frische Substanz berechnet	Menge des CO ₂ in mg in 1 Stunde auf 100 g frische Substanz berechnet	Menge des CO ₂ in mg in 1 Stunde auf 100 g Trockensubstanz berechnet
24	199,1	177,8	7,4	58,6
24	56,1	50,1	2,1	16,5
4	8,8	7,9	2,0	15,5
14	11,3	10,1	0,7	5,7
6	10,1	9,0	1,5	11,8
18	17,8	15,9	0,9	6,9
25	19,9	17,8	0,7	5,6
115	323,1	288,4	2,5	19,8

Tabelle VII.

Versuche mit Zuckerrübe.

Nach 92 Vegetationstagen.

Gewicht der erfrorenen Wurzel = 70 g

Trockengewicht = 15,84 »

Luftstrom. — Temperatur 22—24° C.

Dauer des Versuches in Stunden	CO ₂ in mg	Menge des CO ₂ auf 100 g frische Substanz berechnet in mg	Menge des CO ₂ in 1 Stunde auf 100 g frische Substanz berechnet in mg	Menge des CO ₂ in 1 Stunde auf 100 g Trockensubstanz berechn. in mg
24	39,6	56,6	2,4	10,4
24	13,3	19,0	0,8	3,5
4	1,5	2,1	0,5	2,4
14	8,4	12,0	0,9	3,8
6	4,0	5,7	0,9	4,2
18	7,9	11,3	0,6	2,7
90	74,7	106,7	1,18	5,2

I. Versuch.

Tabelle VIII.

Versuche mit Zuckerrübe.

Nach 92 Vegetationstagen.

Gewicht des erfrorenen Blattwerkes = 159 g

Trockengewicht = 20,08 »

Wasserstoffstrom. — Temperatur 22—24° C.

Dauer des Versuches in Stunden	CO ₂ in mg	Menge des CO ₂ in mg auf 100 g frische Substanz berechnet	Menge des CO ₂ in mg in 1 Stunde auf 100 g frische Substanz berechnet	Menge des CO ₂ in mg in 1 Stunde auf 100 g Trockensubstanz berechnet
24	81,7	51,3	2,1	16,9
24	44,3	27,9	1,2	9,2
4	2,0	1,3	0,3	2,5
14	12,3	7,7	0,6	4,3
6	0,0	0,0	0,0	0,0
18	1,5	0,9	0,05	0,4
90	141,8	89,1	0,99	7,8

Tabelle IX.

Versuche mit Zuckerrübe.

Nach 92 Vegetationstagen.

Gewicht der erfrorenen Wurzel = 116,2 g

Trockengewicht = 26,3 »

Wasserstoffstrom. — Temperatur 22—24° C.

Dauer des Versuches in Stunden	CO ₂ in mg	Menge des CO ₂ in mg auf 100 g frische Substanz berechnet	Menge des CO ₂ in 1 Stunde auf 100 g frische Substanz berechnet in mg	Menge des CO ₂ in 1 Stunde auf 100 g Trockensubstanz berechnet in mg
24	39,5	34,0	1,4	6,2
24	6,6	5,7	0,2	1,04
4	0,5	0,4	0,1	0,5
14	2,7	2,3	0,2	0,7
6	0,3	0,3	0,05	0,2
18	1,5	1,3	0,07	0,3
90	51,1	43,97	0,48	2,15

II. Versuch.

Tabelle X.

Versuche mit Zuckerrübe.

Nach 107 Vegetationstagen.

Gewicht des erfrorenen Blattwerkes = 62 g

Trockengewicht = 9,1 »

Luftstrom. — Temperatur 22—26,1° C.

Dauer des Versuches in Stunden	CO ₂ in mg	Menge des CO ₂ in mg auf 100 g frische Substanz berechnet	Menge des CO ₂ in mg in 1 Stunde auf 100 g frische Substanz berechnet	Menge des CO ₂ in mg in 1 Stunde auf 100 g Trockensubstanz berechnet
6	44,5	71,8	11,9	81,5
18	26,5	42,8	2,3	16,2
24	26,0	41,9	1,7	11,9
24	13,5	21,8	0,9	6,2
24	12,6	20,3	0,8	5,8
96	123,1	198,5	2,06	14,09

Tabelle XI.

Versuche mit Zuckerrübe.

Nach 107 Vegetationstagen.

Gewicht der erfrorenen Wurzel = 60 g

Trockengewicht = 12,8 »

Luftstrom. — Temperatur 22—26,1° C.

Dauer des Versuches in Stunden	CO ₂ in mg	Menge des CO ₂ in mg auf 100 g frische Substanz berechnet	Menge des CO ₂ in mg in 1 Stunde auf 100 g frische Substanz berechnet	Menge des CO ₂ in mg in 1 Stunde auf 100 g Trockensubstanz berechnet
6	10,5	17,5	2,9	13,6
18	65,1	108,5	6,0	28,2
24	47,0	78,3	3,3	15,3
24	1,0	1,7	0,07	0,3
72	123,6	206,0	2,9	13,4

II. Versuch.

Tabelle XII.

Versuche mit Zuckerrübe.

Nach 107 Vegetationstagen.

Gewicht des erfrorenen Blattwerkes = 77 g

Trockengewicht = 11,4 »

Wasserstoffstrom. — Temperatur 22—26,1° C.

Dauer des Versuches in Stunden	CO ₂ in mg	Menge des CO ₂ in mg auf 100 g frische Substanz berechnet	Menge des CO ₂ in mg in 1 Stunde auf 100 g frische Substanz berechnet	Menge des CO ₂ in mg in 1 Stunde auf 100 g Trockensubstanz berechnet
6	18,5	24,0	4,0	27,1
18	27,7	35,9	1,9	13,5
24	22,0	28,6	1,2	8,0
24	5,0	6,5	0,3	1,8
72	73,2	95,1	1,3	8,9

Tabelle XIII.

Versuche mit Zuckerrübe.

Nach 107 Vegetationstagen.

Gewicht der erfrorenen Wurzel = 60 g

Trockengewicht = 12,8 »

Wasserstoffstrom. — Temperatur 22—26,1° C.

Dauer des Versuches in Stunden	CO ₂ in mg	Menge des CO ₂ in mg auf 100 g frische Substanz berechnet	Menge des CO ₂ in mg in 1 Stunde auf 100 g frische Substanz berechnet	Menge des CO ₂ in mg in 1 Stunde auf 100 g Trockensubstanz berechnet
6	16,5	27,5	4,6	21,5
18	29,0	48,3	2,7	12,6
24	11,5	19,2	0,8	3,7
24	14,9	24,8	1,0	4,9
24	6,4	10,7	0,4	2,1
96	78,3	130,5	1,4	6,3

Durch das Erfrieren erstreckt sich der Atmungsprozeß bloß auf einige Tage. Wir fanden in aëroblem Zustande die größte Intensität der Atmung binnen 48 Stunden. Dann sinkt sie allmählich und nach 100 Stunden finden wir dann schon nur ganz minimale Quantitäten ausgeschiedenen Kohlendioxyds. Bei anaërober Atmung sinkt die Intensität der Abscheidung des Kohlendioxyds viel rascher. Die größte Energie fanden wir binnen 24 Stunden, sodann sinkt sie allmählich und gegen 100 Stunden hört sie vollständig auf.

Wie wir weiters sehen werden, wird die Atmungsintensität bei der anaëroben Atmung neuerdings wieder hervorgerufen, wenn wir den Wasserstoffstrom durch Luftstrom ersetzen.

Das Blattwerk der Zuckerrübe der ersten, sowie zweiten Versuchsreihe atmet in aëroblem Zustande natürlich viel energischer als in anaërober Weise.

Wir fanden, daß die Menge des Kohlendioxyds auf 100 g Trockensubstanz berechnet in einer Stunde durchschnittlich 19,8 mg beträgt. Im Wasserstoffstrom, also in anaërober Atmung, konnten wir durchschnittlich in einer Stunde 7,8 mg Kohlendioxyd konstatieren.

In der zweiten Reihe der Versuche betrug die Menge des Kohlendioxyds auf 100 g Trockensubstanz berechnet in einer Stunde im Luftstrom 14 mg, im Wasserstoffstrom 8,9 mg.

Was die Atmung der Wurzeln anbelangt, so belief sich die Menge des Kohlendioxyds auf 100 g Trockensubstanz berechnet binnen einer Stunde bei der ersten Versuchsreihe im Luftstrom auf 5,2 mg, im Wasserstoffstrom auf 2,15 mg.

Bei der zweiten Versuchsreihe betrug die Menge des Kohlendioxyds auf 100 g Trockensubstanz berechnet innerhalb einer Stunde im Luftstrom 13,4 mg, im Wasserstoffstrom 6,3 mg.

Die obenangeführten Zahlen zeigen uns, daß das gefrorene Blattwerk viel energischer atmet als die Wurzeln der Zuckerrübe, was überdies mit den ungefrorenen Organen der Zuckerrübe im vollen Einklange steht.

Man möchte glauben, daß durch den Gefrierprozeß der Organe der Zuckerrübe die Atmungsintensität derselben ungemein sinkt, wie aber aus den hier ange-

führten Daten der Experimente zu ersehen ist, bestehen keine großen Differenzen. Nur ist die Atmung sehr kurz!

Die Atmungsintensität des Blattwerkes der nichtgefrorenen Zuckerrübe nach 92 Vegetationstagen bei 22° C. auf 100 g Trockensubstanz berechnet bei aërober Atmung beziffert sich pro Stunde auf 23 mg CO₂, bei anaërober Atmung auf 11 mg CO₂.

Die Atmungsintensität der ungefrorenen Zuckerrübenwurzel auf 100 g Trockensubstanz berechnet bei 22° C. nach 92 Vegetationstagen bei aërober Atmung pro Stunde beläuft sich auf 11 mg, bei anaërober Atmung auf 6 mg CO₂.

Bei der Atmung des gefrorenen Blattwerkes fanden wir im ersten Falle folgenden Quotient: $\frac{A_n}{N} = 0,39$, im zweiten Falle einen solchen $\frac{A_n}{N} = 0,63$.

Bei den gefrorenen Zuckerrübenwurzeln finden wir nachstehende Verhältnisse:

Bei der Atmung der Wurzel der Zuckerrübe ergab sich im ersten Falle nachstehender Quotient: $\frac{A_n}{N} = 0,41$, im zweiten Falle ein solcher $\frac{A_n}{N} = 0,47$.

Durch unsere zahlreichen Untersuchungen haben wir gefunden, daß das Verhältnis zwischen der anaëroben und aëroben Atmung der verschiedenartigen ungefrorenen Zuckerrübenwurzeln, und zwar immer bei ein und derselben Wurzel bei drei verschiedenen Temperaturen 1—3°, 18—20° und 30—32° C. konstant bleibt.

Bei allen Atmungsexperimenten mit frischer Rübe bei verschiedenen Temperaturen hat sich ein Quotient von $\frac{A_n}{N} = 0,358$ bis 0,6 erwiesen.

Bei unseren Versuchen mit gefrorener Zuckerrübe ergab sich ein Quotient von $\frac{A_n}{N} = 0,39$ bis 0,63.

Wir ersehen daraus, daß die anaërobe zu der aëroben Atmung fast in demselben Verhältnisse steht wie bei den nicht gefrorenen Pflanzenorganen.

Das Konstantbleiben des Quotienten der anaëroben und aëroben Atmung hat sich auch bei den gefrorenen Organen der Zuckerrübe erwiesen.

Von großer Wichtigkeit ist weiter, zu erforschen, ob sich bei der anaëroben Atmung der Organe der Samenpflanzen tatsächlich Alkohol gebildet hat. Palladin und Kostytschew haben laut ihrer neuesten Arbeit, betitelt «Anaërobe Atmung, Alkoholgärung und Acetonbildung bei den Samenpflanzen»,¹⁾ in der Tat Alkohol konstatiert.

Sie äußern sich daselbst wie folgt:

«Bei der anaëroben Atmung lebender und erfrorener Erbsensamen, Ricinussamen und Weizenkeime findet eine beträchtliche Alkoholbildung statt. Die anaërobe Atmung dieser Objekte ist also zum größten Teil Alkoholgärung. Durch das bei unseren Versuchen in Anwendung gebrachte Gefrieren wurden die genannten Pflanzen getötet, die in ihnen befindliche Zymase wurde jedoch nicht zerstört».

Die Ergebnisse der vorerwähnten Forscher können wir in der Weise bestätigen, daß tatsächlich Zymase und Lactacidase durch das Gefrieren nicht zerstört wird, aber ihr Bestehen in voller Aktivität nur so kurz ist, daß sie nicht mehr isoliert werden kann. Uns ist es bisher noch nicht gelungen, aus den erfrorenen Pflanzenorganen das Rohenzym Zymase zu isolieren.

Palladin und Kostytschew bestimmten den Alkohol nach der anaëroben Atmung in den Pflanzenorganen in der Art, indem sie durch mehrfache Destillation und durch den Scheidetrichter das Toluol abtrennten. Die Menge des gebildeten Alkohols wurde aus dem spezifischen Gewicht des vierten beziehungsweise fünften Destillates ermittelt. Zur Identifizierung des Äthylalkohols bedienten sie sich der Methode Berthelot und der Jodoformprobe von Müntz. Nun folgen die Resultate unserer Versuche:

Zur Bestimmung des Alkohols haben wir 6fache Destil-

¹⁾ Diese Zeitschrift, 1906, Heft 3 und 4.

lationsmethode angewendet und den Alkohol in dem gut kalibrierten Pyknometer von Reischauer-Aubry gesammelt. Um den Äthylalkohol qualitativ nachweisen zu können, benützten wir folgende Reaktionen:

Es wurde die zu untersuchende Flüssigkeit mit H_2SO_4 und K_2CrO_4 in bestimmtem Verhältnis versetzt, destilliert und das Destillat in Fraktionen aufgefangen. Die Oxydationsprodukte sammelten wir sodann in mittels Eis gekühltem Wasser unter Berücksichtigung der entweichenden Kohlensäure, welche letztere in Absorptionsapparaten aufgefangen wurde.

Die Produkte der Oxydation des Alkohols und zwar Aldehyd, Essigsäure und Kohlendioxyd wurden sodann qualitativ nachgewiesen.

Zur Bestimmung des Aldehyds verwendeten wir eine ammoniakalisch-alkalische Silberlösung, welche schon von Spuren von Aldehyd reduziert wird.

Wir benützten noch andere Methoden zum weiteren Nachweis des Aldehyds und zwar:

1. Die Bildung von Aldehydharz durch Erhitzen mit konzentrierter NaOH.
2. Die Reaktion mit Nessler's Reagens nach Crismer und
3. Die Jodoformprobe nach Lieben.

Wir haben in der angegebenen Weise von Palladin und Kostytschew die Versuche wiederholt und gefunden, daß das Toluol sich ziemlich gut abtrennen läßt.

Außerdem stellten wir aber noch weitere Versuche mit Sublimat sterilisierten Zuckerrübenwurzeln und Kartoffelknollen an. Die Zuckerrübenwurzeln und Kartoffelknollen wurden bei einer Temperatur von -25° in einer Kältemischung 24 Stunden stehen gelassen. Hierauf wurden die Zuckerrübenwurzeln und Kartoffelknollen in Wasserstoffstrom 48 Stunden belassen und mittels den hier bereits erwähnten Methoden sodann das Kohlendioxyd und der Alkohol bestimmt.

Hier konnten wir nachstehende Resultate konstatieren:
Bei der anaëroben Atmung in Toluoldämpfen:

Blattwerk der Zuckerrübe im Gewichte von 159 g
Ausgeatmetes CO_2 = 141,8 mg

Menge des gebildeten Alkohols	= 129,8 mg
Zuckerrübenwurzel im Gewichte von	= 60 g
Ausgeatmetes CO ₂	= 78,3 mg
Menge des gebildeten Alkohols	= 74,3 mg

Anaërobe Atmung der durch Sublimat sterilisierten Wurzel der Zuckerrübe:

Gewicht der Wurzel	= 461 g
Ausgeatmetes CO ₂	= 324 mg
Menge des gebildeten Alkohols	= 293 mg

Gewicht der durch Sublimat sterilisierten Kartoffel = 352 g

Ausgeatmetes CO ₂	= 0,468 mg
Menge des gebildeten Alkohols	= 0,393 »

Es ist hier noch zu erwähnen, daß wir die kleinsten Mengen Alkohol, welche sich vor dem Versuche im Blattwerke sowie in der Wurzel der Zuckerrübe und Kartoffelknollen fanden, bei der anaëroben Atmung von der Gesamtmenge des Alkohols abgezogen haben. Im nichtgefrorenen Blattwerke waren bloß Spuren von Alkohol vorhanden. In der Wurzel der Zuckerrübe wurde nach mehreren Bestimmungen pro 1 kg frischer Substanz 26 mg Alkohol gefunden. In den Knollen der Kartoffeln konnten wir pro 1000 g frischer Substanz 14 mg Alkohol konstatieren.

Auf das Vorhandensein des Alkohols in den gefrorenen Rübenwurzeln haben schon Strohmmer und Stift¹⁾ darauf aufmerksam gemacht. Sie sagen in ihrer Abhandlung folgendes:

«Daß die Tätigkeit der Enzyme der Rübenwurzeln durch das Gefrieren, wenigstens innerhalb der in unseren Versuchen eingehaltenen Temperaturgrenzen, nicht eingestellt wird, zeigt auch der Umstand, daß in allen gefrorenen Rüben die Anwesenheit von Äthylalkohol, dessen Bildung ja mit Enzymtätigkeit in ursächlichem Zusammenhange steht, nachgewiesen werden konnte.»

Die nachstehenden Zahlen zeigen uns die Verhältnisse zwischen dem gebildeten CO₂ und Alkohol. Die Menge des

¹⁾ Strohmmer und Stift, «Über den Einfluß des Gefrierens auf die Zusammensetzung der Zuckerrübenwurzel», Österr.-ungar. Zeitschrift für Zuckerindustrie und Landwirtschaft, Heft VI, Wien 1904.

Alkohols, wenn $\text{CO}_2 = 100$ ist, belauft sich bei der anaëroben Atmung des Blattwerkes der Zuckerrübe

auf	91,53 mg Alkohol
bei der Zuckerrübenwurzel im ersten Falle	
auf	94,89 mg Alkohol
bei der Zuckerrübenwurzel im zweiten Falle	
auf	90,43 mg Alkohol
bei der anaëroben Atmung der erfrorenen	
Kartoffel auf	: 83,97 mg Alkohol.

Aus den Resultaten unserer Beobachtungen erkennen wir, daß die anaërobe Atmung der erfrorenen Organe der Samenpflanzen und zwar des Blattwerkes, sowie der Wurzel der Zuckerrübe und der Knollen der Kartoffel eine alkoholische Gärung ist.

Wenn bei der anaëroben Atmung die Menge des ausgeschiedenen Kohlendioxyds auf ein minimales Quantum sinkt, wir sodann den Wasserstoffstrom durch Luftstrom ersetzen, so wird neuerdings Kohlendioxyd durch die Oxydationsprozesse ausgeschieden, welches wir überdies aus Tabelle XIV und XV ersehen.

Wir haben die in Tabelle XII und XIII spezifizierten Versuche mit Zuckerrübe in der Weise ergänzt, indem wir nach der anaëroben Atmung Luft durch die Versuchszylinder passieren ließen. Die Menge des ausgeatmeten Kohlendioxyds beim Blattwerk auf 100 g frische Substanz, berechnet binnen 96 Stunden, stieg auf 166,1 mg, bei der Wurzel auf 81,5 mg innerhalb derselben Zeit.

Wir sehen daher, daß sich die Menge des ausgeatmeten Kohlendioxyds beim Blattwerk auf 100 g Trockensubstanz berechnet pro Stunde auf 11,7 mg, bei der Wurzel auf 4 mg beziffert.

Dieses Experiment bestätigte uns dieselbe Erscheinung, welche sich bei den ungefrorenen Organen abspielt.

W. Palladin hat mit seinen Mitarbeitern in dem pflanzenphysiologischen Institut der Universität St. Petersburg sich einer Methode bedient, welche den Zweck hatte, den Charakter der

III. Versuch.

Tabelle XIV.

Versuche mit Zuckerrübe.

Gewicht des erfrorenen Blattwerkes = 77 g

Trockengewicht = 11,4 »

Luftstrom. — Temperatur 19,1—22,2° C.

Dauer des Versuches in Stunden	CO ₂ in mg	Menge des CO ₂ in mg auf 100 g frische Substanz berechnet	Menge des CO ₂ in mg in 1 Stunde auf 100 g frische Substanz berechnet	Menge des CO ₂ in mg in 1 Stunde auf 100 g Trockensubstanz berechnet
6	22,1	28,7	4,8	32,3
17	52,2	67,8	4,0	26,9
25	28,9	37,5	1,5	10,1
24	19,1	24,8	1,0	6,9
24	5,6	7,3	0,3	2,0
96	127,9	166,1	1,7	11,7

Tabelle XV.

Versuche mit Zuckerrübe.

Gewicht der erfrorenen Wurzel = 60 g

Trockengewicht = 12,8 »

Luftstrom. — Temperatur 19,1—22,2° C.

Dauer des Versuches in Stunden	CO ₂ in mg	Menge des CO ₂ in mg auf 100 g frische Substanz berechnet	Menge des CO ₂ in mg in 1 Stunde auf 100 g frische Substanz berechnet	Menge des CO ₂ in mg in 1 Stunde auf 100 g Trockensubstanz berechnet
6	9,1	15,2	2,5	11,8
17	10,4	17,3	1,0	4,8
25	11,1	18,5	0,7	3,5
24	6,6	11,0	0,5	2,2
24	11,7	19,5	0,8	3,8
96	48,9	81,5	0,8	4,0

Atmungsenzyme näher zu beleuchten, und zwar geschah dies auf Grund der Arbeiten von Bertrand, Chodat und Bach.¹⁾

W. Palladin äußert sich in seiner letzten Arbeit in nachstehender Weise:

«Indem ich mich der Theorie von Chodat und Bach anschließe, vermute ich, daß die durch Pyrogallol angeregte Kohlensäureausscheidung ein Resultat der gemeinsamen Tätigkeit der Oxygenase (höhere Hydrosuperoxyde) und der Peroxydase ist. Infolge dessen schließe ich auf Grund der hierbei ausgeschiedenen Kohlensäuremenge auf die Quantität der in den Pflanzen enthaltenen Oxygenase. Das Aufhören der Ausscheidung von Kohlensäure nach einer gewissen Zeit weist auf das Verschwinden der Oxygenase hin. Hiernach wurde 3%ige Wasserstoffsuperoxydlösung in den Kolben gegossen, worauf wiederum eine starke Kohlensäureentwicklung erfolgte. Da nun nach der Theorie von Chodat und Bach ein Teil der Peroxydase bereits zu ihrer gemeinsamen Arbeit mit der Oxygenase verbraucht worden war, zeigt die nach der Hinzufügung von H_2O_2 ausgeschiedene Kohlensäure die Menge der übrig gebliebenen Peroxydase an. Die Summe der sowohl nach Hinzufügung von Pyrogallol als auch von H_2O_2 ausgeschiedenen Kohlensäuremenge gibt nun eine Vorstellung von der in den untersuchten Pflanzen enthaltenen Peroxydase.»

Die Methode, welche Palladin mit seinen Mitarbeitern²⁾ benützte, ist folgende:

¹⁾ Bach und Chodat, Untersuchungen über die Rolle der Peroxydase in der lebenden Zelle, Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXV, S. 2466.

Arch. Sc. phys. et nat., Tome XVII, 1904, Recherches sur les ferments oxydants.

²⁾ N. A. Maximow, «Zur Frage über die Atmung», Berichte der Deutsch. botan. Ges., Jahrgang 1904, Bd. XXII, Heft 4.

E. Tscherniajew, «Über den Einfluß der Temperatur auf die normale und die intramolekulare Atmung der verletzten Pflanzen», Berichte der Deutsch. botan. Ges., Jahrg. 1905, Bd. XXIII, Heft 5.

W. Palladin, «Über den verschiedenen Ursprung der während der Atmung der Pflanzen ausgeschiedenen Kohlensäure», Berichte der Deutsch. botan. Ges., Jahrg. 1905, Bd. XXIII, Heft 6.

W. Palladin, «Die Arbeit der Atmungsenzyme der Pflanzen unter

Wenn die Ausscheidung von Kohlendioxyd der Organe erfrorener Samenpflanzen in Luftstrom vollständig aufgehört hatte, wurden die Pflanzenorgane in einer Reibschale zerrieben, mit destilliertem Wasser übergossen und in einen Erlenmeyerschen Kolben von 300 ccm Inhalt gebracht. Sodann wurde 20%ige Pyrogallollösung hinzugegeben und der Kolben durch einen Kautschukpfropfen mit zwei gebogenen Glasröhren geschlossen und umgekehrt, wie das in seiner Abhandlung in dieser Zeitschrift auf Seite 409 die Abbildung deutlich veranschaulicht.

Durch die kürzere Röhre wird Luft in den Kolben geleitet, die größere Röhre jedoch, welche über die Flüssigkeit hinausragt, dient zum Austritt der Gase.

Wenn sich schon kein Kohlendioxyd durch Einwirkung der Pyrogallollösung mehr bildete, wurde 3%ige Wasserstoffsperoxydlösung in die Kolben gegossen, worauf wiederum eine starke Kohlendioxydentwicklung erfolgte. Die Bestimmung des Kohlendioxyds erfolgte wieder nach der bereits erwähnten Methode von Kolbe-Fresenius-Classen.

Wir benützten bei unseren Versuchen nachstehende Mengen der Substanz:

beim ersten Versuch beim Blattwerk	44,0 g
beim ersten Versuch bei der Wurzel	32,7 »
beim zweiten Versuch beim Blattwerk	26,0 »
beim zweiten Versuch bei der Wurzel	30,0 »
beim dritten Versuch beim Blattwerk	37,0 »
beim dritten Versuch bei der Wurzel	25,0 »

Bei jedem einzelnen hier angeführten Versuch wurde 80 ccm 20%ige Pyrogallollösung und sodann 80 ccm 3%iger Wasserstoffsperoxyd angewendet.

verschiedenen Verhältnissen», Diese Zeitschrift, Bd. XLVII, Heft 4, 5 und 6, 1906.

W. Palladin, «Bildung der verschiedenen Atmungsenzyme in Abhängigkeit von dem Entwicklungsstadium der Pflanzen», Berichte der Deutsch. botan. Ges., Jahrg. 1906, Bd. XXIV, Heft 2.

T. Krasnosselsky, «Bildung der Atmungsenzyme in verletzten Zwiebeln von *Allium Cepa*», Berichte der Deutsch. botan. Ges., Jahrgang 1906, Bd. XXIV, Heft 3.

Die diesbezüglichen Resultate sind aus den nachfolgenden Tabellen zu ersehen. (Siehe Tabelle XVI bis XXVII.)

I. Versuch.

Tabelle XVI.

Erfrorene Blätter der Zuckerrübe.

Menge der Substanz = 44 g. — Trockensubstanz = 5,6 g.

Luftstrom. — Temperatur 20,1—23,7° C.

Dauer des Versuches in Stunden	Menge des CO ₂ in mg	Menge des CO ₂ in mg auf 100 g frische Substanz berechnet	Menge des CO ₂ in mg in 1 Stunde auf 100 g frische Substanz berechnet	Menge des CO ₂ in mg in 1 Stunde auf 100 g Trockensubstanz berechnet
	Pyrogallol-lösung 80 ccm			
16	22,5	51,1	3,2	25,1
8	12,9	29,3	3,7	28,8
16	22,7	51,6	3,2	25,3
25	27,2	61,8	2,5	19,4
65	85,3	193,9	3,0	23,4

Tabelle XVII.

Erfrorene Wurzeln der Zuckerrübe.

Menge der Substanz = 32,7 g. — Trockensubstanz = 7,4 g.

Luftstrom. — Temperatur 20,1—23,7° C.

Dauer des Versuches in Stunden	Menge des CO ₂ in mg	Menge des CO ₂ in mg auf 100 g frische Substanz berechnet	Menge des CO ₂ in mg in 1 Stunde auf 100 g frische Substanz berechnet	Menge des CO ₂ in mg in 1 Stunde auf 100 g Trockensubstanz berechnet
	Pyrogallol-lösung 80 ccm			
17	15,0	45,9	2,7	11,9
25	23,4	71,6	2,9	12,6
23	8,0	24,5	1,1	4,7
65	46,4	141,9	2,2	9,6

I. Versuch.

Tabelle XVIII.

Erfrorene Blätter der Zuckerrübe.

Menge der Substanz = 44,0 g. — Trockensubstanz = 5,6 g.

Luftstrom. — Temperatur 22—26,1° C.

Dauer des Versuches in Stunden	Menge des CO ₂ in mg	Menge des CO ₂ in mg auf 100 g frische Substanz berechnet	Menge des CO ₂ in mg in 1 Stunde auf 100 g frische Substanz berechnet	Menge des CO ₂ in mg in 1 Stunde auf 100 g Trockensubstanz berechnet
	Pyrogallollösung 80 ccm u. Wasserstoffsperoxyd 80 ccm			
18	196,4	446,4	24,8	194,8
26	37,0	84,1	3,2	25,4
28	25,3	57,5	2,1	16,1
18	13,1	29,8	1,7	13,0
24	13,1	29,8	1,2	9,7
24	10,5	23,9	1,0	7,8
138	295,4	671,4	4,9	38,2

Tabelle XIX.

Erfrorene Wurzeln der Zuckerrübe.

Menge der Substanz = 32,7 g. — Trockensubstanz = 7,4 g.

Luftstrom. — Temperatur 22—26,1° C.

Dauer des Versuches in Stunden	Menge des CO ₂ in mg	Menge des CO ₂ in mg auf 100 g frische Substanz berechnet	Menge des CO ₂ in mg in 1 Stunde auf 100 g frische Substanz berechnet	Menge des CO ₂ in mg in 1 Stunde auf 100 g Trockensubstanz berechnet
	Pyrogallollösung 80 ccm u. Wasserstoffsperoxyd 80 ccm			
18	42,5	130,0	7,2	31,9
26	22,9	70,0	2,7	11,9
28	13,3	40,7	1,5	6,4
18	7,6	23,2	1,3	5,7
24	4,4	13,5	0,6	2,5
24	7,5	25,9	1,07	4,2
138	98,2	300,3	2,2	9,6

II. Versuch.

Tabelle XX.

Erfrorene Blätter der Zuckerrübe.

Menge der Substanz = 26 g. — Trockensubstanz = 3,8 g.

Luftstrom. — Temperatur 19,2—22° C.

Dauer des Versuches in Stunden	Menge des CO ₂ in mg	Menge des CO ₂ in mg auf 100 g frische Substanz berechnet	Menge des CO ₂ in mg in 1 Stunde auf 100 g frische Substanz berechnet	Menge des CO ₂ in mg in 1 Stunde auf 100 g Trockensubstanz berechnet
	Pyrogallol- lösung 80 ccm			
15	13,0	50,0	3,3	22,8
8	24,1	92,7	11,6	79,3
17	12,9	49,6	2,9	19,9
25	6,2	23,8	0,9	6,5
65	56,2	216,2	3,5	22,8

Tabelle XXI.

Erfrorene Wurzeln der Zuckerrübe.

Menge der Substanz = 30 g. — Trockensubstanz = 6,4 g.

Luftstrom. — Temperatur 14,2—22° C.

Dauer des Versuches in Stunden	Menge des CO ₂ in mg	Menge des CO ₂ in mg auf 100 g frische Substanz berechnet	Menge des CO ₂ in mg in 1 Stunde auf 100 g frische Substanz berechnet	Menge des CO ₂ in mg in 1 Stunde auf 100 g Trockensubstanz berechnet
	Pyrogallol- lösung 80 ccm			
15	9,8	32,7	2,2	10,2
8	6,0	20,0	2,5	11,7
23	15,8	52,7	2,3	10,7

II. Versuch.

Tabelle XXII.

Erfrorene Blätter der Zuckerrübe.

Menge der Substanz = 26 g. — Trockensubstanz = 3,8 g.

Luftstrom. — Temperatur 17,9—18,2° C.

Dauer des Versuches in Stunden	Menge des CO ₂ in mg	Menge des CO ₂ in mg auf 100 g frische Substanz berechnet	Menge des CO ₂ in mg in 1 Stunde auf 100 g frische Substanz berechnet	Menge des CO ₂ in mg in 1 Stunde auf 100 g Trockensubstanz berechnet
	Pyrogallollösung 80 ccm u. Wasserstoffsperoxyd 80 ccm			
16	33,3	128,1	8,0	54,8
24	41,8	160,8	6,7	45,8
24	63,9	245,8	10,2	70,1
24	10,7	41,2	1,7	11,7
88	149,7	575,8	6,5	44,8

Tabelle XXIII.

Erfrorene Wurzeln der Zuckerrübe.

Menge der Substanz = 30 g. — Trockensubstanz = 6,4 g.

Luftstrom. — Temperatur 17,9—18,2° C.

Dauer des Versuches in Stunden	Menge des CO ₂ in mg	Menge des CO ₂ in mg auf 100 g frische Substanz berechnet	Menge des CO ₂ in mg in 1 Stunde auf 100 g frische Substanz berechnet	Menge des CO ₂ in mg in 1 Stunde auf 100 g Trockensubstanz berechnet
	Pyrogallollösung 80 ccm u. Wasserstoffsperoxyd 80 ccm			
16	24,1	80,3	5,0	23,5
24	30,7	102,3	4,3	19,9
24	0,6	2,0	0,08	0,4
24	1,3	4,3	0,2	0,8
88	56,7	189,0	2,1	10,1

III. Versuch.

Tabelle XXIV.

Erfrorene Blätter der Zuckerrübe.

Menge der Substanz = 37 g. — Trockensubstanz = 4,7 g.

Luftstrom. — Temperatur 16,0—18,1° C.

Dauer des Versuches in Stunden	Menge des CO ₂ in mg	Menge des CO ₂ in mg auf 100 g frische Substanz berechnet	Menge des CO ₂ in mg in 1 Stunde auf 100 g frische Substanz berechnet	Menge des CO ₂ in mg in 1 Stunde auf 100 g Trockensubstanz berechnet
	Pyrogallol- lösung 80 ccm			
23	26,2	70,8	3,1	24,2
22	33,2	89,7	4,1	32,1
24	56,5	152,7	6,4	50,1
24	27,9	75,4	3,1	24,7
28	17,2	46,5	1,7	13,1
121	161,0	435,1	3,6	28,3

Tabelle XXV.

Erfrorene Wurzeln der Zuckerrübe.

Menge der Substanz = 25 g. — Trockensubstanz = 6,1 g.

Luftstrom. — Temperatur 16,0—18,1° C.

Dauer des Versuches in Stunden	Menge des CO ₂ in mg	Menge des CO ₂ in mg auf 100 g frische Substanz berechnet	Menge des CO ₂ in mg in 1 Stunde auf 100 g frische Substanz berechnet	Menge des CO ₂ in mg in 1 Stunde auf 100 g Trockensubstanz berechnet
	Pyrogallol- lösung 80 ccm			
23	9,1	36,4	1,6	6,5
22	9,0	36,0	1,6	6,7
24	22,4	89,6	3,7	15,3
24	6,5	26,0	1,1	4,4
28	12,1	48,4	1,7	7,1
121	59,1	236,4	1,9	8,0

Versuch III.

Tabelle XXVI.

Erfrorene Blätter der Zuckerrübe.

Menge der Substanz = 37 g. — Trockensubstanz = 4,7 g.

Luftstrom. — Temperatur 16—18,1° C.

Dauer des Versuches in Stunden	Menge des CO ₂ in mg	Menge des CO ₂ in mg auf 100 g frische Substanz berechnet	Menge des CO ₂ in mg in 1 Stunde auf 100 g frische Substanz berechnet	Menge des CO ₂ in mg in 1 Stunde auf 100 g Trockensubstanz berechnet
	Pyrogallollösung 80 ccm und Wasserstoff- superoxyd 80 ccm			
48	389,0	1051,4	21,9	172,4
48	43,4	117,3	2,4	19,2
48	53,1	143,5	3,0	23,5
144	485,5	1312,2	9,1	71,7

Tabelle XXVII.

Erfrorene Wurzeln der Zuckerrübe.

Menge der Substanz = 25 g. — Trockensubstanz = 6,1 g.

Luftstrom. — Temperatur 16—18,1° C.

Dauer des Versuches in Stunden	Menge des CO ₂ in mg	Menge des CO ₂ in mg auf 100 g frische Substanz berechnet	Menge des CO ₂ in mg in 1 Stunde auf 100 g frische Substanz berechnet	Menge des CO ₂ in mg in 1 Stunde auf 100 g Trockensubstanz berechnet
	Pyrogallollösung 80 ccm und Wasserstoff- superoxyd 80 ccm			
48	368,6	1474,4	30,7	125,9
48	42,5	170,0	3,5	14,5
48	59,8	239,2	5,0	20,4
144	470,9	1883,6	13,1	53,6

Wenn wir nun die Menge des ausgeschiedenen Kohlendioxyds in Milligramm in einer Stunde auf 100 g Trockensubstanz berechnet berücksichtigen, so ergeben sich nachstehende Quantitäten:

Durch Einwirkung von reiner Pyrogallollösung beim Blattwerk finden wir eine Menge von 22,8—28,3 mg CO₂, bei der Wurzel 8—10,7 mg CO₂.

Durch Einwirkung von Pyrogallollösung und Wasserstoff-superoxyd ergibt sich eine Menge bei dem Blattwerk von 38,2 bis 71,7 mg, bei der Wurzel eine solche von 9,6—53,6 mg CO₂.

Um die Exaktheit der Methode von W. Palladin zu prüfen, haben wir folgende Versuche angestellt:

Das Blattwerk und die Wurzel der Zuckerrübe wurden zerkleinert, langsam getrocknet, zerrieben und sodann das restierende Pulver bei 150° 14 Stunden getrocknet. Durch das Trocknen über 70° wird nach Aso die Tätigkeit der Oxydase aufgehoben.¹⁾

Die Intensität der Abscheidung des Kohlendioxyds unter Einwirkung von Pyrogallollösung, sowie Pyrogallollösung und Wasserstoffsuperoxyd gleichzeitig, ist aus den Tabellen XXVIII bis XXXV ersichtlich.

Die Menge des Kohlendioxyds in Milligramm in einer Stunde auf 100 g Trockensubstanz, berechnet unter Einwirkung von Pyrogallollösung, beziffert sich bei dem getrockneten Blattwerk auf 2,6—9,5 mg CO₂ und steigt unter Einwirkung von Pyrogallollösung und Wasserstoffsuperoxyd auf 10,2—16,5 mg CO₂.

Bei der getrockneten Wurzel beträgt die Menge des Kohlendioxyds in Milligramm in 1 Stunde auf 100 g Trockensubstanz berechnet unter Einwirkung von Pyrogallollösung 1,4—8,8 mg CO₂ und steigt unter Einwirkung von Pyrogallollösung und Wasserstoffsuperoxyd auf 3,6—13,3 mg CO₂.

Wenn wir diese Resultate mit den erfrorenen nicht getrockneten Blättern und Wurzeln der Zuckerrübe vergleichen, so sehen wir, daß wir doch gewisse Prozente des gesamt ausgeschiedenen Kohlendioxyds dem reinen Chemismus zuschreiben

¹⁾ Carl Oppenheimer, «Die Fermente und ihre Wirkungen», Leipzig 1903.

müssen, ohne daß die Einwirkung der Enzyme in Betracht gezogen werden kann.¹⁾ Das beste Beispiel sehen wir daran, wenn wir Wasserstoffsperoxyd auf die 20%ige Pyrogallollösung einwirken lassen. Durch den Einfluß des Wasserstoffsperoxyds auf die Pyrogallollösung entstehen schon Oxydationsprozesse, durch welche sich Kohlendioxyd bildet.

Wir fanden schon nach 24 Stunden 26,7—60 mg, in weiteren 24 Stunden 40—44 mg, nach dem dritten Tag 23,7 bis 40 mg und am vierten Tag sinkt jedoch die Menge auf 2—7 mg CO₂.

Weiters haben wir auch Versuche mit Knochen- und Holzkohle angestellt, woselbst wir wahrnehmen konnten, daß durch Pyrogallollösung und Wasserstoffsperoxyd eine Abscheidung des Kohlendioxyds verursacht wird.

Wir fanden bei der Knochenkohle nachstehende Quantitäten von Kohlendioxyd:

Die Menge des Kohlendioxyds in Milligramm in einer Stunde auf 100 g Trockensubstanz berechnet unter Einwirkung von Pyrogallollösung beziffert sich auf 1 mg und steigt unter Einwirkung von Pyrogallollösung und Wasserstoffsperoxyd auf 5,1 mg CO₂. (Siehe Tabelle XXXVI und XXXVII.)

Bei der Holzkohle konnten wir folgende Quantitäten von Kohlendioxyd konstatieren:

Die Menge des Kohlendioxyds in Milligramm in einer Stunde auf 100 g Trockensubstanz berechnet unter Einwirkung von Pyrogallollösung beläuft sich auf 1,6 mg und sinkt unter Einwirkung von Pyrogallollösung und Wasserstoffsperoxyd auf 1,1 mg CO₂. (Siehe Tabelle XXXVIII und XXXIX.)

Die Abscheidung von Kohlendioxyd bei der Knochen- und Holzkohle erfolgt durch die Vorgänge der Autoxydation. Die Aktivierung des Sauerstoffes in der Knochen- und Holzkohle geht ziemlich energisch vor sich und die beiden Kohlen zeigen Autoxydationswirkungen.

¹⁾ Kastle und Loevenhart ziehen die wirkliche Enzymnatur der Oxygenasen in Zweifel und sehen den Vorgang als einen mehr chemischen an. Carl Oppenheimer, Die Fermente und ihre Wirkungen.

I. Versuch.

Tabelle XXVIII.

Getrocknete Blätter der Zuckerrübe.

Menge der Substanz = 18 g. — Temperatur 17,5—18,1° C.

Luftstrom.

Dauer des Versuches in Stunden	Menge des CO ₂ in mg	Menge des CO ₂ in mg auf 100 g Substanz berechnet	Menge des CO ₂ in mg in 1 Stunde auf 100 g Trockensubstanz berechnet
	Pyrogallollösung 80 ccm		
17	4,4	24,4	1,4
18	22,3	123,9	6,9
25	8,3	46,1	1,8
22	17,8	98,9	4,5
48	8,6	47,8	0,9
130	61,4	341,1	2,6

Tabelle XXIX.

Getrocknete Wurzeln der Zuckerrübe.

Menge der Substanz = 28 g. — Temperatur 17,5—17,9° C.

Luftstrom.

Dauer des Versuches in Stunden	Menge des CO ₂ in mg	Menge des CO ₂ in mg auf 100 g Substanz berechnet	Menge des CO ₂ in mg in 1 Stunde auf 100 g Trockensubstanz berechnet
	Pyrogallollösung 80 ccm		
17	3,4	12,1	0,7
18	17,1	61,1	3,4
25	9,2	32,9	1,3
22	6,4	22,9	1,0
48	15,4	55,0	1,1
130	51,5	183,9	1,4

I. Versuch.

Tabelle XXX.

Getrocknete Blätter der Zuckerrübe.

Menge der Substanz = 18 g. — Temperatur 17,5—18,1° C.

Luftstrom.

Dauer des Versuches in Stunden	Menge des CO ₂ in mg	Menge des CO ₂ in mg auf 100 g Substanz berechnet	Menge des CO ₂ in mg in 1 Stunde auf 100 g Trockensubstanz berechnet
	Pyrogallollösung 80 ccm und Wasserstoffsupper- oxyd 80 ccm		
23	58,0	322,2	14,0
27	31,3	173,9	6,4
24	40,7	226,1	9,4
24	49,8	276,7	11,5
98	179,8	998,9	10,2

Tabelle XXXI.

Getrocknete Wurzeln der Zuckerrübe.

Menge der Substanz = 28 g. — Temperatur 17,5—18,1° C.

Luftstrom.

Dauer des Versuches in Stunden	Menge des CO ₂ in mg	Menge des CO ₂ in mg auf 100 g Substanz berechnet	Menge des CO ₂ in mg in 1 Stunde auf 100 g Trockensubstanz berechnet
	Pyrogallollösung 80 ccm und Wasserstoffsupper- oxyd 80 ccm		
23	17,1	61,1	2,7
27	29,0	103,6	3,8
48	52,1	186,1	3,9
98	98,2	350,7	3,6

II. Versuch.

Tabelle XXXII.

Getrocknete Blätter der Zuckerrübe.

Menge der Substanz = 16,83 g, getrocknet bei 150° C.

Luftstrom. — Temperatur 18—20° C.

Dauer des Versuches in Stunden	Menge des CO ₂ in mg	Menge des CO ₂ in mg auf 100 g Substanz berechnet	Menge des CO ₂ in mg in 1 Stunde auf 100 g Trocken- substanz berechnet
	Pyrogallollösung 80 ccm		
24	51,7	307,2	12,8
24	37,2	221,0	9,2
24	30,7	182,4	7,6
24	34,6	205,6	8,5
96	154,2	916,2	9,5

Tabelle XXXIII.

Getrocknete Wurzeln der Zuckerrübe.

Menge der Substanz = 16,45 g, getrocknet bei 150° C.

Luftstrom. — Temperatur 18—20° C.

Dauer des Versuches in Stunden	Menge des CO ₂ in mg	Menge des CO ₂ in mg auf 100 g Substanz berechnet	Menge des CO ₂ in mg in 1 Stunde auf 100 g Trocken- substanz berechnet
	Pyrogallollösung 80 ccm		
24	33,7	204,9	8,5
24	40,0	243,2	10,1
24	34,0	206,7	8,6
24	32,1	195,1	8,1
96	139,8	849,8	8,8

II. Versuch.

Tabelle XXXIV.

Getrocknete Blätter der Zuckerrübe.

Menge der Substanz = 16,83 g, getrocknet bei 150° C.

Luftstrom. — Temperatur 18—20° C.

Dauer des Versuches in Stunden	Menge des CO ₂ in mg	Menge des CO ₂ in mg auf 100 g Substanz berechnet	Menge des CO ₂ in mg in 1 Stunde auf 100 g Trockensubstanz berechnet
	Pyrogallollösung 80 ccm und Wasserstoff- superoxyd 80 ccm		
24	68,3	405,8	16,9
24	88,1	523,5	21,8
24	43,6	259,1	10,8
72	200,0	1188,4	16,5

Tabelle XXXV.

Getrocknete Wurzeln der Zuckerrübe.

Menge der Substanz = 16,45 g, getrocknet bei 150° C.

Luftstrom. — Temperatur 18—20° C.

Dauer des Versuches in Stunden	Menge des CO ₂ in mg	Menge des CO ₂ in mg auf 100 g Substanz berechnet	Menge des CO ₂ in mg in 1 Stunde auf 100 g Trockensubstanz berechnet
	Pyrogallollösung 80 ccm und Wasserstoff- superoxyd 80 ccm		
24	61,6	374,5	15,6
24	51,8	314,9	13,1
24	44,6	271,1	11,2
72	158,0	960,5	13,3

Tabelle XXXVI.

Versuche mit Knochenkohle, bei 150° C. getrocknet.

Menge der Substanz = 230 g. — Temperatur 18,5—18,9° C.

Luftstrom.

Dauer des Versuches in Stunden	Menge des CO ₂ in mg	Menge des CO ₂ in mg auf 100 g Substanz berechnet	Menge des CO ₂ in mg in 1 Stunde auf 100 g Trockensubstanz berechnet
	Pyrogallollösung 80 ccm		
16	39,5	17,2	1,1
25	34,8	15,1	0,6
23	75,6	32,9	1,4
48	114,4	49,7	1,0
112	264,3	114,9	1,0

Tabelle XXXVII.

Versuche mit Knochenkohle, bei 150° C. getrocknet.

Menge der Substanz = 230 g. — Temperatur 17,5—19,2° C.

Luftstrom.

Dauer des Versuches in Stunden	Menge des CO ₂ in mg	Menge des CO ₂ in mg auf 100 g Substanz berechnet	Menge des CO ₂ in mg in 1 Stunde auf 100 g Trockensubstanz berechnet
	Pyrogallollösung 80 ccm und Wasserstoffsper- oxyd 80 ccm		
6	322,6	140,3	23,4
16	348,5	151,5	9,5
31	235,1	102,2	3,3
45	240,4	104,5	2,3
98	1146,6	498,5	5,1

Tabelle XXXVIII.

Versuche mit Holzkohle.

Menge der Substanz = 90 g. — Temperatur 18—20° C.

Luftstrom.

Dauer des Versuches in Stunden	Menge des CO ₂ in mg	Menge des CO ₂ in mg auf 100 g Substanz berechnet	Menge des CO ₂ in mg in 1 Stunde auf 100 g Trockensubstanz berechnet
	Pyrogallollösung 80 ccm		
24	37,3	41,4	1,7
24	30,3	33,7	1,4
24	38,1	42,3	1,8
72	105,7	117,4	1,6

Tabelle XXXIX.

Versuche mit Holzkohle.

Menge der Substanz = 90 g. — Temperatur 18—20° C.

Luftstrom.

Dauer des Versuches in Stunden	Menge des CO ₂ in mg	Menge des CO ₂ in mg auf 100 g Substanz berechnet	Menge des CO ₂ in mg in 1 Stunde auf 100 g Trockensubstanz berechnet
	Pyrogallollösung 80 ccm und Wasserstoff- superoxyd 80 ccm		
24	40,3	44,8	1,9
24	21,5	23,9	1,0
24	10,2	11,3	0,5
72	72,0	80,0	1,1

Tabelle XL.

Versuche mit Knochenkohle bei 150° getrocknet.
Menge der Substanz = 281 g. — Temperatur 17,5—18,5° C.
Luftstrom.

Dauer des Versuches in Stunden	Menge des CO ₂ in mg	Menge des CO ₂ in mg auf 100 g Substanz berechnet	Menge des CO ₂ in mg in 1 Stunde auf 100 g Trockensubstanz berechnet
	Wasser		
16	17,9	6,4	0,4
25	12,9	4,6	0,2
23	6,5	2,3	0,1
48	12,8	4,6	0,1
6	17,3	6,2	1,0
16	8,6	3,1	0,2
31	40,1	14,3	0,5
45	21,3	7,6	0,2
210	137,4	48,9	0,2

Aus unseren zahlreichen Versuchen geht nachstehendes hervor:

100 g Knochenkohle mit 30 g Wasser entwickeln bei einer Temperatur von 20° C. binnen 1 Stunde 0,3 mg CO₂. Bei 150° C. getrocknet entwickelt dasselbe Quantum von Knochenkohle sowie Wasser innerhalb derselben Zeit durchschnittlich 0,2 mg CO₂.

100 g Holzkohle mit 30 g Wasser entwickeln bei einer Temperatur von 20° C. in 1 Stunde 0,3 mg CO₂. Bei 150° C. getrocknet entwickelt dieselbe Menge von Holzkohle und Wasser innerhalb der gleichen Zeit durchschnittlich ebenfalls 0,3 mg CO₂.

Die Autoxydationswirkungen können wir auch in der Stein- und Braunkohle beobachten.¹⁾

¹⁾ Moritz Traube, Gesammelte Abhandlungen, Berlin 1899.

C. Engler und J. Weissberg, Kritische Studien über die Vorgänge der Autoxydation, Braunschweig 1904.

J. Habermann, Einige Versuche über die Autoxydation der Steinkohle, Journal für Gasbeleuchtung, 1906.

Wir haben viele Experimente über die Autoxydation der Stein- und Braunkohle längere Zeit vorgenommen und daselbst gefunden, daß wir doch die Existenz der Peroxydase bei der Stein- und Braunkohle annehmen können. Durch vergleichende Atmungsversuche mit sterilisierter und nicht sterilisierter Stein- und Braunkohle weiters durch Anwendung der Methode von W. Palladin und seiner Schüler ist es uns gelungen, den Nachweis zu liefern, daß die Abscheidung des Kohlendioxyds

1. durch Autoxydation und
2. durch die enzymatische Wirkung erfolgt.

Die Abscheidung des Methans und des Wasserstoffes wird bloß durch die Peroxydase hervorgerufen.

III.

Isolierung der Rohenzyme.

Zur Isolierung der Rohenzyme wurden gewöhnlich 5--6 kg junge und frische Pflanzensubstanz verwendet.

Die frische Pflanzenmaterie, welche keinerlei Zersetzung durch Fäulnis aufweisen darf, wurde zerstückelt und der Saft aus der so erhaltenen Masse unter einem Drucke von 300—400 Atmosphären ausgepreßt.

Dem so gewonnenen Saft wird ein Gemisch von Alkohol und Äther zugesetzt, worauf ein an Eiweißstoffen reicher Niederschlag sich absetzt.

Diese Operation geschah in einem hohen Zylinder, welchen man vor dem Gebrauche mit Sublimat und sterilisiertem Wasser ausschweifte.

Auf 500 ccm des zellfreien Saftes verwendeten wir 600 ccm eines Gemenges von Alkohol und Äther und zwar 400 ccm Alkohol und 200 ccm Äther. Nach einem Augenblicke setzt man Äther im Überschusse zu und die oberhalb des Niederschlages aus Alkohol und Äther bestehende Flüssigkeit wird sofort aufgehebert. Nun wird neuerdings Äther aufgegossen und sodann sofort die überstehende Flüssigkeit abgehebert.

Filtration des Niederschlages, welcher das Rohenzym enthält.

Der ganze Vorgang bei Fällung des Pflanzensaftes muß rasch vorgenommen werden, sodaß Alkohol und Äther nur möglichst kurze Zeit auf das Enzym einzuwirken vermögen und infolgedessen seine Aktivität nicht abschwächen. Die Flüssigkeit über dem Niederschlag wird deshalb rasch abgegossen oder abgehebert und der so gewonnene, das gärungserregende Enzym enthaltende Niederschlag sofort abfiltriert. Die Filtration läßt sich am schnellsten mittels Leinwand bewerkstelligen. Auf die sterile Leinwand wird die erhaltene Masse aufgeschüttelt und auf die Weise des noch anhaftenden Alkohols und Äthers entledigt, daß man mit dem Filter auf und ab gerichtete, hutschenartige Bewegungen ausführt. War das das Enzym enthaltende Sediment (Rohenzym) gut ausgeschieden, so ist die Filtration in einigen Minuten vollzogen.

Trocknung des das Enzym enthaltenden Niederschlages.

Das so filtrierte Rohenzym wurde entweder im Vakuum oder in sterilen, zu diesem Zwecke besonders arrangierten Kolben getrocknet.

Diese Kolben waren, wie folgt, zusammengestellt: In den Hals jedes der Kolben war ein dreifach gebohrter Kautschukstöpsel eingepaßt, Durch die eine dieser Öffnungen ging eine ziemlich breite, knieförmig gebogene Röhre, welche bis fast an den Boden des Kolbens reichte und mit Watte gefüllt war. In die zweite Öffnung des Stopfens war eine kurze, gerade Röhre gesteckt, die ebenfalls mit Watte gefüllt war, und knapp unter dem Stopfen mündete. Die dritte Öffnung war mittels einer Glasstange verschlossen, welche, sobald die Kolben einer dreifachen fraktionierten Sterilisation unterworfen waren, durch ein Thermometer ersetzt wurde. Das Thermometer wurde, bevor man es in den betreffenden Kolben eingelassen hatte, gründlich mit einer Sublimatlösung abgewaschen und dann auf die Weise abgesengt, daß es in Alkohol getaucht und die sehr schwache Alkoholschicht angezündet wurde.

Sodann erfolgte die Wägung jedes der Kolben.

Unter Beobachtung aller Kautelen gegen die Invasion von Mikroben wurde hierauf in die Kolben ein bestimmtes Quantum des ausgesüßten Niederschlages eingetragen und dessen Trocknung durchgeführt. Die Kolben mit dem Enzym wurden nämlich in kupferne Trockenapparate getan, in welchen eine Temperatur von ca. 36—38° C. erhalten und sterilisierte Luft in starkem Strome in der Weise durchgetrieben worden ist, daß die kurze, unterhalb des Stopfens in den Kolbenhals mündende Röhre mit einer Wasserpumpe in Verbindung gebracht wurde, während die längere Röhre, welche fast bis an den Boden des Kolbens reichte, mit etlichen Waschflaschen, die eine konzentrierte Lösung von Sublimat enthielten, und mit etlichen Zylindern, in deren, mit steriler Watte gefülltem Innern mehrere übereinander geschichtete Lagen feinkörnigen Thymols untergebracht waren, verbunden worden ist.

Der eigentliche Versuch.

Nachdem das Rohenzym durch die Trocknung vollständig vom Alkohol und Äther befreit worden war, wurden die Kolben neuerdings gewogen und nach Abschlag des ursprünglichen Gewichtes die Gewichtsmenge des Rohenzym fixiert, welche zum Versuche verwendet wurde. In die Kolben wurde nun ein Antiseptikum getan und eine entsprechende Zucker-, und zwar vorwiegend Glukoselösung hinzugegossen, welche man vorher einer dreifachen, fraktionierten Sterilisation unterwarf.

Es gelangten 50 ccm der Lösung unter Zusatz von 0,5 g K_3PO_4 zur Verwendung, während das Gewicht des Rohenzym 6—10 g betrug.

In dem Falle, wo nach dem Versuche der Verlust an Glukose bestimmt wurde, gingen wir in der Weise vor, daß die Zuckerlösung nicht in die Kolben mit dem getrockneten Rohenzym gegossen, wobei stets Verluste an Glukose entstehen, sondern daß das getrocknete und abgewogene Rohenzym in die entsprechende quantitativ vorbereitete Glukoselösung hineingeschüttelt wurde.

Der für diese Zwecke verwendete, das Rohenzym enthaltende Niederschlag wurde allerdings nicht im Kolben ge-

trocknet, sondern im Vakuum, welches vorher gründlich mit Formalin ausgewaschen, worauf es luftdicht verschlossen und mit der Luftpumpe verbunden wurde.

Der Niederschlag wird behufs Studiums der Gärwirkung in eine 15 %ige sterilisierte Glukoselösung getan. Die Versuche mit dem die Gärung hervorrufenden Rohenzym wurden in folgender, auf der nachstehenden Abbildung (siehe Fig. 1) deutlich veranschaulichten Weise durchgeführt. Durch den Hals des Gasentwicklungskolbens G, welcher 500 ccm faßt, geht ein genaues Thermometer t, weiter eine Röhre mit einem zylindrischen Trichter T und schließlich eine Gasabführungsröhre, welche mit einem Liebigschen Kühler K verbunden ist.

In dem Trichter T befindet sich ein Stückchen Thymol im Gewichte von 1—2 g. Der Kühler ist mit 2 U-Röhren CuSO_4 und CaCl_2 größeren Kalibers, die mit Kupfervitriolbimsstein und Chlorcalcium gefüllt sind, verbunden.

Die Luft, welche durch den Gasentwicklungskolben getrieben wurde, passiert zuerst einen mit sterilisierter Baumwolle gefüllten Zylinder C, dann die Sublimatlösung HgCl_2 und weiter die Lösung KOH. Der Entwicklungskolben G befindet sich in einem kupfernen Wasserbade WB, welches bis an den Hals des Kolbens hinanreicht, und in welchem ein gut fungierender Ätherthermoregulator TR angebracht ist. Auf der Figur finden wir ferner hinter der mit CaCl_2 gefüllten U-Röhre eine kleinere $\text{Na}_2\text{-CaO}_2$, die mit Natronkalk gefüllt ist; ihr folgt weiter der Geisslersche Apparat KOH, worauf noch zwei weitere U-Röhren eine kleinere und eine größere CaCl_2 und CaCl_2 , mit Chlorcalcium gefüllt, vorgelegt sind, und endlich sehen wir einen Aspirator das Apparatarangement schließen.

Alle Verbindungsstellen des ganzen Arrangements wurden mit Paraffin vergossen und der Inhalt des Kolbens G auf eine Temperatur von 37°C . gebracht, welche konstant durch die ganze Dauer des Versuchs erhalten wurde.

Das durch die Gärung entstandene Kohlendioxyd wurde alle 24 Stunden mittels keim- und kohlensäurefreier Luft und zwar von 6 l innerhalb 6 Stunden ausgetrieben und gewogen.

Manipulation nach Beendigung des Versuchs.

Nachdem der Versuch beendet war, d. i. nachdem kein wägbares Quantum von Kohlendioxyd gefunden werden konnte, impften wir aus dem Versuchskolben 3—4 Zuckergelatine- und Zuckeragarröhren, welche ebensolange beobachtet wurden, als der Versuch dauerte. Außerdem bereiteten wir zu jedem Versuche einen Kontrollkolben in folgender Weise vor.

Die gleiche Menge des Rohenzym als auch der Glukoselösung, wie sie zum ursprünglichen Versuche verwendet wurden, kochten wir durch eine Stunde im Kolben auf dem Sandbade, worauf die Wägung des Kolbens und eine dreifache, fraktionierte Sterilisation folgte. Dabei sahen wir darauf, daß die Lösung stets in demselben Konzentrationsgrade bleibe.

In diese Kolben wurden soviel und solche Antiseptika getan, als ihrer der ursprüngliche Versuch enthielt, und mittels einer sterilen Pipette übertrugen wir hierauf 5 ccm der Gärflüssigkeit nach absolvierter Gärung samt Niederschlag des Originalversuchs in dieselben.

Der Kontrollkolben wurde sodann wieder mit einem Kühler und einem Absorptionsapparate verbunden und hierauf täglich, wie beim ursprünglichen Versuche, die Menge des entstandenen Kohlendioxyds bestimmt.

Analytische Methoden:

1. Bestimmung des Kohlendioxyds.

Nach Beendigung des Versuches wurde eine gewisse Menge der Lösung abgemessen und das Kohlendioxyd nach der Methode Kolbe-Fresenius-Classen bestimmt.

Milchsäurebestimmung.

Zum Nachweise der Milchsäure benützten wir die bekannte Uffelmannsche Reagens. Zur Reindarstellung der Milchsäure haben wir $(C_3H_5O_3) Zn + 3 H_2O$ gewonnen und aus dem Zinklaktat die reine Milchsäure identifiziert.

Was die quantitative Bestimmung der Milchsäure anbelangt, haben wir die von uns bereits angegebene Methode Partheil benützt, welche, wie wir uns überzeugten, verläßliche Daten liefert.

Fig. 1

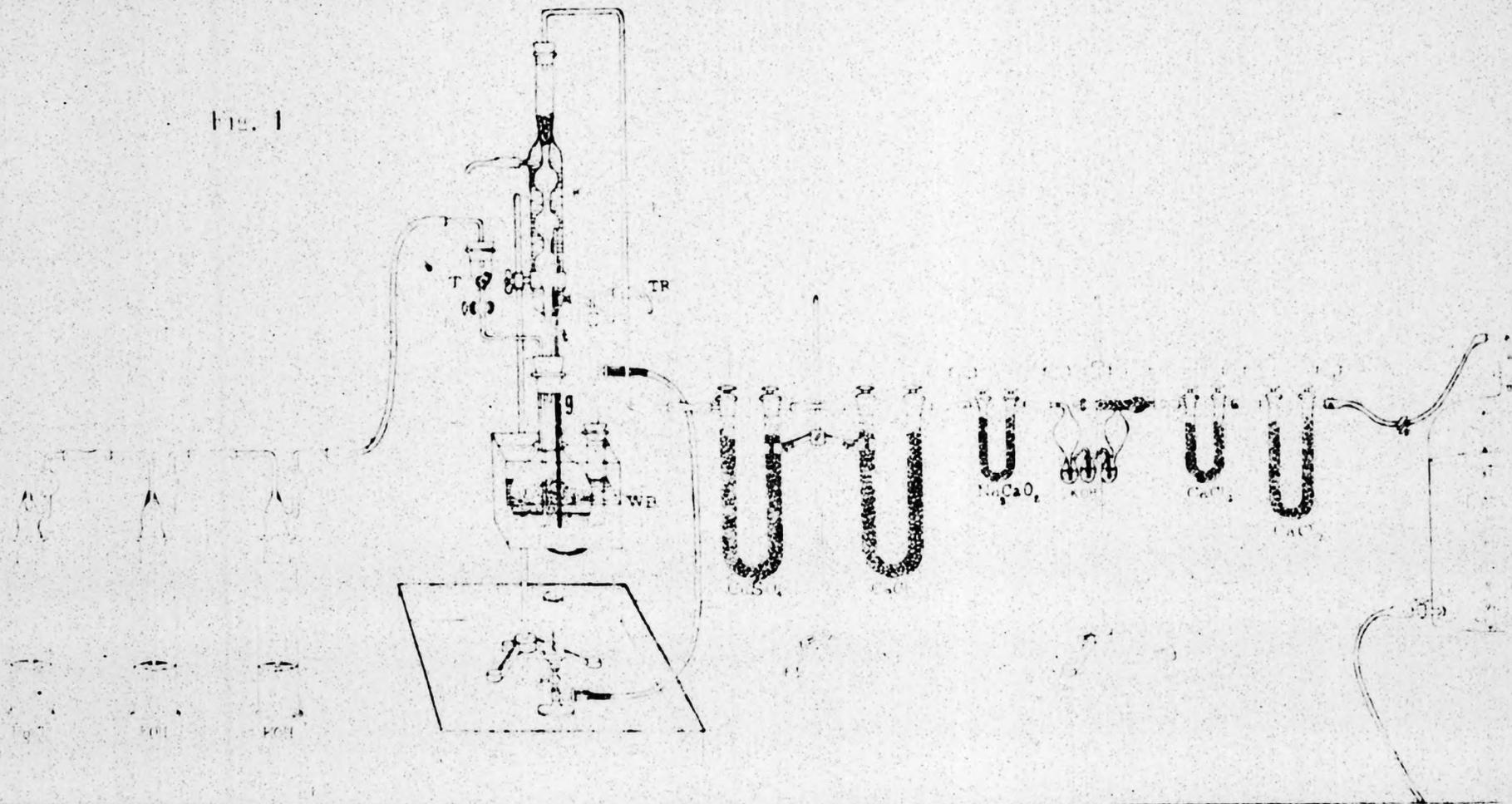
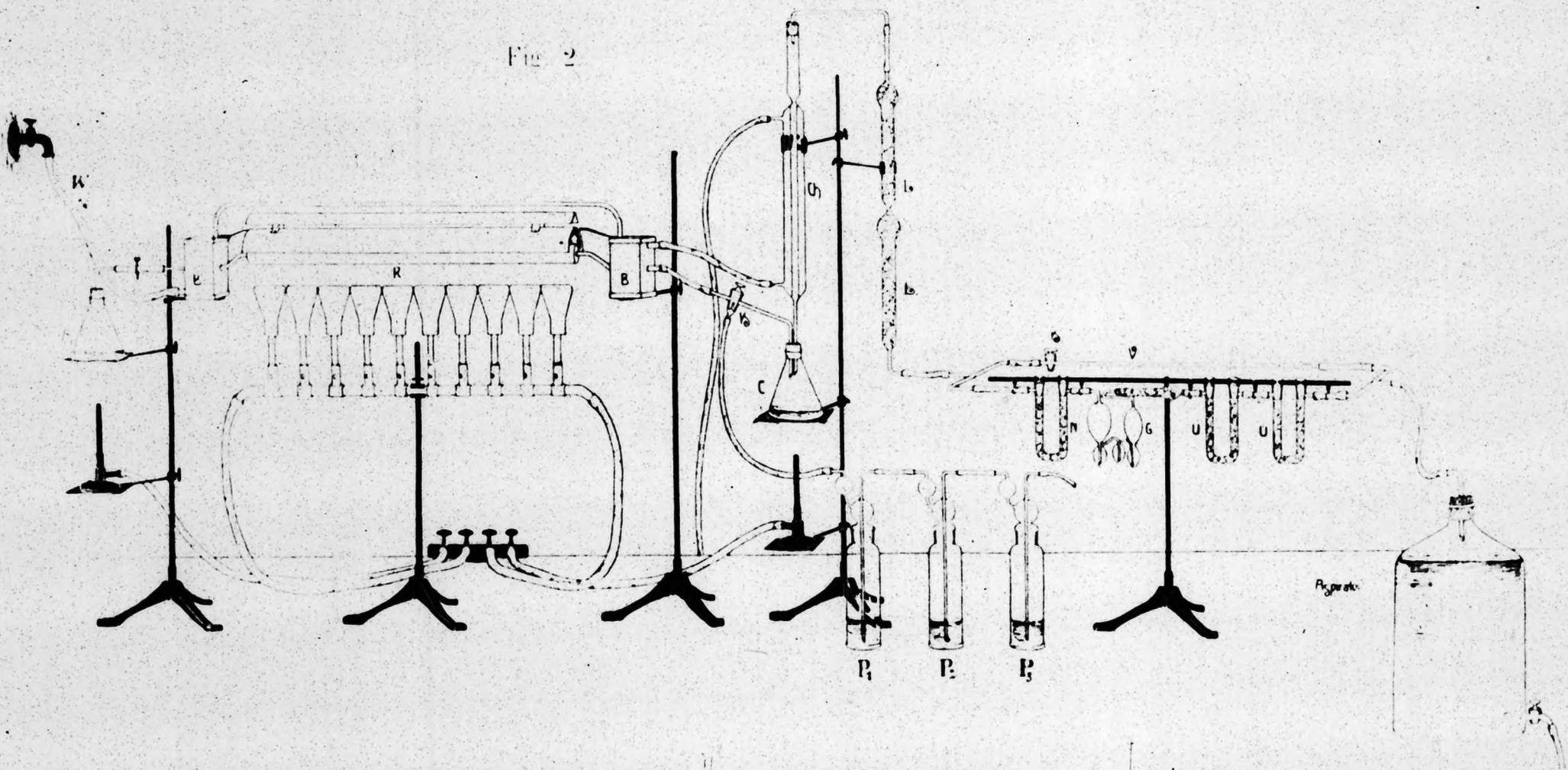


Fig. 2



Bestimmung des Alkohols.

Zum qualitativen Nachweis des Äthylalkohols bedienen wir uns nachstehender Methoden:

1. Die empfindliche Jodoformprobe nach Müntz.¹⁾
2. Die Reaktion von Berthelot und Baumann.

Man versetzt die zu untersuchende Flüssigkeit mit Benzoylchlorid und zerstört den Überschuß davon durch schwache Kalilauge. Es tritt der eigentümliche Geruch des Benzoësäureäthylesters hervor.

3. Der Alkohol läßt sich qualitativ in dem durch mehrfache Destillation gewonnenen Destillate ganz exakt nachweisen, wenn wir den Alkohol durch den Oxydationsprozeß in Aldehyd, Essigsäure und Kohlendioxyd verwandeln.²⁾ Zur Oxydation des Alkohols benutzten wir in einem besonders konstruierten Apparat die Chromsäure; die Oxydationsprodukte sammelten wir sodann in mittels Eis gekühltem Wasser unter Berücksichtigung der entweichenden Kohlensäure, welche letztere in Absorptionsapparaten zur Bestimmung aufgefangen wurde.

Zum Nachweis des Aldehyds verwendeten wir eine ammoniakalisch-alkalische Silberlösung, welche schon von Spuren von Aldehyd reduziert wird (Bildung eines Silberspiegels). Weiters dienten zum Nachweis des Aldehyds nachstehende Reaktionen:

1. Bildung von Aldehydharz durch Erhitzen mit konzentrierter NaOH.
2. Die Reaktion mit Nessler's Reagens nach Crismer.
3. Die Jodoformprobe nach Lieben.

Die quantitative Bestimmung des Alkohols.

Zur Bestimmung kleiner Mengen von Äthylalkohol, der zuvor qualitativ festgestellt wurde, benützt man zweierlei Methoden, denn bei einer Substanz wie Äthylalkohol, namentlich wenn man die zur Verfügung stehenden Mengen berücksichtigt, erscheint eine einzige Bestimmung nicht genügend. Erst wenn

¹⁾ Müntz, Ann. de ch. et de phys. Sér. 5, Bd. XIII, 1878.

²⁾ Georg Landsberg, Über den Alkoholgehalt tierischer Organe. Diese Zeitschrift 1904.

Fig. 1

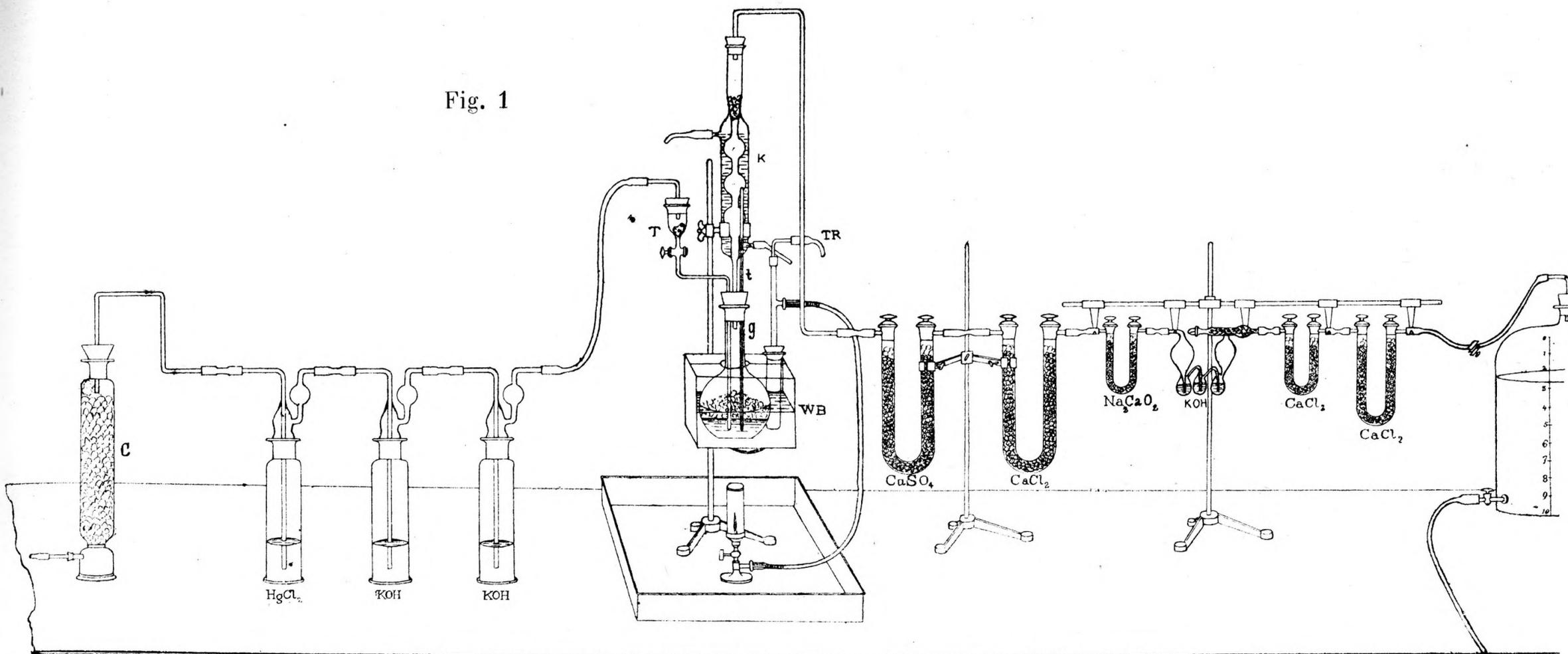
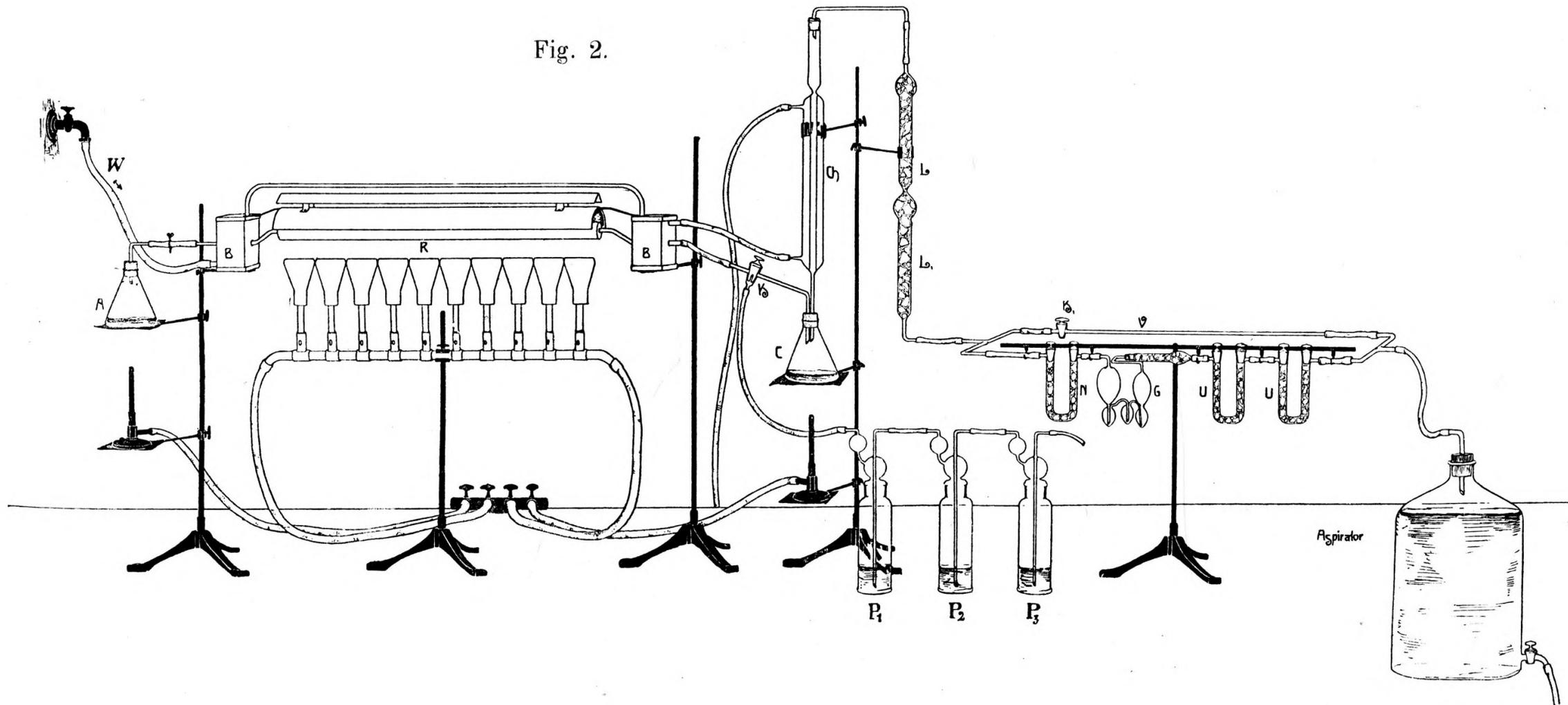


Fig. 2.



man auf zwei verschiedenen Wegen zu dem gleichen Resultate gelangt ist, kann dieses als verläßlich angesehen werden.

Die Bestimmung des Alkohols wird einerseits durch Ermittlung des spezifischen Gewichtes (Reischauer-Aubry), andererseits durch Verbrennung in einem Apparate ausgeführt, der von einem von uns¹⁾ konstruiert ist und dessen Beschreibung wir hier folgen lassen. (Siehe Fig. II.)

Der Apparat ist im Prinzip ein Verbrennungsrohr von nachstehender Einrichtung:

Ein kupfernes Rohr (R) vom Kaliber 2,5 cm und 60 cm Länge, welches mit drahtförmigem Kupferoxyd gefüllt ist, ist an beiden Enden mit Büchsenkühlern (BB) versehen. Von einer Seite fügt sich an das Rohr mittels eines Kautschukschlauches ein ca. 200 ccm fassender Erlenmeyerkolben (A) an, der mittels eines Quetschhahnes von dem Rohre R getrennt werden kann. Auf der anderen Seite ist das Verbrennungsrohr durch Kautschuk mit einer Glasröhre verbunden, die mit einem doppelt gebohrten Hahn (K) versehen ist, sodaß dieser in der einen Stellung (mit I bezeichnet) die Verbindung mit dem Kolben C herstellt, der mit dem Rückflußkühler (Ch) versehen ist. An letzteren schließt sich die Armatur der Austrocknungsapparate (L und L 1) mit wasserfreiem Kupfersulfat und Calciumchlorid und des weiteren einesteils die Absorptionsapparate für die Gewichtsbestimmung von CO₂ (N Natronkalk, G ein Geisslerscher Apparat mit konzentrierter Kalilauge, UU Sicherungsrohr mit Calciumchlorid, letzteres enthält auch zur Hälfte Natronkalk), andern-teils ein direkt zum Aspirator führendes Zweigrohr (V), welches mit einem einfach gebohrten Hahn (K 1) versehen ist. Der Hahn K mit doppelter Bohrung kann auch so gestellt werden, daß durch diese Stellung (mit II bezeichnet) das Verbrennungsrohr abgetrennt und die Verbindung mit den Waschflaschen P 1 (Barytwasser) P 2 P 3 (konzentrierte Kalilauge zur Zufuhr der CO₂-freien Luft) hergestellt wird. Um das Rohr R in Glüh-hitze zu versetzen, benützten wir ein System Bunsenscher Flammen mit Flachbrennern.

Der Vorgang bei der Arbeit ist der folgende:

¹⁾ Von A. Ernest.

1. Werden soweit als möglich alle Fehler, die vorkommen könnten, durch Absorption des in dem Apparat bereits vorhandenen CO_2 ausgeschieden.

In beide Erlenmeyerkolben (A und C) wird etwas destilliertes Wasser (ca. 20 ccm) gegeben, an das Verbrennungsrohr angeschlossen, der Quetschhahn bei dem Kolben A geöffnet, dem Hahn (K) die Stellung (I) gegeben und durch die Nebenleitung bei gleichzeitigem Öffnen des Hahnes (K 1) der Aspirator in Tätigkeit versetzt, wobei man das Wasser in beiden Kolben erhitzt, bis es zu sieden anfängt; der Sud wird etwa 5 Minuten lang wahren gelassen. Dann löscht man die Flammen aus, sperrt den Quetschhahn bei Kolben (A) ab und entzündet die Flammen unter dem Verbrennungsrohr. Nach einer Weile löschen wir die Flammen aus, geben sodann dem Hahn K die Stellung II und lassen durch Kolben C CO_2 -freie Luft durchleiten.

2. Die eigentliche Verbrennung:

Der Kolben A wird abgenommen, ein bestimmtes Volumen einer untersuchten wässrigen alkoholischen Lösung hineingetan und wieder eingestellt. Ist das Verbrennungsrohr bereits bis zur Weißglühhitze erhitzt, so wird die Nebenleitung (V) zum Aspirator durch den Hahn (K 1) abgesperrt, die Hähne der Absorptionsapparate für CO_2 sowie der Quetschhahn bei Kolben (A) geöffnet und die untersuchte Lösung mäßig (bis zu mäßigem Kochen) so lange erhitzt, bis $\frac{3}{4}$ des ursprünglichen Volumens abgedampft sind. Im Kolben C sammelt sich kondensiertes Wasser an und das durch die Verbrennung des Alkohols entstandene CO_2 wird durch den Aspirator in die Absorptionsapparate abgesaugt. Nachdem das angegebene Volumen abgedampft ist, gibt man dem Hahn (K) die Stellung (II), verlöscht die Flammen unter dem Verbrennungsrohr, stellt den Kolben (A) ab, damit er infolge des durch Auskühlen entstehenden Vakuums nicht springt, und erhitzt den Inhalt des Kolbens C unter mäßiger Durchleitung von CO_2 -freier Luft bis zum Kochen, welches 5 Minuten unterhalten wird. Dann löscht man einfach die Flamme aus, schließt sofort die (vor dem Versuch gewogenen) Absorptionsapparate, wiegt in üblicher Weise das CO_2 und berechnet die ihm äquivalente Menge Äthylalkohol. Es

empfiehlt sich, den Inhalt des Kolbens C im voraus auf Alkohol resp. Oxydationsprodukte zu dem Zwecke zu untersuchen, um sich zu überzeugen, ob derselbe vollständig verbrannt wurde. Vor jeder neuen Verbrennung muß man natürlich das eventuell reduzierte Kupferoxyd durch einen Luftstrom bei Weißglühhitze oxydieren.

Eine Bestimmung bei 50 ccm Lösung dauert 3—4 Stunden.

Nachstehend führen wir einige Resultate an, die wir durch Verbrennen bestimmter, im voraus festgestellter Mengen absoluten Alkohols erhalten haben. Der absolute Alkohol wurde aus verkäuflichem 99⁰/₀igen Alkohol durch Destillation mit wasserfreiem Calciumoxyd in eine mit etwas wasserfreiem Kupfersulfat gefüllte Flasche dargestellt. Der Alkohol wurde gewogen.

Es wurden 1,352 g absoluter Alkohol abgewogen, mit Wasser auf 1000 ccm verdünnt und in 50 ccm der Alkohol bestimmt.

Durchschnitt aus drei Verbrennungen 0,1283 g CO₂, was 0,0672 g Alkohol oder 99,49⁰/₀ der ursprünglich verwendeten Menge entspricht.

200 ccm derselben Lösung wurden auf 1000 ccm verdünnt und in 50 ccm dieser verdünnten Lösung wurde der Alkohol bestimmt.

Durchschnitt aus drei Verbrennungen 0,0260 g CO₂, entspricht 0,0136 g Alkohol oder 100,74⁰/₀ des verwendeten Alkohols.

Von der letzterwähnten Lösung wurden 100 ccm abpipettiert.

Durchschnitt aus zwei Verbrennungen 0,0504 g CO₂, entspricht 0,0264 g Alkohol oder 97,9⁰/₀ des verwendeten Alkohols.

In den angeführten Fällen wurden jedesmal ³/₄ des ursprünglichen Volumens abgedampft.

Von derselben Lösung wurden 100 ccm abpipettiert und nur ¹/₂ des ursprünglichen Volumens abgedampft.

Durchschnitt aus zwei Verbrennungen 0,0449 g CO₂, entspricht 0,0235 g Alkohol oder 87,03⁰/₀ des verwendeten Alkohols.

Es wurden 1,9723 g Alkohol abgewogen, auf 500 ccm verdünnt und in 50 ccm der Alkohol bestimmt; abgedampft wurden ³/₄ des ursprünglichen Volumens.

Durchschnitt aus zwei Verbrennungen 0,3788 g CO₂, entspricht 0,1986 g Alkohol oder 100,71 % des verwendeten Alkohols.

Von derselben Lösung wurden 50 ccm abpipettiert, mit 50 ccm Wasser verdünnt und bis auf $\frac{1}{4}$ des ursprünglichen Volumens abgedampft.

Durchschnitt aus zwei Verbrennungen 0,3705 g CO₂, entspricht 0,1943 g Alkohol oder 98,53 % des verwendeten Alkohols.

Abgewogene 2,7035 g Alkohol wurden auf 500 ccm verdünnt, in 50 ccm der Alkohol bestimmt, $\frac{3}{4}$ des ursprünglichen Volumens abgedampft.

Durchschnitt aus zwei Bestimmungen 0,5202 g CO₂, entspricht 0,2728 g Alkohol oder 100,91 % des verwendeten Alkohols.

Von derselben Lösung wurden 50 ccm abgewogen, 50 ccm Wasser zugesetzt und auf $\frac{1}{4}$ der ursprünglichen Lösung abgedampft.

Durchschnitt aus zwei Bestimmungen 0,5096 g CO₂, entspricht 0,2672 g Alkohol oder 98,85 % des verwendeten Alkohols.

Aus den hier angeführten Daten ist ersichtlich, daß man mindestens $\frac{3}{4}$ des ursprünglichen Volumens der Lösung zur Verdampfung bringen muß, soll man die Gewißheit erlangen, daß tatsächlich der gesamte Alkohol bereits verdampft ist. Man sieht ferner, daß bei Beobachtung aller Vorsichtsmaßregeln sehr günstige Resultate erzielt werden, aus welchen man in Verbindung mit der piknometrischen Bestimmung auf das Vorhandensein und die Menge des Alkohols schließen kann.

Wird der Alkohol nach Reischauer-Aubry und zwar durch sechsfache fraktionierte Destillation je abwechselnd aus schwach alkalischer und schwach saurer Lösung bestimmt, so kann man durch Verbrennen und Bestimmen des CO₂ gegenseitig die Richtigkeit der piknometrischen Bestimmung kontrollieren, was bei Ermittlung kleiner Mengen Alkohol unerläßlich ist.

Bestimmung der Essigsäure.

Die Essigsäure wurde aus den Lösungen, welche mit Schwefelsäure angesäuert wurden, mit Wasserdampf abgetrieben und dann im Destillate als Silberacetat, und zwar in farblosen Krystallen ausgeschieden. Die jedesmal vorgenommene Silber-

bestimmung ergab zwischen 62,3—65 % Ag. Die Theorie verlangt 64,64 % Ag im $C_2H_3O_2Ag$.

Resultate der Versuche mit Rohenzym.

In Tabelle XLI sind 9 Versuche verzeichnet, deren Resultate wir aus mehreren Beobachtungen als Durchschnitt angenommen haben.

Aus diesen Versuchen geht zur Evidenz hervor, daß wir tatsächlich den Nachweis erbrachten, daß die aus den Pflanzensäften, welche von Gewebeteilen und Zellen vollständig frei waren, durch absoluten Alkohol und Äther gewonnenen Niederschläge gärungserregende Enzyme enthalten. Die Rohenzyme haben in der Tat bei völliger Abwesenheit von Bakterien in der Glukose eine Milchsäure- und alkoholische Gärung hervorgerufen.

Daß tatsächlich nur die Enzyme die Gärung hervorriefen, dafür haben wir folgende Belege:

1. Bei der Überimpfung des Inhaltes des Versuchskolbens auf Zuckergelatine- und Zuckeragarplatten konnte keine Bakterienentwicklung nachgewiesen werden.

2. Eine Gärung in den Kontrollkolben nach Überimpfung eines Teiles des Inhaltes aus den Originalkolben (nach Absolvierung der Gärung in diesen) in die Kontrollkolben wurde nicht konstatiert; ferner: Die Menge des abgespaltenen Kohlendioxydes erschien so gering, daß sie höchstens binnen 50 Stunden 5—10 mg betrug. Natürlich sind diese Quanten von Kohlendioxyd sehr unbedeutend, wenn man auf die Gesamtmenge des Kohlendioxydes Rücksicht nimmt, welches sich bei der Gärung abspaltet; oder sie sind auf einen Versuchsfehler zurückzuführen.

Zu bemerken ist hier noch, daß wir in der bereits erwähnten Tabelle nur solche Versuche anführten, wovon wir genügend überzeugt waren, daß die Bakterien im Gärungskolben nicht mitgewirkt haben. Der beste Beweis, daß die Milchsäure- und alkoholische Gärung durch Enzyme hervorgerufen wurde, ist der, daß bei den gewonnenen Rohenzymen aus gefrorenen Pflanzenorganen in Glukoselösung keine Gärung beobachtet wurde, ja sogar ohne Antiseptikum binnen 48 Stunden. Bei Benützung von 1—2 % Salicylsäure wurde die Kohlendioxyd-

Tabelle XLI.

Die hier angeführten analytischen Daten sind aus 3—4 Versuchsergebnissen auf 10 g Rohenzym umgerechnet worden.
Temperatur 20° C.

Provenienz der isolierten Enzyme	Lösung, in der die Gärung vor sich geht	Verwendetes Antiseptikum	Dauer der Gärung in Stunden	Gesamt- menge der Milchsäure in g	Gesamt- menge des CO ₂ in g	Gesamt- menge des Alkohols in g
1. Wurzel der Zuckerrübe ¹⁾	15% Glukose	2% Salicylsäure	58	0,23	0,862	0,800
2. » » »	15% »	1% »	59	0,36	0,813	0,793
3. » » »	15% Fruktose	1% »	60	0,12	0,400	0,296
4. » » »	15% Glukose	2% »	38	0,08	0,386	0,289
5. » » »	15% »	2% »	54	0,09	0,268	0,245
6. Blätter » »	15% »	1% »	44	0,08	0,310	0,369
7. » » »	15% »	1% »	48	0,04	0,340	0,364
8. Knollen der Kartoffel	15% »	2% »	48	0,25	0,321	0,284
9. » » »	15% »	2% »	48	0,06	0,281	0,206

¹⁾ Die Rübe nach 60 Vegetationstagen.

abscheidung aus dem Gärkolben nach 5 Tagen nur in ganz minimalen Mengen konstatiert.

Die gewonnenen analytischen Resultate zeigen uns deutlich, daß in allen Fällen Milchsäure nachzuweisen war. Aus der Menge des gebildeten Alkohols und Kohlendioxyds ist zu ersehen, daß faktisch eine alkoholische Gärung vor sich gegangen ist.

Wir stellten sodann weitere Orientierungsversuche mit größeren Mengen von Rohenzym an und zwar gaben wir in dem Versuchskolben 23—25 g Enzym hinein und benützten 250 ccm 15%ige sterilisierte Glukoselösung. Als Antiseptikum wurde wieder 2,5 g Salicylsäure benützt.

In einem Kolben wurde kohlendioxydfreie Luft durchgeleitet, durch den anderen Versuchskolben ließen wir Wasserstoff durchströmen.

Im ersten Falle haben die Enzyme bei Sauerstoffzutritt den Gärungsprozeß hervorgerufen, im anderen Falle bei Sauerstoffabschluß.

Nach 52stündiger Gärung fanden wir nachstehende Resultate:

In Wasserstoffatmosphäre wurde gefunden:

$$\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3 = 0,528 \text{ g}$$

$$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH} = 1,263 \text{ »}$$

$$\text{CO}_2 = 1,392 \text{ »}$$

Bei Sauerstoffanwesenheit wurde konstatiert:

$$\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3 = 0,132 \text{ g}$$

$$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH} = 1,682 \text{ »}$$

$$\text{CO}_2 = 1,453 \text{ »}$$

$$\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2 = 0,321 \text{ »}$$

Ameisensäure konnten wir qualitativ nachweisen.

Die Gase, welche sich bei dem Abbau der Glukose bei Luftzutritt durch Enzymwirkung bilden, sind Kohlendioxyd und Wasserstoff. Beide diese Gase wurden qualitativ nachgewiesen. Die Entnahme derselben erfolgte aus einem Gärkolben. Die Bestimmung des Kohlendioxyds geschah nach den geschilderten Methoden. Sodann wurde das kohlendioxyd- und wasserdampffreie Gas durch einen Verbrennungsofen hindurchgetrieben. Die Einrichtung des letzteren war ganz analog jenem, der bei der elementaren Analyse

verwendet wird. Das aus dem Wasserstoff gebildete Wasser wurde in Chlorcalciumröhren absorbiert. Methan wurde nicht konstatiert, seine Abwesenheit wurde in beigeschlossenen Geissler'schen Apparaten bezw. durch Verbrennung gebildeter CO_2 mit Kaliumhydrat festgestellt.

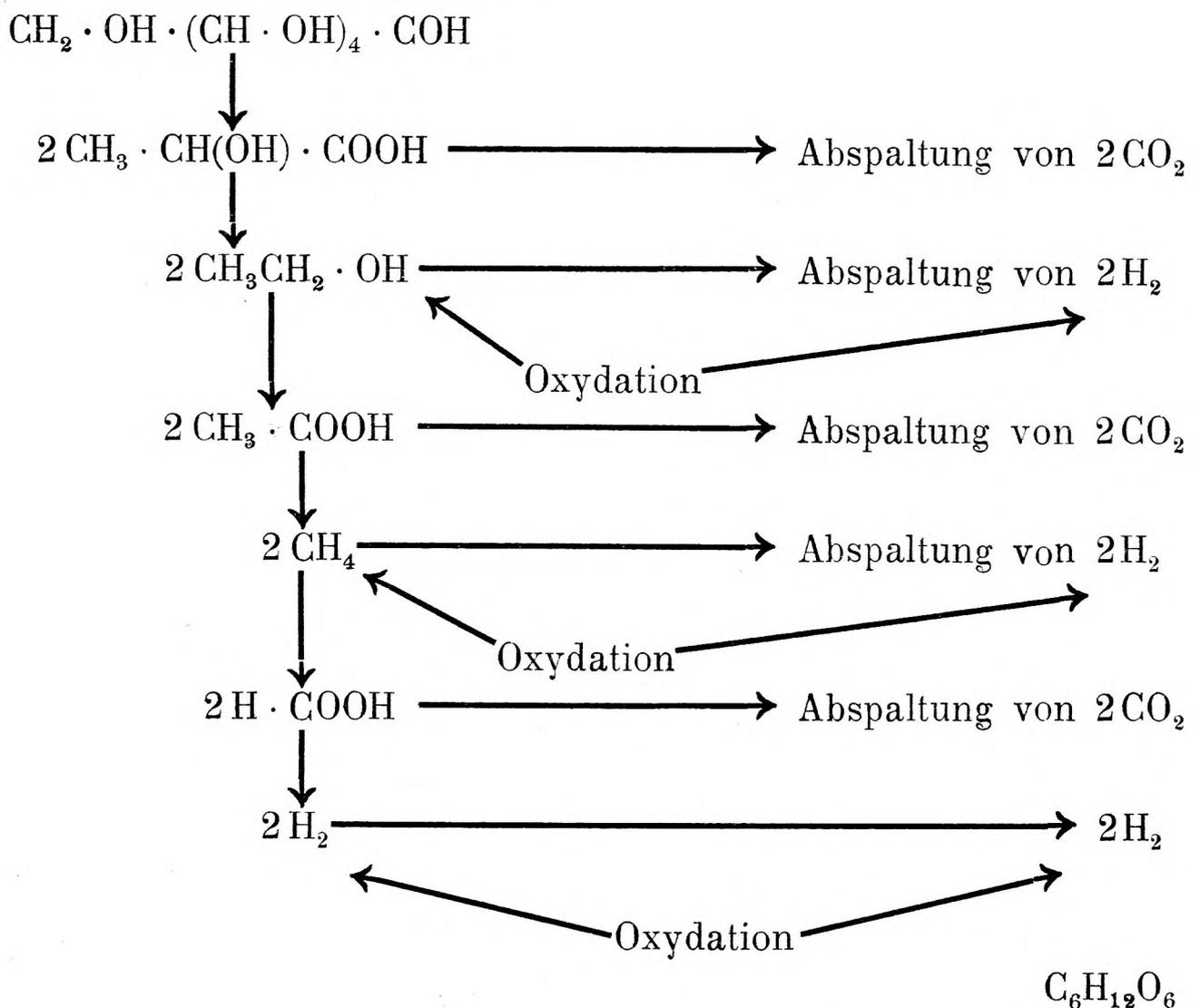
Wir fanden im 1. Falle auf 1,453 g gebildeten CO_2 0,098 g H.

Im 2. Falle fanden wir auf 1,2 g gebildeten CO_2 0,081 g H.

Im 3. Falle fanden wir auf 1,735 g gebildeten CO_2 0,045 g H.

Wir können uns vorstellen, daß der Abbau der Glukose bezw. der Fruktose in der Pflanzenzelle durch nachstehendes hypothetisches Schema charakterisiert wird.

Hypothetisches Schema des Abbaues der Glukose verursacht durch Atmungsenzyme.



Dieses hypothetische Schema hat auf Grund meiner Studien Kollege 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 — konstatiert.

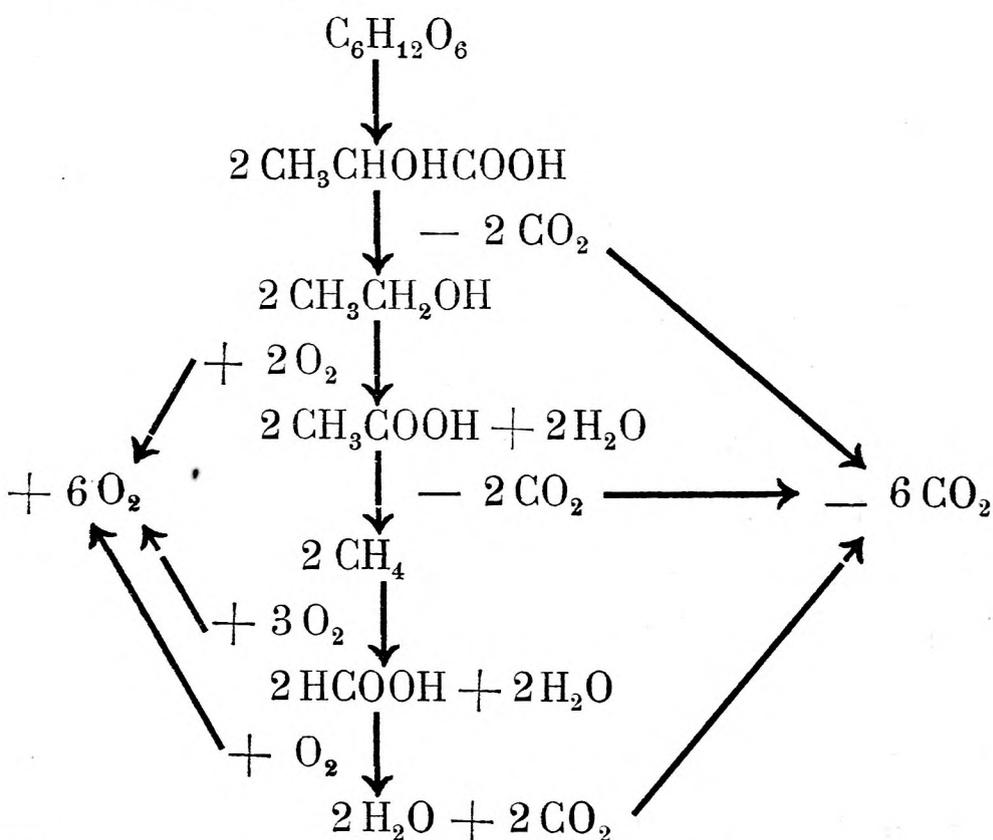
Dem Wasserstoff, welcher bei der Degradation der Kohlenhydrate und zwar durch die Wirkung der Atmungsenzyme als Endprodukt entsteht, ist in der chlorophyllhaltigen Zelle eine bedeutungsvolle Funktion bei der Assimilation des Kohlendioxyds zugewiesen. Es ist die Möglichkeit der Bildung von CH_2O durch Reduktion des CO_2 nach der Formel: $\text{CO}_2 + 4 \text{H} = \text{CH}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}$ nicht ausgeschlossen.

Viel wahrscheinlicher dürfte unsere Hypothese sein, daß das Kohlendioxyd durch Wasserstoff in statu nascendi zu Formaldehyd unter Einwirkung der Sonnenstrahlen in der chlorophyllhaltigen Zelle reduziert wird, bei welchem Prozeß wieder Wasser entsteht, als die Hypothese von Baeyer, wo das Formaldehyd durch die Gleichung $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} = \text{CH}_2\text{O} + \text{O}_2$ formuliert wird.

Weiters ist noch zu betonen, daß die Assimilation des CO_2 nicht bloß der chlorophyllhaltigen Zelle zukommt, sondern daß es auch von einigen chlorophyllfreien Pflanzenzellen assimiliert wird, wie wir das bei einigen Mikrobenarten sehen.

Äußerst interessante Mitteilungen hat in neuester Zeit Walter Löb in Bonn betreffend die Kenntnisse der Assimilation der Kohlensäure geliefert.¹⁾

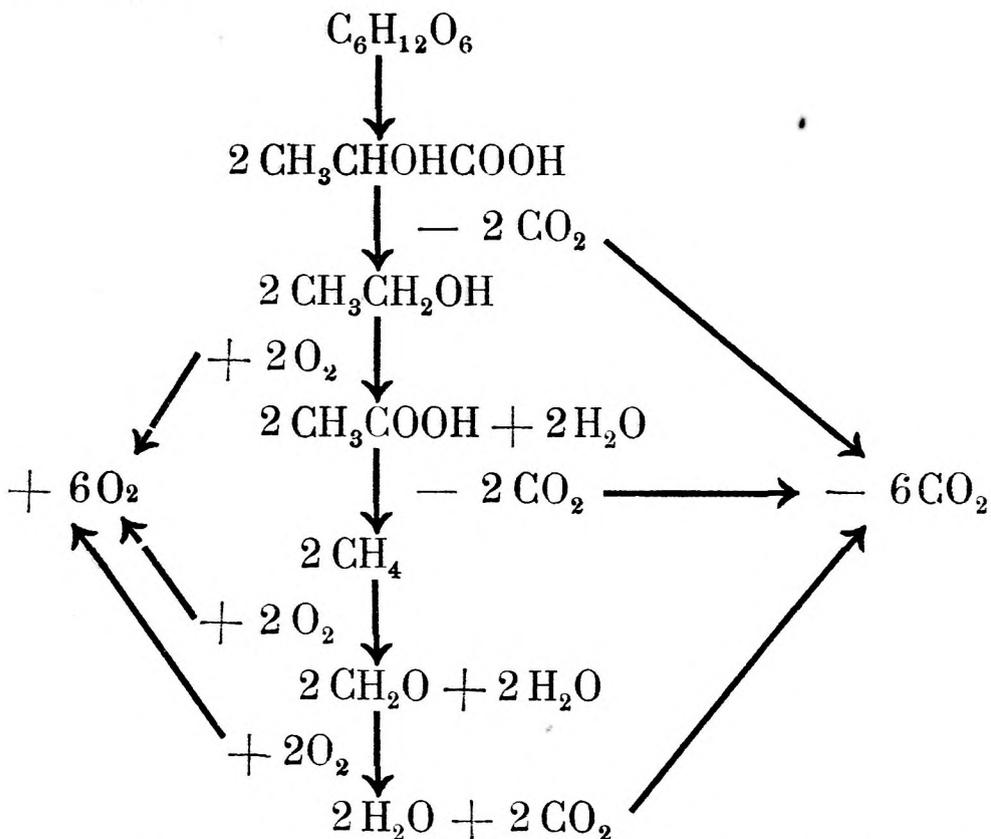
Löb hat mein hypothetisches Schema des Glukoseabbaues durch Atmungsenzyme anders konstruiert. Ich wiedergebe daher dieses Schema nachstehend:



¹⁾ Walter Löb in Bonn, Zeitschrift für Elektrochemie 1905; Landwirtschaftliche Jahrbücher 1906.

Diese Form ist in bezug auf den Assimilationsvorgang gewählt, um sichtbar zu machen, daß das Volumen der bei dem Abbau abgegebenen Kohlensäure mit dem des aufgenommenen Sauerstoffes übereinstimmt.

Das folgende Schema, welches Löb zusammenfaßte, berücksichtigt die chemisch durchaus mögliche, intermediäre Bildung von Formaldehyd:



Auch hier sind Sauerstoffverbrauch und Kohlensäureproduktion dem Volumen nach natürlich gleich, nur ist die Verteilung eine andere.

Aus unseren langjährigen Beobachtungen geht hervor, daß in den Pflanzenzellen Atmungsenzyme vorhanden sind, welche eine Milchsäure- und alkoholische Gärung hervorrufen.

Die von uns gefundenen Enzyme sind in vieler Hinsicht der Zymase und der Lactacidase ähnlich.

Wir haben zweierlei Arten von Atmungsenzymen vor uns und zwar: Die im Protoplasma sich abspielenden primären Prozesse werden

1. durch die Enzyme Zymase (Milchsäurebildung)

2. durch die Lactacidase (Alkohol und Kohlendioxydbildung) hervorgerufen.

Die sekundären Produkte, welche sich durch weitere De-

gradation der Abbauprodukte kennzeichnen, gehen nur bei Gegenwart von Sauerstoff vor sich. Durch Einwirkung wieder neuer Enzyme entsteht die Essigsäure, wahrscheinlich Methan, Ameisensäure und schließlich Wasserstoff. Die gebildeten Spaltungsprodukte, soweit sie noch oxydierbar sind, werden durch den hinzutretenden Sauerstoff der Luft zu Kohlendioxyd und Wasser verbrannt.

Eduard Buchner und Jakob Meisenheimer¹⁾ in der neuesten Arbeit «Über Milchsäuregärung» sowie Eduard Buchner und Rufus Gaunt «Über die Essiggärung²⁾» bestätigten neuerdings, daß die Milchsäuregärung, sowie die Essiggärung durch Enzyme hervorgerufen wird. Das erste Enzym, welches die Spaltung des Zuckers zu Milchsäure mit Hilfe eines von der Lebenstätigkeit der Mikroorganismen abtrennbaren Enzyms bewerkstelligt, nennen die Verfasser Milchsäurebakterienzymase.

Durch Eduard Buchner und Rufus Gaunt wurde sicher bewiesen, daß die Essigbakterien ihre oxydierende Wirkung der Gegenwart eines Enzyms einer Oxydase, die Verfasser Alkohol-oxydase nennen, verdankt. In den Daueressigbakterien scheinen sowohl Oxygenasen, wie Peroxydase und Katalase vorhanden zu sein.

Die Arbeiten von R. O. Herzog³⁾ und Buchner und seiner Mitarbeiter bestätigen also meine früheren Angaben, welche ich schon im Jahre 1903 publizierte, welche dahin lauten, daß in der lebenden Pflanzen- und Tierzelle Milchsäure, Alkohol, Kohlendioxyd, Essig- und Ameisensäure durch Enzyme gebildet wird.

Die Existenz unserer Atmungsenzyme wurde von vielen Seiten bestätigt. Nur eine kleine Minorität von Forschern versuchte es, die Frage nach dem Vorhandensein der Atmungsenzyme im Pflanzen- und Tierorganismus noch als eine offene und die von uns auf Grund unserer Untersuchungen konstatierte Zersetzung der Hexosen durch die glykolytischen Enzyme als das Ergebnis von Bakterienwirkung hinzustellen.

¹⁾ Siehe Liebigs Annalen, Bd. CCCXLIX, S. 125—139.

²⁾ Siehe Liebigs Annalen, Bd. CCCXLIX, S. 140—184.

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXVII, 1902/3.

Wenn einzelne Autoren, wie Batelli, Mazé und Portier, tatsächlich das Vorhandensein von Bakterien in ihren Versuchsflüssigkeiten konstatiert haben, so wäre es ihre Pflicht gewesen, sich auch davon zu überzeugen, ob die gefundenen Bakterien, ihre Art und Zahl, imstande gewesen wären, ebenfalls solche Prozesse zu verursachen, wie ich sie bei den Wirkungen der von mir isolierten Rohenzyme sichergestellt habe. Jeder erfahrene Bakteriologe wird mir gern bestätigen, daß sich ungemein schwer bei völligem Ausschluß von Bakterien operieren lasse. Hat man sie aber da oder dort bei einer Operation konstatiert, so muß man doch sicherlich untersuchen, ob und welche Wirkung, eventuell welche Alteration einer anderen Wirkung ihre Anwesenheit im Gefolge haben konnte. Die bloße Konstatierung des Vorhandenseins einiger weniger Bakterienpezies in einer Gärflüssigkeit reicht, meiner Erfahrung und Überzeugung nach, durchaus nicht hin, um eine so eminente und auffällige Wahrheit zu bestreiten, wie die von mir festgestellte glykolytische Wirkung der von mir isolierten Enzyme. Es genügt das um so weniger, wenn man erwägt, daß 1. unzweifelbar feststeht, daß durch einzelne meiner Enzyme, was jedes Mitglied unseres Laboratoriums bestätigen kann, sofortige Gärungserscheinungen bei Eintragung des Enzymes in die Zuckerlösung auftraten, welche Tatsache auch Angiola Borrino, A. Herlitzka, Blumenthal und Feinschmidt konstatiert haben. Man nenne uns demgegenüber auch nur ein einziges Beispiel einer gleichen Wirkung von Bakterien.

2. Haben wir zu unseren Gärflüssigkeiten stets eine solche Menge von Desinfizientien zugesetzt (1—2% Toluol oder 1—2% Salicylsäure), daß durch sie jegliche Bakterienwirkung für jeden nüchternen Bakteriologen von vornherein ausgeschlossen erscheint.

Bei dieser Gelegenheit will ich des der Paradoxie nicht entbehrenden Faktums gedenken, daß die obenerwähnten Forscher die auf zymatischer Wirkung beruhenden gegenwärtigen Versuche Buchners nicht anzweifelten, trotzdem er weit geringere antiseptische Dosen benützte als ich. Ich zitiere hier diesbe-

züglich die Berliner Berichte Nr. 3 vom Jahre 1903 und Nr. 2 vom Jahre 1904. Diesem zufolge benutzte Buchner zu seinen Versuchen 800 ccm Hefepreßsaft, 80 g Rohrzucker und 8 ccm Toluol. In einem zweiten Falle benützte er 300 ccm Preßsaft und nur 3 ccm Toluol usw. Wenn nun Buchner schon bei einer viel geringeren Dosis von Antiseptics der Ausschluß der Bakterienwirkung ohne weiteres eingeräumt wird, mit welchem Rechte bezweifelt man die Verlässlichkeit meiner Versuche und ihre Resultate, wo ich auf 50 ccm Glukoselösung und 5 g Rohenzym 0,5—1 g Toluol, also 1—2% oder 0,5—1 g Salicylsäure verwendete?

Wir haben bereits in unseren früheren Arbeiten hervorgehoben, daß wir die Möglichkeit der Bakterienwirkung und ihre Konsequenzen stets im Auge behalten haben und daß die von uns durch Enzyme hervorgerufenen Gärungsprozesse in einer Zeitdauer absolviert waren, innerhalb welcher die Bakterien noch gar keine Wirkung, oder doch nur eine ganz unverhältnismäßig geringe, zu erzielen vermocht hätten.

Wir dürfen ferner, was unsere früheren Versuche betrifft, nicht unerwähnt lassen, daß ihre Zahl in die Hunderte geht, wobei ich im Verlaufe von 5 Jahren, die sie umfassen, mit meinen Assistenten mehrere Meterzentner Pflanzen- und Tierorgane verarbeitete. Von allen diesen Versuchen wurden jedoch nur diejenigen publiziert, bei denen auch nur der leiseste Zweifel deplaziert erschiene. Angesichts eines solchen Untersuchungsmaterials sind wohl ein paar, als mißglückt zu bezeichnende, vielleicht nicht einmal mit der erforderlichen Akkurateesse und Vorsicht ausgeführte Experimente, als welche sich diejenigen namentlich von Batelli und Portier auf den ersten Blick geben, nicht geeignet, eine so umfassende und nach allen Richtungen hin gesicherte Arbeit, wie es diejenige unserer Isolierung von Enzymen ist, deren Tragweite heute allgemein anerkannt wird, auch nur zu alterieren!

Nicht unbemerkt können wir namentlich die Arbeiten von Portier¹⁾ lassen, aus welchen hervorgeht, daß sich derselbe

¹⁾ Annales de l'Institut Pasteur 1904.

nicht einmal die Mühe gegeben hat, unsere Arbeiten genau durchzustudieren, wie dies seine Versuchsmethodik dokumentiert.

Von großem Interesse ist allerdings, daß er zur Bestimmung des Alkohols die total ungenaue Methode von Nicloux anwendete und mittels dieser ganz unverläßlichen Methode 1—3 mg Alkohol bestimmte und mit dieser Menge kalkulierte.(!!!)

Überhaupt ist aus seiner Arbeit, die in den «Annales de l'Institut Pasteur», Nr. 10, 1904, erschienen ist, zu ersehen, welche unglaubliche Mangelhaftigkeit der chemisch-analytischen und bakteriologischen Untersuchungsmethoden er bei seinen diesbezüglichen Forschungen hat walten lassen müssen.

Was für einen Wert haben nun solche Einwände gegen unsere langjährigen und gewissenhaften Forschungsergebnisse?

