

Über Milchsäure- und Phosphorsäurebildung im Karpfenmuskel.

Von

Martha Cohn.

(Aus dem chemisch-physiologischen Institut der Universität Frankfurt.)
(Der Redaktion zugegangen am 22. September 1914.)

Aus der voranstehenden Arbeit von F. Laquer geht hervor, daß die Milchsäurebildung im Froschmuskel unter gewissen Umständen von einer sehr erheblichen Phosphorsäurebildung begleitet ist.

Zwar gelang es Laquer nicht, durch elektrische Reizung von Froschschenkeln bis zur Erschöpfung, die bekanntlich mit einer sehr erheblichen Milchsäurebildung verbunden ist, eine Vermehrung des Phosphorsäuregehaltes zu erzielen. Dagegen trat Phosphorsäurebildung bei der Wärmestarre ein, namentlich wenn deren Einleitung eine mechanische Schädigung der Muskulatur durch Zerkleinerung vorangegangen war.

Die Phosphorsäurebildung in der Froschmuskulatur kommt, ebenso wie die Milchsäurebildung, in kürzester Zeit zum Abschluß.

In der genannten Arbeit wurde ausgeführt, daß das eben geschilderte Verhalten der Froschmuskulatur im Einklang steht mit der Annahme einer dem Lactacidogen des Warmblütermuskels ähnlichen Milchsäurevorstufe.

Bei der Tätigkeit der Froschmuskulatur hält nach dieser Vorstellung die Synthese von Kohlenhydrat mit Phosphorsäure (oder einem organischen Phosphorsäurerest), der Spaltung der Kohlenhydratphosphorsäure in Milchsäure und Phosphorsäure das Gleichgewicht, oder, anders ausgedrückt, der assimilatorische Vorgang der Synthese von Kohlenhydrat mit Phosphorsäure vermag den dissimilatorischen der Kohlenhydratphosphorsäurespaltung zu kompensieren.

Je mehr durch chemisch oder mechanisch bedingte Struktur-schädigung die Bedingungen für die Assimilation verschlechtert werden, umso mehr tritt die Phosphorsäurebildung in die Erscheinung.

Es lag nun nahe zu untersuchen, ob auch der Preßsaft aus Kaltblütermuskulatur in ähnlicher Weise, wie es bei dem aus quergestreiften Warmblütermuskel gewonnenen der Fall ist, unter geeigneten Versuchsbedingungen Milchsäure und Phosphorsäure bildet.

Derartige Versuche habe ich auf Veranlassung von Professor Embden unternommen.

Wegen der Schwierigkeit der Beschaffung einer für die Gewinnung großer Preßsaftmengen ausreichenden Quantität von Froschmuskeln verwandte ich die Muskulatur von Fischen, und zwar bisher ausschließlich die des Flußkarpfens.

Die Preßsaftgewinnung erfolgte ganz ähnlich wie in den früheren Versuchen mit Hundemuskulatur. Unmittelbar nach Tötung des Karpfens durch Nackenstich wurde die Haut abgezogen und die abgeschnittene Muskulatur mit einer durch Kältemischung gekühlten Hackmaschine zerkleinert. Nach dem Verreiben des gekühlten Muskelbreis mit Quarzsand und Kieselguhr und der Auspressung des Muskels mit der Buchnerschen Presse wurde der in eisgekühlten sterilen Gefäßen aufgefangene Preßsaft genau, wie früher beschrieben, teils sofort mit 2%iger Salzsäure und 5%iger Quecksilberchloridlösung unter dreifacher Verdünnung gefällt, teils blieb er unter Zusatz einer genügenden Menge gesättigter Natriumbicarbonatlösung während 60—120 Minuten bei 40° stehen. Der Bicarbonatzusatz war stets so groß, daß blaues Lackmuspapier nicht mehr gerötet wurde.

In den am nächsten Tage gewonnenen entquecksilberten und von Schwefelwasserstoff befreiten Preßsaftfiltraten wurden in der früher geschilderten Weise Milchsäure und Phosphorsäure bestimmt. Alle Bestimmungen wurden, wo nicht ausdrücklich anderes vermerkt ist, an 100.ccm Filtrat angestellt.

Die Ergebnisse dieser Versuche sind aus der nachstehenden Tabelle 1 ersichtlich.

Die Kolonnen 2—4 dieser Tabelle enthalten einige Einzelheiten der Versuchsanordnung. Aus den Kolonnen 5 und 6 ist der Milchsäuregehalt von 100 ccm Preßsaft vor und nach dem Stehen bei 40° ersichtlich, aus den Kolonnen 7 und 8 die entsprechenden Werte für Phosphorsäure.

Betrachten wir zunächst die Milchsäurewerte, so sehen wir, daß in den meisten Versuchen die Milchsäurebestimmung in dem Preßsaft nach dem Stehen Werte ergab, die ganz wenig höher liegen, als die für den sofort verarbeiteten Ansatz ermittelten. Ganz ähnlich wie in den früher von Cohn und Meyer ausgeführten Versuchen am Uteruspreßsaft liegen die Unterschiede an sich innerhalb den Fehlergrenzen der Bestimmung, doch weist die Gleichsinnigkeit fast sämtlicher Versuchsergebnisse (nur die eine Doppelbestimmung in Versuch 6 macht davon eine Ausnahme) darauf hin, daß wirklich der Milchsäuregehalt beim Stehen des Karpfenpreßsaftes um ein ganz Geringes zunahm.

Auch der Phosphorsäuregehalt nahm in drei von den vier Versuchen, in denen Phosphorsäurebestimmungen ausgeführt wurden (Versuche 3, 4, 6 der Tabelle I) ein wenig zu, doch liegt auch diese Zunahme mit Ausnahme von Versuch 6 annähernd innerhalb der Fehlergrenze der Bestimmung.

Zwischen dem Verhalten der Karpfenmuskulatur und Hundemuskulatur, deren Preßsaft so beträchtliche Milchsäure- und Phosphorsäuremengen bildet, besteht also ein wesentlicher Unterschied.

Dieser Unterschied konnte durch sehr verschiedene Umstände bedingt sein. Es war denkbar, daß lactacidogenartige Substanzen sich im Karpfenmuskel überhaupt nicht fanden, oder nicht in den Preßsaft übergegangen waren.

Auch die Möglichkeit, daß die für die Umwandlung der in Frage kommenden Kohlenhydratphosphorsäureverbindung in Milchsäure und Phosphorsäure notwendigen Fermente im Preßsaft fehlten, oder daß sie unter den gewählten Versuchsbedingungen (Temperatur, Alkaleszenz usw.) nicht zur Wirksamkeit gelangt waren, mußte in Erwägung gezogen werden.

Zwei Versuche, die ich unter Zusatz von Hexosephosphat

ganz in der früher geschilderten Weise anstellte, ergaben, daß Karpfenmuskelpreßsaft den Abbau dieser Kohlenhydratphosphorsäure zu Milchsäure und Phosphorsäure außerordentlich leicht vollzieht.

Während in Versuch 5 im Leerversuche höchstens eine minimale Milchsäurebildung eingetreten war (Kolonne 9), zeigte der mit Hexosephosphat versetzte Preßsaftanteil ein Ansteigen der Milchsäure um etwa 0,1%. Die Phosphorsäurebildung, die in den Leerversuchen nur sehr geringfügig gewesen war, betrug in diesem Zusatzversuch 0,116% (Kolonne 16).

Von ähnlicher Größenordnung wie in Versuch 5 ist die unter der Einwirkung von Hexosephosphat erfolgte Milchsäure- und Phosphorsäurebildung in Versuch 6.

Da hiernach die für die Milchsäure- und Phosphorsäurebildung aus Lactacidogen notwendigen Fermente im Preßsaft allem Anschein nach vorhanden und unter den von mir gewählten Versuchsbedingungen wirksam waren, mußte angenommen werden, daß das fast völlige Ausbleiben der Milchsäure- und Phosphorsäurebildung in den Leerversuchen durch den Mangel des Preßsaftes an milchsäure- und phosphorsäurebildender Substanz bedingt war.

Fehlte nun das Lactacidogen im quergestreiften Karpfenmuskel wirklich von vorneherein, oder war es nur aus irgend einem Grunde nicht in den Preßsaft gegangen?

Hierüber versuchte ich Aufschluß zu gewinnen durch eine Versuchsanordnung, die der früher von Laquer am Froschmuskel und von Meyer und mir¹⁾ an der Muskulatur des Uterus angewandten völlig gleich war. Ich bestimmte den Milchsäure- und Phosphorsäuregehalt des unter Kühlung der Hackmaschine gewonnenen Karpfenmuskelbreis sofort und nach einstündigem Stehen bei 45° in Kochsalzlösung von 0,7% oder Natriumbicarbonatlösung von 2%.

Diese Versuche sind in Tabelle 2 aufgeführt. Ein Vergleich der Kolonnen 2, 3 und 4 ergibt, daß der Karpfenmuskel unter diesen Versuchsbedingungen ganz ähnlich wie die Frosch-

¹⁾ Cohn, Martha und Meyer, Rudolf, diese Zeitschrift, dieser Band, S. 46.

1	2	3	4	Ohne Hexosephosphat						9	10				
				Nr.	Menge des Preßsaftes für jeden Einzelversuch. ccm	Zugesetzte Menge gesättigter Natriumbicarbonatlösung. ccm	Preßsaft B blieb bei 40° stehen. Minut.	Milchsäure in 100 ccm des				Phosphorsäure in 100 ccm des		In 100 ccm des Preßsaftes B ₁ neugebildete	
								sofort verarbeiteten Preßsaftes A ₁ g	nach dem Stehen bei 40° verarbeiteten Preßsaftes B ₁ g			sofort verarbeiteten Preßsaftes A ₁ g	nach dem Stehen bei 40° verarbeiteten Preßsaftes B ₁ g	Milchsäure g	Phosphorsäure g
1	70	10	60	0,1364	0,1512	0,3715	0,3641	0,0148	Keine Phosphorsäurebildung						
2	80	8	60	0,2687	0,2754 0,2815	—	—	0,0067 0,0128	—						
3	75	35	80	0,5239	0,5350	0,4872	0,4972	0,0111	0,0100						
4	80	10	120	0,3753	0,3956	0,4349	0,4599	0,0203	0,0250						
5	80	15	120	0,3902	0,3996	—	—	0,0094	—						
6	80	30	90	0,4023 0,4205	0,4118	0,4153 0,4158	0,4518	0,0095 Keine Bildung	0,0365 0,0360						

Tabelle 1.

11						12		13		14		15		16		17
Mit Hexosephosphat												Bemerkungen				
Milchsäure in 100 ccm des				Phosphorsäure in 100 ccm des				In 100 ccm des Preßsaftes B ₂ neugebildete								
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						
g		g		g		g		g		g						
—		—		—		—		—		—		Zu den Phosphorsäurebestimmungen je 90 ccm Filtrat.				
—		—		—		—		—		—		Die Milchsäure wurde in 80 ccm Filtrat bestimmt.				
—		—		—		—		—		—		Die Milchsäure B ₁ wurde in 90 ccm Filtrat bestimmt.				
0,3902		0,4914		0,4848		0,6011		0,1012		0,1163		Als Milchsäurewert für A ohne Zusatz wurde der unter Zusatz von Hexosephosphat ermittelte eingesetzt.				
0,4050		0,4853		[0,4155]		0,5485		0,0803		[0,1330]		Als Phosphorsäurewert für A mit Zusatz von Hexosephosphat wurde der im Leerversuch ermittelte Durchschnittswert eingesetzt.				

Tabelle 2.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Nr. des Versuchs	A	B	B	A	B	B	A	A	A	A
	sofort	mit Kochsalz- lösung	mit Natrium- bicar- bonat- lösung	sofort	mit Kochsalz- lösung	mit Natrium- bicar- bonat- lösung	Kochsalz- lösung	Natrium- bicar- bonat- lösung	Kochsalz- lösung	Natrium- bicar- bonat- lösung
Milchsäure in 100 g Muskel				Phosphorsäure in 100 g Muskel			Zunahme der Milchsäure nach dem Stehen bei 45° mit		Zunahme der Phosphorsäure nach dem Stehen bei 45° mit	
7	0,2823	0,3561	0,3959	0,4622	0,5739	0,5071	0,0758	0,1136	0,1117	0,0449
8	—	—	—	0,4350	0,4996	0,5070	—	—	0,0646	0,0720
9	0,1895	0,3153	0,3481	0,4438	0,5499	0,5319	0,1258	0,1586	0,1061	0,0881
10	0,1922	—	0,3870	0,3814	0,4598	0,4694	—	0,1948	0,0784	0,0880

muskulatur in der voranstehenden Arbeit von Laquer,¹⁾ wenn auch nicht in völlig gleichem Umfange, Milchsäure bildet.

Zusatz von Natriumbicarbonat steigert auch hier die Milchsäurebildung sehr deutlich.²⁾ Auch die Phosphorsäurebildung, die in den Preßsaftversuchen nur eben angedeutet war, erreicht in den Breiversuchen recht erhebliche Werte (annähernd 0,065% in Versuch 8, Kolonne 10; bis etwa 0,1% in den Versuchen 7 und 9, Kolonne 10), wobei der Ersatz der Kochsalzlösung durch Natriumbicarbonatlösung keinen gesetzmäßigen Einfluß erkennen läßt.

In den unter Alkalizusatz ausgeführten Versuchen überwiegt überall die Milchsäurebildung die Phosphorsäurebildung ganz beträchtlich.

Natürlich beweist die Tatsache, daß im Preßsaft aus Karpfenmuskel die Milchsäure- und Phosphorsäurebildung fast ausbleibt, während in den Breiversuchen beide Säuren reichlich gebildet werden, durchaus nicht, daß Milchsäure und Phosphorsäure im Karpfenmuskel derselben Quelle entstammen.

Immerhin stimmen meine Beobachtungen aufs beste mit der Annahme überein, daß auch im Karpfenmuskel der Abbau der Kohlenhydrate zu Milchsäure durch eine Bindung des Kohlenhydrats an Phosphorsäure eingeleitet wird, und daß ein Vorrat einer derartigen lactacidogenartigen Substanz auch im quergestreiften Karpfenmuskel abgelagert ist.

In ihrem Verhalten bei der Milchsäure- und Phosphorsäurebildung ist die quergestreifte Karpfenmuskulatur von der Skelettmuskulatur des Hundes dadurch unterschieden, daß, wie aus den oben mitgeteilten Versuchen hervorgeht, ihr Preßsaft nur sehr geringe Mengen Milchsäure und Phosphorsäure entstehen läßt, offenbar deswegen, weil die milchsäure- und phosphorsäurebildende Substanz im Preßrückstande zurückgehalten wird.

Damit stimmt überein, daß in zwei Versuchen, in denen ich die anorganische und die Gesamtposphorsäure im Schenck-Filtrat bestimmte, die Werte für die anorganische

¹⁾ Laquer, F.

²⁾ Siehe Laquer, l. c., S. 69.

Phosphorsäure fast die für die Gesamtphosphorsäure ermittelten erreichten, d. h., es war nur sehr wenig organische Phosphorsäure im Schenck-Filtrat enthalten.

In Versuch 9 waren in das Schenck-Filtrat, auf den Muskelpreßsaft bezogen im Mittel aus je zwei gut übereinstimmenden Parallelbestimmungen

0,4431% Gesamtphosphorsäure

und 0,4127% anorganische Phosphorsäure

übergegangen, d. h. wenig mehr als 0,03% organische Phosphorsäure.

In dem zweiten Versuche war der entsprechende Wert

0,4998% Gesamtphosphorsäure

und 0,4415% anorganische Phosphorsäure,

es waren also etwa 0,058% organische Phosphorsäure in das Schenck-Filtrat übergegangen.

Das Lactacidogen geht möglicherweise deswegen nur so unvollkommen in den Preßsaft des Karpfenmuskels über, weil es irgendwie an hochmolekulare Substanzen, z. B. Eiweißkörper gebunden ist,¹⁾ von denen der Gesamtmolekularkomplex des Lactacidogens nur schwer abgespalten wird, und es wäre denkbar, daß umgekehrt durch das Fehlen oder die leichte Spaltbarkeit einer derartigen Bindung im Hundemuskel der hier reichlich erfolgende Übertritt des Lactacidogens in den Preßsaft bedingt ist.

In ihrem Verhalten bezüglich der Milchsäure- und Phosphorsäurebildung unterscheidet sich die Karpfenmuskulatur ebenso sehr wie von der quergestreiften Muskulatur, auch von der glatten Muskulatur des Säugetiers. Denn bei der Karpfenmuskulatur zeigt zwar der Preßsaft nur eine sehr geringfügige Milchsäure- und Phosphorsäurebildung, im Muskelbrei treten aber bei kurzem Stehen beide Säuren reichlich auf.

Zerkleinerte Uterusmuskulatur zeigt ebensowenig wie Uteruspreßsaft eine irgend erhebliche Milchsäurebildung, während Phosphorsäurebildung in allerdings nicht sehr beträchtlichem

¹⁾ Hier sei daran erinnert, daß sich im Preßsaft aus Hundemuskeln keine in Betracht kommende Menge an Eiweiß gebundenen Phosphors findet. Siehe nachfolgende Arbeit von Embden und Laquer.

Umfange sowohl im Preßsaft wie in der zerkleinerten Uterusmuskulatur auftritt, in der letzteren anscheinend etwas stärker.

Gemeinsam kommt den Preßsäften aus der quergestreiften Muskulatur und der Uterusmuskulatur des Säugetiers sowie auch aus der quergestreiften Muskulatur des Karpfens, die Fähigkeit zu, Hexosephosphat zu Milchsäure und Phosphorsäure abzubauen.

Während allem Anschein nach der Gehalt an Lactacidogen und auch seine Bindungsweise innerhalb derselben Tierreihe bei verschiedenen Arten von Muskelgewebe und auch bei morphologisch sehr ähnlicher Muskulatur innerhalb verschiedener Tierklassen mindestens ein sehr verschiedener sein kann, ist offenbar die Fähigkeit, Hexosephosphorsäure fermentativ unter Milchsäure- und Phosphorsäurebildung zu spalten, eine weitverbreitete.

Die wesentlichsten Ergebnisse der voranstehenden Untersuchung sind folgende:

1. Preßsaft aus den Skelettmuskeln des Karpfens bildet im Gegensatz zu Hundemuskelpreßsaft bei kurzem Stehen höchstens ganz geringfügige Milchsäure- und Phosphorsäuremengen.

2. Hexosephosphorsäure wird durch Karpfenmuskelpreßsaft während kurzem Stehen bei 40° ebenso wie durch den Preßsaft aus quergestreiften Hundemuskeln und aus der glatten Uterusmuskulatur von Kühen in Milchsäure und Phosphorsäure gespalten.

3. Zerkleinerte Karpfenmuskulatur bildet ebenso wie die Muskulatur des Frosches reichlich Milchsäure¹⁾ und Phosphorsäure.²⁾

¹⁾ Fletcher und Hopkins, Lacticacid on amphobian muscle Journ. of Physiol., Bd. 35, 1907, S. 247.

²⁾ Laquer, F., l. c.