

Über Milchsäurebildung und Phosphorsäurebildung im Muskelpreßsaft.

Von

Gustav Embden, Walter Griesbach und Ernst Schmitz.

(Aus dem chemisch-physiologischen Institut der Universität Frankfurt a. M.)

(Der Redaktion zugegangen am 22. September 1914.)

Durch eine Reihe von Untersuchungen aus dem letzten Jahrzehnt, namentlich auch dessen letzten Jahren, ist der Nachweis erbracht worden, daß der Hauptabbauweg der Kohlehydrate im Tierkörper über Milchsäure verläuft.

Die Bildung dieses Produktes aus Kohlehydraten wurde unter sehr verschiedenartigen Versuchsbedingungen beobachtet:

So trat in der künstlich durchströmten Leber reichliche Milchsäurebildung auf, wenn das Organ stark glykogenhaltig war, während die Milchsäurebildung bei Durchblutung der glykogenfreien oder glykogenarmen Leber mit zuckerarmem Blute völlig ausblieb, im Gegenteil der Milchsäuregehalt des Blutes während des Durchströmungsversuches meist deutlich absank.

Wurde aber dem Durchströmungsblute d-Glukose, oder besser noch d-Laevulose hinzugefügt, so fand auch in der glykogenarmen Leber eine reichliche Milchsäurebildung statt.

Schon durch diese Versuche war der endgültige Nachweis des Abbaues der Kohlehydrate der Hexosereihe zu Milchsäure geführt.

Ebenso eindeutig waren die Ergebnisse, die verschiedene Autoren am Gesamtblute, an Leukozyten, an gewaschenen Blutkörperchen und auch am Organbrei unter Anwendung verschiedener Hexosen erhielten.

In den eben erwähnten Untersuchungen wurde der Abbau von Kohlehydraten zu Milchsäure durch lebensfrische tierische Zellen beobachtet.

Es lag jetzt sehr nahe, zu versuchen, die beim Abbau von Zucker zu Milchsäure wirksamen Agentien von den Zellstrukturen abzutrennen, um so den für die alkoholische Gärung längst erwiesenen rein fermentativen Zuckerabbau auch für den Tierkörper darzutun, für den er so oft behauptet, aber nie einwandfrei gezeigt worden war.

Die Tatsache des besonders reichlichen Auftretens von Milchsäure in der Muskulatur veranlaßte uns, in früheren Arbeiten¹⁾ derartige Versuche am Muskelpreßsaft anzustellen.

Das Ergebnis war nicht das anfänglich erhoffte. Zwar gelang es ohne weiteres, zu zeigen, daß im frischen Muskelpreßsaft von Hunden unter bestimmten Versuchsbedingungen eine oft sehr beträchtliche und mit großer Geschwindigkeit ablaufende Milchsäurebildung eintritt, ein Zusammenhang dieser Milchsäurebildung mit einem entsprechenden Verschwinden von Glykogen oder Traubenzucker ließ sich aber nicht feststellen. Glykogen war in mehreren mittels der abgekürzten Pflügerschen Methode untersuchten Fällen im Preßsaft von vornherein überhaupt nicht nachweisbar und Traubenzucker fand sich bei Untersuchung mittels des Knapp'schen Titrationsverfahrens verschiedentlich nur in so geringen Mengen²⁾, daß er zur Deckung der gebildeten Milchsäure bei weitem nicht ausreichte.

Vor allem aber gelang es nicht, durch Zusatz von Glykogen und Traubenzucker die Milchsäurebildung im Sinne einer Steigerung zu beeinflussen.

Das im Muskelpreßsaft anscheinend unabhängig von seinem Glykogen- und Traubenzuckergehalt erfolgende Auftreten von Milchsäure bei kurzem Stehen schien uns am besten erklärbar durch die Annahme einer besonders gearteten Milchsäurevorstufe, über deren Natur wir keinerlei bestimmte Vorstellungen äußern konnten.

¹⁾ Embden, Kalberlah u. Engel. Über Milchsäurebildung im Muskelpreßsaft. I. Mitteilung. Biochem. Zeitschr., Bd. 45, S. 45, 1912. Kura Kondo. II. Mitteilung. Dasselbst, S. 63.

²⁾ Über die der Knappschen Titrationsmethode bei ihrer Anwendung auf nach Schenck gewonnene Preßsaftfiltrate anhaftenden Fehler und über die Frage des Vorkommens von Traubenzucker im Muskelpreßsaft siehe weiter unter S. 16.

Wir schlugen vor, diese Vorstufe wegen ihrer engen biologischen Beziehungen zur Milchsäure einstweilen als Lactacidogen zu bezeichnen.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit und mehr zum Teil noch der nachfolgenden Untersuchungen ist es, die Berechtigung der Annahme eines von den gewöhnlichen Kohlehydraten verschiedenen Lactacidogens zu erweisen und Aufklärung über seine chemische Natur zu gewinnen.

Wenn auch namentlich das letztgenannte Ziel als noch keineswegs erreicht bezeichnet werden kann, so werden doch, wie wir glauben, durch die vorliegende und die nachfolgenden Untersuchungen unsere Vorstellungen über die Entstehung der Milchsäure im Muskel in ganz bestimmte Bahnen gelenkt, auf denen voraussichtlich die schließliche Klärung der chemischen Natur und der biologischen Bedeutung des Lactacidogens erfolgen wird.

In einer bereits erwähnten Untersuchung haben wir auf die Möglichkeit von Beziehungen des Lactacidogens zu der Phosphorfleischsäure Siegfrieds hingewiesen. Wenn auch, wie wir gleich hier erwähnen wollen, diese Vermutung wohl sicher nicht zu Recht besteht, so war sie doch für uns Veranlassung, zu untersuchen, ob vielleicht die Milchsäurebildung im Muskelpreßsaft von einer Phosphorsäurebildung begleitet ist.

Wiederholt ist ja in älterer und neuerer Zeit behauptet worden, daß angestrengte Muskelarbeit zu vermehrter Phosphorsäureausscheidung durch den Harn führe, und daß auch im Muskel selbst bei seiner Tätigkeit Phosphorsäure frei werde.

Vermehrte Phosphorsäureausscheidung durch den Harn nach angestrenzter Muskelarbeit wurde wohl zuerst durch G. J. Engelmann beobachtet.¹⁾

Am Muskel selber glaubten Weyl und Zeitler²⁾ eine Vermehrung der Phosphorsäure während der Tätigkeit fest-

¹⁾ Engelmann, G. J., Archiv f. d. ges. Anatomie u. Physiologie, 1871, S. 14. Siehe auch Presyz, Ungar. Archiv f. innere Med., Bd. I, S. 38.

²⁾ Weyl Th. und Zeitler, H., Über die saure Reaktion des tätigen Muskels und über die Rolle der Phosphorsäure beim Muskel tetanus. Diese Zeitschr., Bd. 6, 1882, S. 557.

stellen zu können. Sie reizten am Kaninchen nach Brustmarkdurchschneidung den Ischiadicus der einen Seite mit tetanisierenden Strömen und fanden in einer Reihe von vier übereinstimmenden Versuchen eine Vermehrung des wasserlöslichen Phosphors, den sie, wohl mit Unrecht, als anorganischen Phosphor ansprachen.¹⁾ Gleichzeitig wurde der Lecithinphosphor etwas vermindert, jedoch bei weitem nicht genügend, um die aufgetretene «anorganische» Phosphorsäure zu decken.

An Hunden arbeitete Macleod²⁾ unter Siegfrieds Leitung. Er stellte unter Benützung von Kontrolltieren, die geruht hatten, fest, daß starke Arbeit im Tretrade die Menge der wasserlöslichen organischen Phosphorsäure vermindert, die der anorganischen vermehrt. Diese Vermehrung der anorganischen Phosphorsäure geschah nur zum geringeren Teile unter entsprechender Verminderung des Nucleonphosphors, zum größeren Teile auf Kosten des organischen, wasserlöslichen Nichtnucleonphosphors, dessen nähere Natur unbekannt blieb.

Natürlich wurde die Deutung dieser Versuche durch den Umstand erschwert, daß die Zirkulation während der Muskelarbeit erhalten bleiben mußte.

Macleod konnte übrigens auch feststellen, daß der Gesamtphosphor der Muskelrockensubstanz während der Arbeit zunimmt, daß also der arbeitende Muskel in besonders hohem Maße Phosphor aus dem Blute aufzunehmen imstande ist.

Daß bei der Autodigestion des Muskels Phosphorsäure aus organischen Verbindungen frei wird, ist bereits von E. Salkowski³⁾ gezeigt worden. Auch von Fürth⁴⁾ konnte am Kaninchenmuskel nach mehrtägigem Liegen eine nicht sehr erhebliche Zunahme der anorganischen Phosphorsäure beobachten.

¹⁾ Siehe hierüber auch Parnas u. Wagner. Biochem. Zeitschr., Bd. 61, S. 387, 1914.

²⁾ Macleod, J. J. R., Zur Kenntnis des Phosphors im Muskel, Zeitschrift für physiologische Chemie, Bd. 28, S. 535, 1899.

³⁾ Salkowski, E., Über die Autodigestion der Organe. Zeitschrift für klinische Medizin, Bd. 17, Suppl. Bd., S. 77.

⁴⁾ von Fürth, O., Über die Gerinnung der Muskeleiweißkörper und deren mutmaßliche Beziehung zur Totenstarre. Hofmeisters Beiträge, Bd. 3, S. 562, 1903.

In der vorliegenden Arbeit haben wir — wie bereits erwähnt — zunächst untersucht, ob im Muskelpreßsaft die früher von uns beobachtete Milchsäurebildung von einer Bildung anorganischer Phosphorsäure begleitet ist.

Methodisches.

Die Preßsaftgewinnung geschah ganz in der früher geschilderten Weise.

Von der Anwendung der Kosselschen Schneidemaschine, die wir bei einem Teil unserer früheren Versuche benutzt hatten, sahen wir ab.

Die Versuchstiere — wir verwandten zunächst nur Hunde — wurden in Äthernarkose aus den Femoralgefäßen entblutet; möglichst bald nach dem Tode des Tieres die Muskulatur der Hinter- und Vorderschenkel (manchmal auch Bauch- und Rückenmuskulatur) so rasch wie möglich von der Hauptmenge Fett — Sehngewebe etc. — befreit, in einer Fleischhackmaschine gut zerkleinert und dann in einer sehr großen Porzellanreibschale mit reinem Quarzsand unter Anwendung eines großen Pistills gründlich verrieben. Mit Vorteil bedienten wir uns bei allen späteren Versuchen einer Vorrichtung, die der von Buchner und Hahn¹⁾ für die Zerkleinerung von Hefezellen angegebenen nachgebildet war. Nach gründlichem Verreiben mit Quarzsand wurde der entstandene Muskelbrei mit Kieselguhr gut durchgeknetet. Die schließlich erhaltene homogene Masse soll sich nur wenig feucht anfühlen.

Bei unseren früheren Versuchen haben wir Muskulatur, Quarzsand und Kieselguhr nicht gewogen. Später wandten wir bei einer bestimmten Versuchsanordnung ganz bestimmte Mengenverhältnisse an und setzten auch das Verreiben mit Quarzsand eine bestimmte Zeit fort.

Für die eigentliche Pressung bedienten wir uns auch bei den Versuchen dieser Arbeit der Organsaftpresse von H. Meyer. Als Preßtuch verwandten wir eine einfache Schicht dünner Gaze.

¹⁾ Buchner, E. u. H. und Hahn, M., Die Zymasegärung. München u. Berlin 1903.

Die Pressung wurde bis zu einem allmählich auf 400 Atmosphären ansteigenden Druck vorgenommen.

Der Preßsaft wurde in eisgekühlten Meßzylindern aufgefangen und bis zum Ansätze des Versuchs, der stets möglich rasch erfolgte, in Eis aufbewahrt. Auch der Quarzsand, die Kieselguhr, die Reibschale etc. waren vor dem Versuch gut gekühlt. Sämtliche Gerätschaften, die mit der Muskulatur oder dem Muskelpreßsaft in Berührung kamen, waren sterilisiert.

Ein Teil des Preßsaftes (Preßsaft A) wurde sofort mit je dem gleichen Volumen Salzsäure von 2% und Quecksilberchlorid von 5%, also unter dreifacher Verdünnung des Preßsaftes, gefällt. Ein anderer Teil blieb unter Zusatz einer für die optimale Milchsäurebildung ausreichenden Menge von gesättigter Natriumbikarbonatlösung¹⁾ in sterilen, mit eingeriebenen Glasstopfen verschlossenen Pulverflaschen während verschiedener Zeiten, höchstens aber zwei Stunden, im Wasserbade von 40° stehen.

Am Schlusse des Versuchs wurde der Preßsaft (Preßsaft B) unter Berücksichtigung des Bikarbonatzusatzes mit Salzsäure (2%ig) auf das Doppelte des ursprünglichen Preßsaftvolumens gebracht und schließlich genau so wie der Preßsaft A mit Sublimatlösung gefällt.

Die gefällten, gründlich durchgerührten Flüssigkeiten blieben über Nacht im Eisschrank — in allen spätern Versuchen bei Zimmertemperatur — stehen.

Am nächsten Morgen wurden sie abgesaugt, die Filtrate mit Schwefelwasserstoff entquecksilbert, durch einen Luftstrom vom Schwefelwasserstoff befreit und nach Abtrennung des Quecksilbersulfids aliquote Filtratanteile zur Bestimmung von Milchsäure und Phosphorsäure verwendet.

In allen späteren Versuchen wurden für jede Milchsäure- oder Phosphorsäurebestimmung 100 ccm Preßsaftfiltrat, entsprechend 33,3 ccm Preßsaft benutzt.

Die Technik der Milchsäurebestimmung wich nicht wesentlich von der früher geschilderten ab. Der gemessene Filtrat-

¹⁾ Kura Kondo, Über Milchsäurebildung im Muskelpreßsaft. II. Mitt. Biochem. Zeitschr. Bd. 45, S. 71. 1912.

anteil wurde mit Natronlauge annähernd neutralisiert, dann mit 15 ccm starker Phosphorsäure (ca. 60%) angesäuert und im Lindschen Apparat unter starker Heizung und lebhafter Rotation mit Äther zunächst wenigstens 40 Stunden lang extrahiert.

Stets wurde alsdann ein Kolben mit neuem Äther mit dem Apparat verbunden und eine mindestens 20stündige Kontrollextraktion vorgenommen.

Gewöhnlich war die Extraktion nach 40 Stunden vollständig, es kam aber vor, daß sich noch bestimmbare Milchsäuremengen in dem zweiten Ätherextrakt fanden.

Die Ätherextrakte wurden unter gründlichem Nachwaschen mit Äther filtriert, der Äther unter Zusatz von etwa 20 ccm Wasser verjagt, die wässrige Lösung des Ätherextraktes auf etwa 100 ccm gebracht, mit Normalnatronlauge schwach alkalisch gemacht, in einer Porzellanschale auf dem Wasserbade auf etwa 5—10 ccm eingeengt und nunmehr dem Milchsäurebestimmungsverfahren nach von Fürth und Charnass in der im hiesigen Institut üblichen Weise unterworfen. Häufig wurden Doppelbestimmungen ausgeführt, die fast stets befriedigend miteinander übereinstimmten. Bei diesen Doppelbestimmungen wurden von vornherein zwei einander entsprechende Preßsaftanteile getrennt verarbeitet.

Die Phosphorsäurebestimmung wurde folgendermaßen ausgeführt:

Der gemessene Filtratanteil (wie bereits oben erwähnt in allen späteren Versuchen 100 ccm) wurde in der Kälte mit Magnesiamixtur und alsdann mit einem reichlichen Überschuß von Ammoniak versetzt. Die Flüssigkeit blieb gut bedeckt während 24 Stunden in der Kälte stehen; der alsdann auf ein aschefreies Filter gebrachte Niederschlag wurde öfters mit Ammoniak von 2% gewaschen, in der Kälte mit Salpetersäure von etwa 8% gelöst, wobei die Lösung in das ursprünglich benutzte Becherglas zurückfloß.

Nach genügendem Waschen des Filters mit kaltem Wasser wurde die Flüssigkeit wieder in der Kälte mit einer ausreichenden Menge Salpetersäure von 25% (1 Teil) Ammonium-

nitrat von 34% (1 Teil) und Ammoniummolybdat von 3% (3 Teile) versetzt. Die Abscheidung des Molybdatniederschlages wird unter diesen Bedingungen erst langsam vollständig, ist aber bei ausreichendem Zusatz des Fällungsmittels nach 24 Stunden abgeschlossen.

Nach dieser Zeit wird der Molybdatniederschlag möglichst vollständig auf ein aschfreies Filter gebracht, mit ammonitrat-haltiger Waschflüssigkeit in üblicher Weise gewaschen und schließlich — wie bekannt — unter Lösung in Ammoniak in das ursprünglich verwendete Becherglas zurückgebracht. Die letzte Fällung der Phosphorsäure als Magnesium-Ammonium-Phosphat wird in üblicher Weise in der Wärme vorgenommen.

Schließlich wird der Niederschlag auf einen geglühten und gewogenen Porzellan-Goochtiiegel gebracht. Nach dem Waschen bis zur Chlorfreiheit und dem Trocknen bei etwas über 100° wird der Porzellantiegel zunächst vorsichtig in seinem Außentiegel, dann ohne denselben in der vollen Gebläseflamme geglüht. Bei den vielen Hunderten von Bestimmungen dieser und der folgenden Arbeiten sind uns nur ganz vereinzelte Analysen durch Springen des Goochtiiegels verloren gegangen. Wir haben uns vielfach davon überzeugt, daß bei der von uns angewendeten Methode des Glühens es nur zu einem äußerst geringfügigen, für unsere Versuche nicht in Betracht kommenden Verluste durch die Reduktionswirkung der Flammengase kommt.

Es ist unbedingt notwendig, bei dem beschriebenen Analysengang die beiden ersten Fällungen der Phosphorsäure in der Kälte vorzunehmen, weil es sonst, wie wir sehr häufig feststellten, zu einer Abspaltung von Phosphorsäure aus organischen Verbindungen kommen kann. In zahlreichen vergleichenden Versuchen mit der üblichen «Warmfällung» und der eben beschriebenen «Kaltfällung» der Phosphorsäure wurde bei der erstgenannten Fällungsart, auch wenn so kurz wie irgend möglich erwärmt wurde, bald nur wenig bald aber ganz erheblich mehr Phosphorsäure als unter Anwendung der «Kaltfällung» gefunden.

Wir besprechen nunmehr zunächst die ersten 5 Versuche, die wir mit der eben geschilderten Technik ausführten.

Das Ergebnis dieser Versuche ist in Tabelle I zusammengestellt. Aus den Kolonnen 2—4 sind die notwendigen Einzelheiten der Versuchsanordnung ersichtlich. Die Kolonnen 5 und 6 geben den Milchsäuregehalt des sofort gefällten und des nach dem Stehen bei 40° verarbeiteten Preßsaftes wieder. In den Stäben 7 und 8 finden sich die entsprechenden Werte für Phosphorsäure (als PO_4H_3 berechnet).

Die fettgedruckten Zahlen in Kolonne 9 geben die aus den Kolonnen 5 und 6 berechneten Werte für neugebildete Milchsäure, jene in Kolonne 10 die aus Kolonne 7 und 8 berechnete Phosphorsäurebildung pro 100 ccm Preßsaft wieder.

Aus Kolonne 11 ist ersichtlich, wieviel Moleküle Phosphorsäure auf je 100 Moleküle Milchsäure beim Stehen des Preßsaftes neugebildet wurden.

In 4 von den Versuchen (Versuch 1, 2, 3, 5) weicht die Zahl der freigewordenen Phosphorsäuremoleküle wenig von derjenigen der Milchsäuremoleküle ab, jedenfalls kaum stärker als es durch die unvermeidlichen Fehler der Bestimmungsmethoden bedingt ist. In Versuch 4 bleibt dagegen die Phosphorsäurebildung ganz merklich hinter der Milchsäurebildung zurück.

Wir sehen also bereits aus diesen Versuchen nicht nur, daß bei 1—2stündigem Stehen frischen Muskelpreßsafts bei 40° eine unter Umständen äußerst beträchtliche Phosphorsäurebildung stattfindet, sondern auch, daß in vier von fünf Versuchen die Mengen der neugebildeten Phosphorsäure und Milchsäure praktisch äquimolekular waren.

Daß es sich hier um ein mehr zufälliges Zusammenreffen handelt, wird in höchstem Maße unwahrscheinlich, wenn man die Größe der Milchsäure- und Phosphorsäurebildung in den verschiedenen Versuchen vergleichend betrachtet. Die Werte schwanken für Milchsäure von ca. 0,048% in Versuch 3 bis nahezu 0,216% in Versuch 5 (für Phosphorsäure

Tabelle 1.

Nr.	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	Für jeden Einzelversuch ver-wandte Prefsaft-menge ccm	Menge der dem Prefsaft B zu-gesetzten Bi-carbonat-lösung ccm	Prefsaft B blieb bei 40' bei Minuten	Milch-säure in 100 ccm des sofort ver-arbeiteten Prefsaftes A g	Milch-säure in 100 ccm des Prefsaftes B g	Phosphor-säure in 100 ccm des sofort ver-arbeiteten Prefsaftes A g	Phosphor-säure in 100 ccm des Prefsaftes B g	In 100 ccm des Prefsaftes B neu-gebildete Milch-säure g	In 100 ccm des Prefsaftes B neu-gebildete Phosphor-säure g	Auf 100 Moleküle Milch-säure neu-gebildete Phosphor-säure-moleküle
2	60	3	120	0,4108	0,5205	0,1170	0,2341	0,1097	0,1171	98
3	70	3	60	0,2738	0,3216	0,1445	0,1865	0,0478	0,0450	87
4	75	4	120	0,2343	0,3401	0,1614	0,2410	0,1058	0,0796	74
5	86	5	120	0,2821	0,4980	0,0893	0,3430	0,2159	0,2537	108

natürlich entsprechend), sie sind also ganz außerordentlich verschieden.¹⁾

Handelte es sich aber nicht um einen Zufall, so war die Bildung äquimolekularer Mengen Milchsäure und Phosphorsäure im Muskelpreßsaft wohl nur erklärlich durch die Annahme, daß das Lactacidogen eine organische Phosphorsäureverbindung ist, die durch Muskelpreßsaft eben unter Bildung äquimolekularer Mengen Milchsäure und Phosphorsäure — offenbar auf fermentativem Wege — zerlegt werden kann.

Unsere nächste Aufgabe war, die in vier von den fünf ersten Versuchen gemachte Beobachtung zu bestätigen und möglichst auch das abweichende Verhalten auch des einen Versuchs aufzuklären.

Bei der Mehrzahl der nächstfolgenden Versuche nahmen wir nun einige Abänderungen in der Art der Preßsaftgewinnung vor, die wir von vornherein für Verbesserungen hielten, die aber die Versuchsergebnisse im höchsten Maße beeinflussten, derart, daß Milchsäure und Phosphorsäure nicht mehr in äquimolekularer, sondern die Milchsäure meist in weit überwiegender Menge auftrat.

Die wesentlichste methodische Änderung, die wir vornahmen, bestand darin, daß wir die unmittelbar nach dem Tode des Tieres mit denkbar größter Beschleunigung gewonnene Muskulatur so rasch wie möglich abkühlten, um einen von vornherein möglichst Milchsäure- und Phosphorsäurearmen Preßsaft zu erhalten.

Zu dem Zwecke wandten wir eine Fleischhackmaschine an, die mit einem Kühlmantel umbaut war, der mit Kältemischung gefüllt wurde. Wir erreichten so, daß das zerkleinerte Fleisch die Hackmaschine statt wie bisher mit einer Temperatur von über 30°, wenig wärmer als 20° verließ.

Auch bei den weiteren, zur Preßsaftgewinnung notwendigen Prozeduren wurde weit mehr als bisher auf mög-

¹⁾ Da das Molekulargewicht der Milchsäure = 90 dasjenige der Phosphorsäure (PO_4H_3) = 98 ist, muß im Falle der Bildung äquimolekularer Mengen Milchsäure und Phosphorsäure die Phosphorsäureneubildung etwas größer als die Milchsäurebildung sein.

lichst starke Abkühlung der verwandten Gerätschaften etc. gesehen.

Ferner wurde bei diesen Versuchen weniger Kieselguhr als bisher verwendet, es wurde feuchter gepreßt, weil wir die Beobachtung machten, daß so die Preßsaftausbeute stieg.

Wir haben zahlreiche derartige Versuche, die wir im folgenden kurz als «Versuche mit starker Kühlung» bezeichnen wollen, angestellt.

Nur in einer ganz geringen Minderzahl der Versuche zeigte sich hier die anfänglich beobachtete äquimolare Milchsäure- und Phosphorsäurebildung. Gewöhnlich überwog die Milchsäurebildung weitaus.

Fünf beliebig herausgegriffene, derartige Versuche sind in Tabelle II (Versuche 6—10) zusammengestellt.

Aus Kolonne 11 dieser Tabelle geht hervor, daß die Zahl der auf 100 Moleküle Milchsäure gebildeten Phosphorsäuremoleküle zwischen 43 (Versuch 7) und 74 (Versuch 10) schwankt.

Kann hier also von einer strengen Äquimolarität keine Rede sein, so ist doch auch in diesen Versuchen ein gewisser Parallelismus zwischen Milchsäure- und Phosphorsäurebildung erkennbar. Die weitaus stärkste Phosphorsäurebildung sehen wir in Versuch 10, in dem sich auch die stärkste Milchsäurebildung findet, die geringste Bildung beider Säuren in den Versuchen 7 und 8 usw.

Wodurch war das abweichende Ergebnis dieser Versuche mit starker Kühlung bedingt?

Von vornherein waren hier sehr verschiedene Möglichkeiten vorhanden, von denen wir nur eine erwähnen wollen, weil sie uns zu einer Reihe gleich zu erörternder weiterer Versuche veranlaßte.

Wir stellten uns nämlich vor, daß vielleicht bei der besonders schonenden Art der Preßsaftgewinnung in den Versuchen mit starker Kühlung der Preßsaft noch ein gewisses Maß von glykolytischer Fähigkeit besäße, d. h., daß er nicht nur imstande wäre, Lactacidogen unter Bildung äquimolekularer Milchsäure- und Phosphorsäuremengen zu spalten, sondern auch Kohlehydrat zu Milchsäure abzubauen.

Tabelle 2.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Nr.	Für jeden Einzelversuch verwandte Preßsaftmenge	Menge der dem Preßsaft B zugesetzten Bicarbonatlösung	Preßsaft B blieb bei 40°	des sofort verarbeiteten Preßsaftes A	des nach dem Stehen bei 40° verarbeiteten Preßsaftes B	des sofort verarbeiteten Preßsaftes A	des nach dem Stehen bei 40° verarbeiteten Preßsaftes B	In 100 ccm Preßsaft B neugebildete Milchsäure	In 100 ccm Preßsaft B neugebildete Phosphorsäure	Auf 100 Moleküle Milchsäure gebildete Phosphorsäuremoleküle	Bemerkungen
	ccm	ccm	Minuten	g	g	g	g	g	g	g	
6	75	8	60	0,2646	0,3800 0,3780	0,1569	0,2388 0,2277	0,1158 0,1138	0,0819 0,0708	65 57	Die untereinander stehenden Zahlen in einzelnen Kolonnen geben die Resultate von Doppelbestimmungen wieder.
7	80	4,8	60	0,1782	0,2693	0,1458	0,1881	0,0911	0,0423	43	
8	80	6	60	0,1707	0,2129	0,2558	0,3402	0,0644	0,0122	46	
9	80	6	60	0,2855	0,4239	0,1612	0,2489	0,1384	0,0877	52	
10	120	10	120	0,3544	0,5569	0,2335	0,3963	0,2025	0,1628	74	

Tabelle 3.

Nr.	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	Für jeden Einzelversuch veränderte Preßsaftmenge	Menge der den Preßsaft-Bicarbonatlösung	Die Preßsaft-Blicben bei 40°	Milch-säure in 100 ccm des so fort verar-beiteten Preß-saftes A	Milch-säure in 100 ccm des Preß-saftes B ohne Zucker-zusatz	Milch-säure in 100 ccm des Preß-saftes B mit Zucker-zusatz	Phos-phor-säure in 100 ccm des Preß-saftes A	Phos-phor-säure in 100 ccm des Preß-saftes B ohne Zucker-zusatz	Phos-phor-säure in 100 ccm des Preß-saftes B mit Zucker-zusatz	In 100 ccm des Preß-saftes B ohne Zucker-zusatz neuge-bildete Milch-säure	In 100 ccm des Preß-saftes B mit Zucker-zusatz neuge-bildete Milch-säure	In 100 ccm des Preß-saftes B ohne Zucker-zusatz neuge-bildete Phos-phor-säure	In 100 ccm des Preß-saftes B mit Zucker-zusatz neuge-bildete Phos-phor-säure	Bemerkungen.
11	80 ccm	4,8 ccm	60 Min.	0,1620 g	0,2491 g	0,2416 g	0,0830 g	0,1701 g	0,1643 g	0,0871 g	0,0796 g	0,0871 g	0,0813 g	Kaltversuch. In Preßsaft B mit Zuckerzusatz kamen 4ccm einer Traubenzuckerlösung von 5,4% = 0,216 gr Traubenzucker Titrationdifferenz mit und ohne Traubenzucker 0,55 ccm. Kaltversuch. Zuckerzusatz wie im vorigen Versuch. Titrationdifferenz zwischen B mit und B ohne Traubenzucker = 1,35 ccm.
12	80	4,8	60	0,1951	0,2619	0,2801	0,1839	0,2357	0,2320	0,0668	0,0850	0,0518	0,0481	
13	30	4,0	60	0,1971	0,2849	0,2849	—	—	—	0,0878	0,0878	—	—	Kaltversuch. Keine Phosphorsäurebestimmung. Zuckerzusatz: 0,216 g in isotonischer Lösung. Nach 30 Minuten im Preßsaft ohne Zuckerzusatz 0,0675, im Preßsaft mit Zucker-zusatz 0,0729% Milchsäure. Titrationdifferenz 0,4 ccm.
14	80	8,0	60	0,2491	0,3726	0,3848	0,1812	0,2267	0,2225	0,1235	0,1367	0,0455	0,0413	Kaltversuch. Zuckerzusatz 0,216 g in 4 ccm wässriger Lösung. In Titrationdifferenz zwis. a B mit B ohne Traubenzucker = 0,9 ccm.

Wir haben daher unsere früher mit ganz negativen Ergebnissen angestellten Versuche über die Einwirkung von Traubenzucker auf den Umfang der Milchsäurebildung im Muskelpreßsaft¹⁾ unter Anwendung starker Kühlung etc. bei der Preßsaftgewinnung wiederholt.

Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle III niedergelegt.

Aus den Kolonnen 11 und 12 dieser Tabelle ist der Umfang der Milchsäurebildung mit und ohne Traubenzuckerzusatz ersichtlich.

In Versuch 13, in dem keine Phosphorsäurebestimmungen ausgeführt wurden, ist die Milchsäurebildung mit und ohne Traubenzuckerzusatz gleich groß. Bei Versuch 11 ist in dem mit Zucker versetzten Preßsaft etwas weniger Milchsäure als in dem entsprechenden Leerversuch gefunden, doch liegt der Unterschied durchaus innerhalb der Fehlergrenze der Bestimmung (siehe Bemerkung zu diesem Versuch). Auch für die Mehr-Bildung von Milchsäure in dem mit Zucker versetzten Preßsaftanteil in Versuch 14 gilt das gleiche (gebundene ccm $n/10$ -Jodlösung in B ohne Traubenzucker 27,6 ccm, in B mit Traubenzucker 28,5 ccm).

Nur in Versuch 12 wurde in dem Ansatz mit Traubenzucker eine Mehrbildung von Milchsäure gefunden, die einer Titrationsdifferenz von merklich mehr als 1 ccm entspricht. Bestimmungsfehler von dieser Größe sind allerdings nach unseren ausgedehnten Erfahrungen selten, aber der Ausschlag ist doch zu gering und das Versuchsergebnis zu vereinzelt, um den Schluß zuzulassen, daß hier zugesetzter Traubenzucker durch Muskelpreßsaft in Milchsäure umgewandelt wurde.

Andererseits läßt sich nicht ausschließen, daß in den Versuchen mit starker Kühlung von vornherein im Muskelpreßsaft vorhandene Kohlehydrate sich an der Milchsäurebildung beteiligten.

Wenn auch, wie wir früher feststellten, Glykogen unter den von uns eingehaltenen Versuchsbedingungen im Muskel-

¹⁾ Siehe Embden, Kalberlah und Engel, l. c., S. 57 und Kura Kondo, l. c., S. 77.

preßsaft fehlt, so ist doch Parnas und Wagner¹⁾ darin Recht zu geben, daß möglicherweise irgendwelche Spaltprodukte des Glykogens z. B. dextrinartiger Natur im Preßsaft enthalten waren.

Auch Traubenzucker war möglicherweise vorhanden.

Zu unserer früheren Angabe, daß Traubenzucker im Muskelpreßsaft höchstens in Spuren vorhanden ist, waren wir an der Hand der Knappschen Methode gelangt. Unterdessen hat sich aber herausgestellt, daß diese Methode an dem nach Schenck enteweißten Preßsaftfiltrat versagt. Ob die relativ hohen Reduktionswerte, die Forschbach²⁾ und in neuerlich angestellten Versuchen auch wir bei der Verwendung alkalischer Kupferlösung feststellten, tatsächlich auf Traubenzucker und nicht vielmehr wenigstens zu einem Teil auch auf eine andere Substanz zu beziehen sind, soll in einer nachfolgenden Arbeit erörtert werden.

Wir haben soeben ausgeführt, bei welcher Art der Preßsaftgewinnung wir in der Regel eine die Phosphorsäurebildung stark überwiegende Milchsäurebildung beobachteten.

Es gelang uns in einer langen Reihe weiterer Versuche ohne weiteres — wenigstens in der überwiegenden Mehrzahl der Versuche — völlige oder annähernde Äquimolarität der Phosphorsäure- und Milchsäurebildung zu erzielen, als wir von einer Kühlung des Fleisches bei der Zerkleinerung mit der Fleischhackmaschine absahen, und ferner bei der Bereitung des Preßsaftes die Muskulatur besonders gründlich mit Quarzsand zerrieben und mit sehr viel Kieselguhr mengten. Bei allen späteren Versuchen der Tabelle IV (von Versuch 31 ab) wurde die zerkleinerte Muskulatur mit der gleichen Menge Quarzsand 10—15 Minuten durch einander ablösende Gehilfen kräftig zerrieben, so daß ein sehr feinfaseriger Brei entstand und dann mit einer der Hälfte des Muskelgewichts entsprechenden Kieselguhrmenge gründlich vermengt. Das so gewonnene, ziemlich

¹⁾ Parnas, J. und Wagner, R., l. c.

²⁾ Forschbach, Zur Frage der Muskelmilchsäure beim Diabetes mellitus und der glykolytischen Kraft des Muskels. Bioch. Zeitschr., Bd. 58, S. 339, 1914.

trockene Preßgut lieferte fast stets einen völlig klaren Preßsaft, im Gegensatz zu der oft trüben Preßsaftbeschaffenheit beim Pressen mit weniger Kieselguhr.

Außer diesen Maßnahmen bei der Preßsaftgewinnung führten wir in einem Teil der Versuche noch eine besondere Vorbehandlung des Preßsaftes ein.

Wir stellten uns vor, daß in den Versuchen mit starker Kühlung die Milchsäurebildung beim Stehen des Preßsaftes deswegen überwiegt, weil hier neben der Spaltung von Lactacidogen in äquimolekulare Mengen Milchsäure und Phosphorsäure noch ein anderer milchsäurebildender Vorgang enthalten ist.

In den Versuchen ohne Kühlung kommt es im allgemeinen schon vor und während der Preßsaftgewinnung zu einer stärkeren Milchsäurebildung als in den Kaltversuchen, und es lag nahe, eben die Einwirkung der während der Zerkleinerung der Muskulatur ohne Kühlung gebildeten Säure mit dem Ausbleiben der überwiegenden Milchsäurebildung beim Stehen des Muskelpreßsaftes in Zusammenhang zu bringen.

Wir haben dementsprechend am Preßsaft versucht, durch vorübergehende Säureeinwirkung bei 25° denjenigen Anteil der Milchsäurebildung zu zerstören, der nicht mit dem Auftreten äquimolekularer Mengen Phosphorsäure einhergeht.

In einer Reihe von Versuchen ist das auch in der Tat gelungen. Im einzelnen gestalteten sich diese Versuche folgendermaßen:

Für jeden Einzelversuch kamen stets 80 ccm Preßsaft zur Verwendung. Eine Preßsaftportion wurde sofort in der früher geschilderten Weise nach Schenck gefällt. Eine zweite blieb unter Zusatz von 10 ccm bikarbonat- und zuckerfreier Ringerlösung und einer gemessenen Menge gesättigter Lösung von Natriumbikarbonat während zwei Stunden bei 40° stehen, und wurde dann ebenso wie der sofort gefällte Preßsaftanteil weiterverarbeitet.

Zwei oder mehr Preßsaftportionen wurden mit Säure vorbehandelt, d. h. 80 ccm Preßsaft wurden mit genau 5 ccm $n/2$ -Schwefelsäure, in einzelnen Versuchen auch $n/5$ -Schwefel-

säure versetzt und blieben 30 Minuten in einem Wasserbade von 25° stehen.¹⁾

Nach dieser Zeit wurde einer der Versuche unterbrochen, d. h. nach Schenck gefällt. In einem weiteren Preßsaftanteil wurde zunächst die zugesetzte Schwefelsäure durch genau 5 ccm $n/2$ - (bezw. $n/5$ -) Natronlauge neutralisiert, alsdann die gleiche Menge Natriumbikarbonatlösung wie bei der nicht mit Säure vorbehandelten Preßsaftportion hinzugefügt. Nun kam der Preßsaft ebenfalls auf zwei Stunden ins Wasserbad von 40° und wurde genau wie die übrigen Ansätze weiterverarbeitet.²⁾

Die Ergebnisse von 38 fortlaufenden in der eben geschilderten Weise vorgenommenen Versuche sind in der Tabelle IV aufgeführt, und zwar in der Reihenfolge, in der sie angestellt wurden.

Die Kolonnen 2 bis 8 enthalten die ohne Säurevorbehandlung, die Kolonnen 9 bis 15 die mit Säurevorbehandlung gewonnenen Ergebnisse.

Betrachten wir zunächst die Versuche ohne Säurevorbehandlung, so sehen wir, daß sie zu einem großen Teil eine annähernd äquimolekulare Bildung von Milchsäure und Phosphorsäure aufweisen. (Siehe die fett gedruckten Zahlen in den Kolonnen 6 und 7 und namentlich in Kolonne 8, aus der die Anzahl der auf 100 Milchsäuremoleküle gebildeten Phosphormoleküle hervorgeht.)

Wo aber ohne Säurevorbehandlung die Menge der Milchsäure überwiegt, da wird sehr häufig eben durch diese Vorbehandlung völlige oder annähernde Äquimolarität der neu gebildeten Mengen beider Säuren erzielt oder doch die zu Ungunsten der Phosphorsäure vorhandene Differenz merklich ver-

¹⁾ Einzelne Abweichungen von der Art der Säurevorbehandlung sind aus der Tabelle ersichtlich.

²⁾ Auch die nicht mit Säure versetzten Preßsaftanteile blieben in einem Teil der Versuche ebenso wie die mit Säure versetzten bei 25° stehen. Da diese Modifikation ohne wesentliche Einwirkung auf das Versuchsergebnis war (es kam in einigen langen Versuchen anscheinend schon während der Vorbehandlung zu ganz geringen Milchsäure- und Phosphorsäurebildungen), ist sie bei der Aufstellung der Tabelle IV nicht berücksichtigt.

kleinert. (Siehe namentlich die Versuche 15, 18, 19, 25, 26, 27, 28, 31, 32, 33.)

In anderen Fällen war aber auch die Säurevorbehandlung nicht imstande, das Mißverhältnis zwischen Milchsäurebildung und Phosphorsäurebildung auszugleichen. (Siehe die Versuche 29, 30, 35, 42.)

In Versuch 30 wurden statt 5 ccm $n/2$ -Säure 10 ccm angewandt, wodurch neben einer starken Verminderung der Milchsäurebildung eine fast ebenso starke der Phosphorsäurebildung auftrat.

In denjenigen Versuchen, in denen es durch Säurevorbehandlung, Äquimolarität der neugebildeten Milch- und Phosphorsäure herbeigeführt wurde, war die Herabminderung der Milchsäurebildung zum Teil recht erheblich. (Siehe Kolonnen 6 und 13 der Versuche 19, 25, 26, 27, 28, 31, 32, 33.)

Die Phosphorsäurebildung wurde durch die Säurevorbehandlung in einem Teil der Fälle garnicht, in einem anderen Teile immerhin merklich beeinflusst.

In denjenigen Versuchen, in denen von vornherein die neugebildeten Mengen beider Säuren praktisch äquimolekular waren, wurde fast stets die Milchsäurebildung nur insoweit vermindert, als eine entsprechende Verminderung auch der Phosphorsäurebildung eintrat (Versuche 17, 20, 23, 24, 40), so daß nirgends durch die Säurevorbehandlung ein außerhalb der Fehlergrenzen der Bestimmungen liegendes Überwiegen der Phosphorsäurebildung hervorgerufen wurde.

Zieht man in denjenigen Versuchen der Tabelle IV, in denen die Säurevorbehandlung ausgeführt wurde, die an den säurevorbehandelten Preßsaftanteilen erhaltenen Ergebnisse in Rücksicht, so sind von den 38 Versuchen dieser Tabelle 31 mal Milchsäure und Phosphorsäure in annähernd äquimolekularen Mengen¹⁾ aufgetreten, in 7 Versuchen nicht.

Von diesen 7 Versuchen (Versuch 29, 30, 35, 36, 38, 42, 44) überwog in sechs Fällen die Milchsäurebildung, und

¹⁾ Annähernde Äquimolarität haben wir — in allerdings etwas willkürlicher Weise — überall da angenommen, wo die gefundene Phosphorsäuremenge von der berechneten um nicht mehr als 20% abweicht. Meist ist in den stimmenden Versuchen die Abweichung allerdings viel geringer.

Tabelle 4.

1	2							3		4		5		6		7		8		9		10		11		12		13		14		15		16		17	
	Ohne Säurevorbehandlung																	Vorbehandlung		mit $\frac{N}{2}$ Säure.		Phosphorsäure		In 100 ccm des		In B_3 auf		Menge		Bemerkungen							
	Milchsäure in 100 ccm des		Phosphorsäure in 100 ccm des		In 100 ccm des Preßsaftes B_1 neugebildete		In B_1 auf 100 Moleküle Milchsäure neugebildete		Milchsäure in 100 ccm des		Phosphorsäure in 100 ccm des		In 100 ccm des Preßsaftes B_3 neugebildete		In B_3 auf 100 Moleküle Milchsäure neugebildete		Menge der den Preßsäften B zuge- setzten Bicarbonat- lösung																				
Nr.	sofort verar- beiteten Preß- saftes A_1	nach dem Stehen bei 40° verar- beiteten Preß- saftes B_1	sofort verar- beiteten Preß- saftes A_1	nach dem Stehen bei 40° verar- beiteten Preß- saftes B_1	Milch- säure	Phos- phor- säure	Phosphorsäuremoleküle	sofort verar- beiteten Preß- saftes A_3	nach dem Stehen bei 40° verar- beiteten Preß- saftes B_3	sofort verar- beiteten Preß- saftes A_3	nach dem Stehen bei 40° verar- beiteten Preß- saftes B_3	Milch- säure	Phos- phor- säure	Phosphorsäuremoleküle	sofort verar- beiteten Preß- saftes A_3	nach dem Stehen bei 40° verar- beiteten Preß- saftes B_3	Milch- säure	Phos- phor- säure	Phosphorsäuremoleküle	ccm																	
15	0,4009	0,5899	0,2132	0,3794	0,1890	0,1662	80	0,3846 [0,4104]	0,5447 [0,5886]	0,2098 [0,2193]	0,3675 [0,3974]	0,1601 [0,1782]	0,1577 [0,1781]	90 [92]	6	Die mit Säure vorbehandelten Preßsäfte standen 30 Minuten bei 20°.																					
16	0,3058	0,4273	0,1744	0,3049	0,1215	0,1305	99	—	—	—	—	—	—	—	—	—	Der Muskel wurde mit sehr viel Kieselguhr gepreßt. Bei Vorbehandlung mit $\frac{N}{2}$ Säure deutliche Abnahme der Phosphorsäurebildung.																				
17	0,3814	0,5528	0,1509	0,3271	0,1714	0,1762	94	0,3807 [0,3780]	0,5130 [0,5400]	0,1643 [0,1678]	0,3073 [0,3376]	0,1323 [0,1620]	0,1430 [0,1698]	99 [96]	6	Sehr trocken gepreßt. Vorbehandlung mit Säure während 30 Minuten. bei 25°.																					
18	0,2362	0,3442	0,2837	0,3630	0,1080	0,0793	67	0,2268	0,3260	0,2594	0,3461	0,0992	0,0867	80	6	Sehr trocken gepreßt. Säurebehandlung wie beim vorigen Versuch.																					
19	0,2713	0,4246	0,1530	0,2843	0,1533	0,1313	78	0,2673	0,3928	0,1572	0,2943	0,1255	0,1371	100	6	Säurebehandlung wie bei den vorigen Versuchen.																					
20	0,3280	0,4630	0,1524	0,2927	0,1315	0,1403	95	0,3307	0,4522	0,1480	0,2764	0,1215	0,1284	97	6	Säurebehandlung wie bei den vorigen Versuchen. Sehr trocken gepreßt.																					
21	0,2930	0,3672	0,2029	0,2732	0,0742	0,0703	87	—	—	—	—	—	—	—	9	Derselbe Preßsaft wurde auch zum Zusatzversuch mit Hexosephosphorsäure verwandt. Versuch 61 Tabelle 8.																					
22	0,3469	0,4347	0,1947	0,2806	0,0878	0,0859	90	—	—	—	—	—	—	—	6	Der nicht ganz einwandfreie Versuch mit $\frac{N}{2}$ Säure, der ein abweichendes Ergebnis gab, wird hier nicht angeführt.																					

Tabelle 4 (Fortsetzung).

1	Ohne Säurevorbehandlung								Vorbehandlung		mit $\frac{N}{2}$ Säure						17
	Milchsäure in 100 ccm des		Phosphorsäure in 100 ccm des		In 100 ccm des Presssaftes B ₁ neugebildete		In B ₁ auf 100 Moleküle Milchsäure neugebildete Phosphorsäuremoleküle	Milchsäure in 100 ccm des		Phosphorsäure in 100 ccm des		In 100 ccm des Presssaftes B ₂ neugebildete		In B ₂ auf 100 Moleküle Milchsäure neugebildete Phosphorsäuremoleküle	Menge der den Presssaften B zugeetzten Bicarbonatlösung ccm		
	sofort verarbeiteten Presssaftes A ₁	nach dem Stehen bei 40° verarbeiteten Presssaftes B ₁	sofort verarbeiteten Presssaftes A ₁	nach dem Stehen bei 40° verarbeiteten Presssaftes B ₁	Milchsäure	Phosphorsäure		sofort verarbeiteten Presssaftes A ₂	nach dem Stehen bei 40° verarbeiteten Presssaftes B ₂	sofort verarbeiteten Presssaftes A ₂	nach dem Stehen bei 40° verarbeiteten Presssaftes B ₂	Milchsäure	Phosphorsäure				
Nr.	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g		
23	0,2511	0,3233	0,2135	0,2843	0,0722	0,0708	90	0,2646	0,3166	0,2166	0,2681	0,0520	0,0515	90	6	Säurebehandlung 30 Minuten bei 25°.	
24	0,2963	0,4300	0,1432	0,2917	0,1337	0,1485	102	0,2815	0,4064	0,1437	0,2687	0,1249	0,1250	92	6	Säurebehandlung 30 Minuten bei 25°.	
25	0,3915	0,4982	0,2692	0,3577	0,1067	0,0885	76	0,3983	0,4867	0,2658	0,3517	0,0884	0,0859	89	6	Säurebehandlung 30 Minuten bei 25°.	
26	0,4050	0,5008	0,3059	0,3831	0,0958	0,0772	74	0,4165	0,4833	0,3073	0,3834	0,0668	0,0761	105	6	Säurebehandlung 30 Minuten bei 25°.	
27	0,2551	0,3361	0,2956	0,3622	0,0810	0,0666	75	0,2538	0,3233	0,2904	0,3598	0,0695	0,0694	92	6	Säurebehandlung 60 Minuten bei 25°.	
28	0,3672	0,5069	0,1934	0,3041	0,1397	0,1107	73	0,3780	0,4961	0,1609	0,2853	0,1181	0,1244	97	6	Säurebehandlung 30 Minuten bei 25°. Der Anfangswert der Phosphorsäure ist im Säureversuch kleiner als im Leerversuch. Analysenfehler.	
29	0,3834	0,5373	0,2103	0,3165	0,1539	0,1062	63	0,3793	0,5056	0,2140	0,3044	0,1263	0,0904	66	6	Trocken gepreßt. Säurebehandlung 30 Minuten bei 25°. Siehe auch Hexosephosphatversuch 62, Tabelle 8.	
30	0,3429	0,5130	0,1987	0,3144	0,1701	0,1157	62	0,3429	0,4442	0,2013	0,2753	0,1013	0,0740	67	6	Nicht ganz trocken gepreßt Säurebehandlung mit 10 ccm $\frac{N}{2}$ H ₂ SO ₄ während 30 Minuten Siehe auch Versuch 55, Tabelle 5.	

Tabelle 4 (Fortsetzung).

1	2							3		4		5		6		7		8		9		10		11		12		13		14		15		16		17	
	Ohne Säurevorbehandlung														Vorbehandlung				mit $\frac{N}{2}$ Säure								Bemerkungen										
	Milchsäure in 100 ccm des		Phosphorsäure in 100 ccm des		In 100 ccm des Pressaftes B ₁ neugebildete		In B ₁ auf 100 Moleküle Milchsäure neugebildete Phosphorsäuremoleküle		Milchsäure in 100 ccm des		Phosphorsäure in 100 ccm des		In 100 ccm des Pressaftes B ₂ neugebildete		In B ₂ auf 100 Moleküle Milchsäure neugebildete Phosphorsäuremoleküle		Menge der den Pressäften B zugeetzten Bicarbonat- lösung																				
sofort verarbeiteten Pressaftes A ₁ g	nachdem Stehen bei 40° verarbeiteten Pressaftes B ₁ g	sofort verarbeiteten Pressaftes A ₁ g	nachdem Stehen bei 40° verarbeiteten Pressaftes B ₁ g	Milchsäure g	Phosphorsäure g	Milchsäure g	Phosphorsäure g	sofort verarbeiteten Pressaftes A ₂ g	nachdem Stehen bei 40° verarbeiteten Pressaftes B ₂ g	sofort verarbeiteten Pressaftes A ₂ g	nachdem Stehen bei 40° verarbeiteten Pressaftes B ₂ g	Milchsäure g	Phosphorsäure g	Milchsäure g	Phosphorsäure g	Milchsäure g	Phosphorsäure g	Milchsäure g	Phosphorsäure g	Milchsäure g	Phosphorsäure g	Milchsäure g	Phosphorsäure g	Milchsäure g	Phosphorsäure g	Milchsäure g					Phosphorsäure g	Milchsäure g	Phosphorsäure g	Milchsäure g	Phosphorsäure g	Milchsäure g	Phosphorsäure g
31	0,5096	0,6520	0,2505	0,3773	0,1424	0,1268	75	0,5117	0,6116	0,2547	0,3767	0,0999	0,1220	112	6	Trocken gepreßt. Quarzsand und Kieselguhr gewogen. Der zerkleinerte Muskel 15 Minuten mit Quarzsand zerrieben. Im Muskelpresssaft B fanden sich wenig mehr Purinkörper als im Muskelpresssaft A.																					
32	0,4442	0,5636	0,2690	0,3804	0,1194	0,1114	86	0,4448	0,5353	0,2748	0,3678	0,0905	0,0930	94	6	Säurebehandlung 20 Minuten bei 25°. Wie im vorigen Versuch gepreßt.																					
33	0,4732	0,5913	0,2674	0,3804	0,1181	0,1130	88	0,4772	0,5690	0,2695	0,3715	0,0918	0,1020	102	6	Gewinnung des Pressaftes wie in den vorhergehenden Versuchen. Säurevorbehandlung 30 Minuten bei 25°.																					
34	0,3739	0,4489	0,2933	0,3736	0,0750	0,0803	98	—	—	—	—	—	—	—	8	Gewinnung des Pressaftes wie in den vorigen Versuchen. Siehe auch Hexosephosphorsäureversuch 63 Tabelle 8.																					
35	0,4536	0,5953	0,2837	0,4010	0,1417	0,1173	76	0,4468	0,5764	0,2864	0,3984	0,1296	0,1120	79	6	Gewinnung des Pressaftes wie in den vorigen Versuchen, jedoch nur 5 Minuten mit Quarzsand gerieben. Säurevorbehandlung 30 Minuten bei 25°.																					
36	0,5063	0,6183	0,3080	0,3974	0,1120	0,0894	73	—	—	—	—	—	—	—	11	Pressung trocken, jedoch nur 5 Minuten mit Quarzsand und Kieselguhr gerieben.																					

Tabelle 4 (Fortsetzung).

1 Nr.	2 Ohne Säurevorbehandlung								9 Vorbehandlung		11 mit $\frac{N}{2}$ Säure					17 Bemerkungen
	3 Milchsäure in 100 ccm des		4 Phosphorsäure in 100 ccm des		6 In 100 ccm des Preßsaftes B ₁ neugebildete		8 In B ₁ auf 100 Moleküle Milchsäure neugebildete Phosphorsäuremoleküle	10 Milchsäure in 100 ccm des		12 Phosphorsäure in 100 ccm des		13 In 100 ccm des Preßsaftes B ₃ neugebildete		15 In B ₃ auf 100 Moleküle Milchsäure neugebildete Phosphorsäuremoleküle	16 Menge der den Preßsäften B zuge- setzten Bicarbonat- lösung ccm	
	5 sofort verar- beiteten Preß- saftes A ₁ g	sofort nachdem Stehen bei 40° verar- beiteten Preß- saftes B ₁ g	sofort verar- beiteten Preß- saftes A ₁ g	nachdem Stehen bei 40° verar- beiteten Preß- saftes B ₁ g	Milch- säure g	Phos- phor- säure g		sofort verar- beiteten Preß- saftes A ₃ g	nachdem Stehen bei 40° verar- beiteten Preß- saftes B ₃ g	sofort verar- beiteten Preß- saftes A ₃ g	nachdem Stehen bei 40° verar- beiteten Preß- saftes B ₃ g	Milch- säure g	Phos- phor- säure g			
37	0,4063	0,4779	0,3265	0,4016	0,0716	0,0751	96	—	—	—	—	—	—	6	Trocken gepreßt, 10 Minuten mit Quarzsand gerieben.	
38	0,4090 0,4063	0,4914	0,2964 0,2954	0,3667	0,0838	0,0708	78	—	—	—	—	—	—	8	Pressung wie im vorigen Versuch. Die untereinanderstehenden Zahlen entsprechen Doppelbestimmungen.	
39	0,4165	0,5009 0,5204	0,2394	0,3376 0,3382	0,0941	0,0985	96	—	—	—	—	—	—	6	Preßsaftgewinnung wie in den vorigen Versuchen. Siehe auch Inosinsäureversuche 58 Tabelle 6.	
40	0,2086	0,2963	0,2129	0,3176	0,0877	0,1047	109	0,2140	0,2990	0,2145	0,3223	0,0850	0,1078	115	6	Preßsaftgewinnung wie in den vorigen Versuchen. Säurevorbehandlung 30 Minuten bei 25°.
41	0,4475	0,5434	0,2336	0,3440	0,0959	0,1104	106	—	—	—	—	—	—	6	Preßsaftgewinnung wie in den vorigen Versuchen.	
42	0,4921	0,5690	0,3191	0,3646	0,0769	0,0455	54	0,4597	0,5636	0,3049	0,3678	0,1039	0,0629	56	10	Preßsaftgewinnung wie in den vorigen Versuchen. Säurebehandlung 30 Minuten bei 25°. Siehe auch Hexosephosphatversuch 64, Tabelle 8.
43	0,3571	0,4705	0,1913	0,3144	0,1134	0,1231	100	—	—	—	—	—	—	10	Preßsaftgewinnung wie in den vorigen Versuchen. Siehe auch Versuch 59, Tabelle 7 mit Phytin und Versuch 65, Tabelle 8 mit Hexosephosphat.	
44	0,3679	0,4664	0,1707	0,3091	0,0985	0,1384	130	—	—	—	—	—	—	6	Preßsaftgewinnung wie in den vorigen Versuchen. Siehe auch Hexosephosphatversuch 66, Tabelle 8.	

nur einmal (Versuch 44) war überwiegende Phosphorsäurebildung vorhanden.

Als Gesamtergebnis der in Tabelle IV zusammengestellten Versuche dürfen wir demnach bezeichnen, daß es unter den oben geschilderten Versuchsbedingungen bei kurzdauerndem Stehen von Preßsaft aus Hundemuskelatur in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle annähernd äquimolekulare Mengen von Milchsäure und Phosphorsäure gebildet wurden.

Die Versuche sind umso beweisender, als der Umfang der Milchsäure- und Phosphorsäurebildung von Fall zu Fall recht verschieden war.

Die auf Grund unserer ersten, in Tabelle I aufgeführten Versuche, ausgesprochene Vermutung, daß das Lactacidogen eine organische Phosphorverbindung sei, die durch Muskelpreßsaft unter Bildung äquimolarer Mengen Milchsäure und Phosphorsäure (und vielleicht unter Freiwerden noch anderer Substanzen) gespalten werden können, gewann also durch die eben besprochene fortlaufende Reihe von 38 Versuchen außerordentlich an Wahrscheinlichkeit.

Der Aufgabe, die chemische Natur dieser Substanz aufzuklären, suchten wir in verschiedener Weise näher zu treten.

Wir gingen zunächst der Vorstellung nach, daß das Lactacidogenmolekül Milchsäure und Phosphorsäure enthielte, und wir versuchten daher aus frischen Preßsäften resp. aus nach Schenck gewonnenen Preßsaftfiltraten nach erschöpfender Extraktion der präformierten Milchsäure, durch Spaltung mit verdünnter Schwefelsäure und mit verdünnter Phosphorsäure, Milchsäure zu gewinnen. Es konnte auf diese Weise keine Spur Milchsäure aus Preßsaftfiltraten abgespalten werden, trotzdem, wie bereits hier erwähnt sei, das Lactacidogen sicher in die Preßsaftfiltrate übergeht.

Dennoch unterzogen wir auch die Möglichkeit, daß das Lactacidogen eine phosphatidartige Verbindung sei, in der Milchsäure und Phosphorsäure in ähnlicher Weise verbunden wären, wie Fettsäure und Phosphorsäure im Lecithin, d. h. durch Vermittlung eines Glycerinmoleküls, einer Prüfung.

In zwei Versuchen waren von vornherein nur Spuren Glycerin vorhanden, und auch beim Stehen des Muskelpreßsaftes unter den zu Milchsäure und Phosphorsäure führenden Bedingungen konnte keine oder doch keine merkliche Glycerinbildung festgestellt werden.¹⁾

Weiterhin bemühten wir uns, das Lactacidogen aus dem Preßsaft zu isolieren. Diese noch keineswegs abgeschlossenen Isolierungsversuche sind in einer nachfolgenden Arbeit von Embden und Laquer niedergelegt.

Schließlich suchten wir auch festzustellen, ob etwa eine der bekannten organischen Phosphorverbindungen des Tierkörpers in Milchsäure und Phosphorsäure zerlegt werde.

In erster Linie konnten hier verschiedene Nucleinsäuren und Nucleinsäurederivate in Betracht kommen.

Tabelle 5 enthält einige Versuche, die wir unter Zusatz der Natronsalze von Thymonucleinsäure, Hefenucleinsäure und Thyminsäure anstellten.

In Versuch 53 ist nur die Milchsäure nach 80 Minuten langem Stehen des Preßsaftes unter den bekannten Versuchsbedingungen bestimmt.

Aus den Kolonnen 3, 9 und 15 geht hervor, daß der Milchsäuregehalt der Preßsäfte am Schlusse des Versuchs durch den Zusatz von Thymonucleinsäure und von Thyminsäure nicht oder nicht merklich verändert wurde.

In Versuch 54 wurde die Milchsäure sofort und nach dem Stehen des Preßsaftes unter Zusatz von hefenucleinsaurem und thyminsaurem Natrium bestimmt. Auch hier zeigt sich keine außerhalb der Fehlergrenze der Bestimmungen gelegene Beeinflussung der Milchsäurebildung durch die genannte Substanzen.

Versuch 55 zeigt, daß Zusatz von thymonucleinsaurem Natrium weder den Umfang der Milchsäurebildung beeinflusst, noch zu vermehrter Phosphorsäure führt.

¹⁾ Bei den Glycerinbestimmungen verfahren wir genau in der von Embden, Schmitz und Baldes (Biochem. Zeitschr., Bd. 45, S. 174, 1912) geschilderten Weise.

Tabelle 5.

Nr.	Ohne Zusatz						Mit Zusatz von Nucleinsäure						Mit Zusatz von Thyminsäure						20 Bemerkungen	
	Milchsäure in 100 ccm des		Phosphor- säure in 100 ccm des		In 100 ccm des		Milchsäure in 100 ccm des		Phosphor- säure in 100 ccm des		In 100 ccm des		Milchsäure in 100 ccm des		Phosphor- säure in 100 ccm des		In 100 ccm des			
	sofort ver- arbei- teten Preß- saftes A ₁ g	nach dem Stehen bei 40° ver- arbei- teten Preß- saftes B ₁ g	sofort ver- arbei- teten Preß- saftes A ₁ g	nach dem Stehen bei 40° ver- arbei- teten Preß- saftes B ₁ g	Milch- säure g	Phos- phor- säure g	sofort ver- arbei- teten Preß- saftes A ₂ g	nach dem Stehen bei 40° ver- arbei- teten Preß- saftes B ₂ g	sofort ver- arbei- teten Preß- saftes A ₂ g	nach dem Stehen bei 40° ver- arbei- teten Preß- saftes B ₂ g	Milch- säure g	Phos- phor- säure g	sofort ver- arbei- teten Preß- saftes A ₃ g	nach dem Stehen bei 40° ver- arbei- teten Preß- saftes B ₃ g	sofort ver- arbei- teten Preß- saftes A ₃ g	nach dem Stehen bei 40° ver- arbei- teten Preß- saftes B ₃ g	Milch- säure g	Phos- phor- säure g		
53	—	0,4921 0,5076	—	—	—	—	—	0,4961	—	—	—	—	—	0,5143 0,5103	—	—	—	—	—	Dauer des Stehens der Preßsäfte bei 40° = 80 Minuten. Für jeden Einzelversuch 80 ccm Preßsaft. Bicarbonatzusatz je 6 ccm. Zu den Preßsäften A ₂ und B ₂ je 0,375 g mit Natronlauge neutralisierter Thymonucleinsäure. Zu A ₃ und B ₃ je 0,375 g mit Natronlauge neutralisierter Thyminsäure in 15, ccm Wasser.
54	0,4657	0,6561	—	—	0,1904	—	0,4617	0,6655	—	—	0,2038	—	0,4630	0,6601	—	—	0,1971	—	—	Dauer des Stehens der Preßsäfte bei 40° = 2 Stunden. Für jeden Einzelversuch 80 ccm Preßsaft. Bicarbonatzusatz: 10 ccm. Zu den Versuchen A ₂ und B ₂ gleiche Mengen (je ca. 0,24 g) mit Natronlauge neutralisierter Hefenucleinsäure, zu A ₃ und B ₃ ca. die gleiche Menge neutralisierter Thyminsäure.
55	0,3429	0,5130	0,1987	0,3144	0,1701	0,1157	0,3456	0,5225	0,2055	0,3207	0,1769	0,1152	—	—	—	—	—	—	—	Dauer des Stehens der Preßsäfte bei 40° = 2 Stunden. Für jeden Einzelversuch 80 ccm Preßsaft. Bicarbonatzusatz 6 ccm. Zu den Versuchen A ₂ und B ₂ die gleichen Mengen mit Natronlauge neutralisierter Thymonucleinsäure. Angabe der Menge fehlt. Der Leerversuch wurde bereits als Versuch 30 der Tabelle 4 wiedergegeben.
56	0,4799	0,5751	0,2362	0,3218	0,0952	0,0856	—	—	—	—	—	—	0,4847	0,5710	0,2431	0,3244	0,0863	0,0813	—	Zu den Versuchen A ₃ und B ₃ je 0,4 g mit Natronlauge neutralisierter Thyminsäure. Der Leerversuch wurde bereits als Versuch 45 der Tabelle 4 wiedergegeben. Dauer des Stehens bei 40° = 2 Stunden. 80 ccm Preßsaft für jeden Einzelversuch. Bicarbonatzusatz 6 ccm.

Daß Muskelplasma thymonucleinsaures Natrium nicht zu spalten vermag, geht übrigens bereits aus den Versuchen hervor, die Fritz Sachs¹⁾ unter Kossels Leitung anstellte.

Versuch 56 zeigt, daß auch Thyminsäure weder den Umfang der Milchsäurebildung noch den der Phosphorsäurebildung im Muskelpreßsaft beeinflusst.

Zwei weitere Versuche wurden unter Zusatz der für den Muskel charakteristischen Nucleinsäure, der Inosinsäure, in Form ihres Natriumsalzes angestellt.

In Versuch 57 wurden nur Milchsäurebestimmungen, in Versuch 58 Milchsäure- und Phosphorsäurebestimmungen ausgeführt. Die scheinbare, geringfügige Steigerung der Milchsäurebildung unter dem Einfluß des Inosinsäuresatzes in beiden Versuchen berechnet sich aus Titrationsunterschieden die innerhalb der Fehlergrenze der Bestimmung liegen.²⁾ Auch Phosphorsäure wurde aus der Inosinsäure nicht abgespalten (Versuch 58).

Die entgegenstehenden Beobachtungen von Levene und Medigreceanu³⁾ sind wohl durch den Unterschied in der angewandten Versuchstechnik bedingt.

Ebensowenig wie den bisher genannten Substanzen kommt dem Phytin, dessen Vorkommen auch im tierischen Organismus durch die Untersuchungen Starkensteins⁴⁾ recht wahrscheinlich geworden ist, ein merklicher Einfluß auf die Milch-

¹⁾ Sachs, Fr., Über die Nuclease. Diese Zeitschr., Bd. 46, 1905, S. 349.

²⁾ In Versuch 47 wurden bei der Titration der beiden B-Bestimmungen ohne Zusatz 41,7 ccm resp. 42,1 ccm $n/10$ -Jodlösung gebunden, in den beiden entsprechenden Bestimmungen mit Zusatz von Inosinsäure 42,8 ccm resp. 43,2 ccm.

In Versuch 58 beträgt der Titrationsunterschied zwischen derjenigen B-Bestimmung ohne Zusatz, die den höheren Wert lieferte und derjenigen unter Zusatz von Inosinsäure 0,85 ccm.

³⁾ Levene und Medigreceanu. On nucleases. Journ. of biol. chemistry, Bd. 9, S. 65, 1911.

⁴⁾ Starkenstein, Die biologische Bedeutung der Inositphosphorsäure. Bioch. Zeitschr., Bd. 30, S. 56, 1911.

Tabelle 6.

1	2	Ohne Zusatz von Inosinsäure			Mit Zusatz von Inosinsäure			14						
		3	4	5	6	7	8		9	10	11	12	13	
Nr.	Milchsäure in 100 ccm des		Phosphorsäure in 100 ccm des		In 100 ccm des Preßsaftes B ₁ neugebildete		Milchsäure in 100 ccm des		Phosphorsäure in 100 ccm des		In 100 ccm des Preßsaftes B ₂ neugebildete		Bemerkungen.	
	sofort verarbeiteten Preßsaftes A ₁	nach dem Stehen bei 40° verarbeiteten Preßsaftes B ₁	sofort verarbeiteten Preßsaftes A ₁	nach dem Stehen bei 40° verarbeiteten Preßsaftes B ₁	sofort verarbeiteten Preßsaftes A ₂	nach dem Stehen bei 40° verarbeiteten Preßsaftes B ₂	sofort verarbeiteten Preßsaftes A ₂	nach dem Stehen bei 40° verarbeiteten Preßsaftes B ₂	sofort verarbeiteten Preßsaftes A ₃	nach dem Stehen bei 40° verarbeiteten Preßsaftes B ₃	sofort verarbeiteten Preßsaftes A ₃	nach dem Stehen bei 40° verarbeiteten Preßsaftes B ₃		
57	— 0,4259	0,5629 0,5683	— —	— —	— —	0,1370 0,1424	— —	— —	— —	— —	— —	— —	0,1519 0,1573	— —
58	— 0,4165	0,5009 0,5204	— 0,2394	— 0,3376 0,3382	— 0,0985	0,0941	— 0,4151	— 0,5319	— 0,2415	— 0,3350	— 0,1168	— 0,0935	— 0,0935	Je 80 ccm Preßsaft. Zu den B-Ver- suchen 6 ccm Bicarbonatlösung. Dauer des Stehens bei 40° = 75 Minuten. Eine A-Bestimmung mit Inosinsäurezusatz wurde nicht ausgeführt. Der Berech- nung der Milchsäurebildung unter Ino- sinsäurezusatz wurde der Leerwert für A zugrunde gelegt. Zu B ₁ wurde die aus 0,7 g inosinsaurem Baryum ge- wonnene Lösung von inosinsaurem Natrium hinzugefügt. Je 80 ccm Preßsaft. Zu den B-Ver- suchen je 6 ccm Bicarbonatlösung. Dauer des Stehens bei 40° 2 Stunden. Zu A ₂ und B ₂ je etwa 0,2 g Inosinsäure als Natriumsalz. Die Leerwerte wurden bereits als Versuch 39 in Tabelle 4 wiedergegeben.

säure- und Phosphorsäurebildung im Muskelpreßsaft zu. (Siehe Tabelle 7, Versuche 59 und 60)¹⁾.

Wir erinnerten uns nunmehr einer neueren Entdeckung aus dem Gebiete der Hefephysiologie.

Bekanntlich hat Iwanoff²⁾ zuerst den Nachweis geführt, daß es bei der Gärung von Zucker unter Zusatz von Alkaliphosphat unter der schon früher von Wroblewski³⁾ beobachteten Beschleunigung der Hefegärung zur Bildung einer organischen Phosphorsäureverbindung kommt.

Harden and Young⁴⁾ machten in demselben Jahre die gleiche Entdeckung.

Es gelang zuerst Iwanoff,⁵⁾ diese Phosphorsäureverbindung, die er für eine Triosephosphorsäure hielt, in Form ihres Kupfersalzes rein darzustellen.

Die Darstellungsmethode wurde sehr wesentlich durch Young⁶⁾ verbessert.

v. Lebedew⁷⁾ sprach zuerst die Ansicht aus, daß es sich um eine Hexosephosphorsäure handle; er glaubte auf Grund seiner Analysen des Phenylhydrazinsalzes eines Hexosephosphorsäureosazons, daß in der Hexosephosphorsäure an ein Hexosemolekül ein Phosphorsäuremolekül gebunden sei. Young⁸⁾ führte dann den endgültigen Nachweis, daß es sich um eine Hexosediphosphorsäure handle. (Bei der Darstellung des ebengenannten Hexosephosphorsäureosazons kommt es zur Abspaltung der einen Phosphorsäure).

¹⁾ Für die freundliche Überlassung eines reinen Präparats von Phytinnatrium (es war nach Angabe der Fabrik nur durch geringe Spuren Eisen verunreinigt) sind wir der Gesellschaft für chemische Industrie in Basel zu großem Dank verpflichtet.

²⁾ Iwanoff, Trav. Soc. des Naturalistes, St. Petersburg, Bd. 34, 1905.

³⁾ Wroblewski, Journal f. prakt. Chem., Bd. 64, S. 1, 1901. (Siehe auch Buchner, «Zymasegärung», 1903, S. 140).

⁴⁾ Harden and Young, Proc. Chem. Soc., Bd. 21, S. 189, 1905.

⁵⁾ Iwanoff, Diese Zeitschr., Bd. 50, S. 281, 1907.

⁶⁾ Young, Proc. Chem. Soc. 1907, S. 65, Proc. Royal Soc. 1909, S. 528, Bd. 81.

⁷⁾ von Lebedew, A., Biochem. Zeitschr., Bd. 20, S. 114, 1909, Bd. 28, S. 213, 1910.

⁸⁾ Young, W. J., Biochem. Zeitschr., Bd. 32, S. 188, 1911.

Tabelle 7.

1	2	3			4			5			6			7			8			9			10			11			12			13			14		
		Ohne Zusatz von Phytin									Mit Zusatz von Phytin									Bemerkungen.																	
Nr.	Milchsäure in 100 ccm des			Phosphorsäure in 100 ccm des			Milchsäure in 100 ccm des			Phosphorsäure in 100 ccm des			In 100 ccm des Preßsaftes B ₁ neugebildete			In 100 ccm des Preßsaftes B ₂ neugebildete																					
	sofort	nach dem Stehen bei 40°	verarbeitetes A ₁	sofort	nach dem Stehen bei 40°	verarbeitetes A ₁	sofort	nach dem Stehen bei 40°	verarbeitetes A ₂	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g		
59	0,3571	0,4705	0,1913	0,3144	0,1134	0,1231	[0,3571]	0,4556	0,2013	0,3324	0,0985	0,1311	Für jeden Einzelversuch 80 ccm Preßsaft. Zu den B-Versuchen je 10 ccm Bicarbonatlösung zu A ₂ und B ₂ je 0,4 g reines Phytinatrium, den bis zum Verschwinden der Rotfärbung von blauem Lackmuspapier Natronlauge zugesetzt war. Die Milchsäurebestimmung A ₂ lieferte sicher zu niedrigen Wert. Der Berechnung der Milchsäurebildung wurde der Leerwert für A zugrunde gelegt. Die Leerwerte dieses Versuchs finden sich auch in Versuch 43, Tabelle 4 und Versuch 65 der Tabelle 8.																								
60	0,5218	0,6601	0,2515	0,4211	0,1383	0,1696	0,5184	0,6736	0,2531	0,4264	0,1552	0,1733	Für jeden Einzelversuch 80 ccm Preßsaft. Zu A ₂ und B ₂ je 0,2 g Phytinatrium. Zu jedem B-Versuch 10 ccm gesättigte Natriumbicarbonatlösung.																								

Die Hexosediphosphorsäure wird von den genannten Autoren als ein normales intermediäres Produkt bei der Alkoholgärung des Zuckers betrachtet, wenn auch die Vorstellungen über die Rolle desselben im einzelnen noch voneinander abweichen.

Dafür, daß Hexosephosphorsäure auch ein Zwischenprodukt beim Abbau der Hexose im tierischen Organismus ist, wurden sichere Anhaltspunkte bisher nicht gewonnen.

Wohl wurde dieser Gedanke verschiedentlich geäußert, so von Rona und Döblin¹⁾ und von Euler und Yngve Funke.²⁾ Die letzteren Autoren fanden auch, daß nach der Verabreichung von Calciumhexosephosphat per os an Kaninchen die in dem Kohlenhydratester zugeführte Phosphorsäure größtenteils in anorganischer Form ausgeschieden wird, und daß der Glycerinextrakt frischer Kaninchendarmschleimhaut aus Hexosephosphat Phosphorsäure abspaltet. Glycerinextrakt aus der Darmschleimhaut des Schweines zeigte nach weiteren Versuchen H. Eulers³⁾ das gleiche Verhalten und ebenso auch ein Wasserextrakt aus Pferdeniere.

Wir haben es im vorstehenden höchst wahrscheinlich gemacht, daß sich im Muskel eine Substanz findet, die durch Muskelpreßsaft, also wohl sicher auf fermentativem Wege unter Bildung äquimolarer Mengen Milchsäure und Phosphorsäure zerlegt wird. Wenn im Molekül der Hexosephosphorsäure zwei Phosphorsäuren an eine Hexose gebunden sind, so könnten, die Bildung von zwei Milchsäuremolekülen aus einer Hexose vorausgesetzt, beim Abbau der Hexosephosphorsäure sehr wohl äquimolekulare Phosphorsäure- und Milchsäure-Mengen entstehen.

Für unsere Preßsaftversuche unter Zusatz von Hexosephosphorsäure, zu deren Besprechung wir nunmehr übergehen, stellten wir Baryumhexosephosphat nach den Angaben von Young⁴⁾ unter Verwendung von Trockenhefe nach v. Lebe-

¹⁾ Rona, P. und Döblin, *Biochem. Zeitschr.*, Bd. 32, S. 504, 1911.

²⁾ Euler, Hans und Funke, Yngve. Über die Spaltung der Kohlenhydratphosphorsäureester. *Diese Zeitschr.*, Bd. 77, S. 488, 1912.

³⁾ Euler, H., Verhalten der Kohlenhydratphosphorsäureester im Tierkörper. *Diese Zeitschr.*, Bd. 79, S. 375, 1912.

⁴⁾ Young, l. c., S. 178.

dew¹⁾ dar. Ein Teil der Präparate war noch mit wenig Baryumphosphat verunreinigt.

Das Bariumhexosephosphat (wir gingen in allen Versuchen von etwa 1,2 g aus) wurde unmittelbar vor dem Versuch durch Verreiben mit der berechneten oder etwas mehr als der berechneten Menge $n/2$ Schwefelsäure zerlegt, das Bariumsulfat durch Zentrifugieren entfernt und der klare (nötigenfalls filtrierte) Abguß mit soviel verdünnter Natronlauge versetzt, daß blaues Lackmuspapier gerade nicht mehr gerötet wurde. Gleiche Mengen der so gewonnenen Lösung (je annähernd die Hälfte) wurden einem Preßsaftanteil A und B hinzugefügt (dem ersteren erst nach Zusatz der Fällungssalzsäure) und die Zusatzversuche wie in allen früheren Fällen mit entsprechenden Leerversuchen verglichen.

In Tabelle 8 sind 7 derartige Versuche zusammengestellt.

Vergleicht man die Kolonnen 6 und 7 (Milchsäure- und Phosphorsäurebildung ohne Hexosephosphat) mit den Kolonnen 12 und 13 (Milchsäure- und Phosphorsäurebildung unter Hexosephosphatzusatz), so sieht man, daß in allen Fällen unter dem Einflusse der Hexophosphorsäure eine sehr deutliche Mehrbildung von Milchsäure und Phosphorsäure eingetreten ist. Überall ist diese Mehrbildung außerhalb der Bestimmungsfehler gelegen und erreicht in einem Teil der Versuche ganz erhebliche Werte.

Das geht ohne weiteres aus den Kolonnen 14 und 15 hervor, in denen die durch den Zusatz der Hexosephosphorsäure verursachte Mehrbildung von Milchsäure und Phosphorsäure berechnet ist.

Aus diesen Kolonnen ersieht man auch, daß in der Mehrzahl der Fälle (Versuche 61, 62, 63, 67) die Menge der durch Hexosephosphorsäurezusatz gebildeten Phosphorsäure die der Milchsäure weit überwiegt.²⁾

Zugesetzte Hexosephosphorsäure vermag also als einzige von allen bisher untersuchten Substanzen — einschließlich

¹⁾ Die Trockenhefe wurde von Schroder in München bezogen.

²⁾ In Versuch 66, wo das Umgekehrte der Fall ist, dürfte wohl ein Bestimmungsfehler vorliegen.

Tabelle 8.

1 Nr.	2 Ohne Hexosephosphat						3 Mit		4 Hexosephosphat						5 Bemerkungen
	6 Milchsäure in 100 ccm des		7 Phosphorsäure in 100 ccm des		8 In 100 ccm des Preßsaftes B neugebildete		9 Milchsäure in 100 ccm des		10 Phosphorsäure in 100 ccm des		11 In 100 ccm des Preßsaftes B ₁ neugebildete		12 Aus Hexosephosphat in 100 ccm Preßsaft neugebildete		
	13 sofort verarbeiteten Preßsaftes A	14 nach dem Stehen bei 40° verarbeiteten Preßsaftes B	15 sofort verarbeiteten Preßsaftes A	16 nach dem Stehen bei 40° verarbeiteten Preßsaftes B	17 Milch- säure	18 Phosphor- säure	19 sofort verarbeiteten Preßsaftes A ₁	20 nach dem Stehen bei 40° verarbeiteten Preßsaftes B ₁	21 sofort verarbeiteten Preßsaftes A ₁	22 nach dem Stehen bei 40° verarbeiteten Preßsaftes B ₁	23 Milch- säure	24 Phosphor- säure	25 Milch- säure	26 Phosphor- säure	
g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g		
61	0,2930	0,3672	0,2029	0,2732	0,0742	0,0703	0,2909	0,4063	0,2275	0,3754	0,1154	0,1479	0,0412	0,0776	Der Leerversuch wurde bereits als Versuch 21 der Tabelle 4 aufgeführt.
62	0,3834	0,5373	0,2103	0,3165	0,1539	0,1062	0,3712	0,5886	0,2378	0,4370	0,2174	0,1992	0,0635	0,0930	Der Leerversuch wurde bereits als Versuch 29 der Tabelle 4 aufgeführt.
63	0,3739	0,4489	0,2933	0,3736	0,0750	0,0803	0,3726	0,5231	0,2970	0,4882	0,1505	0,1912	0,0755	0,1109	Der Leerversuch wurde bereits als Versuch 34 der Tabelle 4 aufgeführt.
64	0,4921	0,5690	0,3191	0,3646	0,0769	0,0455	0,4786	0,6244	0,3107	0,4222	0,1458	0,1115	0,0689	0,0660	Der Leerversuch wurde bereits als Versuch 42 der Tabelle 4 aufgeführt.
65	0,3571	0,4705	0,1913	0,3144	0,1134	0,1231	0,3611	0,5042	fehlt	0,3530	0,1431	—	0,0297	—	Der Leerversuch wurde bereits als Versuch 43 der Tabelle 4 und Versuch 59 der Tabelle 7 aufgeführt.
66	0,3679	0,4664	0,1707	0,3091	0,0985	0,1384	0,3773	0,5170	0,1749	0,3398	0,1397	0,1649	0,0412	0,0265	Der Leerversuch wurde bereits als Versuch 44 der Tabelle 4 aufgeführt.
67	0,4199	0,5198	0,2499	0,3583	0,0999	0,1084	0,4266	0,5501	0,2568	0,4122	0,1235	0,1554	0,0236	0,0470	Der Leerversuch wurde bereits als Versuch 46 der Tabelle 4 aufgeführt.

Traubenzucker und Glykogen — die Milchsäurebildung im Muskelpreßsaft zu steigern.

Wir halten es für unzweifelhaft, daß als die Quelle der mehrgebildeten Milchsäure der Kohlehydratkomplex des Hexosephosphorsäuremoleküls anzusehen ist.

Würde bei der Spaltung des Hexosephosphorsäuremoleküls der Hexosekomplex quantitativ in Milchsäure umgewandelt, so müßten äquimolekulare Mengen Milchsäure und Phosphorsäure entstehen.

Daß dies nicht der Fall ist, sondern daß in der Regel die Bildung von Phosphorsäure überwiegt, dürfte wohl darauf hindeuten, daß Hexosephosphorsäure und Lactacidogen nicht einfach identisch sind, wofür wir auch auf einem anderen Wege als dem hier beschrittenen gewichtige Anhaltspunkte gewonnen haben.

Wohl aber glauben wir, daß durch die Beobachtung, daß der Muskelpreßsaft unter gewissen Versuchsbedingungen äquimolekulare Mengen Milchsäure und Phosphorsäure bildet, im Zusammenhalt mit der Tatsache, daß Hexosephosphorsäure als einzige von allen untersuchten Substanzen den Umfang dieser Milchsäure- und Phosphorsäurebildung steigert, es äußerst wahrscheinlich wird, daß auch das Lactacidogen als eine Kohlenhydratphosphorsäure anzusehen ist, oder doch in seinem Molekül einen Kohlenhydratphosphorsäurekomplex enthält.

Diese Vorstellung gewinnt durch unsere in einer nachstehenden Arbeit zu schildernden Versuche, das Lactacidogen zu isolieren, ganz erheblich an Wahrscheinlichkeit.

Welche biologische Bedeutung dem Lactacidogen zukommt, wird sich besser als es im Anschluß an die in der vorliegenden Untersuchung mitgeteilten Tatsachen möglich ist, nach Kenntnis des in einigen nachfolgenden Arbeiten niedergelegten Materials erörtern lassen.

Vorgreifend möchten wir nur erwähnen, daß wir das Vorkommen von Lactacidogen bisher ausschließlich in der Muskulatur beobachtet haben und daß insoweit die Annahme

einer besonderen Bedeutung des Lactacidogens gerade für die Muskeltätigkeit durchaus mit den beobachteten Tatsachen vereinbar ist.

Bereits gelegentlich unserer früheren Untersuchungen über die Milchsäurebildung im Muskelpreßsaft¹⁾ haben wir daran erinnert, daß nach der Anschauung verschiedener Autoren einer bestimmt lokalisierten Milchsäureproduktion innerhalb des Muskelgewebes eine außerordentliche Bedeutung für die Auslösung der Muskelkontraktion zukommt und daß das Lactacidogen gerade bei der raschen Produktion von Milchsäure, wie wir sie annehmen müssen, falls die Muskelverkürzung überhaupt durch Säuerung bedingt sein soll, eine wichtige Rolle spielen dürfte.

Hierbei mag zunächst die Frage unerörtert bleiben, ob das Lactacidogen als eigentliche Verkürzungssubstanz anzusehen ist, d. h. ob die aus ihm gebildeten Säuren «die kontraktile Elemente des Muskels direkt ohne Vermittlung eines Erregungsprozesses zur Kontraktion bringen» oder ob die sauren Spaltprodukte des Lactacidogens lediglich als Reize wirken, d. h. erst durch Vermittlung neuer Vorgänge im Muskel die Kontraktion auslösen (Schwenker)²⁾.

Auf Grund der im Vorstehenden mitgeteilten Tatsachen darf man es als sehr wahrscheinlich ansehen, daß die anscheinend jeder Muskelverkürzung vorausgehende Steigerung des Wasserstoffionengehalts bestimmter Muskelelemente nicht nur durch das Auftreten der Milchsäure, sondern auch durch das Freiwerden saurer Valenzen der Phosphorsäure bedingt ist. Gerade hierdurch könnte es wohl leichter zu einer stärkeren Steigerung des Wasserstoffionengehaltes kommen, als durch Milchsäureproduktion allein.

Aus einem Lactacidogenmolekül könnten durch Muskelenzyme ähnlich, wie es bei der Hexosephosphorsäure sicher

¹⁾ Embden, Kalberlah und Engel, l. c., S. 61. Kura Kondo, l. c., S. 80.

²⁾ Schwenker, G., Über Dauerverkürzung quergestreifter Muskel, hervorgerufen durch chemische Substanzen. Pflügers Archiv f. d. ges. Physiol., Bd. 157, S. 372, 1914.

der Fall ist, zwei Moleküle Milchsäure und daneben zwei (vorher esterartig an Hexose gebundene) saure Valenzen der Phosphorsäure freiwerden.

Gelegentlich unserer früheren Untersuchungen über die Milchsäurebildung im Muskelpreßsaft haben wir die Anschauung ausgesprochen, daß die Substanz, die durch fermentative Vorgänge im Muskelpreßsaft Milchsäure bildet, nicht einfach Kohlenhydrat ist, sondern daß wir eben ein besonderes Lactacidogen annehmen müssen.

Die letztere Annahme wird durch die vorstehenden Untersuchungen durchaus bestätigt, aber allem Anscheine nach ist das Lactacidogen selbst als eine Kohlenhydratverbindung anzusehen, und auf das engste mit dem Kohlenhydratabbau im Muskel verbunden.

Die oben geschilderten Versuche sprechen dafür, daß der Kohlenhydratabbau im Muskel ebenso wie derjenige durch Hefe beginnt mit einer synthetischen Anlagerung des Kohlenhydrats an Phosphorsäure oder doch an einen phosphorsäurehaltigen organischen Komplex.¹⁾

Wenn dem Muskelpreßsaft zugesetztes Kohlenhydrat nicht zu Milchsäure abgebaut wird, wohl aber das in ihm vorhandene Lactacidogen und ihm zugesetztes Hexosephosphat unter Milchsäure- und Phosphorsäurebildung zerfallen, so ist das vielleicht so zu deuten, daß der Muskelpreßsaft wohl noch die Fähigkeit hat, präformiertes Lactacidogen abzubauen, nicht aber das Vermögen Kohlenhydrat und den Phosphorsäurekomplex zu Lactacidogen zu synthetisieren.

Vielleicht ist aber auch das Überwiegen der Milchsäurebildung über die Phosphorsäurebildung, daß man gerade dann fast regelmäßig beobachtet, wenn man die Muskulatur bei der Preßsaftgewinnung besonders schonend behandelt,²⁾ als der Ausdruck eines Restes von solchen synthetischen Vorgängen aufzufassen, d. h. es erfolgt hier neben dem Abbau des Lacta-

¹⁾ Siehe hierüber Embden und Laquer, Diese Zeitschrift, dieser Band, S. 94.

²⁾ Siehe die oben geschilderten «Versuche mit starker Kühlung» in Tabelle II, S. 13 und Tabelle III, S. 14.

cidogens unter Milchsäure- und Phosphorsäurebildung noch ein Aufbau aus Kohlenhydrat und Phosphorsäure.¹⁾

Die oben geschilderte «Säurevorbehandlung» wird hier nach vielleicht gerade auf die «Phosphatase»²⁾ schädigend einwirken.

Im intakten Muskel, in dem es zu starker Milchsäurebildung ohne jede Phosphorsäurebildung kommen kann,³⁾ dürfte die Synthese des Lactacidogens seiner Spaltung das Gleichgewicht halten.

Wenn es richtig ist, daß die Spaltung des Lactacidogens unter Bildung von Milchsäure und Phosphorsäure die Muskelkontraktion verursacht, oder doch einleitet, so darf man diese Lactacidogenspaltung als Dissimilation im Sinne Ewald Herings bezeichnen, die Neubildung von Lactacidogen aus Kohlenhydrat und Phosphorsäure als Assimilation.

Wir sind uns wohl bewußt, daß die auf Grund unserer tatsächlichen Befunde und früheren Forschungen hier geäußerten Vorstellungen noch keineswegs endgültig bewiesen sind, sie haben sich uns aber zum Teil als Arbeitshypothesen bewährt.

¹⁾ Wir lassen hier und in den folgenden Ausführungen außer acht, daß sehr möglicherweise, wie bereits oben erwähnt, der Phosphorsäurekomplex des Lactacidogens außer an Kohlenhydrat noch an ein anderes Radikal gebunden ist.

²⁾ Euler, H., Zur Nomenklatur der Enzyme. Diese Zeitschr., Bd. 74, S. 13, 1911.

³⁾ Siehe Parnas und Wagner, Biochem. Zeitschr., Bd. 61, S. 387, 1914 und namentlich nachstehende Arbeit von F. Laquer.