

Über das Gärungsoferment im Tierkörper.

2. Mitteilung.¹⁾

Von

Otto Meyerhof.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Kiel.)

(Der Redaktion zugegangen am 13. März 1918.)

Inhaltsübersicht:

1. Die Verbreitung des Coferments im Tierkörper.
2. Der Hemmungskörper der Gärung in den Organen.
3. Das physiologische Verhalten des Organoferments.
4. Die chemischen Eigenschaften des Organoferments.
5. Vergleich von Coferment und «Atmungskörper».
6. Anhang: Das Vorkommen des Coferments in keimenden Erbsen.

In tierischen Organen, insbesondere in der Muskulatur, ist, wie ich kürzlich gezeigt habe, eine Substanz enthalten, die als Coferment der alkoholischen Hefegärung wirksam ist. Die vorliegende Untersuchung erstreckt sich auf die Fragen, in welchen Organen und unter welchen Bedingungen dieser Körper nachweisbar ist, und welche etwaigen Besonderheiten ihn in seinem chemischen Verhalten und seiner physiologischen Wirksamkeit auszeichnen einmal gegenüber dem in der Hefe enthaltenen Coferment der Gärung und dann gegenüber der als «Atmungskörper» bezeichneten Substanz, die wir in Hefe- und Muskelextrakten vorfanden und mit einiger Wahrscheinlichkeit als ein Coferment der Atmung ansprachen. Von dem Ergebnis dieser Versuche hängt es ab, ob und inwieweit diese drei Körper nicht allein hinsichtlich ihres physiologischen Verhaltens als verwandt, sondern als schlechthin identisch zu betrachten sind. Da indes die chemische Natur keines der drei aufgeklärt ist, so kann auch bei völlig gleichsinnigem Verhalten von ihnen höchstens so viel gesagt werden, daß kein Grund vorliegt, sie als verschieden anzusehen. An jede Lösung dieses Problems muß sich die weitere Frage anschließen, was

¹⁾ Vgl. diese Zeitschr., Bd. 101, S. 165 (1918).

denn eigentlich das Coferment der Gärung überhaupt zu tun hat. Ohne daß hierüber etwas ausgemacht werden würde, hätte es keinen Zweck, über die gemeinsame Funktion zu spekulieren, die möglicherweise das Coferment bei der Gärung und Atmung erfüllen könnte. Doch soll dies Thema erst bei späterer Gelegenheit behandelt werden. Dasselbe gilt für die Studien zur Muskelatmung, die hier nur kurz herangezogen werden sollen, soweit als sie für den Zusammenhang von Gärungscoferment und Atmungskörper sprechen.

Methodik: Für alle Versuche, soweit sie Gärungsmessungen sind, wurde die Methode von Warburg-Dorner benutzt: Messung des entwickelten Kohlensäuredrucks mit Barcroftschen Blutgasmanometern.¹⁾ Versuchstemperatur 25° C. Die Atmung wurde, wie bisher, nach der Methode von Warburg-Siebeck²⁾ gemessen. Im einzelnen wurde nach den Angaben der vorigen Arbeit verfahren. Die zur Gewinnung des Macerationssafts dienende Trockenhefe stellte ich nach der Vorschrift von Lebedew³⁾ her aus Reinzuchtunterhefe der Berliner Hochschulbrauerei. Die Tauglichkeit der Hefe für diesen Zweck, soweit Gärkraft, Haltbarkeit und Resistenz gegen schädliche Einflüsse in Frage kommen, nahm im Laufe der letzten Monate ständig ab, wahrscheinlich im Zusammenhang mit der Kriegsernährung der Hefe. Es gelang in der Regel nicht mehr so glatt wie in den ersten Versuchen, das Coferment im Ultrafiltrationsapparat restlos auszuwaschen, ohne die Zymase des Rückstandes zu schädigen. In andern Fällen ließ sich das Coferment überhaupt nicht völlig aus dem Rückstand entfernen, trotz starken Waschens. Man mußte

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. 81, S. 99 (1912). Die Kohlensäuremenge in Kubikzentimetern (0°, 760 mm) berechnet nach der Formel: $\text{CO}_2 = \frac{p \cdot v}{10000(1 + at)} + \frac{a \cdot p \cdot F}{10000}$, wo p die Druckzunahme in Millimeter Manometerflüssigkeit (10000 = 1 Atm.) bedeutet, v Volumen des Gasraumes der Gärungsgefäße (meist 42 ccm), F angewandte Flüssigkeitsmenge (1,2 ccm), a Absorptionskoeffizient für Kohlensäure darin bei 25° (0,76).

²⁾ Abderhaldens Handbuch der Biochem. Arbeitsmethoden, VIII, S. 12.

³⁾ Diese Zeitschr., Bd. 73, S. 447 (1911).

sich daher öfters mit einer nicht völligen Inaktivierung des Rückstandes begnügen. Auch wurde die Zugabe einer Spur Hexosephosphat, die bisher nur wünschenswert erschien, um die Verzögerung der Angärung aufzuheben, absolut notwendig, weil der Macerationssaft sonst öfters überhaupt nicht mehr in Gärung geriet. Das hexosediphosphorsaure Na wurde wie bisher durch Umsatz des Calciumsalzes mit Natriumoxalat hergestellt. Als Calciumsalz wurde das Präparat «Candiolin» von Bayers Farbwerken benutzt, das nach Angabe der Firma reines mittels Hefe hergestelltes Calciumhexosephosphat ist und für dessen Überlassung ich der genannten Firma zu großem Dank verpflichtet bin. Endlich mußte auch die zuzugebende Phosphatmenge genau ausprobiert werden, da die Gärung bei geringer Überschreitung des Optimums stark gehemmt sein konnte. Durch all dies wurden die Versuche erschwert, aber irreführende Fehler konnten nicht entstehen.

1. Die Verbreitung des Coferments im Tierkörper.

Es scheint, daß alle tierischen Organe das Coferment enthalten. Festgestellt wurde es beim Frosch in der Muskulatur, Leber, Ovarien, bei der Ratte in der Muskulatur, beim Kaninchen in Muskeln, Leber, Lunge, Niere. Deutlich nachweisbar, aber in geringerer Konzentration findet es sich in der Milch (Ziegen-, Kuhmilch), es fehlt im Blutserum (Rinder-serum). Bei identischer Herstellung der Extrakte: Kochen des feingeschnittenen Organs mit der gleichen Gewichtsmenge destillierten Wassers und Filtration, erhält man die wirksamsten Auszüge aus Froschmuskulatur, schwächere sowohl aus Säugetiermuskulatur wie aus allen andern genannten Organen. Bei den hier gewählten Versuchsbedingungen, insbesondere einem Überschuß an zugesetztem Phosphat, wodurch der Einfluß des wechselnden Phosphatgehalts der Organe herabgedrückt wird, ist es *ceteris paribus* — vor allem bei Einhaltung der gleichen Reaktion der Flüssigkeit und gleicher Zymasekonzentration — gestattet, aus der Gärungsgeschwindigkeit auf die Cofermentmenge zu schließen und für bestimmte Versuchszeiten wenigstens eine Gleichsinnigkeit zwischen beiden anzunehmen.

Tabelle I.

Die unter einer Nummer angeführten Versuche gehören zu derselben Versuchsserie. Die Experimente sind im Anschluß an die erste Mitteilung fortlaufend numeriert.

In jedem Versuch benutzt: 1,2 ccm Flüssigkeit, darin 0,2 ccm 20%ige Fruktose (bei 9. Glukose), 0,1 ccm $m/_{20}$ hexosediphosphorsaures Natrium, 0,1 ccm KH_2PO_4 von wechselnder Konzentration; 0,2 ccm dreifach eingedickter Ultrafiltrationsrückstand (Zymase), mit wechselnden Mengen Wasser gewaschen, und die angegebenen Zusätze.

	CO ₂ ccm	Versuchs- zeit
9. Je 0,1 ccm $m/_{5}$ - KH_2PO_4 Rückstand mit 860 fach Wasser gewaschen.		2 Std. 20'
Mit 0,6 ccm destilliertem Wasser	0,04	
› 0,6 › Hefekochsaft	2,74	
› 0,6 › Muskelkochsaft (Frosch)	1,34	
› 0,6 › Leberkochsaft (›)	0,80	
› 0,6 › Ziegenmilch (roh)	0,27	
10. Je 0,1 ccm $m/_{2}$ - KH_2PO_4 , Rückstand 110 fach Wasser.		1 Std.
Mit 0,6 ccm destilliertem Wasser	0,22 ¹⁾	
› 0,6 › Muskelkochsaft (Frosch)	2,38	
› 0,6 › Ovarialkochsaft (›)	1,05	
11. Je 0,1 ccm $m/_{2}$ - KH_2PO_4 , Rückstand 80 fach Wasser.		1 Std. 50'
Mit 0,6 ccm destilliertem Wasser	0,06	
› 0,6 › Hefekochsaft	4,17	
› 0,6 › Muskelkochsaft (Ratte)	2,22	
› 0,6 › Kuhmilch (gekocht)	0,20	
12. Je 0,1 ccm $m/_{2}$ - KH_2PO_4 , Rückstand 290 fach Wasser.		3 Std. 30'
Mit 0,6 ccm destilliertem Wasser	0,05	
› 0,6 › Muskelkochsaft (Kaninchen)	1,95	
› 0,6 › Leberkochsaft (›)	1,45	
› 0,6 › Nierenkochsaft (›)	1,74	
› 0,6 › Lungenkochsaft (›)	1,66	
› 0,6 › Ochsen Serum (roh)	0,04	
› 0,6 › › (gekocht)	0,05	

2. Der Hemmungskörper der Gärung in den Organen.

Stellt man die Organauszüge statt durch Kochen durch bloßes Schütteln der feingeschnittenen Organe mit kaltem

¹⁾ Vgl. Methodik S. 3.

Wasser her, so sind sie nicht imstande, die Gärung des gewaschenen Rückstandes zu aktivieren. Dies gilt von allen Organen, während sich bei Milch nur ein geringer Unterschied von roher und gekochter ergibt. Als nächstliegender Grund könnte hierfür in Betracht kommen, daß in der Kälte das Coferment aus den Geweben nicht extrahierbar wäre. Kocht man nun aber einen kalten Organauszug nachträglich auf, so ist jetzt eine deutliche, allerdings verhältnismäßig schwache Wirksamkeit nachweisbar; sie beträgt etwa $\frac{1}{6}$ der des heißen Organextraktes. Dieser letztere Unterschied ist, wie sich auch aus weiterhin folgenden Versuchen ergibt, in der Tat auf ungenügende Extraktion des Coferments in der Kälte zu beziehen. Wie kommt aber die Aktivierung des kalten Organauszuges durch Kochen zustande? Entweder wird durch Kochen erst die wirksame Substanz gebildet oder ein Hemmungskörper zerstört. Dies läßt sich dadurch entscheiden, daß man etwas kalten Organauszug zu dem Gärungssystem Rückstand + Muskelkochsaft hinzugibt: Die Gärung desselben wird gehemmt. Der so nachgewiesene Hemmungsstoff wirkt nun aber nicht etwa nur in Gegenwart des «tierischen» Coferments. Setzt man vielmehr kalten Organauszug zum System: Rückstand + Hefekochsaft, oder zum unfiltrierten Macerationssaft, so ist die Gärung bei entsprechenden Mengen wiederum total gehemmt. (Zusatz von Muskelkochsaft steigert dagegen die Gärungsgeschwindigkeit wegen Vermehrung des Coferments. Vgl. Vers. 17.)

Tabelle II.

Zusammensetzung der Gärungsgemische im ganzen wie in Tab. I. Organauszüge vom Frosch, falls nicht anders bemerkt.

	CO ₂ ccm	Versuchs- zeit
13. 0,1 ccm $\frac{m}{s}$ -KH ₂ PO ₄ , Rückstand mit 1200 fach Wasser gewaschen.		2 Std.
Mit 0,6 ccm destilliertem Wasser	0,04	
› 0,6 › Muskelkochsaft	1,69	
› 0,6 › kaltem Muskelextrakt	0,02	
› 0,6 › kalt., nachträgl. gekocht. Muskelextr.	0,26	

Tab. II (Fortsetzung).

	CO ₂ ccm	Versuchs- zeit
14. 0,1 ccm m/3-KH ₂ PO ₄ , Rückstand, 450fach Wasser. Mit 0,6 ccm destilliertem Wasser	0,05	2 Std.
› 0,6 › Muskelkochsaft	1,97	
› 0,6 › kaltem Muskelextrakt	0,05	
› 0,6 › kalt. Muskelextr., nachträgl. gekocht	0,31	
15. Vgl. Vers. 12, Rückstand, 290fach Wasser. Mit 0,6 ccm destilliertem Wasser	0,05	3 Std. 30'
› 0,6 › Leberkochsaft (Kaninchen)	1,45	
› 0,6 › kaltem Leberextrakt (Kaninchen) . .	0,05	
16. 0,1 ccm m/3-KH ₂ PO ₄ , Rückstand mit 3000fach Wasser gewaschen. mit 0,6 ccm destilliertem Wasser	0,05	2 Std. 50'
› 0,3 › Muskelkochsaft + 0,3 ccm dest. Wasser	0,90	
› 0,3 › Muskelkochsaft + 0,3 ccm kaltem Muskelextrakt	0,17	
17. 0,1 m/3-KH ₂ PO ₄ , unfiltrierter Macerationssaft. 0,6 ccm Macerationssaft + 0,2 ccm dest. Wasser .	2,12	30'
0,2 › › + 0,6 › › › .	0,37	
0,2 › › + 0,6 › Muskelkochsaft	0,88	
0,2 › › + 0,6 › kalter Muskel- extrakt	0,02	

Greift der Hemmungskörper nur das Coferment oder die Zymase oder das ganze Gärungssystem an? Das läßt sich offenbar durch Variation der Mengenverhältnisse der Gärungskomponenten ermitteln. Zymasemenge und -Konzentration wird erhöht oder verringert durch Benutzung von mehr oder weniger Rückstand auf die gleiche Flüssigkeitsmenge; die Cofermentmenge durch Verwendung verschiedener Mengen Kochsaft. Man erreicht die extremsten Unterschiede, wenn man einmal sehr viel Zymase (Rückstand) mit sehr wenig Coferment zusammen benutzt, und umgekehrt. Setzt man nun zu diesen Gemischen genau gleich viel kalten Muskelextrakt, und zwar so viel, daß er eine noch nicht ganz vollständige Hemmung bei durchschnittlichen Verhältnissen hervorruft, so ist folgendes zu erwarten: Greift der Hemmungskörper allein die Zymase

an, so muß die Hemmung bei Vermehrung der Zymase (Rückstand) geringer werden und ebenso umgekehrt, ohne Rücksicht auf die Cofermentmenge; geschieht andererseits der Angriff am Coferment, so wird die Hemmung bei einem Überschuß an Coferment verringert; würde die Hemmung das ganze Gärungssystem betreffen, so müßten die Variationen, wenn die Gärungsgröße durch sie nicht sehr verändert wird, ohne bedeutenden Einfluß sein. Nun ergibt sich ganz ausgesprochen das erste Resultat: Die Hemmung nimmt ab bei steigender, nimmt zu bei herabgesetzter Zymasemenge und sogar im umgekehrten Sinn variiert Cofermentmenge. Der Hemmungskörper greift also allein die Zymase an. Bei geeigneter Wahl der Mengenverhältnisse kann die Hemmung durch die gleiche Menge kalten Extrakts im gleichen Flüssigkeitsvolumen in einem Extrem fast 100 %, im andern kaum 10 % betragen (Vers. Nr. 19). Für die Kombination: wenig Zymase + viel Coferment versetzt man zweckmäßig eine geringe Menge unfiltrierten Macerationssafts mit viel Muskel- oder Hefekochsaft.

Hierzu sei noch eine interessante, aber nicht völlig aufgeklärte Beobachtung mitgeteilt: in allen «gehemmten» Versuchslösungen tritt eine mit der Zeit immer stärker werdende Fällung auf, die an die Fällungen erinnert, die man im Hefepreßsaft und Hefemacerationssaft durch Narkotika in hemmenden Konzentrationen erhält. Doch läßt sich in unserm Fall nicht ausschließen, daß Eiweißkörper des tierischen Extrakts und nicht des Hefeextrakts gefällt werden.

Tabelle III.

Zusammensetzung wie vorher. Besonderheiten angegeben.

	CO ₂ ccm	Hemmung	Versuchs- zeit
18. 1,4 ccm Flüssigkeit. 0,1 ccm m-KH ₂ PO ₄ . A. Wenig Zymase, viel Coferment. Je 0,2 ccm unfiltrierter Macerationssaft.			1 Std. 30'
Mit 0,8 ccm destilliertem Wasser . .	0,64		
» 0,5 » Hefekochsaft + 0,35 dest. Wasser	1,57		

Tab. III (Fortsetzung).

	CO ₂ ccm	Hemmung %	Versuchs- zeit
mit 0,5 ccm Hefekochsaft + 0,35 kaltem Muskelextrakt	0,02	100	
› 0,5 › Muskelkochsaft + 0,35 dest. Wasser	1,16		
› 0,5 › Muskelkochsaft + 0,35 kalt. Muskelextrakt	0,02	100	
B. Viel Zymase, wenig Coferment. Je 0,4 ccm 3 fach eingedickter Rückstand, 140- fach Wasser gewaschen.			2 Std. 10'
Mit 0,6 ccm destilliertem Wasser . . .	0,04		
› 0,3 › Hefekochsaft + 0,35 dest. Wasser	1,38		
› 0,3 › Hefekochsaft + 0,35 kaltem Muskelextrakt	0,55	60	
C. Mittlere Mengen. Je 0,12 ccm Rück- stand.			2 Std. 10'
Mit 0,5 ccm Hefekochsaft + 0,35 destil- liert. Wasser	1,15		
› 0,5 › Kochsaft + 0,35 kalt. Mus- kelextrakt	0,13	88	
19. 1,5 ccm Flüssigkeit. 0,1 ccm m-KH₂PO₄			
A. Wenig Zymase, viel Coferment. 0,2 ccm Macerationssaft.			45'
Mit 0,55 ccm Hefekochsaft + 0,25 dest. Wasser	0,73		
› 0,55 › Hefekochsaft + 0,25 kalt. Muskelextrakt	0,02	100	
B. Viel Zymase, wenig Coferment. 0,6 ccm 3 fach eingedickter Rückstand, 310- fach Wasser gewaschen.			1 Std. 30'
Mit 0,25 ccm Hefekochsaft + 0,25 dest. Wasser	2,55		
› 0,25 › Hefekochsaft + 0,25 kalt. Muskelextrakt	2,25	10	
C. Mittlere Mengen. Je 0,2 ccm Rück- stand.			
Mit 0,8 ccm destilliertem Wasser . .	0,05		
› 0,6 › Muskelkochsaft + 0,25 ccm dest. Wasser	1,89		
› 0,6 › Muskelkochsaft + 0,25 ccm kaltem Muskelextrakt . .	0,38	80	
› 0,6 › Muskelkochsaft + 0,25 ccm kalt. Muskelextr. (1/2 St. 60°)	0,52	72	

Unter Nr. 19 C ist als letzte Reihe ein Versuch registriert, bei dem der kalte Muskelextrakt $\frac{1}{2}$ Stunde auf 60° erwärmt wurde; dadurch ist nur eine geringe Abschwächung seiner Hemmungskraft eingetreten.

Auf die gleiche Weise wie im kalten Muskelauszug läßt sich der Hemmungskörper auch in den andern Organextrakten nachweisen, doch ist er in ihnen — nach derselben Methode dargestellt — in erheblich kleinerer Konzentration vorhanden. Am wenigsten findet man in der Milch. Völlig fehlt er im Blutserum. Es besteht also eigentümlicherweise ein Parallelismus zwischen dem Gehalt an Coferment und an Hemmungskörper; doch ist das vielleicht zufällig.¹⁾

Tabelle IV.

Vgl. Tab. I. Hierzu Versuch Nr. 15. Organe vom Frosch.

	CO ₂ ccm	Hemmung %	Versuchs- zeit
20. 1,3 ccm Flüssigkeit. 0,1 ccm m-KH ₂ PO ₄ , Rückstand 210 fach gewasch., je 0,2 ccm. Mit 0,7 ccm destilliertem Wasser . . .	0,33		2 Std.
» 0,5 » Muskelkochsaft + 0,2 dest. Wasser	2,30		
» 0,5 » Muskelkochsaft + 0,3 kalt. Ovarialextrakt	1,58	30	
21. 1,2 ccm Flüssigkeit. 0,1 ccm m-KH ₂ PO ₄ , Rückstand 1500 fach gewaschen. Mit 0,6 ccm destilliertem Wasser . . .	0,08		2 Std.
» 0,6 » gekochter Ziegenmilch . . .	0,20		
» 0,6 » roher Ziegenmilch	0,18		
22. 1,3 ccm Flüssigk. 0,15 ccm m/s-KH ₂ PO ₄ . Je 0,35 ccm Macerationssaft. Mit 0,5 ccm gekochter Kuhmilch ²⁾ . . .	1,57		1 Std. 30'
» 0,5 » roher Kuhmilch	1,33	15	
23. 1,2 ccm Flüssigkeit. 0,05 ccm m-KH ₂ PO ₄ . Je 0,3 ccm Macerationssaft. Mit 0,6 ccm destilliertem Wasser . . .	3,33		4 Std.
» 0,6 » kaltem Muskelextrakt . . .	0,13	96	
» 0,6 » » Ovarialextrakt . . .	1,02	70	
» 0,6 » » Leberextrakt . . .	0,79	76	
» 0,6 » rohem Ochsen Serum . . .	3,60	0	

¹⁾ Das Vorhandensein dieses Hemmungskörpers macht eine alkoholische Gärung in den überlebenden Organen, wie sie z. B. Stoklasa nachgewiesen zu haben glaubt (Pflügers Archiv, Bd. 101, S. 311, 1904) schon allein sehr unwahrscheinlich. Vgl. auch Harden und Maclean, Journ. of. physiology, Bd. 42, S. 64 (1911).

²⁾ Auch gekochte Kuhmilch hemmt die Gärung etwas aus unbekanntem Gründen.

Die Zerstörung des Hemmungskörpers durch Kochen legt den Gedanken nahe, daß es sich um ein koagulierendes Protein handelt. In diese Richtung deutet auch der Umstand, daß er ein Ultrafilter nicht passiert. Saugt man kalten Muskelextrakt durch ein Collodiumfilter, so hemmt das Ultrafiltrat nicht nur nicht die Gärung des Macerationssafts, sondern steigert sie sogar etwas: im Gegensatz zum Hemmungskörper ist ja das Coferment dialysabel. Allerdings durchdringt auch das Coferment das Collodiumfilter nicht glatt und ungeschädigt, wie aus dem langwierigen Waschen zu seiner völligen Entfernung im Macerationssafttrückstand sowie aus direkten Versuchen hervorgeht, und da schon der kalte Muskelextrakt nur wenig Coferment enthält, ist es nicht verwunderlich, daß der Cofermentgehalt im Ultrafiltrat desselben zu gering ist, um gewaschenen Rückstand zur Gärung zu aktivieren.

Tabelle V.

Von hier an alle folgenden Versuche mit Froschmuskulatur.

24. 1,4 ccm Flüssigkeit. 0,1 ccm $m\text{-KH}_2\text{PO}_4$. 0,6 ccm Macerationssaft.		45'
Mit 0,4 ccm destilliertem Wasser	2,06	
» 0,4 » Ultrafiltrationsrückstand von kaltem Muskelextrakt	0,08	
» 0,4 » Ultrafiltrat von kaltem Muskelextrakt	2,39	
» 0,4 » aufgekochtem Ultrafiltrat von kaltem Extrakt	2,40	
25. Schädigung des Coferments durch Ultrafiltration von Hefekochsaft: Von 5 ccm werden 4 ccm durchs Kollodiumfilter gesaugt. 1,5 ccm Flüssigkeit. 0,1 ccm $m/s\text{-KH}_2\text{PO}_4$, 0,25 Rückstand von Macerationssaft, 95fach gewaschen.		1 Std. 50'
Mit 0,8 ccm destilliertem Wasser	0,23	
» 0,8 » Hefekochsaft	4,18	
» 0,8 » Rückstand von Hefekochsaft	3,95	
» 0,8 » Ultrafiltrat von Hefekochsaft	1,03	

3. Das physiologische Verhalten des Organ-Coferments.

Über die Rolle des Coferments bei der Gärung ist so gut wie nichts bekannt. Wir fragen hier nur, ob die Kinetik des Gärungsverlaufes bei Benutzung des Muskelkochsafts merklich verschieden ist von der mit Hefekochsaft beobachteten. Das ist in der Tat nicht der Fall; denn die Abweichungen, die sich zunächst zeigen, verschwinden bei genauerer Analyse der Erscheinungen oder geringen Modifikationen der Versuchsanordnung. Der Muskelkochsaft enthält viel weniger freies Phosphat als der Hefekochsaft. Diese Differenz ist keineswegs gegenüber dem Phosphatzusatz zu vernachlässigen, denn der Phosphatgehalt von 0,6 ccm Hefekochsaft entspricht etwa 0,15 ccm $m/2$ - KH_2PO_4 , der im Muskelextrakt ist nur ein Sechstel hiervon. Nach den schönen Untersuchungen Hardens und Youngs¹⁾ bedingt aber ein Überschuß an freiem Phosphat (über das jeweils durch Hexosephosphatzersetzung frei werdende) eine Mehrbildung einer dem Phosphat äquimolekularen Kohlen säuremenge. Dieser Umstand wirkt nun in unserm Fall zusammen mit dem geringeren Cofermentgehalt des Muskelkochsafts und bedingt, daß während der «Phosphatsteigerung» der Gärung in gleichen Zeiten weniger CO_2 gebildet wird als mit Hefekochsaft. Andererseits erfolgt aber nach den Untersuchungen Hardens der Anstieg der Gärungsgeschwindigkeit am Anfang bei kleiner Phosphatkonzentration schneller als bei hoher — übrigens bei verschiedenen Preßsäften mit starken individuellen Schwankungen, die zum Teil sicherlich durch wechselnden Cofermentgehalt bedingt sind —, und auch dies läßt sich durch Messungen in kurzen Zwischenräumen (10 Min.) beim Vergleich der Wirkung von Hefekochsaft und Muskelkochsaft feststellen. Ich möchte hier von genauerer Betrachtung der Gärungskinetik Abstand nehmen und verzichte auf weitläufige Mitteilung der Versuchsergebnisse. Jedenfalls wird die Verschiedenheit der Geschwindigkeitskurve

¹⁾ Zusammenfassung: Harden, «Alcoholic Fermentation». London 1911 (Monographs on Biochemistry).

der Gärung in beiden Fällen so vollständig durch die quantitativen Differenzen der Phosphat- und Cofermentkonzentration erklärt, daß sich der Gehalt an freiem Phosphat in den beiden Kochsäften schon allein aus dem Gärungsverlauf genau berechnen ließ.

Als eine weitere Differenz der beiden Kochsäfte erschien es anfangs, daß die merkwürdige, ganz enorme Steigerung der Gärungsgeschwindigkeit durch arsensaures Salz, die von den englischen Forschern studiert und durch beschleunigten Zerfall des Hexosephosphats erklärt worden ist, zwar mit nicht zu stark gewaschenem Macerationssafttrückstand und Hefekochsaft stets zu erhalten war, aber unter gewöhnlichen Umständen niemals mit Muskelkochsaft.

Indessen läßt sich hier auch zeigen, daß sekundäre Momente daran schuld sind, und zwar vor allem der zu geringe Phosphatgehalt des Muskelextrakts. Während nämlich die Zugabe von Phosphat zum Hefekochsaft die Wirkung des arsensauren Natriums eher abschwächt (entsprechend den Hemmungen durch zu hohe PO_4 -Konzentration), ist dieselbe in der Menge von 0,1 ccm $\text{m}/2\text{-KH}_2\text{PO}_4$ unbedingt erforderlich, um eine typische, wenn auch nicht ganz so starke Arseniatsteigerung in Gegenwart von Muskelkochsaft hervorzurufen. Es scheint, daß es sich hierbei nicht, oder jedenfalls nicht allein, um eine unmittelbare Wirkung des Phosphats als Komponente der chemischen Gärungsreaktion handelt — denn dafür ist auch im Muskelextrakt noch genug vorhanden —, sondern um einen schützenden Einfluß desselben gegen eine von Arseniat hervorgerufene Schädigung der Zymase bzw. eines Teils des Enzymkomplexes.

Versuch 26.

Bestimmung des durch Magnesiamixtur fällbaren Phosphats.

(Vgl. Treadwell, Quantitative Analyse II, S. 358 (5. Aufl.).)

In 20 ccm Macerationsskochsaft gefunden 0,258 g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$; entspricht 0,83% P_2O_5 oder 0,116 m PO_4 pro Liter.

In 17 ccm Muskelkochsaft gefunden 0,037 g; entspricht 0,14% P_2O_5 oder 0,02 m PO_4 pro Liter.

Tabelle VI.

Steigerung der Gärungsgeschwindigkeit durch arsensaures Na (0,1 ccm $m/_{30}$) im System: Rückstand + Hefekochsaft und Rückstand + Muskelkochsaft.

	CO ₂ ccm	Arseniat- steigung %	Versuchs- zeit
27. 1,5 ccm Flüssigkeit. Rückstd. schwach (30 fach Wasser) gewaschen; 3 fach eingedickt.			1 Std. 30'
Zusätze:			
0,7 ccm dest. Wasser + 0,2 $m/_{10}$ -Phosphat ¹⁾	0,53		
0,7 » Muskelkochsaft + 0,2 $m/_{10}$ -Phosphat	1,04		
0,7 » Muskelkochsaft + 0,2 $m/_{10}$ -Phosphat + 0,1 $m/_{30}$ -Arseniat	gehobmt		
0,7 » Hefekochsaft + 0,2 dest. Wasser	1,69		
0,7 » Hefekochsaft + 0,1 Arseniat + 0,1 dest. Wasser	4,03	160	
28. 1,4 ccm Flüssigkeit. Rückstand 400 fach mit Wasser gewaschen.			
Zusätze:			
0,8 ccm dest. Wasser	0,05		1 Std. 10'
0,55 » Hefekochsaft + 0,2 dest. Wass.	1,85		2 » 10'
0,55 » Hefekochsaft + 0,15 $m/_{10}$ -Arseniat	4,37	135	2 » 10'
0,55 » Hefekochsaft + 0,1 $m/_{30}$ -Arseniat + 0,1 dest. Wasser . .	4,65	150	2 » 10'
0,6 » Muskelkochsaft + 0,1 dest. Wasser	0,26		1 » 10'
0,6 » Muskelkochsaft + 0,1 $m/_{30}$ -Arseniat	0,18		1 » 10'
0,6 » Muskelkochsaft mit Phosphat gekocht (entsprechend 0,1 ccm $m/_{3}$ -Phosphat) + 0,1 dest. Wasser	0,70		1 » 10'
0,6 » gleicher Muskelkochsaft (mit Phosphat) + 0,1 $m/_{30}$ -Arseniat	1,22	75	1 » 10'

¹⁾ Für diese und manche spätere Versuche ist statt KH_2PO_4 das noch günstigere Gemisch: $2 K_2HPO_4 + 1 KH_2PO_4$ benutzt worden.

Tab. VI (Fortsetzung).

	CO ₂ ccm	Arseniat- steigung ‰	Versuchs- zeit
29. 1,5 ccm Flüssigkeit. Rückstand mit 95fach Wasser gewaschen.			2 Std. 10'
Zusätze:			
0,8 ccm dest. Wasser + 0,1 m/2-Phos- phat	0,25		
0,7 > Muskelkochsaft + 0,1 m/2-Phos- phat + 0,1 dest. Wasser . .	2,00		
0,7 > Muskelkochsaft + 0,1 m/2-Phos- phat + 0,1 m/20-Arseniat . .	3,19	60	

4. Die chemischen Eigenschaften des Organ- Coferments.

Über das chemische Verhalten des Gärungcoferments der Hefe ist, abgesehen von seiner Dialysierfähigkeit, wesentlich das folgende bekannt: Obwohl es für einige Zeit kochbeständig ist, wird es durch mehrstündiges Kochen am Rückflußkühler zerstört, noch schneller in alkalischer Lösung.¹⁾ Es wird durch hochkonzentrierten Alkohol und Aceton gefällt.²⁾ Diese Fällung ist aber häufig nicht vollständig, wie mir scheint, besonders dann, wenn andere alkoholfällbare Substanzen schon aus der Lösung entfernt sind. In Gegenwart von 50 % Alkohol bleibt das Coferment vollständig gelöst.³⁾ Wird eine solche Lösung eingedampft, bei neutraler Reaktion mit überschüssigem Bleiacetat versetzt, filtriert und mit Schwefelwasserstoff behandelt, so ist nach Harden und Young⁴⁾ der überwiegende Teil des Coferments im Filtrat nachweisbar, nur ein geringer wechselnder Anteil mit Bleisalz gefällt worden, was die englischen Forscher für

¹⁾ Siehe u. a. Buchner und Haehn, Biochem. Zeitschr., Bd. 19, S. 191 (1909); ferner Euler, «Chemie der Hefe und der alkoholischen Gärung», 1915.

²⁾ Buchner und Ducharček, Biochem. Zeitschr., Bd. 15, S. 221 (1909). Aceton fällt besser als Alkohol.

³⁾ Harden, Alcoholic fermentation, S. 62. Vgl. auch Hagman, Biochem. Zeitschr., Bd. 69 (1915).

⁴⁾ Harden, a. a. O., S. 62.

einen mehr nebensächlichen, auf Adsorption beruhenden Befund halten. (Unterschied gegen Hexosephosphat, das mit Bleisalz fällt.)¹⁾

Eine große Zahl von Versuchen wurde der Frage gewidmet, ob sich das Muskelcoferment in all diesen Punkten ebenso verhält. Das Ergebnis ist nicht ganz befriedigend, woran zum Teil die mäßig gute Beschaffenheit der Macerations-säfte die Schuld trug, die eine völlige Inaktivierung des Rückstandes teils nicht ermöglichten, teils nicht vertrugen, zum andern Teil die überaus große Empfindlichkeit des geprüften Körpers gegenüber jeder Art chemischer Einwirkung. Zusammenfassend läßt sich aber sagen, daß diese große Labilität wie auch andere Besonderheiten doch nicht so beträchtlich von dem Verhalten des Hefecoferments abweichen, um nicht durch Milieueinflüsse erklärbar zu sein. Hinsichtlich der Thermostabilität stimmen beide Körper völlig überein; die Fällbarkeit durch Alkohol und Aceton erscheint bei dem Muskelcoenzym etwas geringer zu sein; andererseits ist die Fällbarkeit durch Bleisalz größer, als nach den Angaben Harden und Youngs erwartet wurde; aber das Hefecoferment verhält sich in meinen Versuchen hier ganz ähnlich; endlich werden beide von Tierkohle ziemlich stark adsorbiert.

A. Kochbeständigkeit und Alkoholfällbarkeit.

Durch einige Minuten langes Kochen ändert sich die Wirksamkeit des Muskelkochsafts nicht merklich. Dampft man ihn im Vakuum bei 40° auf etwa $\frac{1}{3}$ ein und verdünnt aufs ursprüngliche Volumen, so ist eine sehr geringe, aber immerhin merkliche Abschwächung eingetreten; diese ist nur wenig größer, wenn man zuvor mit dem gleichen Volumen absoluten Alkohol versetzt, filtriert und das Filtrat ebenfalls im Vakuum bei 40° auf $\frac{1}{3}$ des ursprünglichen Volumens eindampft; dampft man stärker ein, so wird die Abschwächung etwas stärker.

Engt man den Muskelkochsaft auf offener Flamme auf ein

¹⁾ Die Spaltung des Gärungsoferments durch Lipase aus Rizinus-samen (Buchner und Klatter, Biochem. Zeitschr., Bd. 8, S. 520) (1908) konnte nicht geprüft werden, da das Präparat nicht zu beschaffen war.

kleines Volumen ein, auf dem Wasserbad zur Trockne, und erhitzt dann noch etwa eine Stunde, so ist allerdings die Aktivität stark verringert, aber doch noch nicht gänzlich aufgehoben. In all diesen Punkten verhält sich der Hefekochsaft genau ebenso.

Versetzt man den Muskelkochsaft mit so viel absolutem oder 96% igem Alkohol, daß die Alkoholkonzentration etwa 85% beträgt, wäscht den Niederschlag mit absolutem Alkohol nach und schwemmt ihn wieder in Wasser auf, während man andererseits das Alkoholfiltrat bei 40° im Vakuum eindampft und wieder aufs alte Volumen bringt, so ergibt sich, daß nur etwa die Hälfte gefällt worden und etwas weniger im alkoholischen Filtrat geblieben ist. Mit Aceton wurden keine besseren Resultate erzielt. Das Hefecoferment scheint nach den Versuchen verschiedener Autoren unter diesen Umständen vollständiger niedergeschlagen zu werden.

Tabelle VII.

	CO ₂ ccm	Versuchs- zeit
30. 1,2 ccm Flüssigkeit. 0,1 ccm m-KH ₂ PO ₄ , Rückstand mit 110fach Wasser gewaschen. Ein Teil des Muskelkochsaftes im Vakuum 3fach konzentriert, ein anderer Teil mit 1 Vol. Alkohol versetzt; das Filtrat 10fach konzentriert und aufs alte Volumen gebracht. Zusätze:		1 Std.
0,6 ccm dest. Wasser	0,22	
0,6 > Muskelkochsaft	2,38	
0,2 > 3fach konz. Muskelkochsaft	2,00	
0,6 > 3 > >	3,03	
0,6 > Alkoholfiltrat, eingengt und wieder verdünnt	1,51	
31. 1,2 ccm Flüssigkeit. 0,1 ccm m-KH ₂ PO ₄ , Rückstand mit 100fach Wasser gewaschen. Muskelkochsaft zum Teil mit 1 Vol. Alkohol versetzt. Filtrat auf 1/2 des ursprüngl. Vol. im Vakuum eingedampft. Zusätze:		2 Std. 40'
0,6 ccm dest. Wasser	0,30	
0,6 > Muskelkochsaft	3,00	
0,3 > Alkoholfiltrat (2fach konz.)	2,52	

Tab. VII (Fortsetzung).

	CO ₂ ccm.	Versuchs- zeit
32. 1,2 ccm Flüssigkeit. 0,1 ccm m-KH ₂ PO ₄ , Rückstand mit 80fach Wasser gewaschen. Hefekochsaft zum Teil mit 1 Vol. Alkohol versetzt. Filtrat im Vakuum auf 1/3 Vol. eingedampft.		1 Std. 40'
Zusätze:		
0,6 ccm dest. Wasser	0,28	
0,6 » Hefekochsaft	3,15	
0,3 » Alkoholfiltrat (2fach konz.)	2,52	
33. 1,3 ccm Flüssigkeit. 0,1 ccm m/s-KH ₂ PO ₄ , Rückstand mit 750fach Wasser gewaschen. Ein Teil von Muskelkochsaft und Hefekochsaft zur Trockne; 1 1/2 Std. auf kochendem Wasserbad erhitzt und aufs alte Vol. aufgefüllt.		1 Std. 40'
Zusätze:		
0,7 ccm dest. Wasser	0,12	
0,7 » Muskelkochsaft	1,31	
0,7 » eingedampfter Muskelkochsaft	0,35	
0,7 » Hefekochsaft	1,18	
0,7 » eingedampfter Hefekochsaft	0,16	
34. 1,0 ccm Flüssigkeit. 0,1 ccm m/s-KH ₂ PO ₄ , Rückstand mit 1300fach Wasser gewasch. (je 0,15 ccm). Ein Teil Hefekochsaft auf Wasserbad zur Trockne, 2 1/2 Std. trocken auf Wasserb. erhitzt; aufs alte Vol.		1 Std. 50'
Zusätze:		
0,5 ccm dest. Wasser	0,02	
0,5 » Hefekochsaft	2,28	
0,5 » eingedampfter Hefekochsaft	0,04	
35. 1,4 ccm Flüssigkeit. 0,1 ccm m/s-KH ₂ PO ₄ , Rückstand mit 30fach Wasser gewaschen. Ein Teil Muskelkochsaft mit 10 Vol. 96°/10 igem Alkohol versetzt. Niederschlag gelöst: 3fach konzentriert gegenüber Ausgangsvolumen. Filtrat im Vakuum 3fach konzentriert.		1 Std. 10'
Zusätze:		
0,7 ccm dest. Wasser	0,28	
0,7 » Muskelkochsaft	1,78	
0,7 » Alkoholniederschlag (3fach)	1,76	
0,7 » Alkoholfiltrat (3fach)	1,40	

B. Fällung durch Pb-Salz und Adsorption an Tierkohle.

Für die Fällung des Muskelkochsafts durch Bleisalz wurde so verfahren: Der Muskelkochsaft wird mit 1 Volumen Alkohol versetzt, durch gehärtetes Filter abgesaugt; dann im Vakuum auf ein kleines Volumen eingedampft, Bleiacetat im Überschuß hinzugefügt (bei neutraler Reaktion), zentrifugiert; der Niederschlag mehrmals gewaschen. Das Filtrat, sowie der im alten Volumen aufgeschwemmte Niederschlag werden durch Schwefelwasserstoff vom überschüssigen Bleisalz befreit und nach Abfiltrieren des Pb-Salzes durch längeres Durchleiten von Luft möglichst von Schwefelwasserstoff befreit, nachher sorgfältig neutralisiert. Alle diese Manipulationen schädigen mehr oder weniger das Coferment und man muß schon recht vorsichtig und ziemlich schnell arbeiten, um überhaupt ein Ergebnis zu erzielen. Immerhin ließen sich einige Versuche so durchführen, daß noch ein Teil des Coferments nachweisbar blieb; in mehreren Fällen war ein größerer Teil im Bleifiltrat, ein kleinerer im Niederschlag; in einem Fall ergab sich das Umgekehrte. Ein dem ersteren ungefähr entsprechendes Resultat wurde auch mit Hefekochsaft erhalten. Hierdurch gewinnt man den Eindruck, daß die Fällung des Coferments durch Bleisalze nicht prinzipiell unmöglich, aber von Milieubedingungen abhängig ist. Doch kann es sich sehr wohl dabei um eine Adsorption am Bleiniederschlag handeln.

Tabelle VIII.

Um Hemmungen durch zu hohe Phosphatkonzentration zu vermeiden, wurden die Versuche meist doppelt, mit 0,1 ccm m/s und 0,1 ccm $m-KH_2PO_4$ angestellt. Angeführt sind nur diejenigen, bei denen die Ausschläge jeweils größer waren.

	CO ₂ ccm	Versuchs- zeit
36. 1,5 ccm Flüssigkeit. 0,1 ccm $m-KH_2PO_4$, 110 fach gewasch. Rückstand. Die Konzentration der mit Pb behandelten Lösungen ist gut halb so groß, wie das Alkoholfiltrat.		
Zusätze: 0,8 ccm dest. Wasser	0,51	4 Std.
0,3 » eingedampftes Alkoholfiltrat . .	2,00	1 »
0,75 » gereinigtes Pb-Filtrat	2,06	4 »
0,75 » gereinigter Pb-Niederschlag . .	1,05	4 »

Tab. VIII (Fortsetzung).

	CO ₂ ccm	Versuchs- zeit
37. 1,4 ccm Flüssigkeit. 0,1 ccm m-KH ₂ -PO ₄ , 430 fach gewasch. Rückstand. Konzentrationen wie oben.		4 Std.
Zusätze:		
0,7 ccm dest. Wasser	0,17	
0,35 > eingedampftes Alkoholfiltrat	2,75	
0,75 > gereinigtes Pb Filtrat	0,31	
0,75 > gereinigter Pb-Niederschlag	2,45	
38. 1,2 ccm Flüssigkeit. 0,1 ccm m-KH ₂ PO ₄ , 1500 fach gewasch. Rückstand. Konzentrationen wie oben.		5 Std.
Zusätze:		
0,6 ccm dest. Wasser	0,04	
0,6 > Muskelkochsaft.	0,48	
0,3 > Alkoholfiltrat (2 fach)	0,35	
0,6 > Pb-Filtrat	0,14	
0,6 > Pb-Niederschlag	0,07	
39. 1,2 ccm Flüssigkeit. 0,1 ccm m/5-KH ₂ PO ₄ , 80 fach gewasch. Rückstand. Versuch mit Hefekochsaft. Konzentrationen wie oben.		3 Std. 30'
Zusätze:		
0,6 ccm dest. Wasser	0,29	
0,35 > Alkoholfiltrat (2 fach)	4,10	
0,6 > Pb-Filtrat	0,96	
0,6 > Pb-Niederschlag	0,80	

Um die Möglichkeit einer Adsorption am Bleisalz-niederschlag zu prüfen und die allgemeine Charakteristik des Coferments zu vervollständigen, wurde die Adsorption an Tierkohle untersucht. Hefekochsaft und Muskelkochsaft wurden mit einem Zehntel des Gewichts an Tierkohle (Mercks gereinigte Blutkohle) kurze Zeit geschüttelt, dann mehrere Stunden auf Eis gehalten und nach Aufkochen die Tierkohle abfiltriert. (Ohne Aufkochen läßt sich der Hefekochsaft durch Filtration nicht ganz von Tierkohle befreien; das ist aber unbedingt nötig, weil die Zymase durch sie zerstört wird.) Wenngleich schon Kochsäfte verschiedener Hefepräparate sich nicht genau gleich verhalten, so zeigt doch z. B. der folgende Versuch, daß unter den angegebenen Umständen der größere Teil des Coferments sowohl im Hefe- wie Muskelkochsaft durch Tierkohle entfernt ist.

Tabelle IX.

Muskelkochsaft, Hefekochsaft und 1 : 1 verdünnter Hefekochsaft, je mit $\frac{1}{10}$ des Gewichts Tierkohle 4 Stunden auf Eis. Dann nach Aufkochen durch gehärtete Filter abfiltriert.

	CO ₂ ccm	Versuchs- zeit
40. 1,4 ccm Flüssigkeit. Rückstand mit 180fach Wasser gewaschen. 0,1 ccm $m/2$ -Phosphat.		
Zusätze:		
0,7 ccm dest. Wasser	0,05	2 Std. 10'
0,7 » Muskelkochsaft	1,71	
0,7 » » , mit Tierkohle behandelt	0,76	
0,7 » Hefekochsaft	3,63	
0,7 » » , mit Tierkohle behandelt .	1,43	
0,7 » » , 1 : 1 verdünnt	2,75	
0,7 » verdünnter Hefekochsaft, mit Tierkohle behandelt	1,40	

5. Vergleich von Coferment und «Atmungskörper».

Die vielfachen Übereinstimmungen, die sowohl in chemischer Hinsicht wie im physiologischen Verhalten zwischen dem kürzlich von mir beschriebenen Atmungskörper¹⁾ der Hefeextrakte und dem Coferment der Gärung bestehen, hatten schon ursprünglich dazu geführt, eine Verwandtschaft beider zu vermuten. Diese Wahrscheinlichkeit verdichtete sich sehr, als sich herausstellte, daß auch der Muskelkochsaft sowohl das Coferment der Gärung wie den Atmungskörper enthält und daß dieser genau die gleichen physiologischen Eigenschaften zeigt, wie jener, daß einerseits der Muskelkochsaft den atmungsunwirksamen Ultrafiltrationsrückstand des Hefemacerations-safts, andererseits der Hefekochsaft die atmungsunwirksame extrahierte Muskulatur wieder zu aktivieren vermögen, prinzipiell ebenso wie die eigenen Kochsäfte. Es ist daher geboten, auch bezüglich der im letzten Kapitel studierten chemischen Beeinflussungen festzustellen, ob sie auf den Atmungskörper von Muskel- und Hefeextrakt ebenso einwirken wie auf das Coferment. Der Muskelkochsaft hat außerdem, wie schon in der

¹⁾ Pflügers Archiv, Bd. 170 (1918).

vorigen Mitteilung erwähnt (cf. Vers. 7), die aus der Symmetrie herausfallende Eigenschaft, die Atmung des unfiltrierten Macerationssafts um etwa 100% zu steigern und erregt infolgedessen die Atmung des gewaschenen Hefesaftückstandes sogar stärker als Hefekochsaft; auch bezüglich dieser Steigerung interessiert es, ob sie ähnlich beeinflussbar ist wie die Atmungs-erregung selbst.

Im Gegensatz zur Gärungsaktivierung ist nun auch kalter Muskelextrakt imstande, die Atmung des Macerationssaftückstandes zu erregen, allerdings erheblich schwächer als heißer Auszug; aber durch nachträgliches Kochen nimmt die Wirksamkeit nicht zu. Dieses differente Verhalten des kalten Extrakts gegenüber Atmung und Gärung macht jedoch unserer Hypothese keinerlei Schwierigkeiten. Denn wie in Kap. 2 gezeigt wurde, greift der Hemmungskörper des kalten Extrakts nicht das Coferment, sondern die Zymase an; und so erklärt sich einfach aus der Verschiedenheit von Atmungsenzym und Zymase, daß die Atmung durch ihn nicht alteriert wird. Daher verringert natürlich auch die Zugabe von kaltem Extrakt zum System: Rückstand + Muskelkochsaft die Atmungsgröße nicht, sondern erhöht sie sogar ein wenig (infolge der Vermehrung des Atmungskörpers). Andererseits hat der kalte — und ebenso der nachträglich gekochte — Extrakt nur etwa $\frac{1}{5}$ der Wirksamkeit des Kochsafts, was sich in genauer Übereinstimmung mit Kap. 2, Vers. 13 und 14 (Gärungsaktivierung durch nachträglich erhitzten kalten Extrakt) durch die schlechten Extraktionsbedingungen unserer Substanz unter diesen Umständen erklärt.

Tabelle X.

Macerationssaft und Muskelextrakte genau neutralisiert gegen Neutralrot (p_H. 7—8).

	O ₂ cmm	Versuchs- zeit
41. Flüssigkeitsmenge 2,0 ccm. Rückstand mit 200fach Wasser gewaschen, 3fach konzentriert. Lösungen mit Phenylurethan gesättigt. Versuchstemp. 29°.		3 Std.
1,1 ccm Macerationssaft + 0,9 dest. Wasser . .	90	
1,1 „ „ + 0,9 ccm Muskelkochsaft	238	

Tab. X (Fortsetzung).

	O ₂ cmm	Versuchs- zeit
1,1 ccm Macerationssaft + 0,9 ccm kalter Muskel- extrakt	95	3 Std.
0,4 » Rückstand + 1,6 ccm dest. Wasser . .	0	
0,4 » » + 1,6 » Muskelkochsaft .	165	
0,4 » » + 1,6 » kalter Muskelextr.	36	
0,4 » » + 1,6 » kalter Muskelex- trakt, nachträglich gekocht	43	
0,4 » Rückstand + 0,6 ccm Muskelkochsaft + 1,0 dest. Wasser	91	
0,4 » Rückstand + 0,6 ccm Muskelkochsaft + 1,0 kalter Muskelextrakt	96	

Die Versuche über die Kochbeständigkeit und das Verhalten gegen Bleisalze ergeben beim Atmungskörper der Kochsäfte die erwarteten Resultate: wir finden einen vollständigen Parallelismus, wenn auch keine zahlenmäßige Übereinstimmung mit den Gärungsexperimenten. Es ist hierfür ja zu berücksichtigen, daß Atmung und Gärung nicht nur unter ganz andern Milieubedingungen untersucht werden (Atmung in neutralisierter Lösung, ohne Zucker, mit Phenylurethan), sondern auch, daß die Gärungsgeschwindigkeit viel weniger als die Atmungsgeschwindigkeit den Coenzymkonzentrationen genau proportional ist. Wie weit diese Proportionalität für die Atmung besteht, mag der folgende Versuch zeigen.

Tabelle XI.

Alle Lösungen genau neutralisiert und mit Phenylurethan gesättigt.

cmm O ₂ in	1 Std. 20'	3 Std.
42. 2 ccm Flüssigkeit. Rückstand mit 300 fach Wasser gewaschen, 3 fach konzentriert. Methylenblau me- dicinale Höchst 0,5 ‰. Temp. 29°.		
1,1 ccm Macerationssaft + 0,9 dest. Wasser . . .	38	77
1,1 » » + 0,2 ccm Methylenblau + 0,7 dest. Wasser	112	186
1,1 » Macerationssaft + 0,9 ccm Muskelkochsaft	97	202

Tab. XI (Fortsetzung).

	1 Std. 20'	3 Std.
0,4 ccm Rückstand + 1,6 ccm $m/15$ neutr. Phosphat	2	4
0,4 » Rückstand + 1,4 Muskelkochsaft + 0,2 dest. Wasser	63	125
0,4 » Rückstd. + 1,4 Muskelkochsaft + 0,2 ccm Methylenblau	110	193
0,4 » Rückstand + 0,4 Muskelkochsaft + 1,2 dest. Wasser	24	40
0,4 » Rückstd. + 0,4 Muskelkochsaft + 0,2 ccm Methylenblau + 0,8 dest. Wasser	83	112
0,4 » Rückstand + 0,1 Muskelkochsaft + 1,5 $m/15$ neutr. Phosphat	5	14

A. Kochbeständigkeit.

Wird der Muskelkochsaft, wie im vorigen Kapitel beschrieben, auf dem kochenden Wasserbad eingedampft, und 1—2 Stunden trocken darauf erhitzt, so ist der Atmungskörper zwar noch nicht zerstört, aber stark geschädigt. Der folgende Versuch 44 ist gleichzeitig mit den gleichen Lösungen (Rückstand, Muskelkochsaft, eingedampfter Muskelkochsaft) wie der entsprechende Versuch 33 angestellt und gibt ungefähr das gleiche Bild. Ein genauerer Vergleich ist wegen der starken Veränderung der Gärungsgeschwindigkeit in den ersten Stunden unmöglich. Entsprechende Versuche mit dem Atmungskörper aus Hefeextrakten sind schon früher beschrieben, die zu demselben Resultat führten;¹⁾ mit Macerationskochsaft sind sie wegen dessen nicht unbeträchtlicher Eigenoxydation nicht genau auszuführen. Die Atmungssteigerung, die der Muskelkochsaft im unfiltrierten Macerationssaft hervorruft, wird durch ein solches Erhitzen auf dem Wasserbad in ähnlicher Weise herabgesetzt, wie die Atmungserregung des Rückstandes. Trotzdem kann aber diese Steigerung nicht allein durch einen Überschuß an Atmungskörper bedingt sein (wie die entsprechende Gärungssteigerung von Macerationssaft durch Muskelkochsaft auf Erhöhung der

¹⁾ Pflügers Archiv, Bd. 170 (1918).

Cofermentkonzentration beruht), weil ja Hefekochsaft die Atmung des Macerationssafts nicht oder nur sehr wenig steigert.

Wird der Muskelkochsaft mit 1 Volumen Alkohol versetzt, und das Filtrat im Vakuum aufs halbe ursprüngliche Volumen eingedampft, so ist keine Abschwächung festzustellen: ein gleichzeitig mit denselben Lösungen wie der Vers. 31 angestelltes Experiment ist unter Nr. 45 angegeben. Vakuumeindampfungen und Alkoholfällungen mit dem Atmungskörper der Hefe sind schon früher mitgeteilt.¹⁾

Tabelle XII.

Alle Lösungen neutralisiert, mit Phenylurethan gesättigt. Je 2 ccm Flüssigkeit. Temp. 29° C.

	O ₂ cmm	Versuchs- zeit
43. Rückstand 3 fach konz., mit 230 fach Wasser gewaschen. Ein Teil des Muskelkochsafts 2 ¹ / ₂ Std. auf kochendem Wasserbad eingedampft und erhitzt, im alten Vol. aufgelöst.		2 Std.
0,4 ccm Rückstand + 1,6 ccm m/16 neutr. Phosphat	2	
0,4 „ „ + 1,6 „ Muskelkochsaft . .	93	
0,4 „ „ + 1,6 „ eingedampfter Muskelkochsaft	17	
44. Rückstand 3 fach konz., mit 700 fach Wasser gewaschen. Ein Teil Muskelkochsaft 1 ¹ / ₂ Std. auf Wasserbad erhitzt, aufs alte Vol. gebracht.		3 Std. 30'
1,1 ccm Macerationssaft + 1,0 dest. Wasser . .	122	
1,1 „ „ + 1,0 Muskelkochsaft . .	233	
1,1 „ „ + 1,0 eingedampfter Muskelkochsaft	148	
0,3 ccm Rückstand + 1,7 dest. Wasser	3	
0,3 „ „ + 1,7 Muskelkochsaft	57	
0,3 „ „ + 1,7 eingedampft. Muskelkochsaft	27	
45. Rückstand 3 fach konz., mit 100 fach Wasser gewaschen. Ein Teil Muskelkochsaft mit 1 Vol. Alkohol versetzt. Filtrat aufs halbe Vol. eingedampft.		2 Std.
1,1 ccm Macerationssaft + 0,9 dest. Wasser . .	76	
0,4 „ Rückstand + 1,6 dest. Wasser	2	
0,4 „ „ + 1,4 ccm Muskelkochsaft + 0,2 dest. Wasser	130	
0,4 „ Rückstand + 0,7 ccm Alkoholfiltr. (2 fach konz.) + 0,9 dest. Wasser	138	

¹⁾ Pflügers Archiv, Bd. 170 (1918).

B. Fällung durch Bleisalz.

Nach dem oben beschriebenen Verfahren mit Alkohol, Bleiacetat, Schwefelwasserstoff behandelte Hefe- und Muskelkochsäfte wurden wiederholt ebenso auf ihre Fähigkeit zur Atmungserregung wie auf ihre Aktivierung der Gärkraft untersucht. Hier kommt als weitere Komplikation noch hinzu, daß die Autoxydation von Schwefelwasserstoff einen Atmungsvorgang vortäuschen könnte, doch ergeben Kontrollen ohne Ultrafiltrationsrückstand (also in Abwesenheit von Atmungsenzym), daß in den Versuchen hierdurch kein erheblicher Fehler entsteht. Auch der Atmungskörper erleidet durch die Behandlung eine starke Abschwächung, besonders im Muskelkochsaft. Und auch hier ist der Ausfall der Versuche nicht gleichmäßig. Im allgemeinen erscheint wohl ein größerer Teil des Atmungskörpers im Bleisalzfiltrat; doch kommt auch das Umgekehrte vor. Auffällig ist, daß die Methylenblausteigerung im Bleisalzfiltrat stets außerordentlich groß ist, in der Lösung des Bleisalzniederschlags sehr gering.

Tabelle XIII.

Vgl. Tab. XII.

	O ₂ cmm	Versuchs- zeit
46. Versuch mit Hefekochsaft. Rückstand 3 fach konzentriert, mit 260 fach Wasser gewaschen. Das Alkoholfiltrat auf dem Wasserbad eingedampft.		3 Std. 30'
Konzentrationen der Zusätze entspr. sich ungefähr:		
0,4 ccm Rückstd. + 1,6 dest. Wasser	4	
0,4 „ „ + 1,1 Kochsaft + 0,5 dest. Wass.	56	
0,4 „ „ + 1,1 Alkoholfiltrat + 0,5 dest. Wasser	40	
0,4 „ Rückstand + 1,5 Bleifiltr. + 0,1 dest. Wasser	21	
0,4 „ „ + 1,5 Bleifiltr. + 0,1 Methylenblau 0,5 %	84	
0,4 „ Rückstand + 1,5 Bleiniederschlag + 0,1 dest. Wasser	32	
0,4 „ Rückstand + 1,5 Bleiniederschlag + 0,1 Methylenblau	32	

Tab. XIII (Fortsetzung).

	O ₂ cmm	Versuchs- zeit
47. Versuch mit Hefekochsaft. Rückstand 2fach konzentriert, mit 85 fach Wasser gewaschen. Behandlung und Konzentrationen wie oben.		4 Std. 30'
1,1 ccm Macerationssaft + 1,1 Wasser	78	
0,6 » Rückstand + 1,6 dest. Wasser	11	
0,6 » » + 1,0 Alkoholfiltrat + 0,6 dest. Wasser	58	
0,6 » » + 1,5 Bleifiltrat	41	
0,6 » » + 1,5 Bleiniederschlag	38	
0,6 » » + 1,5 Bleiniederschlag + 0,1 Methylenblau	50	
48. Versuch mit Muskelkochsaft. Rückstand 100 fach gewaschen. Konzentrationen entsprechen sich genau.		2 Std.
0,4 ccm Rückstand + 1,6 dest. Wasser	2	
0,4 » » + 0,7 Alkoholfiltr. + 0,9 dest. Wasser	138	
0,4 » Rückstand + 1,0 Bleifiltrat + 0,6 dest. Wasser	15	
0,4 » Rückstand + 1,0 Bleifiltrat + 0,5 dest. Wasser + 0,1 ccm Methylenblau	179	
0,4 » + 1,2 Bleiniederschlag + 0,4 dest. Wasser	5	
0,4 » Rückstand + 1,2 Bleiniederschlag + 0,3 dest. Wasser + 0,1 ccm Methylenblau	0	

Endlich muß für den Vergleich von Atmungskörper und Gärungsoferment das Ergebnis der Ultrafiltration berücksichtigt werden: durch Ultrafiltration von Hefekochsaft wird sowohl die Atmungserregung wie die Gärungsaktivierung sehr stark geschwächt. Die betreffenden Versuche sind schon mitgeteilt. Für die Gärungsaktivierung s. oben Vers. 25, für die Atmungsaktivierung Vers. 122. Pflügers Archiv, Bd. 170 (1918.)

C. Die Atmung der extrahierten Muskulatur.

Da die absolute Atmungsgröße der zerkleinerten Froschmuskeln von mancherlei Milieubedingungen, vor allem der Reaktion, der Sauerstoffversorgung, der Art der Zerkleinerung

abhängig ist, möchte ich an dieser Stelle nicht systematisch auf sie eingehen. Übrigens ist dieser Gegenstand, wenn auch zum Teil unter andern Gesichtspunkten und mit abweichender Methodik schon von Thunberg in zahlreichen Untersuchungen behandelt worden.¹⁾ Worauf es hier allein ankommt, ist dies: die Reaktivierung der atmungsunwirksamen, mit Wasser erschöpften Muskulatur durch Muskelextrakt ist keine bloße Wiederherstellung der Milieubedingungen (Salze, Reaktion, Eiweißstoffe usw.), sondern der Einfluß einer besonderen Substanz, die in den bisher erforschten Eigenschaften völlig übereinstimmt mit dem Atmungskörper der Hefe und des auf Macerationssafttrückstand wirkenden Muskelkochsafts. Dieser letztere enthält eben offenbar nur diesen einen Atmungskörper, der gleicherweise die Atmung des Muskelgewebes wie des Heferückstands aktiviert. Bezüglich der Gleichsetzung dieser Substanzen sei das folgende hervorgehoben: Die Atmung des mit Wasser extrahierten Muskelgewebes wird durch Hefekochsaft mindestens ebenso gut wie durch Muskelkochsaft wieder erregt, ebenfalls durch Extrakt von alter Acetonhefe, der entsprechend der schwächeren Wirksamkeit auf die Atmung von Heferückstand auch die des Muskels schwächer aktiviert (Vers. 49, 51, 52). Die wirksame Substanz läßt sich zum Teil aus dem Hefekochsaft durch Alkohol ausfällen (Vers. 50).

Kalter Muskelextrakt erregt die Atmung auch, aber viel schlechter als Muskelkochsaft (Vers. 49). Durch Eindampfen auf dem Wasserbad zur Trockne und anschließendes 2stündiges Erhitzen darauf wird die Wirksamkeit auf etwa $\frac{1}{3}$ abgeschwächt; bei Hefekochsaft ist diese Abschwächung im allgemeinen geringer, doch ist hier ebenfalls die Autoxydation des Hefekochsafts eine störende Komplikation (Vers. 52). Für die Verwandtschaft zwischen der Atmung der extrahierten Muskulatur und des gewaschenen Heferückstandes spricht endlich der Umstand, daß es bei beiden gelingt, durch hexosephosphorsaures Na einen der natürlichen Atmung außerordentlich ähnlichen Oxydationsprozeß zu erregen²⁾ (Vers. 50, 51).

¹⁾ Skand. Archiv, Bd. 22 (1909), Bd. 23 (1910), Bd. 24, 25 (1911).

²⁾ Bezügl. des Heferückstandes s. Pflügers Arch., Bd. 170 (1918).

Dieser Befund hat für den Muskel ein besonderes Interesse durch die Feststellung Embden und Laquers, daß Hexosephosphorsäure die Vorstufe der im Muskel gebildeten Milchsäure ist.¹⁾

Tabelle XIV.²⁾

Je 0,5 g feinzerschnittene Froschmuskulatur in 1,8—2,0 ccm gut neutralisierter Flüssigkeit. Die nicht extrahierte Muskulatur meist in 1,5% K_2HPO_4 (nach Thunberg), eventl. etwas $NaOH$ $n/10$ dazu zur Neutralisation der Muskeln. Die übrige Menge Muskulatur 4—5 mal mit je 800 ccm Leitungswasser ausgezogen, durch Gaze abfiltriert und auf Filtrierpapier getrocknet. Versuchstemp. 25°.

	O_2 cmm	Versuchs- zeit
49. Je 0,5 g Muskulatur in 2,0 ccm Flüssigkeit.		
Nichtextrahierte M. mit 1,7 ccm Muskelkochsaft	118	1 Std. 30'
Extrahierte M. mit 2,0 ccm 1,5% K_2HPO_4 . . .	2	
» » » 1,7 » Muskelkochsaft . . .	69	
» » » 1,7 » kaltem Muskelauszug	13	
» » » 1,6 » Hefekochsaft	80	
1,6 ccm Hefekochsaft (ohne Muskulatur)	13	
50. Muskulatur in 1,8 ccm Flüssigkeit. Hefekochsaft mit 10 Vol. 96% igem Alkohol gefällt; Niederschlag mit Äther gewaschen, im Vakuum über H_2SO_4 getrocknet. Dann im alten Volumen K_2HPO_4 (1,5%) gelöst.		
Nichtextr. Muskulatur mit 1,8 ccm K_2HPO_4 (+ 0,4- $n/10$ - $NaOH$)	141	3 Std.
Extrahierte M. mit 1,8 K_2HPO_4	0	
» » » 1,8 Hefekochsaft	87	
» » » 1,8 Alkoholfällung + K_2HPO_4 .	21	
» » » 0,8 $m/20$ -Hexosephosph. + 1 ccm K_2HPO_4	46	
1,8 ccm Hefekochsaft für sich	22	
1,8 » Alkoholfällung + K_2HPO_4 für sich . . .	0	

¹⁾ Embden und Laquer, Diese Zeitschr., Bd. 98, S. 181 (1916/17).

²⁾ Die Atmung der Muskulatur wird in der Regel ohne Antiseptica untersucht, da sie durch diese stark geschädigt wird. Doch spielen in den kurzen Versuchszeiten und der niedrigen Temperatur Bakterien dabei keine Rolle.

Tab. XIV (Fortsetzung).

	O ₂ cmm	Versuchs- zeit
51. Muskulatur in 1,8 ccm Flüssigkeit. Acetonhefe 1 1/2 Jahr gelagert, nicht mehr gärend, mit 8 fachem Vol. Wasser extrahiert.		
Nichtextr. Muskulatur mit 1,4 ccm K ₂ HPO ₄ + 0,4 n/10-NaOH	247	3 Std. 15'
Extr. Muskulatur mit 1,8 K ₂ HPO ₄	0	
› › › 1,5 Muskelkochsaft + 0,3 K ₂ HPO ₄	104	
› › › 1,5 Acetonhefeextrakt + 0,3 K ₂ HPO ₄	51	
› › › 1,5 m/20-Hexosephosph. + 0,3 K ₂ PHO ₄	47	
1,5 ccm Acetonhefeextrakt für sich	0	
52. Muskulatur in 1,8 ccm Flüssigkeit. Kochsäfte z. T. 2 Stunden auf Wasserbad zur Trockne eingedampft; auf altes Vol. gebracht.		
Extrahierte Muskulatur + 1,8 K ₂ HPO ₄	8	3 Std.
› › + 1,8 Muskelkochsaft	71	
› › + 1,8 eingedampft. Muskelkochsaft	26	
› › + 1,8 Hefekochsaft	85	
› › + 1,8 eingedampft. Hefekochsaft	53	
1,8 ccm Hefekochsaft für sich	10	

Ist nun nach allem der Atmungskörper und das Coferment der Gärung völlig identisch? Hier eine sichere Entscheidung zu treffen, dürften die Versuche nicht hinlangen. Ich halte es für möglich, daß bei der Betätigung des Atmungskörpers neben einem Coenzym der Atmung, das dem Gärungscoenzym gleich oder mindestens verwandt wäre, noch eine Komponente beteiligt ist, die als Oxydationssubstrat, als Nährstoff, wirkt, während bei der Gärung ja der Zucker diese Rolle spielt. Diese Komponente dürfte vielleicht dem Hexosephosphat nahe stehen. Doch erscheint es vorläufig zwecklos, die Hypothesen weiter auszuspinnen. Wesentliche Unterschiede in den Eigen-

schaften des Gärungscoferments und des Atmungskörpers haben sich jedenfalls nicht gefunden.

Anhang.

Das Coferment der alkoholischen Hefegärung ist nicht auf tierische Organe beschränkt. Es läßt sich auf dieselbe Weise z. B. in keimenden Erbsen nachweisen. Das ist von Interesse, da nach Versuchen von Pflanzenphysiologen der Erbsensamen selbst zu alkoholischer Gärung befähigt ist.¹⁾ Diese Gärung soll im Unterschied von der Hefegärung nur in Abwesenheit von Luft beträchtlich sein.²⁾

Da in einem ersten Versuch die in Wasser erweichten Erbsen, mit etwa demselben Gewicht Wasser gekocht, nur einen geringen, durch verkleisterte Stärke zähflüssigen Saft abgaben, in dem wenig Coferment nachweisbar war, wurden in einem weiteren Versuch allein die gekeimten Wurzelspitzen benutzt, da hier die Gärungsenzyme am reichlichsten zu erwarten waren. In der Tat war so die Ausbeute an Coenzym viel besser.

Tabelle XV.

5 g trockene Erbsen 24 Stunden in Wasser geweicht, dann 48 Stunden zwischen feuchtem Filtrierpapier keimen gelassen. Die gekeimten Wurzeln abgeschnitten, mit 3 ccm Wasser aufgeköcht. Das Filtrat benutzt.

	CO ₂ ccm	Versuchs- zeit
53. 1,2 ccm Flüssigkeit. Rückstand mit 90 fach Wasser gewaschen. Je 0,2 ccm 3 fach konzentrierter Rückstand und Zusätze:		
0,6 ccm dest. Wasser + 0,1 ccm $m/5$ -K ₂ HPO ₄ . . .	0,22	2 Std.
0,6 „ „ „ + 0,1 „ $m/2$ -K ₂ HPO ₄ . . .	0,49	
0,6 „ Hefekochsaft + 0,1 „ $m/2$ -K ₂ HPO ₄ . . .	3,53	
0,6 „ Erbsensaft + 0,1 „ $m/2$ -K ₂ HPO ₄ . . .	1,76	

¹⁾ Siehe z. B. Kostytschew, Biochem. Zeitschr., Bd. 15, S. 164 (1909).

²⁾ Kostytschew a. a. O.

Zusammenfassung.

1. Das Coferment der alkoholischen Gärung scheint sich in allen tierischen Organen zu finden (Kaninchen, Frosch). Am konzentriertesten erhält man es aus Froschmuskulatur; es fehlt im Blutserum.

2. Die Gärungsaktivierung gelingt nur mit heißen Organ-auszügen. Dies liegt neben der schlechten Extrahierbarkeit des Coferments in der Kälte an einem Hemmungskörper, der sich in allen kalten Organextrakten findet und durch Kochen zerstört wird. Dieser hemmt die Gärung nicht nur in Gegenwart des tierischen Coferments, sondern auch in Gegenwart des Hefecoferments. Durch Variation der Zymase- und Cofermentmengen und Bestimmung der Hemmungsstärke läßt sich zeigen, daß der Hemmungskörper nur die Zymase angreift, nicht das Coferment. Er passiert ein Ultrafilter nicht und scheint Eiweißnatur zu besitzen. Am stärksten findet man ihn in der Muskulatur, schwächer in den andern Organen; er fehlt im Blutserum, in Parallelismus zum Coferment.

3. Die Kinetik des Gärungsverlaufs zeigt bei Verwendung von Muskelkochsaft statt Hefekochsaft nur solche Abweichungen, die sich durch den geringeren Gehalt an Phosphat, Coferment und daneben wohl noch einer weniger guten Konservierung der Zymase erklären; qualitative Besonderheiten ergeben sich nicht (Phosphatsteigerung, Arseniatsteigerung).

4. In den bisher bekannten chemischen Eigenschaften stimmt das Muskelcoferment mit dem Hefecoferment ganz oder nahezu überein; dies betrifft außer der Dialysierfähigkeit die Grenzen der Kochbeständigkeit; die Fällbarkeit durch Alkohol, die Adsorption an Tierkohle und auch, soweit sich das feststellen ließ, das Verhalten gegen Bleisalze.

5. In den gleichen Eigenschaften stimmt auch der «Atmungskörper» sowohl im Muskelkochsaft wie im Hefekochsaft mit dem Coferment der Gärung überein; genauer geprüft wurde dies an der Atmungserregung im Rückstand des Hefemacerationssafts; aber auch die Atmungserregung im zerkleinerten extrahierten

Muskelgewebe zeigt dieselben Gesetzmäßigkeiten. Hiernach nimmt die Wahrscheinlichkeit zu, daß das Coferment der Gärung und der Atmungskörper mindestens zum Teil identisch sind.

6. Anhangsweise wird das Coferment der alkoholischen Hefegärung auch in keimenden Erbsen nachgewiesen.

