© Biodiversity Heritage Library, http://www.biodiversitylibrary.org/; www.zobodat.at

solche rein theoretischen Fragen will ich hier nicht weiter eingehen. Mir ist es vorläufig nur darauf angekommen zu zeigen, dass es eine typische Infektionskrankheit gibt, für die Lebewesen als Erreger gar nicht in Frage kommen. Dieser Nachweis scheint mir von einiger Wichtigkeit zu sein. Kennen wir doch eine ganze Reihe Infektionskrankheiten[1]), wo alle unsere bisherige Erfahrung dagegen spricht, dass die Erreger Organismen sind. Für ein weiteres Eindringen in die Aetiologie dieser Krankheiten scheint mir das alte Dogma von der unbedingt parasitären Natur aller Infektionskrankheiten nur hinderlich zu sein.

Berlin, Botanisches Institut der Universität.

---

68. Julius Stoklasa: Über das Enzym Lactolase, welches die Milchsäurebildung in der Pflanzenzelle verursacht.

Eingegangen am 13. Oktober 1904.

Wir hatten Gelegenheit, nachzuweisen, dass die anaërobe Atmung diverser Pflanzenorgane eine alkoholische Gärung ist. Alle unsere Versuche wurden in besonders konstruierten Apparaten durchgeführt, unter völligem Ausschluss von Mikroben; denn nur diejenigen Resultate unserer Beobachtungen wurden berücksichtigt, bei welchen mit absoluter Bestimmtheit durch Gelatineplattenguss, sowie durch Impfung mit der Platinöse in Bouillon dokumentiert werden konnte, dass z. B. Zuckerrübenwurzel, Kartoffelknollen oder Erbsensamen sich in einem Milieu befanden, in welchem weder Bakterien, noch auch Hyphomyceten vorhanden sein konnten.

Ferner haben wir durch Anwendung der Methode von FRÄNKEL-HUEPPE die Überzeugung gewonnen, dass auch keine anaëroben Bakterien vorhanden waren.

Es ist daher als gewiss anzusehen, dass der Prozess der anaëroben Atmung der Pflanzenzelle eine alkoholische Gärung ist. Nachdem wir aber immer bei der anaëroben Atmung Milchsäure nachgewiesen haben, so lässt sich schliessen, dass der Prozess in zwei Phasen vorläuft. Zunächst bildet sich aus den Hexosen Milchsäure, und erst diese wird in Alkohol und Kohlendioxyd gespalten.

---

1) Von Pflanzenkrankheiten rechne ich hierher vor allem die Mosaikkrankheit des Tabakes.

© Biodiversity Heritage Library, http://www.biodiversitylibrary.org/; www.zobodat.at

Zu denselben Resultaten ist in Bezug auf die alkoholische Gärung A. J. NABOKICH gelangt. (Siehe: Über die intramolekulare Atmung der höheren Pflanzen; diese Berichte 1903, Band XXI, Heft 8 und Russisches Journal für Exp. L. 1904.)

Wir haben auch tatsächlich durch Anwendung der modifizierten BUCHNER-ALBERT'schen Methode in den frischen Pflanzenorganen das gärungserregende Enzym nachgewiesen.

Die betreffenden Pflanzenteile wurden zerrieben und unter einem Druck von 300 Atmosphären ihres zellfreien Saftes entledigt. Hierauf wurden mittelst Alkohol und Äther die Enzyme aus diesem Safte ausgeschieden.

Die Beschreibungen der Methoden, sowie die Resultate der Beobachtungen über die Gärkraft der Enzyme aus diversen Pflanzenorganen wurden ausführlich in den zahlreichen Publikationen behandelt.[1])

Aus unseren Beobachtungen ergibt sich heute als feststehend, dass wir nicht nur in den betreffenden Organen nach erfolgter anaërober Atmung, sondern auch direkt aus den Pflanzen, welche normal atmen, im stande waren, das gärungserregende Enzym (Alkoholase) zu isolieren und den Beweis zu liefern, dass die anaërobe Atmung eine alkoholische Gärung ist.

Beim Studium der chemischen Bilanz der anaëroben Atmung, welche durch die in der Pflanzenzelle sich befindenden Enzyme hervorgerufen wird, wurde der Beweis erbracht, dass ein grösseres Quantum der zersetzten Glukose, Fruktose, Galaktose oder Saccharose, Maltose und Laktose gefunden wurde, als die Bildung des Alkohols und des Kohlendioyxds nach der Formel:

$$C_6H_{12}O_6 = 2C_2H_5 \cdot OH + 2CO_2$$
$$C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O = 4C_2H_5 \cdot OH + 4CO_2$$

erforderte.

Nach einer länger als 12 Stunden andauernden, anaëroben Atmung war es immer möglich, in der Lösung schwache, saure Reaktion nachzuweisen. Die steigende Acidität hat im Verlaufe der Zeit die vollständige Vernichtung der Alkoholase zur Folge. Nach dem Versuche wurde in einigen Fällen festgestellt, dass die Acidität der gefundenen Menge an Milchsäure entspricht.

Diese Erscheinung trat nicht nur bei den höher organisierten Pflanzen zutage, sondern die Entstehung der Milchsäure wurde auch beim Studium der Atmung der Spaltpilze in der Lösung der Hexosen und Dissaccharide konstatiert. Die Spaltpilze zeichnen sich, wie bekannt, durch eine energische Respirationstätigkeit aus.

1) JULIUS STOKLASA: Über die Isolierung der gärungserregenden Enzyme aus dem Pflanzenorganismus. Centralblatt für Bakteriologie, II. Abteilung, XIII. Band, Nr. 1–3.

© Biodiversity Heritage Library, http://www.biodiversitylibrary.org/; www.zobodat.at

Nun gelangen wir dazu, nachzuweisen, dass tatsächlich bei der anaëroben Atmung der Pflanzenorgane Milchsäure entsteht.

Die Versuche wurden mit grossen Quantitäten Zuckerrübe (*Beta vulgaris*) ausgeführt.

Beim Studium der Bildung von Alkohol und Milchsäure neben jener des Kohlendioxyds wurde der nachstehende Modus gewählt.

Die ganze Wurzel (auch wenn sie auf der Oberfläche des Periderms sehr sorgfältig gereinigt worden war) zu sterilisieren, ging sehr schwer, weshalb das Periderm und eine weitere, 1—1,5 *cm* dicke Schicht der eigentlichen Zuckerrübenwurzel (des sogen. „Fleisches") entfernt wurde. Erst dann sterilisierten wir die Rübe durch 25 Minuten in 0,5prozentiger Sublimatlösung; die der Wurzel noch anhaftende Sublimatlösung wusch man mit sterilisiertem Wasser ab.

Wir hielten nun weiter folgendes Verfahren ein: Die vorsichtig gereinigte, vom Periderm befreite Wurzel wurde in Hälften geteilt, von diesen jede abgewogen und bezeichnet. Nach wiederholter Sterilisierung mit 0,5prozentiger Sublimatlösung in der Dauer von 25 Minuten wurden beide Stücke in sterilisiertem Wasser gewaschen. Hierauf wurde die eine Hälfte abgesengt und in den Versuchszylinder gebracht, die andere gewogen und analysiert. Diese Prozedur wiederholte man mit soviel Rübenexemplaren, als zur Erzielung des nötigen Gewichtes erforderlich waren.

Die Wurzeln wurden in steriles, destilliertes, durch Kochen von Luft befreites Wasser getaucht.

So war es möglich, eine tunlichst genaue Voranalyse der Zuckerrübe durchzuführen. Nachdem dann der Versuchszylinder noch abgesengt worden war, verschloss man ihn und machte den Pfropfen durch Übergiessen mit geschmolzenem Paraffin völlig undurchlässig.

Die Zuckerrübe enthielt vor dem Versuche keinen Alkohol und keine Milchsäure. Dass tatsächlich Äthylalkohol nach Verweilen in der Wasserstoffatmosphäre vorhanden war, stellten wir an einer grösseren Menge — bis 10 *kg* — Zuckerrüben fest, welche vollständig sterilisiert, etwa 5—10 Tage unter einer von einer Wasserstoffatmosphäre abgesperrten sterilisierten Wassersäule gehalten wurden. Nach starker Gärung in dem sterilen Medium — denn es wurden keinerlei Mikroorganismen in demselben konstatiert — wurden sowohl aus dem Wasser, als auch aus der Zuckerrübe, und zwar nach mehrfacher Destillation unter strenger Identifizierung 50—100 cm^3 Äthylalkohols abdestilliert. Der Siedepunkt wurde mit 78—79° C. und das spezifische Gewicht mit 0,799 bei 15° C. gefunden.

Sowohl in der reinen Lösung, wie in der Pflanzenmasse wurden weiter die nicht flüchtigen und flüchtigen organischen Säuren bestimmt. Es wurde gefunden, dass tatsächlich bei der Gärung Alkohol und Kohlensäure Hauptprodukte sind und sich nebenbei eine gewisse

© Biodiversity Heritage Library, http://www.biodiversitylibrary.org/; www.zobodat.at

Menge Milchsäure bildet. Die Milchsäure wurde zunächst in ein Calciumlaktat übergeführt, welches mittelst verdünnter Schwefelsäure zersetzt wurde, worauf die Milchsäure durch Äther ausgeschieden worden ist. Aus dem Ätherextrakt wurde die Milchsäure in Bleisalz übergeführt und sodann als Zinklaktat in krystallinischer Form ausgeschieden, worauf die Umkristallisation in verdünntem Alkohol vorgenommen und die Analyse durchgeführt wurde. Die Milchsäure wurde nicht nur durch die UFFELMANN'sche Reaktion, sondern auch durch die Konstitution $(C_3H_5O_3)_2$ Zn 3 aqua sichergestellt. Die Formel $(C_3H_5O_3)_2$ Zn 3 aqua verlangt 21,59 Zn, und wir haben durch zwei Versuche 21,01—21,3 Zn gefunden. Die Milchsäure neben Alkohol und Kohlendioxyd wurde bei der anaëroben Atmung der Zuckerrübe, der Gurken (*Cucumis sativus*), der Kartoffeln (*Solanum tuberosum*) und der Erbsensamen (*Pisum sativum*) nachgewiesen. Äusserst interessant erwies sich die Verfolgung des Prozesses bei den Gurken und Erbsensamen, wo überall die Milchsäure quantitativ nach der Methode von PARTHEIL bestimmt wurde. Wir haben konstatiert, dass 1 *kg* der Gurkenmasse in der Trockensubstanz binnen 100 Stunden der anaëroben Atmung nach mehreren Versuchen bei einer Temperatur von 20° ergaben:

$C_3H_6O_3$ = 8,24 *g*
C_2H_5OH = 14,20 „
CO_2 = 11,26 „

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

Wir haben auch einige Versuche ausgeführt, um zu beweisen, dass tatsächlich die Bildung von Milchsäure, Alkohol und Kohlendioxyd bei absoluter Abwesenheit von Mikroben erfolgt ist. Wir beliessen die Gurken, Zuckerrüben und Kartoffeln in einer verdünnten Sublimatlösung und zwar in einer 0,05prozentigen Lösung, und nach einer Woche wurden ebenfalls, allerdings in kleineren Mengen, Milchsäure, Alkohol und Kohlendioxyd konstatiert.

Die Analyse umfasst die $C_3H_6O_3$, CO_2, $C_2H_5 \cdot OH$-Mengen nicht nur als Quanta in der Lösung, sondern auch als den Inhalt der in der Gurke sich befindenden Verbindungen. Dabei beobachteten wir die interessante Erscheinung, dass die Gurken bei der anaëroben Atmung eine verhältnismässig grosse Menge von Milchsäure bilden, ein viel geringeres Quantum sehen wir dagegen bei den verschiedenen Samen. Die Gurken enthielten bei 95 pCt. Wasser 0,3—0,5 pCt. Glukose.

Weitere Beobachtungen beziehen sich auf die Wurzel der Zuckerrübe.

© Biodiversity Heritage Library, http://www.biodiversitylibrary.org/; www.zobodat.at

1 *kg* Zuckerrübenwurzel, berechnet auf Trockensubstanz, entwickelt innerhalb 100 Stunden insgesamt bei anaërober Atmung bei einer Temperatur von 20° C.:

$C_3H_6O_3$ = 3,23 *g*
C_2H_5OH = 10,32 „
CO_2 = 9,56 „

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

Nachdem wir mit voller Sicherheit bei Abwesenheit sowohl der aëroben als auch der anaëroben Mikroben konstatiert haben, dass sich Milchsäure bildet und sie sich immer als wesentlicher Bestandteil des anaëroben Stoffwechsels vorfindet, sind wir zur Isolierung der Enzyme geschritten, welche die Milchsäurebildung im Pflanzenorganismus verursachen. Bei der Isolierung derselben aus den diversen Pflanzenorganen sind wir in folgender Weise vorgegangen: Die betreffenden Organe wurden zu feinem Brei zerrieben und zu diesem, im Gewichte von etwa 2—3 *kg*, ein kleines Quantum ausgeglühten und ausgekühlten, scharfkantigen Sandes gemischt. Diese Mischung wurde in Portionen von je 300 *g* in einer Zerreibungsvorrichtung abermals gut zerrieben, so dass die Zellen der Pflanzenorgane gründlich zerrissen wurden, wovon wir uns durch die mikroskopische Untersuchung überzeugt haben Der auf diese Art erhaltene Brei wurde sofort bei einem Drucke bis zu 350 Atmosphären ausgepresst. Zu dem Safte, welcher von den Gewebsteilen und Zellen vollständig frei war, wurden absoluter Alkohol und Äther solange hinzugefügt, als die Bildung eines Niederschlages wahrzunehmen war. Auf 300 *ccm* Saft setzt man 500 *ccm* Alkohol zu und dann unmittelbar 500 *ccm* Äther. Der Fällung des das Enzym enthaltenden Niederschlages erfolgt in hohen Glaszylindern. Nach der Auscheidung des Niederschlages und dem darauf folgenden Abgiessen des grössten Teiles der über demselben stehenden Flüssigkeit, wird ebensoviel Äther, als vorher Alkohol und Äther zur Fällung verwendet wurde, aufgegossen. Sodann wird die stehenbleibende Flüssigkeit rasch abgehebert und der Niederschlag selbst sofort mittelst Saugpumpe filtriert. Die ganze Operation muss in wenigen Minuten beendet sein, da insbesondere durch eine über einige Minuten dauernde Wirkung des Alkohols und Äthers das isolierte Enzym an Gärkraft ungemein einbüsst. Je schneller wir arbeiten, eine desto grössere Gärungsenergie zeigt uns das Enzym. Nach der Filtration wird der Niederschlag im Vakuumtrockenapparate bei einer Temperatur von 25—30° C. getrocknet. Hierauf wird die trockene, hornartige Substanz zu einem feinen Pulver zerstossen und sofort zum Studium der Gärung verwendet. Der pulverförmige Niederschlag wurde behufs Studiums in 10 pCt. Glukose-, Fruktose-, Galaktose-, Maltose-, Saccharose- und Laktoselösung getan und 1—2 pCt. Toluol zugesetzt.

© Biodiversity Heritage Library, http://www.biodiversitylibrary.org/; www.zobodat.at

Die isolierten Enzyme riefen in zahlreichen Fällen augenblickliche, alkoholische Gärung hervor, welche ihren Kulminationspunkt in 6—8 Stunden erreicht hatte. Das Studium der Gärung wurde in speziell dazu eingerichteten Apparaten verfolgt, deren Beschreibung sowie die Ausführung der Analysen in meinen letzten Publikationen enthalten sind.[1])

Tabelle I.

Temperatur 25° C. Verwendet wurden stets 10 *g* des Enzyms.

Provenienz des isolierten und verwendeten Enzyms	Verwendetes Antisepticum Toluol pCt.	Dauer der Gärung in Stunden	Gefundene Menge des $C_3H_6O_3$ in *g*	Gefundene Menge des CO_2 in *g*
Zuckerrübe	1	92	0,62	1,56
Zuckerrübe	2	95	0,53	0,63
Kartoffel	1	63	0,86	1,92
Gurken	1	75	0,95	1,43

In der angeschlossenen Tabelle finden sich die Resultate unserer Beobachtungen der Wirkung von Enzymen in reiner Glukoselösung. Als Antiseptikum wurden 1—2 pCt. Toluol verwendet.

Die Gärung der Enzyme zeigt bei **vollständigem Zutritt von Luft,** sobald sie länger als 24 Stunden dauert, eine Entwicklung von Wasserstoff, und zwar sind wir imstande, in dem entweichenden Gase neben Kohlendioxyd auch Wasserstoff zu konstatieren.

Aus dem Alkohol wird bei Einwirkung neuer Enzyme, betreffs welcher noch an anderem Orte die Rede sein wird, dieser oxydiert, wobei er in Essigsäure übergeht.

Neben Essigsäure entsteht ferner auch Ameisensäure. Aus der Ameisensäure bildet sich bei der Abspaltung von CO_2 schliesslich Wasserstoff.

Der Wasserstoff, welcher bei der Degradation der Kohlenhydrate und zwar durch die Wirkung der Enzyme als Endprodukt entsteht, geht in statu nascendi durch Oxydation zum grossen Teile in Wasser über. Es ist ganz gut wahrscheinlich, dass dem Wasserstoff, der in statu nascendi bei der Spaltung der Kohlenhydrate[2]) entsteht, in der chlorophyllhaltigen Zelle eine bedeutungsvolle Funktion bei der

1) a) Der anaërobe Stoffwechsel der höheren Pflanzen und seine Beziehung zur alkoholischen Gärung: HOFMEISTER's Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie. b) PFLÜGER's Archiv für die gesamte Physiologie 101, 1904. c) Archiv für Hygiene, Bd. L, 1904.

2) Dass Wasserstoff und häufig auch Methan bei der Zersetzung der Kohlenhydrate entstehen und zwar durch Einwirkung der Schizomyceten, Mucorarten usw. ist bekannt.

© Biodiversity Heritage Library, http://www.biodiversitylibrary.org/; www.zobodat.at

Assimilation des Kohlendioxyds zugewiesen ist; es ist die Möglichkeit der Bildung von CH_2O durch Reduktion des CO_2 nach der Formel:

$$CO_2 + 4H = CH_2O + H_2O$$ [1])

nicht ausgeschlossen.

In einer nächsten Abhandlung werden wir diese ziemlich interessanten Prozesse beleuchten und alle Atmungsenzyme anführen, auf deren möglichen Verlauf auf Grund meiner früheren Arbeiten BACH als erster so geistreich hingewiesen hat[2]).

Auch können wir uns die Entstehung des Formaldehyds nach ERLENMEYER vorstellen, nach dem als Zwischenprodukt Ameisensäure auftritt, nach folgender Formel:

$$CO_2 + H_2O = HCOOH + O \text{ und } HCOOH = HCOH + O.$$

Viel wahrscheinlicher dürfte unsere Hypothese sein, dass das Kohlendioxyd durch Wasserstoff in statu nascendi zu Formaldehyd reduziert wird, bei welchem Prozesse wieder Wasser entsteht.

Nach neueren Beobachtungen wird deduziert, dass die Assimilation des CO_2 nicht bloss der chlorophyllhaltigen Zelle zukommt, sondern dass es auch von einigen chlorophyllfreien Pflanzenzellen assimiliert wird, wie wir das bei einigen Mikrobenarten sehen.

Prag, Chem.-physiol. Versuchsstation der k. k. techn. Hochschule.

---

69. Friedrich Hildebrand: Einige biologische Beobachtungen.

Mit Tafel XXII.

Eingegangen am 14. Oktober 1904.

1. Über die Blüten von Roscoea purpurea.

Obgleich in den letzten Zeiten sehr viele Beobachtungen über Bestäubungsverhältnisse veröffentlicht worden sind, und auch schon vor Jahren IRWIN LYNCH[3]) diejenigen von *Roscoea purpurea* besprochen hat, so möchte ich doch auf diese hier näher eingehen, indem hier ein sehr interessanter Fall von denjenigen vorliegt, welche zeigen, dass ähnliche Blüteneinrichtungen bei Pflanzen vorkommen,

1) Allgemein wird die Hypothese BAEYER's anerkannt, dass das Formaldehyd das erste Assimilationsprodukt des CO_2 in den grünen Pflanzenteilen ist. Die Reaktion wird am einfachsten durch die Gleichung $CO_2 + H_2O = CH_2O + O_2$ formuliert.

2) „Dégradation des hydrates de carbon dans l'organisme animal." Comptes rendus Nr. 22, 2. Juni 1903.

3) Soc. of the Linn. Soc. Bot., Vol. XIX, S. 102.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft

Jahr/Year: 1904

Band/Volume: 22

Autor(en)/Author(s): Stoklasa Julius

Artikel/Article: Über das Enzym Lactolase. welches die Milchsäurebildung in der Pflanzenzelle verursacht. 460-466