

Die Lehre von den chemischen Fermenten oder Enzymologie : auf Grund von vorhandenen und eigenen Versuchen / von Adolf Mayer.

Contributors

Mayer, Adolf, 1843-

Publication/Creation

Heidelberg : Carl Winter, 1882.

Persistent URL

<https://wellcomecollection.org/works/gbqh2bnz>

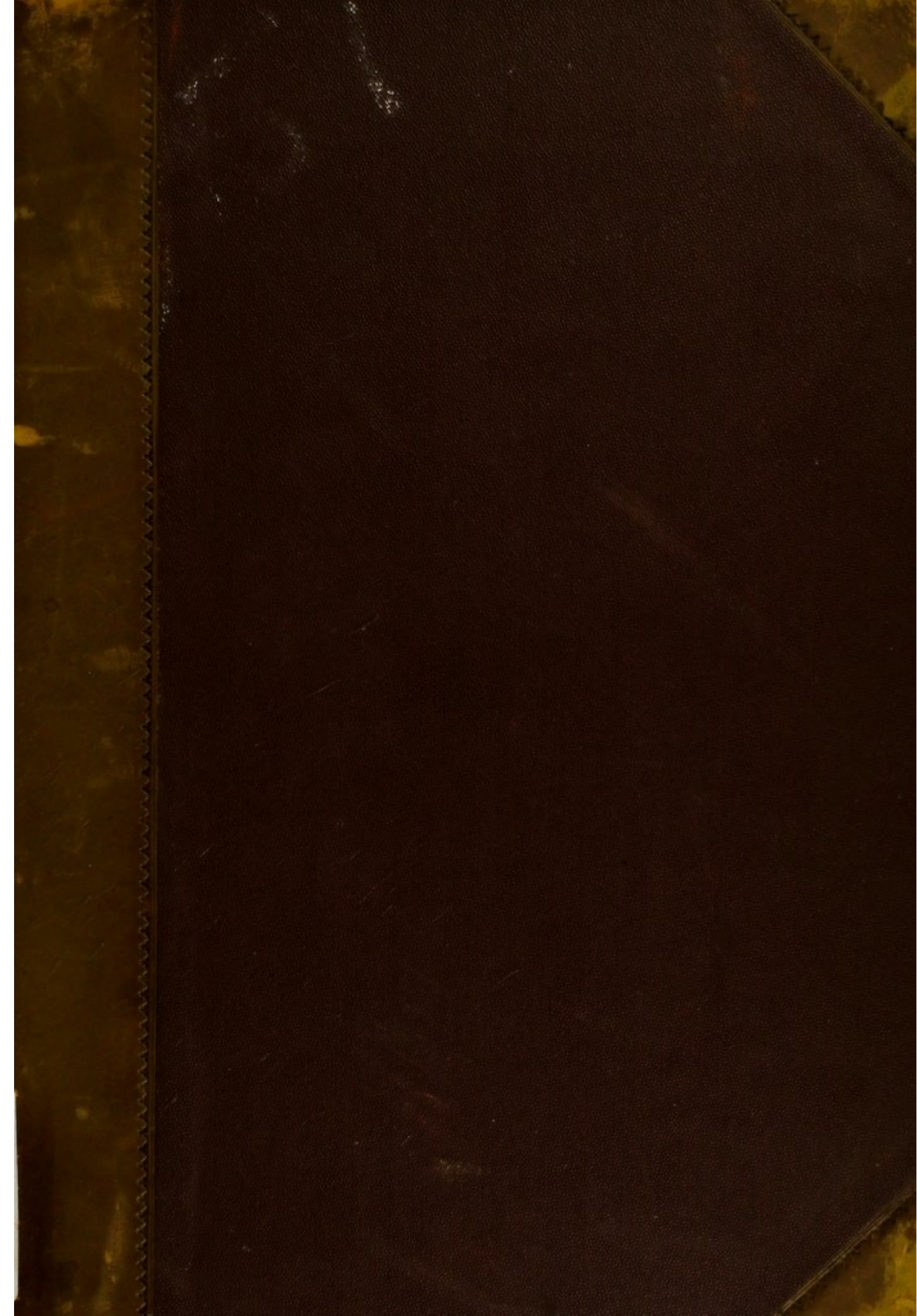
License and attribution

This work has been identified as being free of known restrictions under copyright law, including all related and neighbouring rights and is being made available under the Creative Commons, Public Domain Mark.

You can copy, modify, distribute and perform the work, even for commercial purposes, without asking permission.



Wellcome Collection
183 Euston Road
London NW1 2BE UK
T +44 (0)20 7611 8722
E library@wellcomecollection.org
<https://wellcomecollection.org>



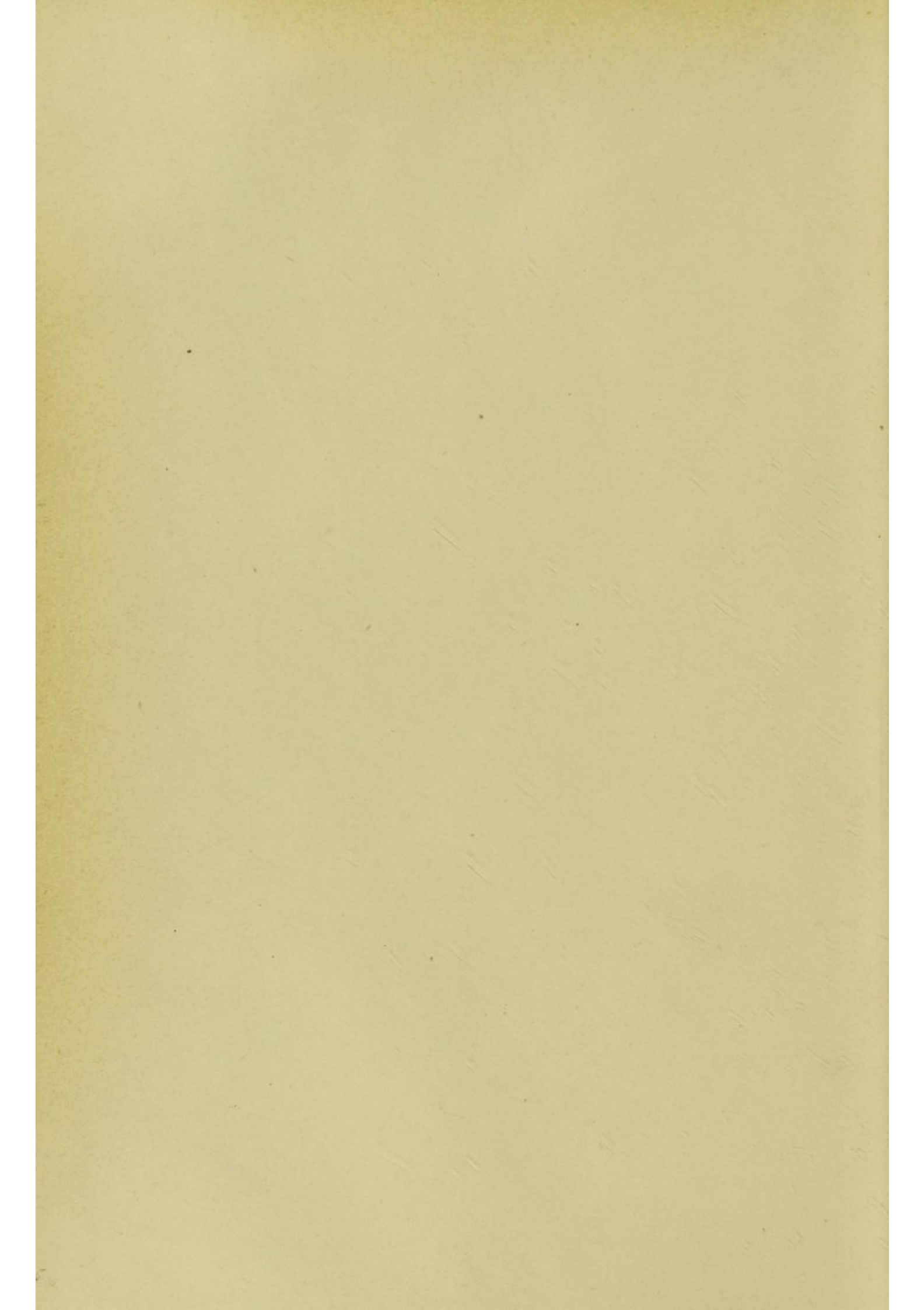
30. I.



22102027392

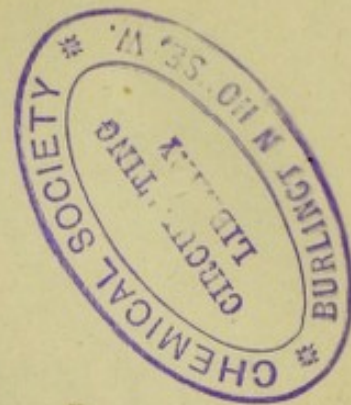
Med
K12264

26 38









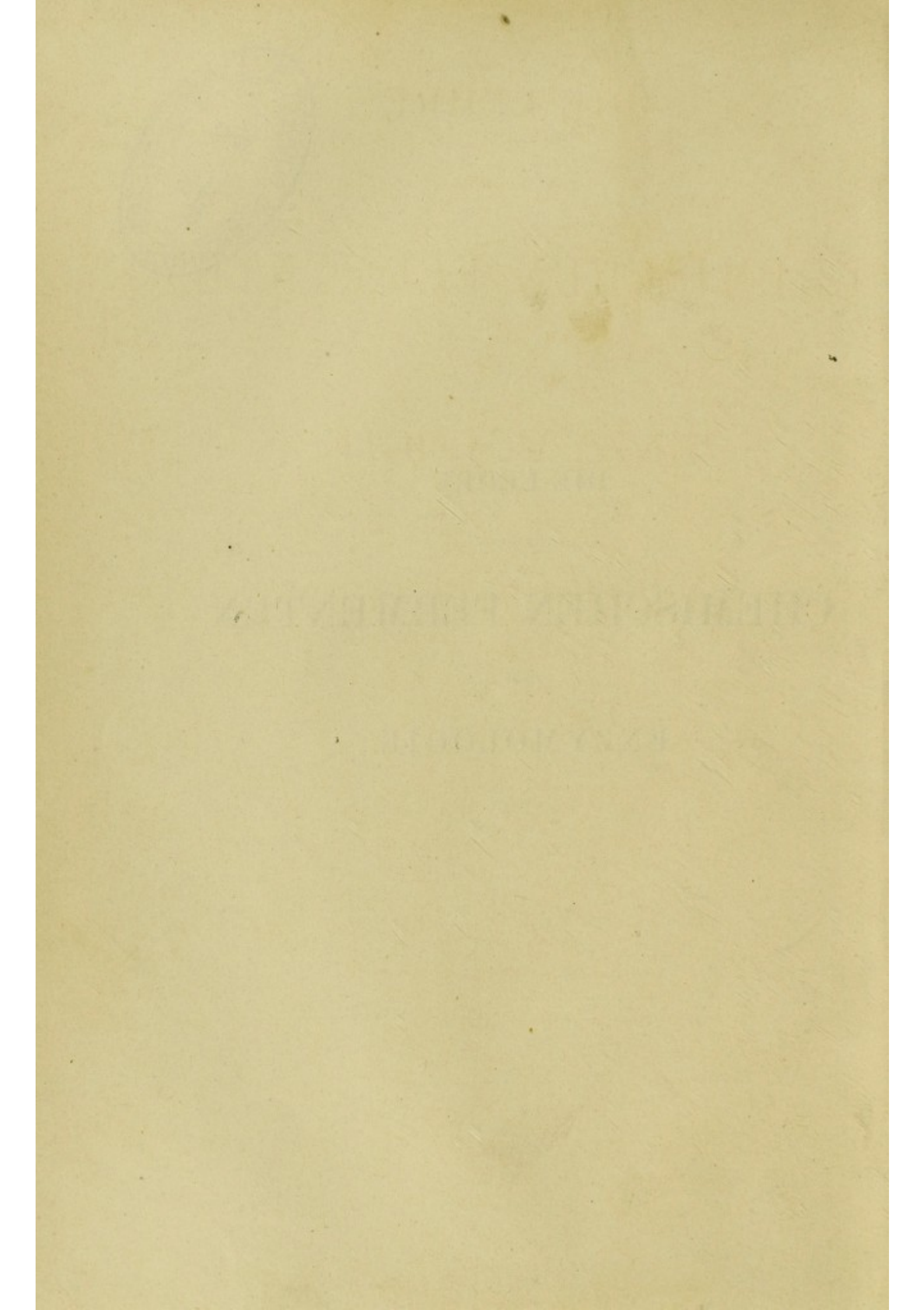
DIE LEHRE

VON DEN

CHEMISCHEN FERMENTEN

ODER

ENZYMOLOGIE.



CHECKED

DIE LEHRE

VON DEN

CHEMISCHEN FERMENTEN

ODER

ENZYMOLOGIE.

1983

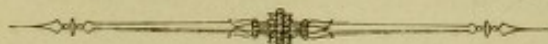
AUF GRUND VON VORHANDENEN UND EIGENEN VERSUCHEN

BEARBEITET

VON

DR. ADOLF MAYER,

PROFESSOR UND VORSTAND DER HOLL. REICHVERSUCHSSTATION IN WAGENINGEN.



HEIDELBERG.

CARL WINTER'S UNIVERSITÄTSBUCHHANDLUNG.

1882.

Alle Rechte vorbehalten.

~~98400~~

14 804 658

WELLCOME INSTITUTE LIBRARY	
Coll.	Wellcome
Coll.	
No.	①①

Vorwort.

Eine Monographie wie die vorliegende bedarf eigentlich keines Commentars.

Jeder, der in sie hineinblickt, wird erkennen, daß der Strom der Thatfachen auf dem Gebiete der chemischen Fermente mächtig angeschwollen ist, und noch fehlte bis dahin jede ordnende Hand, um Einheitliches zu sammeln und Fremdartiges auszuschneiden.

Ob mein Blick scharf genug und meine Hand fest genug gewesen ist, um dieser lohnenden Aufgabe gerecht zu werden, wage ich, in der wissenschaftlichen Vereinsamung, in der ich mich seit einem halben Jahrzehnt befinde, und in Anspruch genommen durch eine Ueberlast von praktischen Berufspflichten, selber nicht zu beurtheilen. Das aber habe ich mir, mehr wie bei früheren compilerischen Arbeiten, die trotzdem jederzeit wohlwollend aufgenommen worden sind, zur Pflicht gemacht, soweit meine Kräfte das zuließen, selber in die Arena der experimentellen Forschung beinahe in Betreff eines jeden wichtigeren Gegenstandes, der in dieser Schrift Behandlung gefunden hat, mit einzutreten und nicht bloß von der gesicherten Journalistentribüne aus eine wohlfeile Sentenz ertönen zu lassen. Ich möchte wünschen, daß dieser Vorzug der autoptischen Kenntniß des ganzen Gegenstands die vielen Mängel, welche die Schrift ohne Zweifel erkennen lassen wird, zum Theile auszugleichen im Stande wäre.

Die Monographie, obgleich sie bei der Neuheit des Gegenstands nicht lehrbuchmäßig abgefaßt werden konnte, sollte zugleich als eine Art von Ergänzung dienen zu meinem in dem gleichen Verlage erschienenen «Lehrbuch der Gährungschemie», in welchem nur die «organisirten Fermente» eine eingehende Behandlung erfahren haben.

Es erübrigt mir noch meinen Mitarbeitern bei den hier veröffentlichten Versuchen, den Herren F. J. van Pefch, W. Hagemann und W. Heubach, mit Ausnahme des letztgenannten noch gegenwärtig Assistenten an der niederländischen Reichsversuchsstation, den gebührenden Dank für ihre treulichen Hülfeleistungen auszusprechen. Bei der Ausführung einiger Versuche ist mir auch der Nachfolger des Herrn Heubach, Herr J. D. Kobus, sehr behülflich gewesen.

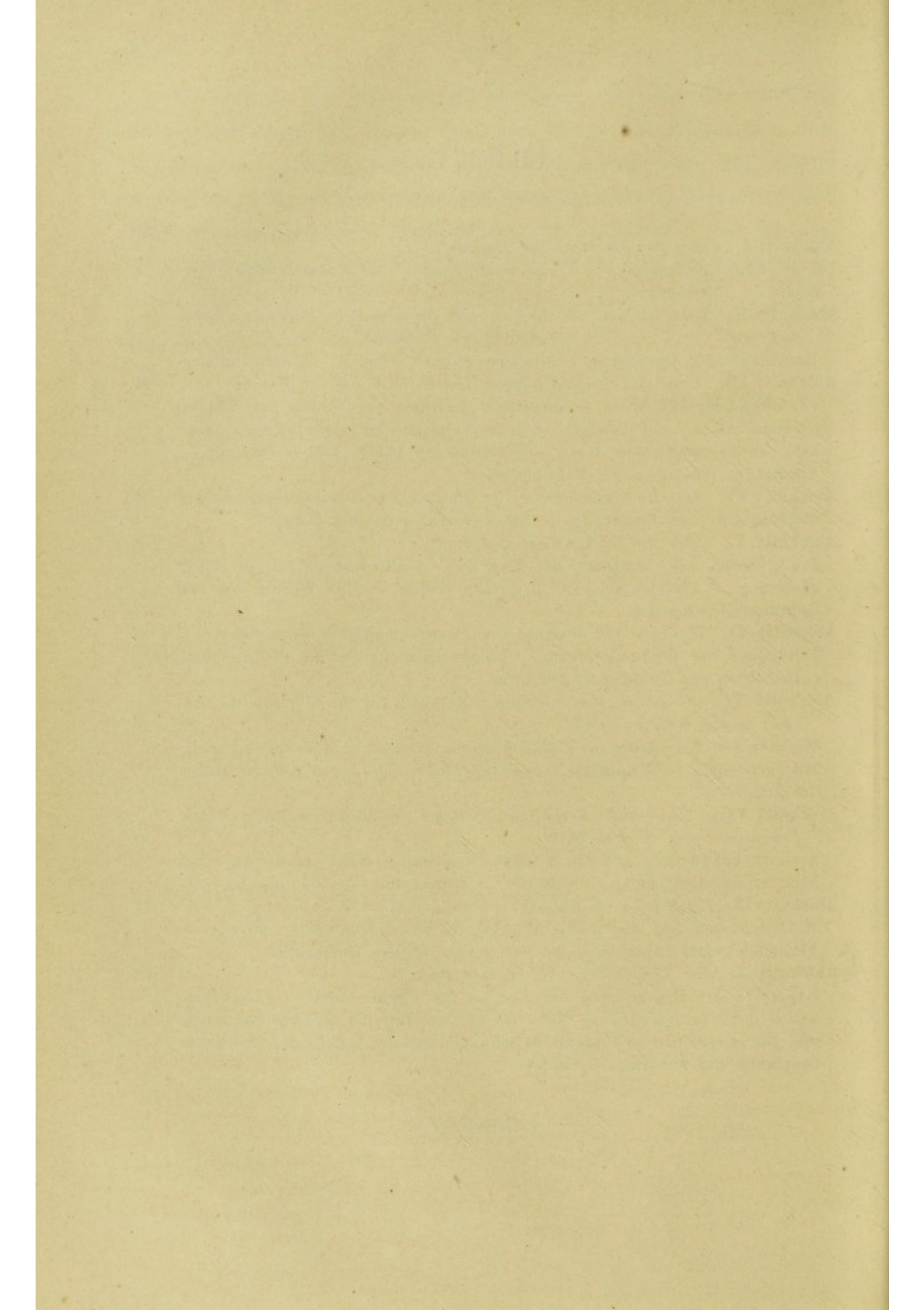
Wageningen in Holland, April 1882.

Adolf Mayer.

Inhalt.

	Seite
Abchnitt I. <i>Ueber das Entstehen der Enzyme</i>	1
Eintheilung der Enzyme. — Verbreitung derselben im Pflanzen- und Thierreiche. — Enzymogene.	
Abchnitt II. <i>Die Isolirung der Enzyme und die chemische Zusammensetzung derselben</i>	10
Vorschriften zur Darstellung. — Schädigung durch Alkohol. — Enzymanalysen.	
Abchnitt III. <i>Ueber den Einfluß höherer Temperaturen auf die Enzyme . . .</i>	20
«Tödtungstemperaturen». — Inconstanz derselben. — Einfluß von Wasser, Glycerin, Alkohol auf dieselben. — Schwächungen der Enzymlösungen unterhalb der Tödtungstemperaturen. — Widerstand trockener Enzympräparate. — Einwirkung des Lichts auf Enzymlösungen.	
Abchnitt IV. <i>Das Unwirksamwerden der Enzyme durch chem. Beimengungen.</i>	43
Gährungsgifte und Enzymgifte. — Incongruenz beider Kategorieen.	
Abchnitt V. <i>Ueber die Wirkung der Enzyme</i>	52
Der Chemismus der enzymotischen Prozesse. — Wasseraddition bei der Milchgerinnung. — Wärmetönung bei Fermentprozessen. — Unterschiede von den Gährungserscheinungen.	
Abchnitt VI. <i>Ueber die für Wirkung der Enzyme günstigsten Temperaturen .</i>	63
Feststellung der Wirkungsoptima. — Inconstanz dieser Optima. — Beziehung derselben zu den Tödtungstemperaturen.	
Abchnitt VII. <i>Ueber die Beimengungen, welche sich für die Wirkung der Enzyme günstig erwiesen haben</i>	78
Wirkung von Alkalifalzen und Alkaloiden. — Wirkung von Kochsalz auf die Milchgerinnung. — Abhängigkeit des Sinns dieser Wirkungen von der Menge des Zusatzes.	
Abchnitt VIII. <i>Quantitative Beziehungen zwischen der Menge von angewendetem Enzym und dem Wirkungseffekt</i>	82
Versuche mit Diastase, Invertin, Pepsin, Chymosin. — Wird das Enzym durch seine fermentative Thätigkeit zerstört? — Versuche mit Chymosin und Invertin.	
Abchnitt IX. <i>Einwirkung von Enzymen und enzymotischen Prozessen aufeinander.</i>	97
Milchgerinnung und diastatische Wirkung in gemeinschaftlicher Lösung. — Verhalten gegen Gährungserreger und andere niedere Organismen.	
Abchnitt X. <i>Zur Theorie der enzymotischen Prozesse</i>	104
Hypothese der Hydratirung der Enzyme am eigenen Leibe. — Hypothese analog der Säurewirkung. — Neue Theorie der Enzyme als Organismenreste und der enzymotischen Prozesse als beruhend auf der gesteigerten Molekulartemperatur der Substrate. — Schluß.	





I. Ueber das Entstehen der Enzyme.

Alle chemischen Fermente¹⁾ lassen sich in fünf große Gruppen unterbringen:

- A) *Zuckerbildende.*
- B) *Peptonbildende.*
- C) *Albuminbildende.*
- D) *Glycerinbildende.*
- E) *Ammoniakbildende.*

Die erste Gruppe ist die zahlreichste. Dazu gehören: *Diastatase* (Maltin), *Ptyalin*, *Myrofin*, *Emulfin*, *Invertin*, *thierisches Invertin*, und eines der *Pankreasfermente*²⁾.

Jedes dieser Fermente übrigens, welches wir mit dem Namen eines chemischen Individuums belegen, besteht, wie einige im Folgenden mitgetheilte Thatfachen lehren werden, aus mehreren Unterformen, Spielarten möchte ich beinahe sagen, welche ihre Wirksamkeit unter etwas abweichenden Bedingungen zur Geltung bringen. Die Namen der Enzyme sind also nicht aufzufassen, wie die von chemischen Individuen, streng und mit Ausschließlichkeit definirend, sondern als dienend zur vorläufigen Orientirung hinsichtlich Ursprung und Wirkungsweise. Diese Bemerkung gilt natürlich auch für die anderen Gruppen.

Zuckerbildende Enzyme werden gefunden im Thier- und Pflanzenreich, im ersteren als Inhalt und Sekret drüsigter Organe, im letzteren hauptsächlich während des Keimlebens entstehend und, so viel man weiß, das ganze Pflanzengewebe durchdringend. Kommen analog wirkende Fermente in beiden Reichen vor, so zeigen doch die Details ihrer Wirksamkeit, daß sie nicht identificirt werden dürfen.

¹⁾ Für den Begriff *chemische Fermente* ist in dieser Schrift in der Regel kurzweg der bereits vielfach adoptirte Ausdruck *Enzyme* gebraucht worden, um sie kurz und deutlich von den organisirten Fermenten zu unterscheiden.

²⁾ Ebenso diastatische Fermente, die noch sonst im Thierkörper und zumal in der Leber verbreitet sind, die wir aber noch zu wenig kennen, um sie behandeln zu können.

Die chemische Umsetzung, welche die zuckerbildenden Enzyme vollziehen, ist recht verschieden, nicht allein hinsichtlich des Produktes, unter dem nicht immer Dextrose, sondern zuweilen Maltose sich befindet, sondern namentlich hinsichtlich des Substrates, als welches in den verschiedenen Fällen Stärkemehl, Rohrzucker oder eine ganze Reihe von Glycosiden dienen.

Diaftase ist nachgewiesen in den ruhenden Samen der Gerste, des Mais' und anderer Getreidearten, des Flachses und Hanfes, der Erbse, der Wicke, der wilden Kastanie, der Pinie, der *Mirabilis Jalappa* und des Kürbis¹⁾, also in Samen der verschiedensten Pflanzenarten, beinahe gleichgültig, ob sie Stärke besitzen, ob nicht. In anderen Samen jedoch, und zwar von Lupinen und *Mandeln* wurde sie vermißt, ebenso im Sklerotiumkörper des Mutterkorns. Ferner ist die *Diaftase* nachgewiesen in gekeimten Getreidesamen und zwar in größeren Mengen als in den ruhenden, in Bohnenkeimlingen (*Phaseolus multiflorus* und *Vicia faba*), in gekeimtem Buchweizen und natürlich auch in den Keimlingen der anderen vorhin genannten Samen.

Erwiesen ist die Thatfache des Vorkommens eines diaftatischen Enzyms noch für Keimlinge der Roßkastanie, der Erbse, von *Mirabilis Jalappa*. In der keimenden Gerste entwickelt sich zwischen dem dritten und dem siebten Tage die größte Menge von Enzym. Die ursprünglich vorhandene Menge wird dabei verdreifacht (Kjeldahl).

Ruhende Wurzel- oder andere unterirdische Organe scheinen in felteneren Fällen diaftasehaltig zu sein. Nur in der ruhenden Zwiebel ist das Ferment nachgewiesen. Aber in den treibenden Knollen von Kartoffeln, *Dioscorea Batatas*, *Gesneria barbata*, in den Rhizomen von *Iris germanica* ist *Diaftase* anwesend. Ferner beweist das Süßwerden der Kartoffeln nahe bei der Erfrierungstemperatur, daß dieselben auch im ruhenden Zustande *Diaftase* enthalten.

Treibende pflanzliche Sprosse und Wurzeln sind nach den vorliegenden Angaben so allgemein diaftasehaltig, daß es unnöthig erscheint, die Thatfachen einzeln aufzuzählen, welche diese Regel beweisen. Auch in den Blättern mehrerer Bäume, so von der Eiche und vom Weißdorn ist das Ferment gefunden, ebenso im jungen Holz der Roßkastanie, nicht aber in dem der Birke.

¹⁾ Vergl. namentlich die Abhandlung von C. Krauch, Landw. Versuchsstat. 23, S. 77 und Baranetzky: Die stärkeumbildenden Fermente, Leipzig 1878.

Eine interessante Beziehung in dieser Richtung ist noch durch Baranetzky angedeutet worden. Dieser fand nämlich die Ausbeute an Diaftase aus gleichartigen gekeimten Samen um so größer, je mehr deren Keimung unter Zutritt der atmosphärischen Luft stattgehabt hatte — ein deutlicher Fingerzeig hinsichtlich der Entstehung des Fermentes durch gerade beim Keimungsproceß energisch statthabende Oxydationsprozesse¹⁾. Erwähnenswerth erscheint noch der Nachweis von Diaftase in Kiefernpollen durch Erlenmeyer²⁾.

Alles dies zusammenfassend, können wir aussprechen, daß *das Vorkommen des diaftatischen Fermentes in der Pflanze allgemein ist, so allgemein, können wir sagen, wie das Auftreten des Stärkemehls selber*, wenn auch nicht in allen Fällen damit zusammengehend. Nur ruhende Organe, die zur Zeit keine Vegetationserrscheinungen (welche ja zu einem großen Theile auf Umwandlung des Stärkemehls Bezug haben) unterhalten, sind manchmal frei davon.

Was die Vertheilung der Diaftase in keimenden Getreidekörnern angeht, so wissen wir, daß der Eiweißkörper am reichsten daran ist, daß aber auch die Radicula des Keimlings etwas von dem Enzyme enthält (Payen).

Das *Ptyalin*, früher auch wohl thierische Diaftase genannt, vollzieht, soweit diese Frage bis jetzt studirt worden ist, denselben Proceß wie diese, darf aber trotzdem mit derselben nicht identificirt werden, weil die Bedingungen seiner Wirksamkeit, wie wir weiter unten sehen werden, ganz andere sind. Dasselbe kommt vor in dem Sekret der Speicheldrüsen zumal der Pflanzenfresser. Doch kommen auch in anderen thierischen Organen diaftatische Enzyme in kleineren Mengen vor.

Das *Stärkeverdauende Ferment* des Pankreassekrets ist, wie schon diese Bezeichnungsweise ausdrückt, allein in dem Sekrete dieser einen thierischen Drüse aufgefunden worden.

Ein noch unbekanntes stärkeverwandelndes Enzym muß auch in einer Gruppe der niedrigsten pflanzlichen Organismen, den Butterfäurebakterien, *Clostridium butyricum*, vorkommen, da diese Bakterien auf Kosten von Stärke zu leben vermögen³⁾. Daher z. Th. auch wohl die diaftatische Wirkung gefaulter thierischer Gewebe.

¹⁾ Die stärkeumbildenden Fermente etc., Leipzig 1878.

²⁾ Bei Krauch citirt.

³⁾ Vgl. Prazmowski: Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte und Fermentwirkungen einiger Bakterienarten, Leipzig 1880.

Glycogenverdauende Fermente, die mit den Stärkeverdauenden identisch zu sein scheinen, sind in den allerverschiedensten thierischen Organen, zumal in der Leber der Säugethiere gefunden worden. Ja, J. Seegen u. Kratfchmer¹⁾ geben an, daß sich in gekochten thierischen Organen, ja in reinen Eiweißstoffen selbst, dafern sie an Wasser lösliches Eiweiß abgeben, langsam glycogenverdauende Fermente in sich zu erzeugen im Stande wären. Wir werden auf diese Thatfache noch zurückkommen.

Ueber Verbreitung von *Emulfin* und *Myrofin* wissen wir wenig. Das erstere wird aus den süßen wie aus den bitteren Mandeln dargestellt, das andere aus dem schwarzen und weißen Senffamen. Aus dieser Weise des Vorkommens lernen wir übrigens, daß bei diesen Fermenten ganz ähnlich wie bei der Diastase die Verbreitung größer ist, als der augenblickliche Nutzen; denn wenigstens findet das Emulfin in den süßen Mandeln kein geeignetes Substrat für die ihm charakteristische Wirkungsweise, ganz nach Analogie des Auftretens von Diastase im Leinfamen.

Das Invertin ist als solches allein dargestellt aus den beiden Spielarten des Hefepilzes *Saccharomyces cerevisiae*. Ich selber habe es abwechselnd mit anscheinend gleichem Erfolge aus Preßhefe, aus Bieroberhefe und Unterhefe bereitet. Einige fruktifizirende Schimmelarten wie der gemeine Pinfelschimmel, ferner *Asperigillus nigra* haben die Fähigkeit Rohrzuckerlösungen zu intervertiren, daher wohl ein ähnliches Ferment in ihnen angenommen werden muß. Anderen Schimmelforten sowie den verbreitetsten Bakterien muß von demselben Grundsatz ausgehend der Gehalt an Invertin abgesprochen werden (Gayon).

Da in mehreren höheren Pflanzen Rohrzucker regelmäßig und vorzüglich als Reservestoff auftritt, so muß auch wohl in diesen ein invertinartiges Ferment angenommen werden (Hoppe-Seyler), da für die entsprechenden Umwandlungen die allezeit anwesenden Pflanzen Säuren offenbar nicht allezeit genügen; sonst wäre ja in sauren Pflanzentheilen Anwesenheit von Rohrzucker einfach unmöglich, was mit der Erfahrung im Streite ist. In einzelnen Fällen, wie im Malze, ist man sogar durch zwingende Gründe genöthigt, invertinartige Enzyme anzunehmen²⁾.

Das Vorkommen eines thierischen *Invertins*³⁾ muß in dem Sekret

¹⁾ Pflüger's Archiv, Bd. 14, S. 593.

²⁾ Brown u. Heron: Annal. d. Chem. u. Pharm., Bd. 199, S. 186.

³⁾ Vergl. auch Paschutin: Archiv für Anatom. Physiol. etc. von Reichert u. Du Bois-Reymond 1871, S. 305.

der Darmdrüsen von Hunden, Kaninchen, Vögeln und Fischen (Berthelot), also wahrscheinlich sehr allgemein angenommen werden.

Besprechen wir sodann die Gruppe der *peptonbildenden Fermente*. Wir haben dahin zu rechnen: das *Pepsin* (vermuthlich mehrere), das *Trypsin*¹⁾, *Pflanzenpepsin* und *Papain*. Daß unter diesen Enzymen das Trypsin außer peptonähnlichen Stoffen noch andere Produkte wie Leucin und Tyrosin erzeugt, thut dieser Eintheilungsweise keinen Eintrag.

Unter diesen Fermenten kommt, wie bekannt, das *Pepsin* beinahe ausschließlich in thierischen Drüsen und deren Sekreten vor. Das Gleiche gilt für das *Trypsin*.

Das *Pflanzenpepsin* ist nachgewiesen in einer Reihe von ruhenden Samen (Wicken, Hanffamen, Leinfamen). In anderen Samen fehlt dasselbe (Maisfamen, Lupinenfamen, dem Samen von Kürbis, Mandeln und von Pinien). In gekeimter Gerste ist dasselbe nachzuweisen, nicht aber in den Keimlingen von Bohnen. Blätter, soweit sie in dieser Richtung untersucht sind, erwiesen sich alle frei von peptonisirenden Fermenten (Eichen-, Birken-, Weißdornblätter). Auch das junge Holz der Roßkastanie, die Knollen der Zwiebel und Kartoffel, der Sklerotiumkörper des Mutterkorns geben die entscheidende Reaktion nicht²⁾.

Reich an pepsinartigen Stoffen erwiesen sich dagegen bekanntlich die drüsigten Organe und deren Sekrete von »fleischessenden« Pflanzen, *Drosera*, *Nepenthes*, *Darlingtonia* u. a. m.

Das *Papain*, das vielleicht auch als Pflanzentrypsin bezeichnet werden könnte, weil es wie dieses schon in neutraler Lösung seine Wirksamkeit äußert und bei dieser Wirksamkeit neben peptonartigen Stoffen auch krySTALLINISCHE Spaltungsprodukte (Leucin) erzeugt, ist gefunden in dem Milchsaft der Früchte und des Stammes von *Carica papaya*, ferner in dem Milchsaft des gewöhnlichen Feigenbaums³⁾.

Wir finden daher die peptonbildenden Enzyme viel sparsamer im Pflanzenreiche als die zuckerbildenden, entsprechend dem quantitativen Zurücktreten der Eiweißkörper gegenüber den Kohlehydraten in diesem Reiche. Jedoch ist bei den allerniedrigsten pflanzlichen Organismen ein trypsinähnliches Ferment jüngst durch Duclaux gefunden worden⁴⁾.

¹⁾ Vergl. W. Kühne: Verhandl. d. naturw. Vereins, Heidelberg, 6. März 1876.

²⁾ In Bezug auf die im Texte erwähnten Thatfachen vergl. C. Krauch a. a. O. und die Arbeiten von v. Gorup u. Will.

³⁾ A. Kurtz: Compt. rend., T. 90, p. 1379.

⁴⁾ Compt. rend. T. 91, p. 371, 733. Auch Wurtz: ebenda, T. 91, p. 787.

Auch die *albuminbildenden Enzyme* kommen im Thier- und im Pflanzenreiche vor. Ich rechne in diese Gruppe das *Labferment* und *analoge Fermente* aus dem Pflanzenreich. Der Chemismus ist in diesem Falle noch nicht völlig bloßgelegt. Aber so viel ist klar, daß Casein dabei verwandelt wird in einen Körper, der sich ganz wie coagulirtes Eiweiß verhält (Danilewsky u. Radenhausen). Die Bezeichnung als Albuminbildner, will man anders die Enzyme nach den Fermentationsprodukten klassifizieren, erscheint also einstweilen als die richtigste.

Auch das noch wenig bekannte Enzym, welches die Faserstoffgerinnung des Blutes bewirkt, würde in diese Gruppe zu rechnen sein. Wir übergehen aber daselbe in den meisten Fällen mit Stillschweigen, da in Bezug auf die Wirkung desselben noch wenig exakte Erfahrungen vorliegen¹⁾.

Das *Labferment* wird bekanntlich einzig und allein in den Magendrüsen von Thieren und den Sekreten dieser Drüsen gefunden.

Die Verbreitung analoger Enzyme im Pflanzenreiche ist sehr sparsam, entsprechend der geringeren Bedeutung der durch jene herbeizuführenden Reaktionen daselbst. Es bestehen zwar eine Menge von Angaben über dergleichen Vorkommnisse. Allein ich habe beim sorgfältigen Durchprüfen, weder in *Oxalis acetosella* und *stricta*, noch in *Cirsium arvense* und *Rumex patientia*, auch nicht im Samen von schwarzem Pfeffer ein wie das Lab wirkendes Ferment²⁾ auffinden können. Nur die halb entwickelten Blumenblätter der Artischocke gaben mir ein positives Resultat, und auch in diesem Falle wurde nur eine sehr kleine Menge von gleich Lab wirkendem Enzym gefunden. Bakterien scheiden auch zuweilen ein chymosinartiges Ferment ab. Darauf ist die mehrfach beobachtete Wirkung von altem Käse auf die Milchgerinnung zurückzuführen. Ich hatte die Mitwirkung von solchen Organismen in halb verdorbenen Labextrakten zu beobachten Gelegenheit; und eine noch exaktere Bestätigung hat diese Thatfache jüngst durch Duclaux gefunden³⁾.

Glycerinbildendes oder fettspaltendes *Ferment* ist bis jetzt nur im Sekret der Pankreasdrüse und einiger tiefer liegenden Darmdrüsen aufgefunden worden. Daselbe wirkt nicht allein auf Triglyceride, sondern

¹⁾ Vergl. übrigens Alex. Schmidt: Pflüger's Archiv, Bd. 13, S. 108.

²⁾ Da doch jedes Kind seinen Namen haben muß, so sehe ich nicht ein, warum ich nicht in der Folge dies Enzym nach dem Vorgange Deschamps' «*Chymosin*» nennen sollte.

³⁾ Compt. rend., T. 91, p. 731.

auch auf andere zusammengesetzte Aether des Glycerins, wie speziell für das Lecithin nachgewiesen. Theoretisch wahrscheinlich ist wohl auch angesichts der übrigen Analogien, daß derartige Fermente auch dem Pflanzenreiche nicht fremd sind. Doch hat man bisher nicht darnach gesucht und darf sich folglich auch nicht wundern, daß man noch nichts gefunden¹⁾.

Das ganze Bild, das man auf Grund dieser Zusammenstellungen über die Verbreitung der Enzyme erhält, läßt sich kurz in der folgenden Weise charakterisiren.

Alle Enzyme treten auf als unmittelbare Produkte des organischen Lebens. Kein einziges ist bis zur Stunde künstlich bereitet. Ihre Vertheilung ist größtentheils so, wie es dem Nutzen der Organismen entspricht. Ferner ist ihr Vorkommen im Thierreich, der größeren Differenzirung der zu ihm gehörigen Organismen entsprechend, mehr lokal, im Pflanzenreich örtlich durch den Organismus weiter verbreitet.

Als Ausnahme zu der so sich ergebenden Regel kann nicht gelten, daß Baranetzky einmal beobachtet hat, wie der Extrakt von Blättern von *Melianthus major*, ein andermal wie der von ruhenden Kartoffelknollen an Fermentkraft durch Stehen gewann, ein Vorgang, der von dem genannten Autor so gedeutet wird, daß hier das Ferment sich nachträglich und also ohne Mithülfe von Organismen entwickelt habe²⁾. Da die betreffenden Beobachtungen sich nicht nach einer bestimmten vorgeschriebenen Versuchsführung wiederholen lassen und daher, wenn sie richtig sind, auf einem glücklichen Zufall beruhen, so läßt sich erstens nicht ermeßen, welcher Werth denselben beizulegen ist. Ohne darum an der Thatfache selber den leisesten Zweifel aussprechen zu wollen, muß daran erinnert werden, daß man gut thut, in den experimentellen Wissenschaften nur solche Thatfachen zur Grundlage von Theorien zu machen, deren Bedingungen man kennt, und welche man daher, sobald man diese hergestellt hat, objektiv demonstrieren können muß.

Aber zum Andern selbst, wenn die Thatfache festgestellt wäre, so

¹⁾ Von der Pectase, dem hypothetischen Fermente Fremy's, das Pectin in die bekannte Gallerte umwandeln soll, schweige ich hier, weil der chemische Umsatz, den sie bewirken soll, selber noch im Dunkeln ist. Ebenso von der fünften Gruppe der Enzyme, den *Ammoniakkbildenden*, weil der einzige Repräsentant derselben das Harnstoffferment nach den Untersuchungen von Muskulus (Pflüger's Archiv, Bd. 12, S. 214) wohl mit einiger Wahrscheinlichkeit, aber noch nicht mit aller nöthigen Sicherheit zu den Enzymen gerechnet werden kann.

²⁾ Baranetzky: Die Stärkeumbildenden Fermente in den Pflanzen, 1878, S. 57.

würde sie sich höchst wahrscheinlich unter einen Gesichtspunkt bringen lassen, der meines Wissens zuerst von Heidenhain¹⁾ für das Trypsin gebraucht worden ist zur Erklärung der Thatfache, daß Pankreasinfuse in der Regel erst nach einiger Zeit fibrinverdauende Eigenschaften erlangen, ja mit Soda versetzt, selbst lange in ihrem unwirksamen Zustande conservirt werden können. Da durch künstliche Mittel, wie durch eine vorausgehende Behandlung mit Alkohol, oder durch schwaches Ansäuern eine sogleich verdauende Flüssigkeit erhalten werden kann²⁾, so macht man in diesem Falle mit zwingender Nothwendigkeit die Annahme eines *Zymogens*, welches durch Abspaltung — und diese eben muß der Alkohol (resp. die Säure) bewirken — Trypsin erzeuge. Andere Beobachter gehen noch weiter und lassen in allen thierischen drüsigen Organen nur Fermentogene entstehen, aus denen erst sekundär die Enzyme sich abspalten sollen. Ist man aber einmal gezwungen, das Bestehen von Fermentogenen zuzugestehen, so ist nicht abzusehen, warum dieselben nicht auch in Pflanzenaufgüssen ihr Wesen treiben können; ja für das Papaïn liegen ganz ähnliche Beobachtungen vor (Kurtz), und ich selber habe einmal die Erhöhung der Fermentkraft roher unmittelbar erst aus Hefe dargestellter Invertinlösungen durch stundenlanges Erhitzen auf 32° wahrgenommen. Da ferner die Fermentogene, sofern man zu der Annahme von solchen sich bequemen muß, ebenso wie die Enzyme selber, wo diese direkt auftreten, aus Organisirtem abstammen, so gelangen wir zu dem allgemeinen Resultate, daß *die Enzyme* (mehr oder weniger direkte) *Erzeugnisse von Organismen sind* und zwar in einem höheren Grade, als dies von irgend einem andern organischen Körper, auch wenn dessen Synthese noch nicht geglückt ist, gesagt werden kann. Bei allen anderen chemischen Körpern, können wir sagen, sind wir auf dem Weg zur synthetischen Darstellung. Dies gilt ebenso für die Eiweißstoffe, als für die Alkaloïde und organischen Farbstoffe und jede andere Körperklasse, die in dieser Hinsicht besondere Schwierigkeiten bereitet. Entscheidend ist dabei auch nicht, ob wir Zusammensetzung und Constitution zuvor einigermaßen kennen. Dies ist z. B. bei Eiweißstoffen und gar bei Humuskörpern noch gar nicht genügend der Fall, und doch nähern wir uns in unsern Synthesen sichtbarlich diesen Körperklassen. Bei den chemi-

¹⁾ Pflüger's Archiv, Bd. 10, S. 581.

²⁾ Vergl. W. Kühne: Verhandlungen des naturwissenschaftlichen Vereins zu Heidelberg, 1876, März. Durch viel Glycerin oder wenig Soda oder Kochsalz wird die Spaltung verhindert.

schen Fermenten ist dies nicht der Fall. Ich pointire diesen eigentlich sehr bekannten Satz hier, weil ich denselben später zu gebrauchen gedenke.

Vielleicht ist Jemand geneigt, diesen Satz als implicite mit der Definition eines Enzyms gegeben und darum als selbstverständlich, nicht als eine Errungenschaft der Erfahrung hinzustellen. Dem gegenüber wäre noch hervorzuheben, daß wir keine andersartigen chemischen Fermente kennen, als die hier erwähnten, die sich sammt und sonders aus Organismen herleiten. Wohl wirken noch andere leicht zu bereitende chemische Körper ähnlich wie die Fermente, d. h. so, daß sie sich scheinbar nicht definitiv an den sich abspielenden Reaktionen betheiligen, und mit verdünnten Säuren speziell können wir wirklich beinahe alle die Reaktionen, zu denen die Enzyme befähigt sind, im Groben wiederholen. Allein schon der Instinkt des Sprachgebrauchs hat hier richtig entschieden und nennt alle dergleichen Körper nur *«fermentartig wirkende»*, nicht eigentlich Fermente, und dies ohne Zweifel darum, weil alle diese Körper solche sind, die überhaupt mit starken chemischen Affinitäten begabt sind, so daß wir uns leicht chemische Reaktionen denken können — z. Th. können wir uns ganz detaillirte Vorstellungen davon machen — die durch sie eingeleitet werden, und als deren Endresultat sie doch wieder zurückgebildet werden. Wir brauchen uns dabei nur an die völlig aufgeklärte Wirkung der Schwefelsäure bei der Aetherbildung aus Alkohol zu halten. Wenn wir daher Enzyme definiren, als organische Stoffe von *im Allgemeinen sehr indifferenter Natur, die spezifische Umsetzungen bewirken, an denen sie sich endgültig nicht betheiligen*, so ist der im Vorigen erörterte Satz nicht schon im Voraus gegeben, sondern ein davon differentes Erfahrungsergebnis.

Natürlich können wir die Sache auch umdrehen und die Entstehungsweise in die Definition legen, dann ergibt sich die chemische Indifferenz im Allgemeinen als hinzukommender Erfahrungssatz. Worauf es logisch ankommt, ist ja nur die Zusammengehörigkeit der beiden Attribute, und das allein möchte ich erfuchen, im Auge zu behalten. Mögen diese und noch weitere Kennzeichen zu einem einzigen festen Begriffe verschmelzen, so ist dies nur ein sicheres Zeichen für das Fortschreiten unserer Erkenntniß.

Weit eher als eine Ausnahme zu der im Vorgehenden constatirten Regel würde gelten können: Die schon erwähnte von Seegen u. Kratfchmer beobachtete langsame glycogenverdauende Wirkung aller möglichen in Wasser löslichen Eiweißstoffe. • Doch handelt es sich, wie

die Beobachter ausdrücklich hervorheben, nur qualitativ um die gleiche Wirkung, quantitativ ist dieselbe gar nicht mit jener zu vergleichen; ja die Zuckerbildung ist in diesem Falle «verschwindend klein» im Vergleiche mit einem gewöhnlichen diastatischen Prozesse. — Indessen viel oder wenig, die Thatfache muß, wenn sie nicht gegen die von uns gegebene Regel verstoßen soll, ihre Erklärung finden. Diese aber wird zu suchen sein in der relativ großen Verbreitung von diastatischen Enzymen im Thier- und Pflanzenkörper, aus denen ja alle Eiweißstoffe dargestellt werden müssen. Noch nirgendwo ist die Thatfache aufgezeigt — und erst diese würde einen ernstlichen Einwurf darstellen — daß Eiweißlösungen stärkere enzymotische Reaktionen besitzen als die Flüssigkeiten, aus denen sie dargestellt worden sind.

Endlich müssen wir am Schlusse dieses Abschnittes noch einer Beobachtung Erwähnung thun, die von Brown u. Heron¹⁾ gemacht worden ist. Dieselbe ist wichtig genug, um der Ausgangspunkt neuer Untersuchungen über das Entstehen der Enzyme zu werden — falls sie sich wirklich bewahrheiten sollte. Die Beobachtung, die übrigens nicht im Widerspruch steht mit der hier gebrauchten Auffassung, will, daß das diastatische Vermögen des Extraktes ungekeimter Gerste sich bedeutend erhöhe durch Berührung mit lebenden Hefezellen, und wird gedeutet, daß das Wachsthum dieser Zellen gewisse Aenderungen in Albuminoiden der Gerste herbeizuführen vermag, wie sie sonst nur von den lebenden Zellen des keimenden Kornes bewerkstelligt werden — eine Auffassung, die offenbar einseitig ist, die wir aber nicht bekämpfen wollen, so lange die Thatfache selber noch nicht über allen Zweifel erhaben ist.

II. Die Isolirung der Enzyme und die chemische Zusammensetzung derselben.

Herrscht in Bezug auf das Vorkommen der Enzyme eine merkwürdige Uebereinstimmung, so kann man daselbe sagen in Bezug auf die zweckmäßigen Methoden ihrer Isolirung.

Namentlich ist bei allen diesen Methoden charakteristisch: *Das Anhaften an chemische Niederschläge aller Art, besonders an solche von fein vertheiltem amorphem Zustande*²⁾.

¹⁾ Annal. d. Chem. und Pharm., Bd. 199, S. 254.

²⁾ Hierauf ist auch zurückzuführen die Beobachtung, die schon von de Saussure

Für die *Diaftase* wird z. B. die folgende Methode angegeben: Der wässrige Extrakt eines Diaftase liefernden Pflanzentheils wird mit verdünnter Phosphorsäure versetzt, dann mit Kalkwasser neutralisirt.

Der niederfallende phosphorsaure Kalk reißt Eiweißstoffe und Diaftase mit sich nieder. Aber die letztere ist dem Niederschlage leichter zu entziehen durch schwach mit Phosphorsäure angeäuertes Wasser. Dann fällt man nochmals mit nicht zuviel Alkohol.

Das Kriterium der relativen Reinheit eines Präparats ist immer, daß gewisse Eiweißreaktionen, namentlich die mit Gerbsäure und Sublimat, auch die Xanthoproteinreaktion ausbleiben, und eine möglichst kleine Menge desselben eine möglichst energische Fermentreaktion ausübt.

Einen Niederschlag mit Bleiessig scheinen auch die reinsten Präparate zu geben, diese Reaktion also möglicherweise den Enzymen selbst eigenthümlich zu sein. Nach mehreren Angaben enthalten gereinigte Diaftase und andere Fermente keinen Schwefel mehr, einen Bestandtheil, der bekanntlich für die Eiweißstoffe charakteristisch ist.

Nach anderen Angaben wird Diaftase lediglich durch wiederholtes Fällen mit Alkohol und Wiederauflösen in Wasser reiner und reiner gewonnen, wobei indeffen die Beobachtung gemacht wird, daß zu häufiges Fällen ein unwirksames Präparat liefere, auch manchmal gar keinen Niederschlag mehr erzeuge. Auch fraktionirte Fällungen mit dem gleichen Reagens werden empfohlen.

Zum Extrahiren von Diaftase und anderer Fermente ist auch salicylsäurehaltiges Wasser benutzt (Erlenmeyer), wobei aber nur von der später noch zu erörternden Thatfache Nutzen gezogen ist, daß die genannte aromatische Säure den fäulnißbewirkenden Bakterien feindlich, den Enzymen selbst aber nicht schädlich ist.

Von Payen u. Perfoz ist zum Reinigen diaftatischer Lösungen auch das Erhitzen auf 70° empfohlen, wobei zuerst viele Eiweißstoffe coaguliren.

Aehnlich lauten die Vorschriften für das *Ptyalin*. Auch für dieses wird von Fällungen mittelst Phosphorsäure und Kalk und mittelst Alkohol Gebrauch gemacht. Doch sind in Bezug auf dieses zuckerbildende Enzym des Thierreichs die Erfahrungen noch sehr eingeschränkt.

gemacht ist, daß Getreidekleber, besonders das Mucin desselben diaftatische Eigenschaften besitze, ebenso die Wahrnehmung von Kurtz und Wurtz, daß das Papan bei der Verdauung von Fibrin sich auf dasselbe niederschlage, so daß dieses den Verdauungsprozeß scheinbar allein fortsetzen könne, u. a. m.

Sowohl für Gewinnung des Ptyalins, als auch des diaftatischen Pankreasfermentes ist auch die weiter unten beschriebene Wittich'sche Methode, Ausziehen mit Glycerin, Niederschlagen mit Alkohol, verwendet worden.

Für die Darstellung des *Myrosins* besteht eine Vorschrift von Buffy¹⁾, die ungefähr auf das Folgende hinausläuft: Ausziehen des weißen Senf-samens mit kaltem Wasser. Eindampfen des Extrakts bei 40°, dann Fällern durch Weingeist. So wird ein noch unreines, aber doch wirksames Präparat erhalten, das in Wasser aufgelöst bei 60° coagulirt.

Emulfin wird aus den süßen Mandeln ebenfalls durch Wasser ausgezogen²⁾, der Extrakt auf verschiedene Weise, namentlich vom Fette gereinigt, dann wieder mit Alkohol niedergeschlagen, wobei es indeffen noch 22% Aschenbestandtheile, hauptsächlich Calciumphosphat, mit sich niederreißt.

Ueber das *Invertin* stehen mir anlässlich der Darstellung eines wirksamen Präparats einige eigene Erfahrungen zu Gebote, die wohl nur auf eine einzige Frage sich erstrecken, dafür aber quantitativ durchgeführt sind, während man bei den meisten hier zu erwähnenden Vorschriften nur sagen kann, sie sind an sich zweckdienlich, aber fast nirgends die Dienlichkeit jeder einzelnen vorgeschlagenen Manipulation einer anderen möglichen gegenüber irgendwie ziffernmäßig erwiesen — ein Vorwurf, von dem sich überhaupt der größere Theil unserer präparativen und selbst der analytischen Methoden erst sehr allmählich befreit³⁾.

¹⁾ Journ. Pharm. (2) 26, S. 39.

²⁾ Vergl. Robiquet: Journ. Pharm. (2) 24, S. 326.

³⁾ Anlässlich der im Folgenden mitzutheilenden Versuche bemerke ich, daß ich das experimentelle Material schon z. Th. anderweitig benutzt habe, und um keine Verwirrung in die Bezifferung der zahlreichen Versuchsreihen zu bringen, die alte Numerirung beibehalten werde.

Ich habe meine Invertin-Versuche bis jetzt publizirt:

Versuchsreihe 1—9	in Zeitschrift für Spiritusindustrie,	1881, Nr. 16,
» 10—20	» » »	» 20,
» 21—30	» » »	1882, » 2.

Hieran schließen an noch nicht veröffentlichte Versuchsreihen 31 und folgende. Alle diese Versuchsreihen werden die alten Nummern behalten.

Ich habe ferner über Lab veröffentlicht:

Versuchsreihe 1—30 in Milchzeitung, 1881, Januar.

Weitere Versuche L 31 und folgende in Landw. Versuchsst., 1881, B. 27, S. 247.

Ich werde diese Reihen citiren mit L 1—L 40.

Ferner habe ich einige Pepsinversuche veröffentlicht:

Versuchsreihe 1—9 in Zeitschr. f. Biologie, 1881, S. 351. Ich werde diese Reihen

Bei der Darftellung des Invertins und anderer Fermentftoffe benutzt man, wie wir gefehen haben, mit Vorthail Alkohol als Fällungsmittel. Da nun der Alkohol fchon bei verhältnißmäßig geringer Beimengung und bei niederer Temperatur die Fermentkraft des Invertins fchädigt, fo ift es nicht unwahrſcheinlich, daß auch bei jeder Fällung mit Alkohol eine gleiche Einbuße zu conftatiren ift. Ja gewiffe Andeutungen in der Literatur über die Unzweckmäßigkeit einer zu häufig wiederholten Fällung mit Alkohol deuten darauf hin, daß dahingehende Beobachtungen fchon wirklich gemacht worden find. Zur näheren Präzifirung derartiger Einflüffe für einen beftimmten Fall dient

Verfuhsreihe 10.

Wäſſrige Invertinlöfung wurde in 3 Theile getheilt, ein Theil fiefelber überlaſſen, ein Theil mit fo viel 95procentigem Alkohol gefällt, bis keine weitere Trübung mehr eintrat, abfiltrirt, das niedergeſchlagene Ferment wieder in Waſſer aufgelöst und auf das urſprüngliche Volumen gebracht, ein Theil endlich zweimal hintereinander der gleichen Operation unterworfen. Mit allen drei Löfungen wurden vergleichende Invertirungsverfuhe unternommen.

Reſultate der 10. Verfuhsreihe:

	Polarifation im kurzen Rohre nach 140 Min. bei 32°.	Procentifch Zucker invertirt.
Urſprüngliche Invertinlöfung	— 3.7	93
Einmal mit Alkohol gefällt	— 1.2	82
Zweimal » » »	+14.4	13.

Namentlich das wiederholte Fälln mit Alkohol hat fiefich mithin als fehr ſchädlich erwiefen, wobei zu bemerken ift, daß, um bei Portion 3 das zweite Mal die völlige Fällung mit Sicherheit zu erreichen, ein fehr großes Uebermaß an Alkohol nöthig gewefen ift¹⁾.

Die filtrirten alkoholifchen Löfungen erwiefen fiefich nach dem vorſichtigen Eindampfen bei 25° auf dem Waſſerbade und nachher im Exſiccator über Schwefelfäure als völlig frei von wirksamem Ferment.

jetzt anführen als P 1 — P 9. So wird keine Verwechſelung bei der Berufung auf diefe oder jene Reihe möglich fein.

¹⁾ Eine weitere Verfuhsreihe in der gleichen Weiſe ausgeführt findet fiefich a. a. O. beſchrieben. Bei derſelben wurde die Invertinlöfung mit der zehnfachen Menge 92procentigen Alkohols gefällt, nach dem Wiederlöfen in Waſſer erwies fiefiefich als ungefähr halb fo ſtark, als die urſprüngliche Löfung.

Die angemessene Deutung ist einstweilen diese, daß besonders hochprocentiger Alkohol das Ferment langsam zerstört, und daß bei jeder folgenden Fällung immer mehr hochprocentiger Alkohol verwendet werden muß, weil das Invertin, an sich in Alkohol nicht ganz unlöslich, nur von anderen Stoffen mit zu Boden gerissen wird, die ebenfalls nicht ganz unlöslich nur so lange durch Alkohol gefällt werden, als ein Uebermaß von ihnen vorhanden ist. Künstlicher erscheint die Annahme der successiven Veränderung dieser (eiweißartigen?) Körper in mehr und mehr Alkohol-lösliche Modificationen.

Wenn aber Alkohol einen so schädlichen Einfluß auf das Invertin-ferment auszuüben vermag, dann ist auch die vorausgehende Behandlung der Hefe mit Alkohol, wie sie der Vorschrift nach erfolgen soll, und welche zum Zweck hat, die Hefe zu tödten und so die nachherige Diffusion des Invertins zu erleichtern¹⁾, ferner dieselbe von einigen in Alkohol löslichen Extraktivstoffen zu befreien, eine kritische Operation, und es wird zu erörtern sein, wie groß hierbei der Alkoholgehalt zu bemessen ist, um nicht die Grenze des Zweckmäßigen zu überschreiten.

Bei Versuchen in dieser Richtung wurde Ausgang genommen von je 100 cem einer frischen breiigen Bieroberhefe (von holländischem «Gerstebier»), welche das eine Mal mit dem gleichen Volumen eines 92.7 (Volum-) procentigen Alkohols, das andere Mal mit dem fünffachen Volumen desselben 45 Stunden lang stehen gelassen wurde. Dann wurde abfiltrirt und mit Alkohol von der gleichen Concentration des ablaufenden (nach einer Berechnung, in welcher der ungefähr zu schätzende Wassergehalt der Hefe berücksichtigt war) gewaschen.

Beide Portionen Hefe wurden an der Luft abtrocknen gelassen, dann in gleicher Weise mit Sand zerrieben, wobei die zweite Portion Hefe sich natürlich als trockner erwies. Dann wurden beide Portionen mit 100 cem Wasser bei 25—32° C. ausgelaugt und die Fermentkraft dieser Lösungen bestimmt, wobei sich ergab, daß dieselbe in beiden Fällen sich verhielt wie 4 : 3²⁾.

Die beiden Fermentlösungen wurden weiter zu Versuchen benutzt und zunächst mit dem gleichen Volumen Alkohol vermischt, wobei ge-

¹⁾ Auch lebende Hefe gibt allerdings fortwährend und so lange sie lebt Invertin an die umgebende Flüssigkeit ab, aber zu wenig, um darauf eine Methode der Gewinnung des Enzyms zu begründen.

²⁾ Die Polarisationsresultate dieser Versuchsreihe (10a) finden sich in den folgenden kleinen Tabellen:

rade die Lösung mit geringerem Fermentvermögen einen etwa fünffach stärkeren Niederschlag ergab.

Hieraus folgt, daß man dadurch, daß man die Hefe vor der Extraktion einer Berührung mit zu viel starkem Alkohol aussetzt, wohl viel mehr, aber ein an Ferment ungleich ärmeres Extrakt erhält, was sich auch sofort dem Auge durch die ungleich braunere Färbung des so gewonnenen wässrigen Extraktes kundgibt.

Dieses Resultat erklärt sich ohne Zwang aus der schon bekannten Thatfache, daß starker Alkohol einerseits auf das Invertin schädigend einwirkt, daß aber zugleich unter diesen Umständen Hefezellhaut und Protoplasma eine (wohl mit dem Tode zusammenfallende) Vermehrung seiner osmotischen Durchlässigkeit erleidet, so daß die Hefeinhaltsstoffe nun leicht in Masse an Wasser abgegeben werden können.

Der gleiche Gedanke wurde nun noch weiter experimentell verfolgt, insofern auch der Einfluß von mehr oder weniger Alkohol bei der Fällung des Invertins in seinem Einflusse auf die Invertirung untersucht wurde.

Es wurde wieder die gleiche Hefe (Bieroberhefe), die zu den vorigen Versuchen diente, mit dem gleichen Volum 92procentigen Alkohols versetzt, einige Tage stehen gelassen, dann abfiltrirt, mit Sand zerrieben, mit Wasser ausgelaugt und nun die bräunlich gefärbte Invertinlösung *a* als solche verwendet, *b* mit der zehnfachen Menge Alkohol gefällt.

Der so entstehende Niederschlag wurde über Schwefelsäure getrocknet und dann mit Wasser auf das ursprüngliche Volum gebracht.

10procentige Zuckerlösung wurde mit einem Zehntel dieser Lösung versetzt und genau zwei Stunden auf den Temperaturen 26, 31, 36, 41° erhalten, dann rasch abgekühlt und die Invertirung durch Polarisation festgestellt.

1. Hefe, zuvor mit dem gleichen Volumen Alkohol behandelt:

Temperatur der Invertirung.	Polarisation im kurzen	Procentisch intervertirt	
Grad.	Rohr.	überhaupt.	pro Stunde.
26	+ 1.5	70	35
31	— 1.1	81	41
36	— 2.6	88	44.

2. Hefe, zuvor mit dem fünffachen Volumen Alkohol behandelt:

26	+ 6.7	81	26
31	+ 4.2	59	30
36	+ 1.9	68	34.

Die Resultate dieser *Versuchsreihe* (10b) sind gewesen:

a) Invertin nicht niedergeschlagen.

Temperatur der Intervertirung	Polarisation im kurzen	Procentisch intervertirt	
Grad.	Rohre.	insgesamt.	pro Stunde.
26	+ 7.2	45.0	22.5
31	+ 4.6	56.3	28.1
36	+ 2.4	66.2	33.1
41	+ 0.1	78.0	39.0.

b) Invertin, mit der zehnfachen Menge Alkohol niedergeschlagen.

26	+ 11.1	27.5	13.7
31	+ 9.3	36.0	18.0
36	+ 8.7	38.3	19.1
41	+ 7.6	43.3	21.6.

Man sieht auch hier wieder, daß die Behandlung mit viel Alkohol die Fermentkraft des Invertinpräparats geschädigt hat.

Für die Darstellungsweise des Invertins ergibt sich aus dem Allen, daß es, um ein kräftiges Präparat zu erhalten, besser ist, auch zur anfänglichen Behandlung der Hefe nicht zu große Mengen von Alkohol zu gebrauchen, und auch bei der Ausfällung mit diesem Reagens sparsam zu sein. Die scheinbare Mehrausbeute, die man im anderen Fall erhält, ist in Wahrheit eine Minderausbeute, indem das Präparat in einem weit höheren Grade verunreinigt erhalten wird.

Im Uebrigen macht noch Schützenberger die Angabe, daß auch das Invertin, ähnlich wie die anderen Enzyme durch Fällung mit Phosphorsäure und dann mit Kalkwasser verhältnißmäßig rein erhalten werden kann.

Bei all' den mitgetheilten Methoden der Darstellung der Enzyme thut man weiter gut, das Organ, aus welchem sie gewonnen werden, zuvor so viel als möglich zu zerkleinern und abzutödten, da die Fermentkörper wohl ein gewisses Diffusionsvermögen selbst durch lebende Membranen hindurch besitzen, allein doch nicht genügend, um rasch und viel von ihnen zu gewinnen. Als Beleg für die erstere Behauptung mag unter Anderem gelten, daß das Invertin gefunden wird in den Waschwässern von Hefe im Zustande der Inanition (Béchamp). Dagegen wird die Ausbeute durch Abtödten derselben mit starkem Alkohol oder besser Aether sehr vergrößert.

Nicht bloß in Bezug auf die zweckmäßige Isolirungsweise der zucker-

bildenden Enzyme herrscht eine unverkennbare Uebereinstimmung. Diefelbe dehnt sich auch noch auf weitere Gruppen der Enzyme aus.

In Bezug auf das Pepsin des Magenfafts liegen sehr viele Erfahrungen vor. Unreine Präparate werden erhalten durch Fällen mit essigsaurem Blei oder Sublimat, Zersetzen des Niederschlags mit Schwefelwasserstoff, dann das in Lösung übergegangene Enzym Fällen mit Alkohol. Ein relativ sehr reines Präparat erhält man nach der Brücke'schen Methode: Anfäuern eines durch Selbstverdauung von Magenschleimhaut erhaltenen künstlichen Magenfafts mit Phosphorsäure, nahezu Neutralisiren mit Kalkwasser, worauf mit dem phosphorsauren Kalk wieder das Enzym niedergeschlagen wird. Dann wird durch Anfäuern mit Phosphorsäure das Ferment wieder in Lösung gebracht. Eine wiederholte Reinigung wird erzielt, indem man eine alkoholisch-ätherische Auflösung von Cholesterin der Enzymlösung zusetzt. Das Cholesterin scheidet sich hierbei in der Form eines feinen Schaumes an der Oberfläche der Flüssigkeit ab. Auch diese Abcheidung fixirt das Pepsin an seiner Oberfläche; es kann mit demselben abfiltrirt und gewaschen werden. Wenn man später das feuchte Cholesterin mit Aether erschöpft, bleibt schließlich eine sehr concentrirte wässrige Lösung von Pepsin zurück. Dasselbe wird durch Bleiessig und Platinchlorid gefällt, nicht durch Gerbsäure und Sublimat und gibt nur noch eine ganz schwache Xanthoproteinreaktion.

Andere Methoden beruhen darauf, daß man die Schleimhaut des Magens mit Glycerin (durch tagelange Digestion) extrahirt und das Filtrat in starken Alkohol tropfen läßt, wobei ein Niederschlag entsteht, der zwar kein reines, aber doch ein brauchbares Pepsinpräparat ist¹⁾.

Bei der Darstellung des *Trypsins* müssen wir berücksichtigen, daß die Behandlungsweise theilweise Bezug hat auf die Verhinderung einer ungewöhnlich raschen Fäulniß der Pankreasdrüse und ihrer Sekrete. Sehen wir davon ab, so beschränken sich die älteren Methoden auf Ausziehen mit Wasser oder Glycerin, Fällen mit Alkohol und Wiederholen dieser Manipulationen. Die neuere Kühne'sche Methode aber läuft darauf hinaus, daß man wiederholt mit Alkohol fällt, dann aber der wässrigen Lösung durch wenig Essigsäure einen Eiweißkörper entzieht, der zunächst das Enzym mit niederreißt, durch Waschen aber von demselben befreit werden kann.

Die trypsinhaltigen Waschwässer werden wieder mit Alkohol nieder-

¹⁾ Vergl. die Methode von Wittich: Pflüger's Archiv, 1869, p. 193.

geschlagen, und nun folgt noch eine umständliche weitere Reinigung von Eiweißstoffen, Erdsalzen, Peptonen, Tyrosin und Leucin. Immer wird aber zwischenein wieder die Alkoholfällung angewendet. Endlich macht man auch von der Dialyse Gebrauch, für welche das Trypsin also keine Neigung hat. Diese letztere Beobachtung wiederholt sich auch bei anderen Fermenten.

Das *Papain*, das Trypsin des Pflanzenreichs, wurde bisher durch Niederschlagen der betreffenden wässrigen Auszüge mittelst Alkohol gewonnen. Man kann es ferner reinigen durch Diffusion, für die es schwer zugänglich ist. Es kann weiter gereinigt werden durch Niederschlagen mit Bleiessig und Zersetzung des Niederschlags mit Schwefelwasserstoff. Uebrigens zeigen die so gewonnenen Präparate noch die charakteristischen Eiweißreaktionen.

Ueber das *Chymosin* liegen noch wenig Methoden der Reindarstellung vor, da man meistens in der Richtung arbeitete, wirksame und haltbare Extrakte für die Praxis der Süßkäsebereitung zu erhalten. Doch spielt in vielen Fällen das Ausziehen mit glycerinhaltigem Wasser eine Rolle, welchem größere Mengen von Kochsalz und kleinere von Bor säure der Haltbarkeit wegen zugesetzt sind.

Aus einigen wenigen Versuchen über das Verhalten des Labenzym gegen verschiedene Reagentien¹⁾ ergibt sich noch, daß der auf den successiven Zusatz von Natronphosphat und Chlorkalcium entstehende Niederschlag daselbe völlig einschließt. Durch Wasser kann er demselben theilweise wieder entzogen werden. Auch Zinnchlorür erzeugt einen Niederschlag in dem Hansen'schen Labextrakt und durch jenen wird gleichfalls das Chymosin eingeschlossen.

Eine besondere Erwähnung verdient endlich das eigenthümliche Verhalten von Enzymlösungen gegen Thierkohle, eine Substanz, die bekanntlich eine stark absorbirende Wirkung besitzt für Stoffe von hohem Molekulargewichte. Ein Fabrikant von Labextrakt erzählte mir, daß er, um farblose Extrakte zu erhalten, dieses Mittel angewendet habe²⁾, erhielt aber zu seiner Verwunderung Flüssigkeiten, die alles Fermentvermögen verloren hatten. Dieselbe Erscheinung wurde auch beim Pepsin beobachtet, so daß es sich auch hierbei um eine allgemeinere Eigenschaft zu handeln scheint. Eine entgegenstehende Angabe wird

¹⁾ Meine Abhandl. in Landw. Versuchsst., B. 27, 1882, S. 250.

²⁾ Derselbe war früher Zuckerfabrikant und betrachtete die Knochenkohle als Universalreinigungsmittel.

allerdings von Payen u. Perfoz hinsichtlich der Diaftase gemacht; doch scheint diese Behauptung nicht auf einer quantitativ vergleichenden Prüfung der Fermentkraft zu beruhen, denn gerade dieses Enzym bleibt erfahrungsgemäß (zusammen mit Eiweißstoffen) zurück beim Filtriren des Malzextrakts durch Thonzellen.

Die gefundene Elementarzusammensetzung der Enzyme, soweit mir Resultate der Art zugänglich waren, wird am besten in einer tabellari-
schen Uebersicht mitgetheilt werden.

	Kohlen- stoff. %	Wasser- stoff. %	Stick- stoff. %	Schwefel. %	Afche. %	Analytiker.
Diaftase ¹⁾ . . .	45.7	6.9	4.6	—	6.1	Krauch.
Diaftase ²⁾ . . .	55.9	8.2	6.1	—	4.5	
Diaftase	—	—	7—8	—	—	Dubrunfaut.
Pankreasdiaftase .	43.6	6.7	14.0	0.9	7.0	Hüfner.
Invertin	—	—	4.3	—	—	Adolf Mayer.
Invertin ³⁾ . . .	40.5	6.9	9.5	—	—	Donath.
Invertin	43.9	8.4	6.0	0.6	—	Barth.
Emulfin	48.8	7.1	14.2	1.3	—	Aug. Schmitt.
Emulfin	43.5	7.0	11.6	1.3	—	Bull.
Papaïn	52.2	7.1	16.4	—	—	Wurtz.

Man sieht, eine vollständigere Sammlung von Analysen ist nicht nöthig, um die Thatfache zu erhärten, daß wir noch sehr weit davon entfernt sind, in dem, was wir ein isolirtes Enzym nennen, einen chemisch einigermaßen reinen Körper vor uns zu haben.

Zwar ist der schwankende Stickstoffgehalt in einigen Fällen zu erklären. Ist viel Stickstoff vorhanden, so sind Eiweißstoffe mit niederge-
schlagen; ist der Gehalt daran besonders gering, so ist zuweilen die Beimengung von dextrinartigen Kohlehydraten daran schuld. Aber auch die nach Kräften gereinigten Präparate zeigen keine befriedigende Con-
stanz der Zusammensetzung.

Man kann sich dieser Erfahrung gegenüber auf den optimistischen
Standpunkt stellen und sagen, was noch nicht gelungen ist, wird ge-
lingen. Man wird aber auch fragen können: *Sind die Fermentkörper*

¹⁾ Nach der Methode von Duquesnel gewonnen.

²⁾ Nach der Methode von Wittich.

³⁾ Nach der Methode von Donath durch Ausschütteln mit Aether gewonnen.

überhaupt chemische Individuen? Ist es erlaubt, den Begriff einer chemisch reinen Substanz auf sie anzuwenden?

Wenn wir die Resultate der in diesem II. Abschnitte gesammelten Thatfachen zusammenzustellen suchen, so können wir kurz aussprechen, *daß die Enzyme bis jetzt noch nicht den Charakter einer festen chemischen Zusammensetzung haben erkennen lassen, und daß sie hinsichtlich ihrer Fällbarkeit und Löslichkeit sich mit Stoffen von großem Molekulargewichte vergleichen lassen.*

Daß die Eiweißstoffe als solche oder nahe Abkömmlinge derselben die Träger der enzymatischen Eigenschaften sein möchten, dies wird uns zwar durch manche Beobachtungen¹⁾ nahegelegt und deshalb vielfach angenommen. Ein Beweis dafür ist aber keineswegs erbracht. Ja der häufig kleine Stickstoffgehalt besonders stark concentrirter Enzyme macht es nicht gerade wahrscheinlich.

III. Ueber den Einfluß höherer Temperaturen auf die Enzyme. Einwirkung des Lichts.

Die Enzyme haben alleammt — und in Bezug hierauf können die Beobachtungen als sehr vollständig gelten — die Eigenschaft, die sich bei keiner anderen Körperklasse so stereotyp zurückfindet, durch Erhitzen ihrer Lösungen auf eine unter dem Kochpunkt des Wassers gelegene höhere Temperatur ihre charakteristische Reaktionsfähigkeit einzubüßen, ohne dabei an ihrem übrigen chemischen Verhalten eine merkbare oder wenigstens irgendwie in die Augen fallende Aenderung zu erleiden.

Dieser allgemeine Satz findet seine Belege in den folgenden Einzelerfahrungen:

Die *Diaftase* erleidet in wässriger Lösung bei 65° C. eine Schwächung ihrer zuckerbildenden Eigenschaften (Kjeldahl). Etwas über 75° C. wird sie durch kurzes Erhitzen definitiv getödtet. Niedere Temperaturen, das Gefrierenlassen diaftatischer Lösungen, sind natürlich unschädlich.

¹⁾ Hierhin gehören auch die Wahrnehmungen von Brown u. Heron, wonach Malzextrakt ziemlich genau in dem Maße die diaftatische Wirkung einbüßt, als durch höheres oder minder hohes Erhitzen Eiweißstoffe daraus abgeschieden werden — natürlich, da die niederfallenden Stoffe eben erfahrungsgemäß die Enzyme mit sich reißen.

Ptyalin wird schon bei 67° zerstört, wenn die Erwärmung 20 Minuten lang fortgesetzt wird (Pascutin)¹⁾.

Für das *Emulin* existirt nur die noch allgemeinere Angabe, daß das Fermentvermögen erlischt zwischen 60 und 90° .

Bei noch anderen Fermenten hat man sich damit begnügt, die Vernichtung durch die Kochhitze festzustellen.

Für das *Invertin* liegen aus meinen eigenen Untersuchungen genauere Angaben vor.

Die Versuche über die vorliegende Frage, von denen ich hier zu berichten habe, sind mit einer besonders erwähnten Ausnahme alle so angestellt, daß die zuvor mit Alkohol extrahirte Hefe erst mit Sand zerrieben und dann mit Wasser ausgelaugt wurde. Aus dem wässrigen Extrakt wurde dann das Invertin durch starken Alkohol niedergeschlagen, über Schwefelsäure getrocknet und so aufbewahrt. Nur in wenigen besonders verzeichneten Fällen wurde die Donath'sche Methode (Ausfälln mit Aether), die mir übrigens, was die Ausbeute an Enzym anlangte, unzulängliche Resultate gab, verwendet. Das so dargestellte Invertin ist beinahe ganz in Wasser löslich und wurde diese Lösung der 10 procentigen Rohrzuckerlösung zugesetzt und deren Invertirung mit dem Polarisationsapparate (Soleil-Ventzke) verfolgt.

Die für alle die hier zu beschreibenden, z. Th. auch schon im Vorhergehenden beschriebenen Versuche dienende Lösung von reinem Rohrzucker des Handels polarisirte für sich $+ 38.1$ an dem benutzten Instrumente in der 20 cm langen Röhre bei der in allen diesen Versuchen ziemlich gleichmäßigen Zimmertemperatur. Wo eine etwas anderes polarisirende Zuckerlösung verwendet wurde, wird dies ausdrücklich erwähnt werden.

Nach dem Kochen mit $\frac{1}{10}$ Volumen verdünnter Schwefelsäure war die Polarisation im Mittel zweier Bestimmungen — 5.2 für die kurze Röhre. Das wäre auf die lange Röhre und auf die ursprüngliche Concentration umgerechnet — 11.5 . $+ 38.1 - (-11.5)$ oder 49.6 Theilstriche entsprachen also der vollständigen Invertirung und hiernach sind die gleich mitzutheilenden Zahlen für die Invertirung zu beurtheilen.

Versuchsreihe 2.

Die Invertinlösung, die in dieser und der folgenden Reihe nach der Donath'schen Methode bereitet worden war, wurde zu je 2 ccm in ver-

¹⁾ Reichert u. du Bois-Reymond: Archiv 1871, S. 350.

schiedene Reagiercylinderchen gebracht und diese in einem Wasserbade äußerst langsam fortschreitend auf immer höhere Temperatur erhitzt. Ein Gläschen wurde bei 45° herausgenommen; die folgenden bei 48, 51, 54, 57° und so immer um je 3° fortschreitend bis 72°.

Alle diese Flüssigkeiten wurden nun mit 20 ccm Rohrzuckerlösung vermengt und nach etwa 24 Stunden filtrirt und im kurzen Rohre auf ihre Polarisation geprüft.

Das Resultat war:

Invertinlösung erhitzt auf	Ablefung.	Procentisch intervertirt	
		überhaupt.	pro Stunde.
45°	13.9	15.0	0.6
48°	14.5	12.2	0.5
51°	17.3	0.2	0.01
54°	17.5	0	0.0
ebenfalls alle höher erhitzten		0	0.0.

Nach weiteren 52 Stunden wurden die Polarisationen der drei ersten Flüssigkeiten wiederholt — diesmal mit den folgenden Resultaten:

Invertinlösung erhitzt auf	Ablefung.	Procentisch intervertirt	
		überhaupt.	pro Stunde.
45°	5.5	52.0	0.7
48°	7.5	43.4	0.6
51°	16.5	3.4	0.04
54°	17.5	0	0.0.

Hieraus ist mit Deutlichkeit zu ersehen, daß das Invertin durch ein Erhitzen auf 45° in wässriger Lösung noch sehr wenig geschwächt wird, daß aber ein längeres Erhalten auf dieser und den höheren Temperaturen schon merkbar schädlich wirkt. Die wirkliche Tödtungstemperatur unter den eingehaltenen Versuchsbedingungen dürfte ziemlich genau bei 51° angenommen werden können — eine Temperatur, die nach den bisherigen Erfahrungen auffallend niedrig und keinesfalls höher liegt, als die Grenztemperatur des Mutterorganismus.

Versuchsreihe 3.

Indem daran gedacht werden konnte, daß diese niedrige Tödtungstemperatur in Zusammenhang stehen könnte mit der etwas sauren Reaktion der gebrauchten Invertinlösung, wurde dieselbe Lösung noch einmal zu einer Versuchsreihe gebraucht, nachdem dieselbe mit einigen Tropfen einer $\frac{1}{10}$ Normal-Kalilauge genau neutralisirt worden war. Je 2 ccm der so behandelten Fermentlösung werden wie in der vorigen Versuchs-

reihe auf die dort verwendeten Temperaturgrade langsam erhitzt und sodann nach der Zumischung zu der 10fachen Menge 10 procentiger Zuckerlösung nach 46 Stunden die folgenden Resultate am Polarisationsinstrumente erhalten:

Invertinlösung erhitzt auf	Ablefung kurzes Rohr.	Procentisch intervertirt überhaupt.	pro Stunde.
45°	12.9	19.4	0.4
48°	16.5	3.4	0.06
51°	17.0	Spuren	Spuren
54°	17.0	»	»
57°	17.0	»	»

Nach Verlauf von weiteren 24 Stunden wurde abermals geprüft und diesmal die folgenden Resultate erhalten:

Invertinlösung erhitzt auf	Ablefung.	Procentisch intervertirt überhaupt.	pro Stunde.
45°	10.1	32.2	0.46
48°	16.0	5.6	0.08
51°	16.8	2.2	0.03.

Die Resultate der beiden Polarisationsreihen sind also durchaus übereinstimmend mit einander.

Die Invertinlösung erscheint (z. Th. durch die Beimischung von etwas Alkalilösung) etwas geschwächt. Der nachtheilige Einfluß der Erwärmung macht sich geltend schon bei 48°, und durch die sehr langsame Erhitzung auf 51°, wobei die Lösung einige Minuten lang auf den benachbarten Temperaturen verweilt, ist beinahe alles Fermentvermögen vernichtet.

Die niedrig liegende Tödtungstemperatur des Invertins hat sich also unter verschiedenen Umständen bestätigt und tritt sowohl in neutraler als saurer verdünnter Lösung ungefähr bei 51° ein, während schon einige Grade darunter eine entschiedene Schwächung des Ferments sich zeigt.

Ganz anders verhält sich natürlich trockenes Invertin¹⁾, da bekanntlich auch in diesem Punkte chemische Fermente große Uebereinstimmung mit den Lebensbedingungen niedriger Organismen zeigen.

Wenn die im Vorgehenden dargestellten Versuche dazu gedient

¹⁾ Auf diese Unempfindlichkeit, die allen chemischen Fermenten zuzukommen scheint, hat Alexander Schmidt schon vor längerer Zeit hingewiesen. Siehe mein Lehrbuch der Gährungschemie: 3. Ausg., S. 16.

haben, die Tödtungstemperatur des Invertins zu ermitteln, so erübrigt mir nun noch in dem gleichen Abschnitte mitzutheilen, daß unter diesem Invertin nicht ein jeder Fermentstoff zu verstehen ist, der der Bierhefe entflammend, das Vermögen besitzt, Rohrzucker in Invertzucker umzuwandeln, sondern nur einer dieser Fermentstoffe, der auf die beschriebene Weise (Fällung mit Alkohol) dargestellt wurde. Ich habe nämlich nunmehr von einigen Beobachtungen zu berichten, welche dafür sprechen, daß in der Hefe noch andere zuckerintervertirende Fermente, für welche andere Tödtungstemperaturen charakteristisch sind, existiren.

Schon meine Beobachtung aus dem Jahre 1871¹⁾, die freilich nur qualitativ war (weil sie einem anderen Zwecke diente) wies hierauf im Zusammenhange mit den eben mitgetheilten Versuchsreihen hin — im Falle wenigstens, daß sie sich nicht als irrig erwies.

Damals war zu den betreffenden Versuchen kein mit Hülfe von Alkohol isolirtes Invertin, sondern ein ungereinigtes wässriges Hefextrakt benutzt, und als definitive Tödtungstemperatur war etwa 65° gefunden worden, indem Rohrzucker mit Hefextrakt vermischt, das bis zu 65° erhitzt worden war, nach einiger Zeit deutliche Gelbfärbung mit Natronlauge zeigte.

Bei unseren neuen Versuchen dagegen mit präparirtem Invertin erscheint bei schwacher Concentration der Fermentlösung 51° als die resp. endgültige Tödtungstemperatur. Um diese Verschiedenheit zu erörtern, wurde nun noch ein Versuch mit Hefe selber unternommen.

Versuchsreihe 9.

Dieselbe Sorte von Getreidehefe, aus welcher alle Invertinpräparate, die zu den vorausgehenden Versuchen benutzt worden, dargestellt waren, diente auch hier. Sie wurde mit Wasser zu einem gleichmäßigen Schlamme vertheilt und je 5 ccm von dieser milchigen Flüssigkeit langsam im Wasserbad, von Station zu Station in 9 Minuten fortschreitend, auf die Temperaturen 45, 48, 51, 54, 57, 60, 63, 66° erhitzt, während bei jeder dieser Temperaturen eine Portion von 5 ccm kalt gestellt wurde. Die aufgeschlämmte Hefe wurde dann mit 10 ccm Rohrzuckerlösung in Berührung gebracht und nach einiger Zeit filtrirt und die folgenden Polarisationsresultate beobachtet:

¹⁾ Landw. Versuchsst., Bd. 14, S. 72.

Hefe erhitzt auf	Polarifation im kurzen Rohr.	Zeit der Einwirkung.	Polarifation berechnet auf die gleiche Zeit ¹⁾ von $\frac{3}{4}$ Stunde.
45°	} gähren stark.		
48°			
51°	+ 3.2 gährt schwach.	1 h. 15 m.	+ 3.2
54°	+ 3.2 gährt nicht	1 » 45 »	+ 5.8
57°	+ 0.1 » »	1 » 55 »	+ 4.2
60°	+ 0.1 » »	2 » 05 »	+ 5.0
63°	+ 1.1 » »	2 » 20 »	+ 6.3
66°	+ 8.0 » »	2 » 25 »	+ 10.1.

Die Polarifation der ursprünglichen Zuckerlösung würde (bei der gleichen Verdünnung auf $\frac{2}{3}$) gewesen sein + 12.3.

Die Zahlen der letzten Colonne bilden mit Ausnahme der etwas abnormen Zahl 4.2 eine regelmäßige Reihe, deren Umrechnung auf procentische Invertirung nicht nöthig erscheint, um deutlich erkennen zu lassen, daß wohl eine starke Schwächung des Invertirungsvermögens der Hefe zwischen 51 und 54° gelegen sein mag, aber daß jedenfalls eine noch stärkere Schwächung zwischen 63 und 66° bemerkbar ist. Die erstere Beobachtung entspricht der Tödtungstemperatur des mittelst Alkohol isolirbaren Invertins, die andere bestätigt meine Wahrnehmung vom Jahre 1871 und ist kaum einer anderen Deutung fähig, als daß ein zweites Invertin von etwas größerer Widerstandskraft, aber durch Alkohol besonders leicht zerstörbar, existire; denn die andere Möglichkeit, daß nämlich dieses Ferment in Alkohol löslich sei, ist durch anderweitige Versuche als widerlegt anzusehen.

Auch in Bezug auf das bekannteste der peptonbildenden Enzyme, das Pepfin, habe ich in der gleichen Richtung Versuche angestellt.

Pepfinlösung wurde auf die folgende Weise bereitet. Die Schleimhaut vom Magen eines frisch geschlachteten Schweins wurde mit concentrirtem Glycerin übergossen und so einige Wochen lang bei gewöhnlicher Zimmertemperatur sich selber überlassen. Dann wurde filtrirt, das klare Filtrat, das mühsam durchs Filter ging, mit starkem Alkohol versetzt und die Ausscheidung abfiltrirt, mit Alkohol gewaschen und

¹⁾ Diese Umrechnung auf gleiche Zeiten ist zwar, wie wir später sehen werden, nicht ganz korrekt. Allein wollte man die nöthige Korrektur anbringen, so würde man nur etwas abgeschwächte Zahlen, die im Uebrigen die gleiche Regelmäßigkeit zeigen würden, erhalten.

über Schwefelsäure getrocknet. Dieses Präparat wurde auch zu allen noch weiter unten beschriebenen Pepsinversuchen benutzt.

Als Verdauungsobjekt dienten Eiweißstückchen, die, um möglichst vollständige Gleichmäßigkeit zu erzielen, auf die folgende Weise bereitet worden waren. Frisches Hühnereiweiß wurde zur Entfernung der Häute und bis zu einer gleichmäßigen Lösung gerührt. Dann wurde die Lösung in eine kapillare Glasröhre, die von innen gefettet worden war, gefüllt und durch Eintauchen in heißes Wasser die Eiweißlösung zum Coaguliren gebracht. Das erstarrte Eiweiß konnte dann aus der Röhre in der Form sehr dünner Cylinder gezogen werden, und diese Massen wurden über Schwefelsäure getrocknet, darnach ungefähr im Aussehen an käufliche Suppenudeln erinnernd. Wurden nun von diesen Eiweißfäden gleich lange Stücke abgeschnitten und zu den vergleichenden Verdauungsversuchen benutzt, so konnte man sicher sein, unter thunlichst gleichen Bedingungen zu arbeiten.

Versuchsreihe P 1.

Eine kleine Menge Pepsin wurde in Wasser, dem auf ein Liter 6 ccm reine rauchende Salzsäure zugesetzt worden war, aufgelöst. Die Auflösung des nach der beschriebenen Weise dargestellten Pepsins wird erst durch die Anwesenheit von Salzsäure ermöglicht. Dann wurde die erhaltene Pepsinlösung zu je 2,5 ccm auf eine größere Anzahl von Reagircylinderchen vertheilt und in jedes ein Stückchen Eiweiß, welches nach der Berechnung 8 mg wiegen mußte, eingelegt. Alle Reagircylinderchen wurden in ein Wasserbad, das langsam etwa in 3 Minuten um 1° C. erwärmt wurde, eingesenkt und bei den folgenden Temperaturen je eines der Gläser herausgenommen und abgekühlt: 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75°. Später wurden alle Gläser gleichmäßig auf 37° gebracht und die Zeit bis zur völligen Verdauung, endgültiges Schmelzen des immer dünner und durchsichtiger werdenden Fadens, beobachtet.

Am anderen Tage waren in den vier ersten Reagircylindern, in denen eine Erhitzung bis auf 55° stattgefunden hatte, die Eiweißstückchen verdaut. Nur in dem Glase, zuvor bis auf 50° erhitzt, war ein kleiner Rest unverdauten Eiweißes übrig geblieben. In allen Gläsern, die auf 60° und höher erhitzt waren, war die Verdauung höchst unvollständig geblieben.

Nach diesem Versuche zu urtheilen, würde die gesuchte Tödtungs-

temperatur zwischen 55 und 60° zu setzen fein. Die theilweise Verdauung selbst bei höheren Temperaturen ist dem langsamen Anwärmen bei der ersten Erwärmung zuzuschreiben.

Versuchsreihe P 2.

Wiederholung der Versuchsreihe P 1, nur daß, um die Wirkung der vorausgehenden Erhitzung schärfer zu machen, die Eiweißstückchen, diesmal im Gewicht von 9 mg, erst nach der Abkühlung beigelegt wurden.

Nach 17 Stunden waren diesmal die Eiweißstückchen in den ersten 4 Cylinderchen völlig verdaut. In den auf 60° und höher erhitzten war nur eine leichte Faserung wahrzunehmen und zeigten die Flüssigkeiten keine Peptonreaktion.

Das Pepsin verliert mithin unter den obwaltenden Umständen seine enzymatischen Eigenschaften zwischen 55 und 60° C.

Auch ein Enzym der dritten Kategorie, das Chymosin des Kälbermagens, wurde von mir in der gleichen Richtung nicht weniger sorgfältigen Untersuchungen unterworfen.

Mit Hansen'schem Labextrakt¹⁾ wurden nämlich die folgenden Versuche angestellt:

Versuchsreihe L 21,

wobei 5 Portionen von frischem Labextrakt in Reagirgläsern langsam im Wasserbade erwärmt wurden, und zwar war die Steigerung der Temperatur so geregelt, daß für die Erhöhung um 1° 4 bis 5 Minuten Zeit nöthig waren. Bei den Temperaturen von 48, 51, 54, 57, 60° wurde je ein Reagirglas herausgenommen. Bei dem Erwärmen zeigte sich etwas Trübung des klaren Extrakts, namentlich aber war dies der Fall zwischen 57 und 60°.

Am anderen Tage wurden mit diesen Labproben Gerinnungsversuche angestellt, zugleich ein vergleichender Versuch mit nicht erhitztem Labextrakt. Menge der Milch $\frac{1}{2}$ Liter, des Extrakts 0.2 ccm oder 0.4 ‰ Vol., Gerinnungstemperatur 37 bis 38° C.

Die Resultate dieser Versuchs-Anstellung sind gewesen:

¹⁾ Um über dieses Extrakt, das übrigens das gebräuchlichste des Handels ist, ein Urtheil zu geben, füge ich folgende Notizen aus meinem Laboratorium herrührend bei.

Reaktion: schwach sauer, vollkommen hell, gelblich gefärbt.

Spec. Gew. 1.152—1.156 bei 17°.

Gehalt an Trockensubstanz 21.1—21.6 ‰.

Asche, enthält reichlich Kochsalz und Borfäure.

Behandlung des Labs zuvor.	Gerinnungszeit.
Nicht erhitzt	37.5 Min.
Auf 48° erhitzt	37.0 »
» 51° »	43.5 »
» 54° »	42.0 »
» 57° »	41.0 »
» 60° »	40.5 »

Die langsame Erhitzung des Labextrakts selbst bis zu 60° hat also nicht geschadet, denn die wahrgenommenen Unterschiede sind zu klein im Verhältniß zur Genauigkeit der Methode. Die beginnende Trübung des Extrakts hat also nichts zu thun mit einer Schwächung seiner Fermenteigenschaften.

Versuchsreihe L 23.

Wiederholung der vorigen, nur daß diesmal höhere Erhitzungstemperaturen gewählt wurden, nämlich solche von 63, 66 und 69°. Gerinnungstemperatur 37.5°. Das Resultat dieser Reihe war nun:

Behandlung des Labs zuvor.	Gerinnungszeit.
Nicht erhitzt	23.5 Min.
Auf 63° erhitzt	22.5 »
» 66° »	81.0 »
» 69° »	105.0 »

Nach dieser Versuchsreihe beginnt die Abtödtung des Fermentvermögens schon unterhalb 66°. Der beste Ausdruck für das Resultat dieser Versuche wird sein, wenn wir die Tödtungstemperatur auf 66° setzen.

Bevor wir in diesem Abschnitte zu unserer ersten Verallgemeinerung schreiten, müssen wir noch kurz eine, wie ich glaube, scheinbare Ausnahme von der Regel besprechen. Nach zuverlässigen Wahrnehmungen zeigen auch gekochte thierische Gewebe eine ziemlich regelmäßige, obwohl schwache diastatische Wirkung, ebenso Lösungen von Präparaten von Eiweißkörpern, die ja in der Regel während der Präparation höheren Temperaturen ausgesetzt worden sind. Gingen diese Wahrnehmungen dahin, daß man wirkliche Enzymlösungen unter Umständen so hoch erhitzen könnte, mit dem Effekt, daß auch nur ein beliebig kleiner Bruchtheil der enzymotischen Wirkung restirte, so müßte die Verallgemeinerung, auf die wir hinzielen, unterbleiben, so aber werden wir gut thun, uns zu erinnern, daß die Enzyme sich gerne fixiren auf in der Flüssig-

keit in fester Form anwesenden Stoffen, zumal Eiweißstoffen, und daß niedergeschlagene Enzyme, die der schädlichen Einwirkung des Wassers bei höherer Temperatur entzogen sind, sich verhalten werden wie trockene Präparate, die, wie wir gleich lernen werden, sich ganz und gar unempfindlich gegen die fraglichen Temperaturen verhalten. Diese scheinbare Ausnahme gehört also voraussichtlich ganz in dieselbe Kategorie von Thatfachen, wie die, daß man hartschalige (unquellbare) Samen — am berühmtesten dafür sind australische *Medicago*-Arten — ohne Schaden für ihre Keimkraft stundenlang kochen kann, obschon bei der Kochtemperatur jedes organische Leben, das sich wirklich in Lebenserscheinung offenbart (nicht latent ist), unwiederbringlich erlischt.

Aus allen den im Vorhergehenden angeführten Details folgt also wieder *eine gemeinschaftliche, schon vorweg mitgetheilte Eigenschaft aller Enzyme*, nämlich die, *in wässriger Lösung unterhalb des Kochpunkts des Wassers eine völlige Zerstörung ihrer charakteristischen Eigenschaften zu erleiden*. Und zwar liegen die kritischen Temperaturen bei den verschiedenen Fermentkörpern nicht allzuweit auseinander. Am niedrigsten beim präparirten Invertin bei $\pm 52^{\circ}$, am höchsten bei der Diastase $\pm 74^{\circ}$, wenigstens soweit die bis jetzt mitgetheilten Angaben reichen. Alle anderen «Tödtungstemperaturen», dafern Angaben vorhanden, liegen zwischeninne.

Man könnte sich auf Grund der mitgetheilten Daten eine kleine übersichtliche Tabelle construiren, in welcher alle diese charakteristischen Temperaturen verzeichnet wären. Ich glaube indessen, einer solchen Tabelle keinen erheblichen Werth beimessen zu dürfen, da besondere und mannigfaltig variirte Versuche, die ich mit Invertin angestellt habe, zu zeigen geeignet erscheinen, daß die «Tödtungstemperaturen» keineswegs constante sind, sondern sich ziemlich leicht durch äußere Einflüsse abändern lassen.

Lassen wir zunächst von diesen äußeren Einflüssen die anwesende Feuchtigkeit variiren.

Versuchsreihe 4.

Je 0.1 g trockenes Invertin wurde auf die in der Tabelle angegebenen Temperaturen zwischen 40 und 100° im Wasserbade sehr langsam erhitzt, dann mit Wasser zu 10 ccm Flüssigkeit gelöst und diese Lösung mit 20 ccm der Rohrzuckerlösung zusammengebracht. Nach etwa 22 Stunden wurden die Polarisationen beobachtet:

Invertinpulver erhitzt auf	Ablefung kurzes Rohr.	Procentisch intervertirt überhaupt.	pro Stunde.
40°	— 3.6	95.6	4.5
50°	— 3.7	99.0	4.5
60°	— 4.0	100.0	4.5
70°	— 4.0	100.0	4.5
80°	— 4.0	100.0	4.5
90°	— 4.0	100.0	4.5
97°	— 4.0	100.0	4.5.

Die vorkommenden Verschiedenheiten sind so klein, daß sie unzweifelhaft als Versuchsfehler in Rechnung kommen müssen.

Als Resultat kann unzweifelhaft bezeichnet werden: die vollständige Unveränderlichkeit des trockenen Invertins bei Temperaturen bis zum Siedepunkt des Wassers.

Ausgehend von diesem Grenzpunkte erschien es ferner von Interesse zu prüfen, wie sich Invertin in einer wasserarmen Lösung verhalten würde, da offenbar die Zerstörung des Fermentkörpers in einer Einwirkung des Wassers auf die Molekeln desselben zurückzuführen ist. Nimmt man nun statt des Wassers ein anderes Lösungsmittel oder dieses mit Wasser vermischt, so kann hierdurch voraussichtlich die Einwirkung des Wassers eingeschränkt werden, zumal da ein anderes mit Wasser mischbares Lösungsmittel auch Anziehungen auf die Wassermolekeln ausüben wird.

Versuchsreihe 5.

0.1 g Invertin wurde mit 5 ccm Glycerin von 1,25 spec. Gew. versetzt und die Flüssigkeit dann mit Wasser auf 10 ccm gebracht.

Je 2 ccm dieser Flüssigkeit wurden in einzelne Reagircylinder gebracht und im Wasserbade sehr langsam erwärmt. Bei 46, 50, 55, 60, 65° wurde je ein Glas herausgenommen und der Inhalt davon mit der 10fachen Menge der 10procentigen Zuckerlösung versetzt. Die Polarisationsprüfung ergab nach 10^{1/2} stündiger Einwirkung bei gewöhnlicher Temperatur:

Invertinlösung zuvor erhitzt auf	Ablefung.	Procentisch intervertirt überhaupt.	pro Stunde.
46°	12.5	21.3	1.2
50°	11.6	25.3	1.4
55°	14.1	14.3	0.8
60°	17.0	1.4	0.08
65°	17.3	0.0	0.0.

Nach weiteren $4\frac{1}{2}$ Stunden hatte eine zweite Ablefung am Polarisationsinstrumente Platz mit den folgenden Resultaten:

Invertinlösung zuvor erhitzt auf	Ablefung.	Procentisch intervertirt überhaupt.	pro Stunde.
46°	11.3	26.7	1.1
50°	10.3	32.0	1.3
55°	13.6	16.5	0.7
60°	17.1	innerhalb der Versuchsfehler	
65°	—	—	—

Die zwei Reihen bestätigen einander und enthalten nur die eine scheinbare Anomalie, daß eine vorausgehende Erhitzung auf 50° wohlthätig gewirkt zu haben scheint. Da eine solche Einwirkung indessen ganz ohne Analogie dastehen würde, so ist diese übrigens ganz unbedeutende Abweichung in Uebereinstimmung mit späteren Vorkommnissen so zu erklären, daß das Invertin häufig nur eine unvollständige Lösung bildend, im Anfang mühsam gleichmäßig zu vertheilen ist.

Im Uebrigen lehrt der Versuch deutlich genug die erwartete Verschiebung der Tödtungstemperatur nach oben zu.

Im reinen Wasser ist die Tödtung unter übrigens ganz übereinstimmenden Umständen schon bei 51 bis 52° eine nahezu vollständige. Mit Glycerin ist selbst bei 55° erst eine Schwächung auf noch nicht die Hälfte der ursprünglichen Wirkung wahrzunehmen, und die Tödtung bei ungefähr 61° anzunehmen. Schätzungsweise kann man die Verschiebung der Tödtungstemperatur auf ungefähr 9° C. festsetzen.

Eine ähnliche, die Zerstörung des Invertins verzögernde Einwirkung, wie sie in dieser Versuchsreihe für die Beimischung von Glycerin nachgewiesen worden ist, ließ sich in geringerem Maße auch voraussehen, wenn lediglich concentrirtere Invertinlösungen verwendet wurden.

Die Versuchsreihen 2 und 3, mit denen wir die Versuchsreihe 5 bisher allein zu vergleichen Gelegenheit hatten, sind, wie angegeben, mit einer sehr fermentarmen Donath'schen Invertinlösung angestellt worden. So verdünnt waren diese Lösungen, daß pro Stunde bloß eine Invertirung von 1% des vorhandenen Zuckers in Maximo erreicht werden konnte, während wir soeben aus Versuchsreihe 4 ersehen haben, daß sich unter übrigens gleichen Verhältnissen und selbst bei niedriger Temperatur leicht 3 und 4% des vorhandenen Zuckers stündlich zerpalten lassen.

In concentrirteren Invertinlösungen, die sich also leicht herstellen

lassen, ist das Verhältniß zwischen Wasser und Ferment ein der Einwirkung des ersteren weniger günstiges, und darum ist unter diesen Umständen die gleiche Einwirkung (ähnlich wie bei Beimischung des Glycerins) nur in geringerem Maße zu erwarten. Aehnliche Beobachtungen sind bei anderen Enzymen schon durch v. Wittich gemacht worden.

Versuchsreihe 6

wurde also genau in den Verhältnissen angestellt wie Versuchsreihe 5; 0.1 g auf 10 cem Fermentlösung gebracht, nur zu dieser Lösung ausschließlich Wasser verwendet. Auch waren die Erhitzungsweise und die gewählten Erhitzungstemperaturen genau die nämlichen, wie in der 5. Reihe, so daß auch die Beweiskraft dieser erst durch die Vergleichung mit diesen neuen Versuchen in das rechte Licht tritt. Die Resultate nun dieser Versuchsreihe sind die folgenden gewesen:

Invertinlösung zuvor erhitzt auf	Ablefung am Polarisations- Apparate nach 19 Stunden.	Procentisch intervertirt überhaupt.	pro Stunde.
45°	1.5	70.2	3.7
50°	9.1	36.4	1.9
55°	16.1	5.4	0.3
60°	17.3	0.0	0.0
65°	17.3	0.0	0.0.

Nach vollen 24 Stunden wurde noch eine zweite Ablefung gemacht mit dem folgenden Resultate:

Invertinlösung zuvor erhitzt auf	Ablefung am Polarisations- Apparate nach 24 Stunden.	Procentisch intervertirt überhaupt.	pro Stunde.
45°	— 1.4	83.0	3.5
50°	6.7	47.1	2.0
55°	15.3	9.0	0.4
60°	17.3	0.0	—
65°	17.3	0.0	—.

Die Resultate der beiden Versuchsreihen zeigen völlige Uebereinstimmung miteinander und lehren, daß bei größerer Concentration der Invertinlösung die schädliche Wirkung des Wassers in der Wärme etwas herabgesetzt wird. Denn in verdünnter Lösung erschien 51° als Tödtungstemperatur, in der concentrirteren wird ungefähr 56° als solche zu bezeichnen sein. Dagegen muß auch nach dieser Versuchsreihe die positive conservirende Eigenschaft eines tüchtigen Procentsatzes Glycerin bestätigt werden. Denn bei Anwesenheit dieses wirkte eine Temperatur

von 50° noch nicht im geringsten schädigend ein, was diesmal doch entschieden beobachtet wurde.

In jedem Falle ist durch die mitgetheilten Versuche gezeigt, daß ganz abgesehen von der nicht zu umgehenden Annahme, daß es verschiedene Invertinforten gibt, die unter etwas von einander abweichenden Umständen wirksam sind, eine und dieselbe Sorte von Invertin und unzweifelhaft auch von anderen Fermenten, — ein ganz ähnliches Verhalten ist durch Pafchutin für mehr oder weniger verdünnte Ptyalinlösungen nachgewiesen worden¹⁾ — unter etwas variirten äußeren Umständen (Zusatz von mehr oder minder Wasser, Beimengung eines an sich unschädlichen Körpers) verschiedene Vernichtungstemperaturen besitzen.

Muß aber soviel zugegeben werden, dann hat auch eine genaue Feststellung der Tödtungstemperatur keinen Sinn mehr; denn diese selbst ist ja eine *variable*.

Selbstverständlich ist aus diesem Satze auch methodologisch Einiges zu lernen. Und endlich dürfen wir uns nicht wundern, wenn die in Rede stehenden Temperaturgrenzen von verschiedenen Forschern etwas verschieden angegeben werden.

Ähnlich wie eine Beimischung von Glycerin die Tödtungstemperatur des Invertinfermentes nach oben zu zu verschieben geeignet ist, so hat die Anwesenheit von *Alkohol*, dessen enzymfeindliche Natur wir ja schon im vorigen Abschnitte kennen gelernt haben, einen umgekehrten Einfluß. Ich will hierfür, obschon mir noch mehr Daten zur Verfügung stehen²⁾, um den Leser nicht zu sehr durch Zahlen zu ermüden, nur die folgenden beiden vergleichenden Reihen anführen.

Versuchsreihe 8.

10procentige Rohrzuckerlösung wurde mit $\frac{1}{10}$ Volum einer Invertinlösung versetzt, die $\pm 15\%$ Alkohol enthielt und langsam auf die in der Tabelle figurirenden Temperaturen erhitzt war.

Invertinlösung zuvor erhitzt auf	Ablefung nach 5 Stunden.	Procentisch intervertirt überhaupt.	pro Stunde.
35°	— 1.5	83.6	17.0
40°	+ 7.0	45.8	9.0
45°	+ 16.9	2.0	0.4
50°	+ 17.1	—	—
55°	+ 17.1	—	—

¹⁾ Vergl. Reichert u. Du Bois-Reymond, Archiv 1871, S. 353.

²⁾ Vergl. Versuchsreihe 7, Zeitschr. f. Spiritusfabr., 1881, Nr. 16.

Also schon bei 45° beinahe absolute Tödtung, während schon unter 40° eine starke Schwächung beginnt.

Die genau vergleichende

Versuchsreihe 8a

ohne Alkohol gab dagegen die folgenden Resultate:

Invertinlösung zuvor erhitzt auf	Ablefung nach 5 Stunden.	Procentisch intervertirt überhaupt.	pro Stunde.
35°	— 4.1	95	19.0
40°	— 4.0	94.6	19.0
45°	— 3.1	90.6	18.0
50°	+ 1.6	69.0	14.0
55°	+ 16.3	4.6	1.0.

Hier also wie in der Versuchsreihe 6, worin das Invertin in ähnlicher Concentration verwendet war, die Tödtungstemperatur bei 55°, so daß sie der Alkohol um 10° herabgesetzt hat.

Außerdem hat in diesen vergleichenden Versuchen der Alkohol der Intensität des Intervertirungsprozesses als solcher geschadet, was indeffen bei anderen Concentrationen, wie wir später erkennen werden, nicht immer der Fall zu sein braucht.

Mit alledem ist jedoch nicht der Einfluß höherer Temperaturen auf die Enzyme erschöpft, nicht einmal der auf die wässrigen Lösungen.

Die im Vorigen besprochenen Grenztemperaturen sind solche Wärme- grade, bei welchen die Einwirkung durch wenige Minuten genügt, um die Fermentwirkung völlig verschwinden zu machen. Damit ist natürlich nicht ausgeschlossen, daß schon niedrigere Temperaturen bei verhältnißmäßig längerer Einwirkung schädigend wirken können.

Ich habe eine größere Reihe von Fermentstoffen speziell in dieser Richtung untersucht, und namentlich die stundenlange Einwirkung von Temperaturen, die den sogenannten Optimaltemperaturen der enzymatischen Wirkungen naheliegen, experimentell erörtert. Diese optimalen Wirkungstemperaturen liegen natürlich sammt und sonders niedriger als die absoluten Zerstörungspunkte, da, selbst angenommen, daß bei diesen letzteren die Fermentwirkung außerordentlich rasch erfolge, doch nur sehr kurze Augenblicke für dieselbe zur Verfügung stehen würden. Wir sehen hieraus zugleich, die aufgeworfene Frage hat auch noch von einem

anderen Gesichtspunkte aus ein theoretisches Interesse, nämlich wenn wir den Verlauf der später zu erörternden Wirkungskurven der Temperatur begreifen wollen.

Beschäftigen wir uns zunächst mit dem *Invertin*.

Aus eben mitgetheilten Versuchen über die Tödtungstemperatur des Invertins ging hervor, daß in nicht zu concentrirten wässrigen Lösungen das Invertin schon durch ein sehr kurzes Erhitzen auf etwa 50° C. oder etwas darüber durchaus zerstört wird. In den damals mitgetheilten Versuchsdaten sind indeffen auch einige Andeutungen vorhanden in Betreff der Schädigungen der Fermentkraft bei weniger hohen Temperaturen. Aus Versuchsreihe 2 ebenso wie aus Versuchsreihe 3 ergibt sich, daß schon ein sehr kurz dauerndes Erhitzen auf 48° unter den fraglichen Umständen schwächend wirkt.

Hier aber wünschen wir wie gesagt die Frage noch weiter zu erörtern, namentlich in dem Sinn, wie ein dauerndes Verweilen auf derartigen Temperaturen wirkt, also unter Zugrundelegen von Zeiten, welche denen, innerhalb welcher durch das Ferment eine bedeutende intervertirende Wirkung ausgeübt werden kann, vergleichbare sind. Leicht möglich, daß eine Schwächung, die nach dem Erhitzen von wenigen Minuten noch nicht deutlich zur Wahrnehmung gelangt, innerhalb dieser viel längeren Zeiten sehr beträchtlich wird.

Es waren also die neuen Versuche so einzurichten, daß man Temperaturen, die der optimalen Invertirungstemperatur naheliegen, längere Zeit auf Invertinlösungen einwirken lassen mußte.

Eine derartige mit besonderer Sorgfalt durchgeführte Versuchsreihe soll nun in Folgendem beschrieben werden.

Versuchsreihe 27.

Eine gefättigte Invertinlösung aus Preßhefe auf die früher beschriebene Weise bereitet, wurde auf ein Viertel verdünnt, filtrirt und in 8 Portionen vertheilt, 4 davon wurden $\frac{1}{2}$, vier 1 Stunde auf die Temperaturen 30° , 35° , 40° und 45° erhitzt, rasch abgekühlt und dann mit der 10fachen Menge 10procentiger Zuckerlösung vermengt und 7 Stunden lang bei 28° einwirken lassen, alsdann polarisirt. Die Resultate dieser Versuche lassen sich übersichtlich in folgender Weise zusammenstellen:

Zeit der Erhitzung:	Temperatur	Polarisation im kurzen Rohr.	Procentisch intervertirt überhaupt.	pro Stunde.
30 Min.	30°	+ 6.5	48	6.9
30 »	35°	7.0	46	6.6
30 »	40°	7.8	42	6.0
30 »	45°	8.5	39	5.6
60 Min.	30°	7.0	46	6.6
60 »	35°	7.8	42	6.0
60 »	40°	8.5	39	5.6
60 »	45°	9.2	36	5.1.

Also schon bei 35°, ja selbst schon unterhalb der Optimaltemperatur der Intervertirung hat eine Schwächung des Invertins statt. Die Schwächung beträgt 2% auf 48% oder 4% innerhalb einer halben Stunde bei 30° u. f. w., wie folgende kleine Tabelle aufweist, wobei die Voraussetzung gemacht ist, daß in der ersten halben Stunde die Schwächung ebenso groß war als in der anderen, was (innerhalb so kurzer Zeiten) nicht weit von der Wahrheit abweichen kann.

Schwächung des Invertins in 1 Stunde.

Bei 30°	. .	um 8%	feiner ursprünglichen Stärke.
» 35°	. .	» 16%	» »
» 40°	. .	» 22%	» »
» 45°	. .	» 28%	» »

Das steht nicht in Widerspruch mit den Resultaten anderer älteren Versuchsreihen, bei denen zwischen 35° und 40° kein erheblicher Unterschied wahrgenommen werden konnte. Damals hatte aber die Mehrerhitzung der Probe von 40° über die von 35° nur 15 Minuten lang gedauert, der Unterschied, der hier 6% beträgt, muß dadurch auf 1½% reducirt werden — eine Größe, die schon beinahe in die Versuchsfehler fällt, dennoch aber der Wahrnehmung nicht gänzlich entgangen ist.

Feststehend ist also die Thatfache, daß Invertinlösungen für sich allein schon bei Temperaturen in ihrer Fermentkraft geschädigt werden können, bei denen sie in Berührung mit Rohrzucker ihre Thätigkeit mit besonders großer Energie entfalten. Ich sage damit aber nicht, daß dies immer in gleicher Weise der Fall sein muß. Im Gegentheil habe ich in späteren und wiederholten Versuchen, welche sich die theoretische Ausbeutung der in Rede stehenden Thatfachen vorgefetzt hatten, gefunden, daß manche Invertinlösungen selbst bei tagelangem Erhitzen auf

solche niedrige Temperaturen ($32-34^{\circ}$) beinahe völlig intakt bleiben, daß also auch bei dieser Erscheinung wieder die nähere Zusammensetzung der fraglichen Flüssigkeit sich in hohem Grade geltend macht. Von diesen Beziehungen zur Theorie der enzymotischen Prozesse weiter unten im Abschnitte X. Hier will ich nur noch die Thatfache erwähnen, daß Heidenhain¹⁾ für das Trypsin eine schnelle Zerstörung beim andauernden Digeriren seiner Lösung bei 35° beobachtet hat, gleichgültig ob die Lösung gleichzeitig Soda enthält oder nicht. Das Gleiche habe ich ferner für Ptyalin und Diastase auch für das Chymosin gefunden, während Pepsin sich unter gleichen Umständen als resistent erwies. Man vergleiche darüber die folgenden Versuche.

Versuchsreihe 36.

Hansen'sches Labextrakt wurde auf das 100fache verdünnt, ein Theil 3 Stunden lang genau auf 37° erwärmt, ein anderer Theil bei der gewöhnlichen Zimmertemperatur belassen. Noch am selben Tage wurden beide Portionen des verdünnten Extraktes mit dem 25fachen Volum frischer Kuhmilch vermennt, und bei der Temperatur 37° die Gerinnung abgewartet.

Das Resultat ist gewesen, daß die sehr geringe Erwärmung auf 37° , aber mehrere Stunden fortgesetzt, das Extrakt so geschwächt hatte, daß nun innerhalb 190 Minuten keine Gerinnung eintrat, während im anderen Falle dieselbe normal nach 22 Minuten erfolgte. $\frac{8}{9}$ des Extrakts war also jedenfalls zerstört — eine Erfahrung, die noch deutlicher spricht als die bezüglich des Invertins mitgetheilte.

Versuchsreihe 37.

Ptyalin. Durch Sammeln von menschlichem Speichel, Filtriren desselben, Niederschlagen des Filtrats mit Alkohol, wurde ein sehr kräftiges Ptyalinpräparat bereitet. Eine verdünnte (concentrirt wirkt die Lösung zu rasch, um die Wirkung verfolgen zu können) wässrige Lösung wurde theilweise 3 Stunden lang auf 46° , der optimalen Wirkungstemperatur dieses Ferments, erhitzt, theilweise unangerührt gelassen. Beide Portionen wurden sodann mit der 20fachen Menge eines ziemlich dicken, filtrirten Stärkekleisters vermennt und wieder einer Temperatur von 46° ausgesetzt. Von Zeit zu Zeit wurden Probenchen der beiden Mischungen herausgenommen und mit verdünnter Jodtinktur auf das Vorhandensein

¹⁾ Pflüger's Archiv, Bd. 10, S. 579.

von Stärke geprüft. In der Probe mit nicht erhitztem Ptyalin hörte die Blaufärbung, nachdem der Versuch 10 Minuten gedauert hatte, auf, in der anderen Probe war um diese Zeit noch ein Bruchtheil von unveränderter Stärke nachzuweisen.

Versuchsreihe 38.

Diaftase. Frischer nicht gereinigter Extrakt eines selbst dargestellten Malzes wurde z. Th. 3 Stunden auf 60° erhitzt; dann mit dem gleichen Volum Stärkekleister bei derselben Temperatur digerirt. Daneben ging ein genau vergleichender Versuch mit unbehandeltem Malzextrakt. Auch hier wurde das Verschwinden der Jodreaktion als Kriterium benutzt. Ein kleiner Unterschied im selben Sinne $4\frac{1}{2}$ Min. gegenüber 4 Min. war auch hier deutlich zu constatiren.

Da hierbei daran gedacht werden konnte, daß das Diaftasepräparat nur deßhalb eine sehr unbedeutende Schwächung zeige, weil es im unreinen Malzextrakt noch einige Gelegenheit zur Thätigkeit (langsame Ueberführung von Dextrin in Maltose) finden konnte, so wurde der Versuch mit einem reineren Präparate und unter Zugrundlage der doppelten Zeit wiederholt. Dies reinere Präparat war durch Niederschlagen des Malzextrakts mittelst Alkohol erhalten. Das Erhitzen der wässrigen Lösung wurde $5\frac{1}{2}$ Stunden lang bei 62° fortgesetzt. Beim Ermitteln des Fermentvermögens des so behandelten Präparats im Vergleiche mit dem nicht behandelten nach der Vermischung mit der 20fachen Menge Stärkekleisters bei 55° ergab sich nun in der That eine viel stärkere Schwächung als bei dem ersten Versuche. Nach 28 Min. war, wie die Jodreaktion zu erkennen gab, beinahe alles Stärkemehl durch die zuvor nicht behandelte Diaftase zerstört. Die längere Zeit auf die Optimaltemperatur der Wirksamkeit erhitze Diaftase hat in derselben Zeit eine große Menge Stärkemehl übrig gelassen.

Durch Vergleichung der Färbungsintensitäten konnte — da sich der Abschluß der Reaktion unter den gewählten Verhältnissen nur schwierig erreichen ließ — schätzungsweise festgestellt werden, daß das nicht behandelte Präparat in der gleichen Zeit den anderthalbmal so großen Effekt hervorbrachte als das behandelte. Hieraus folgt, mit Hülfe der allgemeinen und für die diaftatische Wirkung durch Kjeldahl speziell festgestellten Beziehungen zwischen Menge und Leistung der Fermente, daß durch das $5\frac{1}{2}$ stündige Erwärmen auf die optimale Temperatur der Wirkung eine Zerstörung von mindestens 33% des ursprünglich vor-

handenen Ferments eingetreten sei. Alle 10 Minuten würde somit eine Schwächung von 1⁰/₁₀ eingetreten sein.

Bei einem fünften Ferment, dem *Pepfin*, ist unter ähnlichen Umständen der Nachweis seiner Zerstörung während seiner Unthätigkeit nicht geglückt. Ja, ich muß wohl sagen, meine Versuche haben gerade das Entgegengesetzte zu Tage gefördert.

Versuchsreihe 39.

Pepfin wurde dargestellt durch die abpräparirte Schleimhaut des Magens eines frisch geschlachteten Schweines einige Tage mit concentrirtem Glycerin zu digeriren, und alsdann das Filtrat in 92procentigen Alkohol tropfen zu lassen. Der im Exsiccator getrocknete Niederschlag wurde in Salzsäure von ungefähr 2⁰/₁₀₀ HCl gelöst. Eine Portion der klaren Lösung wurde 3 Stunden bei 46° im Wasserbade erhalten; eine andere Portion der gleichen Lösung blieb bei Zimmertemperatur stehen. Beide Portionen wurden dann in der Menge von ungefähr 10 ccm mit einem gleichgroßen Würfel von coagulirtem Hühnereiweiß versetzt und in das gleiche Wasserbad bei 46° eingesetzt. In beiden Fällen war die Verdauung nach ungefähr 12 Stunden beendet. In einem zweiten Falle wurde die Erhitzung der einen Portion 6½ Stunden und bei 55° fortgesetzt. Auch nach dieser länger dauernden Einwirkung war keine irgendwie erhebliche Verschiedenheit in der Verdauungsenergie nachzuweisen, während das ähnlich wirkende Trypsin, wie ich früher mitgetheilt habe, unter gleichen Umständen Schwächung erleidet. Der Fall beim Pepfin liegt allerdings eigenthümlich. Dies Enzym ist ein solches, welches unter allen Umständen darauf angewiesen ist, *ungelöste* Körper so zu verändern, daß sie in Lösung übergeführt werden. Dies bringt mit sich, daß wenn wir selbst, was wir einstweilen dahingestellt lassen wollen, eine gewisse Fernwirkung des Enzyms (Nägeli) statuiren, daselbe niemals anders zur Wirksamkeit gelangen kann, als daß ein Theil desselben in Unwirksamkeit verkehrt. Würde mithin die derzeitige Unthätigkeit die Zerstörung involviren, so könnte unter keinerlei Umständen auch bei der Anwesenheit von noch so vielem Verdauungssubstrat (ungelöste Eiweißkörper) das völlige Intaktbleiben des Ferments, seine unendliche Wirkungsfähigkeit constatirt werden, was doch andererseits geradezu als erwiesen anzunehmen ist.

Stellen wir uns auf den Darwinistischen, pseudoteleologischen Standpunkt, so können wir also vielleicht sagen, das Pepfin ist, gleichsam um

feine dauernde Wirksamkeit zu verbürgen, auch während seiner Unthätigkeit mit einem besonderen Maße von Widerstandsfähigkeit ausgerüstet.

Vielleicht steht hiermit im Zusammenhang, daß auch bei den anderen Fermenten, mit welchen Versuche angestellt wurden, die Schwächung ungleich ist, und so weit wir sehen, größer bei denjenigen, die berufen sind auf gelöste oder durch Quellung fein vertheilte Körper einzuwirken.

Beim Lab kann auf Grund der Versuchsreihe 36 die Schwächung durch Erhitzen auf die Normaltemperatur auf mindestens 30% der ursprünglichen Stärke per Stunde geschätzt werden, bei Invertin auf Grund der Versuchsreihe 27 auf 28%, während des einstündigen Erhitzens auf 45%; manchmal ist sie auch freilich wieder gar nicht wahrnehmbar. Beim Ptyalin dagegen, das unter Umständen berufen ist auf feste Stärkemehlkörner, die sich nicht suspendiren lassen, zu wirken, bewirkte das einstündige Erhitzen auf die Optimaltemperatur nur eine Schwächung von *ungefähr* 10% (Versuchsreihe 37); bei der Diastase, für welche genau daselbe gilt, gar nur 6% (Versuchsreihe 38).

Ein Gesetz ist so freilich unter keiner Bedingung mehr aufzustellen. Allein es bleibt die Regel übrig, welche — nicht, wie man gewöhnlich sagt, durch die Ausnahme bestätigt — aber wohl durch dieselbe erst recht in's Licht gesetzt wird, die Regel nämlich, daß *die chemischen Fermente während ihrer Unthätigkeit* unter Bedingungen, die im Uebrigen zur Thätigkeit disponiren, *mehr oder weniger leicht einer Zerstörung unterliegen* und nur ausnahmsweise gegen diese Zerstörung geschützt sind, namentlich dann, wenn sie auch während ihrer Thätigkeit durch diese Einrichtung Schaden erleiden würden.

Wenn wir durch die Eingangs dieses Abschnitts mitgetheilten Thatfachen als eine ganz allgemeine Regel bestätigt finden, daß die Enzyme in wässriger Lösung bei bestimmten Temperaturen, zwischen 52 und 74° bei verschiedenen Präparaten einer Zerstörung unterliegen, und selbst schon viele Grade unterhalb dieser Temperatur eine langsame Schwächung erleiden, so haben wir daneben noch im Allgemeinen festzustellen, — was wir für einen besondern Fall schon wissen — daß diese Regel keine Geltung hat für *trockene Enzympräparate*. Für diese gilt eine ganz andere Regel. Sie können als *absolut haltbar* bezeichnet werden *gegenüber dem Einfluß höherer Temperaturen*, d. h. haltbar, insofern organische Körper überhaupt haltbar sind. Natürlich tritt bei bestimmten Tempe-

raturen, weit oberhalb dem Kochpunkte des Wassers, endlich Zersetzung ein, weil dann die Affinitäten der in den Enzymen enthaltenen Atome zu einer anderen Gruppierung bestimmen. Spezielle Thatfachen stehen uns in dieser Beziehung die folgenden zu Gebote:

Bei der Diaftafe lehrt schon die Praxis der Darrmalzbereitung, daß im trockenen Zustande die Erhitzung erstaunlich weit gehen darf, ich will nicht sagen, ohne das Ferment überhaupt zu schädigen, aber ohne eine sehr ausgestreckte Zerstörung desselben eintreten zu lassen. Das Darren muß freilich bei niedriger Temperatur beginnen, um später bei gesteigerter Hitze fortgesetzt zu werden — natürlich, weil Anfangs noch Wasser vorhanden ist, welches schon unter dem Kochpunkte die Zerstörung einleitet¹⁾. Eine genauere Angabe besagt, daß man Diaftafe trocken auf 120—125° erhitzen kann (Krauch).

Peptin kann trocken auf 110° erhitzt werden, ohne die Wirksamkeit einzubüßen (Al. Schmidt), Pankreatin, worunter in diesem Falle wohl *Trypsin* zu verstehen ist, nach demselben Autor, gar auf 160° und geht erst bei 170° zu Grunde.

Emulfin kann trocken auf über 100° erwärmt werden.

Für das *Invertin* haben wir weiter oben eine völlig schlagende Versuchsreihe, betreffend seine Beständigkeit im trockenen Zustande bis dicht zum Siedepunkte des Wassers, angeführt. Man sieht, dies sind Alles keine wirklich genauen Bestimmungen der wirklichen Zerstörungstemperaturen der trockenen Enzyme, aber Thatfachen genug, welche beweisen, wie hoch diese Temperaturen über jenen, die auf wässrige Lösungen Bezug haben, liegen.

Ueber die Einwirkung des Lichts auf Enzymlösungen habe ich die folgenden kurzen Thatfachen aus meinen eigenen Beobachtungsreihen mitzutheilen:

Versuchsreihe 29.

2 cem einer wirksamen Invertinlösung wurden 15 Tage im Winter bei Zimmertemperatur dem Lichte ausgesetzt, an einem Fenster, wo die Sonne an diesen Tagen öfter schien. 2 cem derselben Invertinlösung wurden ohne Luft über Quecksilber in derselben Weise exponirt. Eine dritte ebenso große Portion wurde mit Luft im Dunkeln belassen, während die Temperaturverhältnisse ungefähr die gleichen waren.

¹⁾ Ich leugne damit nicht, daß es noch andere technische Gründe gibt, welche das langsame Anwärmen des Malzes empfehlen.

Alsdann wurden die Lösungen je mit der 10fachen Menge 10procentiger Zuckerlösung zusammengemischt und nach 2 $\frac{1}{2}$ Stunden im kurzen Rohre polarisirt. Die Resultate waren:

Vorausgehende Behandlung des Ferments.	Polarisation.
Im Lichte mit Luft	+ 7.1
Im Lichte ohne Luft	+ 6.3
Im Dunkeln mit Luft	+ 5.7.

Es ist keine weitere Umrechnung nöthig, um sogleich zu sehen, daß die Kraft der drei verschieden behandelten Invertinlösungen nicht viel differirte.

Auf *Pepsin*lösungen habe ich Licht dauernd und unter ganz ähnlichen Umständen einwirken lassen, — mit dem gleichen negativen Erfolge. Ganz anders aber verhält sich meinen Versuchen zufolge das Chymofin.

Versuchsreihe L 19.

Ein frisches Hanfen'sches Labextrakt wurde ohne Luft in einem Reagirgläschen über Quecksilber an einem Fenster dem hellen Tageslichte ausgesetzt, daneben ein Parallelversuch begonnen mit der einzigen Verschiedenheit, daß das betreffende Reagirgläschen mit schwarzem Papier umhüllt wurde. Ein dritter Versuch unterschied sich vom ersten dadurch, daß die Luft Zutritt hatte. Neun Tage später wurden die drei verschieden behandelten Proben benutzt, um ihr Fermentvermögen festzustellen. Je $\frac{1}{2}$ Liter Milch wurde mit 0,2 ccm, also 0,4 $\frac{0}{00}$ Volum vermengt und bei 35° die Gerinnungsdauer in der gewöhnlichen Weise wahrgenommen. Das Resultat war:

Vorausgehende Behandlung des Labextraktes.	Gerinnungszeit.
Im Lichte ohne Luft	103.5 Min.
Im Dunkeln ohne Luft	67.5 »
Im Lichte mit Luft	121.0 »

Die schädliche Wirkung des Lichts ist also selbst bei Abschluß der Luft und mit Vermeidung des direkten Sonnenlichts schon nach kurzer Zeit sehr bemerkbar.

Aus Vergleich von Probe 1 mit 3 erhellt, daß bei Anwesenheit von Luft die schädliche Einwirkung des Lichts noch etwas begünstigt zu werden scheint¹⁾.

¹⁾ Die praktischen Regeln, die hieraus abgeleitet werden können, liegen auf der Hand. Dunkles Glas, Papierhüllen sind anzuempfehlen für die Fabrikanten und Händler in Labextrakt. Ist das Glas durchsichtig, so wird der Kleinhändler und Consumant auf vorsichtiges Bewahren im Dunkeln zu achten haben.

Im Folgenden seien die Resultate des vorliegenden Abschnitts unserer Versuche und Betrachtungen noch einmal zusammengestellt:

1. *Alle Enzyme erleiden in wässriger Lösung bei erhöhten Temperaturen weit unter dem Kochpunkte des Wassers eine vollständige Zerstörung ihres Fermentvermögens.*

2. *Durch größere Concentration oder durch Beimischung von Glycerin kann die Zerstörungstemperatur beim Invertin und gewiß auch bei anderen Enzymen nach oben verschoben werden. Beimischung von Alkohol hat den umgekehrten Einfluß.*

3. *Trockene Enzyme können ohne Schaden auf den Kochpunkt des Wassers und höher erhitzt werden.*

4. *Alle Zerstörungstemperaturen sind keine ganz constanten Zahlen, da nicht bloß Concentration der Lösung und fremde Beimengungen, sondern auch die Dauer der Erhitzung auf die Erscheinung von Einfluß sind.*

5. *Temperaturen, welche der Zerstörungstemperatur nahe liegen, ja selbst solche, die unterhalb des enzymotischen Wirkungsoptimums liegen, schädigen häufig die Fermentkraft mehr oder minder und können bei genügender Zeit wirkliche Zerstörungstemperaturen werden.*

6. *Die Lichtempfindlichkeit einzelner Enzymlösungen ist keine allgemeine Eigenschaft der in diese Gruppe gehörigen Substanzen.*

IV. Das Unwirksamwerden der Enzyme durch chemische Beimengungen.

Beide Klassen von Fermenten, die Enzyme und die Gährungsorganismen, besitzen eine Reihe von ihrer Wirksamkeit feindlichen oder gar dieselbe dauernd vernichtenden Substanzen. *Gifte* nennen wir solche Substanzen, soweit es sich um Organismen handelt. Aber auch den Enzymen gegenüber sind wir geneigt von Giften zu sprechen, ähnlich wie wir beinahe nicht umhin konnten, von deren *Tödtung* durch Temperaturerhöhung zu sprechen, so sehr ist das Verhalten der Enzyme dem von wirklichen Organismen in allen diesen Punkten analog. Zwar in den Details werden wir hier Verschiedenheiten begegnen, die selbst so groß sind, daß einige derselben geradezu als reaktive Unterscheidungsmittel zwischen Enzymen und Gährungspilzen benutzt worden sind, aber wie wir sehen werden, läuft dieser ganze Unterschied darauf hinaus, daß die Organismen empfindlicher sind, vermuthlich weil sie den Giften eine größere Anzahl von Angriffspunkten darbieten.

Dieser Unterschied tritt noch am wenigsten in's Licht, wenn wir das Verhalten gegen Säuren und Alkalien in's Auge fassen. Gegen freies Alkali sind die niederen Organismen, die eigentlichen Pilze mehr, die Spaltpilze weniger¹⁾, sehr empfindlich. Durch ein kleines Uebermaß werden sie, wie unter Anderem auch die Dumas'schen Versuche über die Alkoholgährung lehren, lahmgelegt oder gar getödtet.

Für mehrere Enzyme ist Daselbe nachgewiesen. Ich selber habe es wiederholt für das Chymosin beobachtet²⁾. Das Ptyalin ist relativ unempfindlicher gegen die Beimengung von kohlenfauren Alkalien, dagegen hebt $\frac{1}{20}$ 0/0 Salzsäure die Wirkung dieses Enzyms beinahe gänzlich auf³⁾.

¹⁾ Diese Regel scheint zuerst von Grace-Calvert aufgestellt worden zu sein. Vergl. Compt. rend. 75, S. 1015, 1119.

²⁾ Vergl. Maandblad v. natuurwetenschappen. Jahrg. 8, S. 126.

³⁾ Griswold: Bericht der deutschen chemischen Gesellschaft, 1882, S. 736 und Versuchsreihe L 26 im vorigen Abschnitt, ferner die folgenden beiden Versuchsreihen:

Versuchsreihe L 24. Am 19. Juni 1880 wurden kleinere Mengen von frischem Hanfen'schen Labextrakt auf verschiedene Weise aufbewahrt. Eine Probe von 10 ccm wurde dabei mit 1 ccm $\frac{1}{10}$ Normal-Kalilauge versetzt, was übrigens genügte, um eine alkalische Reaktion des Anfangs äußerst schwach sauer reagirenden Extrakts herbeizuführen. Eine zweite ebenso große Probe wurde mit 2 ccm der gleichen Kalilauge versetzt. Die Aufbewahrung geschah im Hintergrunde eines Zimmers, allwo das Licht keine bemerklich schädliche Einwirkung geltend machen konnte. Am 28. Juni, also neun Tage später, wurden Gerinnungsversuche mit diesen Extrakten gemacht, über deren Resultat die folgenden Zahlen Auskunft geben.

Behandlung des Labs zuvor.	Gerinnungszeit.
Ohne Zusatz	67.5 Min.
10 0/0 Vol. $\frac{1}{10}$ Normal-Kalilauge dabei	129 »
20 0/0 » » » » »	170 »

Der kleinere Zusatz von Alkali hatte also genügt, innerhalb neun Tagen die Hälfte des Ferments zu zerstören, während durch die größere Menge diese Zerstörung sich beinahe bis auf zwei Drittel erstreckte.

Bei noch stärkeren Zusätzen von Alkali zum Labextrakte kann die Zerstörung des Ferments beinahe plötzlich stattfinden, worüber folgende Versuchsreihe Auskunft gibt.

Versuchsreihe L 25. Am 22. Juni desselben Jahres wurde zu je 10 ccm von frischem Hanfen'schen Labextrakt 1 ccm, 2 ccm und 3 ccm Kalilauge zugesetzt und dann sogleich mit dem so behandelten Labextrakte Gerinnungs-Versuche mit je $\frac{1}{2}$ Liter frischer Milch und mit 0.05 ccm Labextrakte angestellt. Gerinnungstemperatur 35° C.

Das Resultat dieser Versuchsanstellung war:

Behandlung des Labs zuvor.	Gerinnungszeit.
Unverändert	73 Min.
Mit 10 0/0 Vol. $\frac{1}{10}$ Normal-Kalilauge	82 »
» 20 0/0 » » » » »	100 »
» 30 0/0 » » » » »	gerinnt nicht.

Bei der Diaftafe ist die Schädlichkeit von freiem Alkali durch Kjeldahl wahrgenommen.

Säuren müssen schon in größeren Mengen angewendet werden, um sowohl den Gährungsorganismen (zunächst den Spaltpilzen) und den Enzymen schädlich zu werden. Verschiedene Säuren verhalten sich allerdings wesentlich verschieden. So sind z. B. die leichtflüchtigen Fettsäuren dem Alkoholgährpilze besonders feindlich¹⁾. Einige Enzyme sind gegen Säuren recht unempfindlich, nämlich diejenigen, die wie das Pepsin darauf angewiesen sind in stark saurer Lösung zu wirken. Die empfindlichen Enzyme sind für Säure um so empfindlicher, je stärker sie vorher mit Wasser verdünnt sind (Pascutin an der Diaftafe). Die übrigen gährungs- und enzymfeindlichen Substanzen können wir zweckmäßig in einige Untergruppen bringen und dann der Reihe nach behandeln.

1. *Eiweißcoagulirende Stoffe*; 2. *Athmungsgifte*. — Eine dritte Gruppe, die der *spezifischen Nervengifte*, bedarf keiner eingehenden Besprechung, weil die Stoffe, die selbiger angehören (Alkaloide), für Enzyme und Gährungspilze gleich unwirksam zu sein scheinen²⁾.

Zu der ersten Gruppe gehören namentlich die Salze der schweren Metalle, aber auch Gerbstoffe, z. Th. auch die schon oben genannten Säuren, und Phenole. Dieselben sind alle in mehr oder minder hohem Maße gährungsfeindlich, da die Eiweißstoffe des lebensfähigen Protoplasmas durch dieselben aus ihrer für das Leben charakteristischen Struktur, bei welcher Aufquellung in Wasser eine große Rolle spielt, in den unlöslichen Zustand übergeführt werden. Dieselben erweisen sich auch den meisten enzymotischen Wirkungen gegenüber als feindlich, da die niederfallenden Eiweißstoffe vielfach die chemischen Fermente mit sich reißen und die Lösung auch hier die Vorbedingung der Wirksamkeit ist.

So wird mehreren Angaben zufolge Diaftafe sowohl als Chymosin durch Gerbstoffe ausgefällt, und so versteht es sich von selbst, wenn bei

Man sieht, daß bei geringerem Alkalizusatze zum Labextrakte das Zurückgehen der Fermentkraft zwar gleich beginnt, doch lange nicht die Dimensionen annimmt, wie bei einer tagelang fortgesetzten Berührung, daß dagegen ein einigermaßen erheblicher Alkalizusatz sogleich einen sehr vollständig zerstörenden Einfluß ausübt.

Die Spur von Alkali, die bei derartigen Versuchen indirekt mit dem Lab in die Milch kommt, hat, wie andere Versuche lehren, keinen schädlichen Einfluß auf die Gerinnung.

¹⁾ A. J. Neale: Neue Zeitschrift für Rübenzucker-Industrie, 1879.

²⁾ Vielleicht nur scheinen; denn daß Chinin niederen Organismen schädlich ist, ist mitgeteilt und bestätigt. Enzymotische Wirkungen dagegen werden durch Chinin nicht behelligt. Vergl. Schaer: Journal für prakt. Chemie, 1876, Bd. 12, S. 123.

Anwesenheit dieser Substanz häufig Schwächung oder Vernichtung der diastatischen Wirkung beobachtet worden ist. Daher vermuthlich das Scheitern der Versuche aus Eichen Diaftase zu bereiten. Die Salze der schweren Metalle, selbst Alaun, ebenso Arsenfäure und arsenfaures Natron sind der diastatischen Wirkung in hohem Grade feindlich (Kjeldahl); ebenso Kupfervitriol (Detmer). Daß Phenol die Wirkung von Emulfin und Ptyalin verhindert, wird von Plugge angegeben¹⁾. Der Diaftase ist dieser Körper weniger schädlich.

Interessanter ist das Verhalten der Enzyme und Gährungsorganismen gegen diejenige Kategorie von Stoffen, die man als Athmungsgifte bezeichnen könnte. Ich rechne hierhin Blaufäure, Chloroform, Schwefelkohlenstoff, kurz Stoffe, die in die Blutbahn der höheren Thiere gebracht, unmittelbar die schwersten Schädigungen veranlassen, und soweit man sehen kann, den Organismus zunächst vom Athmungsprozeß aus bedrohen.

Am genauesten kennen wir die Wirkung der *Blaufäure*, selbst auf pflanzliche und die *Gährungsorganismen*. Ich habe früher gezeigt, daß wenn man ein Blatt von *Elodea canadensis* in $\frac{1}{5}$ procentige Blaufäure bringt, die Protoplasmabewegung in den Zellen derselben, also eine Erscheinung, die als ein Symptom einer kräftigen Athmung dienen kann, erlischt, aber nach Auswaschung wieder hervorgerufen wird. Ein Gährungsorganismus, der Pilz der gewöhnlichen Bierhefe, stellt ebenso bei einem etwas größeren Gehalte der umgebenden Flüssigkeit an Blaufäure (etwa $\frac{1}{4}\%$) die Gährthätigkeit, die ja als die spezifische Athmung der gährungserregenden Pilze aufgefaßt werden kann, ein, und wie aus Fiechter'schen Versuchen hervorgeht²⁾, erlischt bei einem noch größeren Zusatze von Blaufäure auch die Befähigung des Hefepilzes zur Athmung von freiem Sauerstoff. Ebenso können andere ächte Gährungen, wie aus den gleichzeitig angestellten Versuchen des genannten Forschers erhellt, wie Butterfäuregährung, Fäulniß von Eiweißstoffen, ja auch ammoniakalische Harnfäulniß³⁾, durch Zusätze von Blaufäure, deren Größe sich allerdings nach der vorhandenen Menge von Bakterien richten muß, verhindert werden.

Ganz anders ist dagegen das Verhalten von Blaufäure den *Enzymen* gegenüber. Derselbe Fiechter hat die Einwirkung derselben auf den Fermentprozeß des Ptyalins, der Pankreasdiaftase, des Pepsins studirt; und

¹⁾ Pflüger's Archiv für Physiologie, Bd. 87, S. 538.

²⁾ Ueber den Einfluß der Blaufäure auf Fermentvorgänge, Basel 1875.

³⁾ Deren Zugehörigkeit zu den ächten Gährungen in neuerer Zeit angezweifelt wird.

dabei eine so große Unempfindlichkeit dieser Enzyme gegen das Gift festgestellt, daß es nach ihm fraglich erscheint, «ob dieser Effekt noch speziell der Blaufäure oder aber der Säure überhaupt zukomme». Mag diese Ausdrucksweise, die chemischen Eigenschaften der Blaufäure im Auge behalten, immer eine Uebertreibung enthalten, die zu Grunde liegenden Thatfachen sind charakteristisch genug. Ich selber habe früher¹⁾ gezeigt, daß die Wirkung des Invertins der Hefe in einer blaufäurehaltigen Rohrzuckerlösung noch unbehelligt fortgeht, wenn die Gährung schon lange unterdrückt ist.

Ganz ähnlich steht es mit dem *Chloroform*, dessen schädlicher Einfluß auf die Protoplasmabewegung, z. B. auf die Flimmerbewegung der Samenfäden der Säugethiere, festgestellt ist.

Chloroform, bis zu 12⁰/₀ Invertinmischungen zugesetzt, hat keine nachtheilige Wirkung, während jeder gährungsartige Vorgang erlischt (Müntz). Besonders ist dies Letztere erwiesen für die alkoholische, die Harnsäuregährung und, wie ich aus eigener Anschauung bestätigen kann, die Milchsäuregährung der Milch²⁾. Ebenso unschädlich wie gegenüber Invertin, erwies sich Chloroform gegenüber der Wirkung von Emulfin und Myrofin und, wie Versuche in meinem Laboratorium gelehrt haben, gegenüber der von Diastase. Das Letztere wird auch von Detmer angegeben³⁾. Nur das Pepfin macht nach Erfahrungen eines meiner Assistenten eine Ausnahme, insofern bei Anwesenheit eines Chloroformtropfens in einer Reagiröhre mit Verdauungsflüssigkeit Stücke mit coagulirtem Eiweiße sich viel langsamer lösen als sonst unter genau vergleichbaren Umständen.

Aber es handelt sich ja in all' den hierhin gehörigen Thatfachen allein um die Bestätigung der Regel, daß enzymotische Prozesse gegenüber den Athmungsgiften besonders unempfindlich sind. Diese Regel hat freilich ihre Ausnahmen. Ueber ein weiteres Gift, das vermuthlich zur selben Kategorie zu rechnen ist, den *Schwefelkohlenstoff*, liegen meines Wissens keine erwähnenswerthen Resultate vor.

Aethyläther, dessen physiologische Eigenschaften denen der zuletzt genannten Reagentien nicht unähnlich und nur der Stärke nach geringer sind, wurde wenigstens für die diastatische Wirkung als unschädlich erkannt, während er andererseits als Vergiftungsmittel der Bierhefe empfohlen worden.

¹⁾ Landw. Versuchsst., Bd. 16, S. 281.

²⁾ Compt. rend., T. 80, p. 1250.

³⁾ Landw. Jahrb. 1881, 5 u. 6.

Auch Benzol, Terpentinöl und römisch Kümmelöl sind nicht im Stande die diastatische Wirkung aufzuheben (Detmer).

In die gleiche Kategorie von Erscheinungen, obwohl in diesem Falle von eigentlichen Giftstoffen nicht die Rede ist, gehört weiter die zuerst von Paul Bert beschriebene Einwirkung von *hohen Drucken* auf Gährungsorganismen und chemische Fermente. Unter hohen Drucken ist in diesem Falle zu verstehen ein ungewöhnlich hoher Partialdruck von Sauerstoff, gleichgültig ob derselbe durch sehr starke Zusammenpressung von gewöhnlicher atmosphärischer Luft oder durch Verwendung von reinem Sauerstoff, in welchem Falle dann weit geringere Drucke für denselben Effekt genügen, erreicht ist. Stark verdichteter Sauerstoff nun wirkt wie ein Athmungsgift, und selbst niedrige Organismen leiden darunter, so daß sie der Spannung von einigen Atmosphären (5 Atm. O wird von Bert angegeben) endlich erliegen. Die Enzyme dagegen, die mit keiner Form der Athmung irgend etwas zu thun haben, erweisen sich sehr resistent, so selbst, daß das Verhalten gegen hohen Druck als ein bequemes Unterscheidungsmittel zwischen Gährungs- und enzymatischen Prozessen empfohlen wird.*

Auch noch in Bezug auf einige andere Gifte, die sich minder bequem den beiden aufgestellten oder einer anderen Gruppe unterordnen lassen, liegen einzelne Erfahrungen vor. Ich rechne hierzu weniger die gährungs- und enzymfeindliche Wirkung des Borax, worüber in der Literatur allerlei aufzuspüren ist, weil bei diesem Salze wegen seiner alkalischen Natur im Dunkeln bleibt, wieviel einer spezifischen Wirkung zuzuschreiben ist. Hat ja doch auch Natronwasserglas¹⁾ ganz ähnliche Wirkungen, obschon bei diesem Salze eine spezifische Wirkung nicht vorausgesetzt werden wird. Allein die Borfsäure selber hat sehr merkwürdige spezifisch-antiseptische Eigenschaften, und unzweifelhaft kommen dieselben auch noch bei Gebrauch von Borax zur Geltung, wie ja in neuerer Zeit auch Borfsäureglycerid als ein vorzügliches Conservierungsmittel empfohlen wird. Während aber Borax, vermuthlich wegen seiner alkalischen Eigenschaften auch auf mehrere Enzyme²⁾ (Myrofin, Emulfin, Diastase, Invertin) schädigend einwirkt, ist für die Säure die Unwirksamkeit dem Invertin gegenüber constatirt³⁾. Dagegen wirkt die Säure auf die Milchsäuregährung der Milch verzögernd, eine Thatfache, die in der

¹⁾ Rabuteau u. Papillon: Compt. rend., T. 15, p. 754, 1030.

²⁾ Dumas: Compt. rend., T. 75, p. 277.

³⁾ Béchamp: ebenda, T. 75, p. 337.

Milchwirthschaft von Schweden eine ausgedehnte praktische Anwendung findet. Ja die antiseptische Wirkung der Borfäure scheint sich auch auf die Fäulniß des Fleisches zu erstrecken, wenigstens werden Conservirungsfalze fabrikmäßig bereitet und für Fleisch empfohlen, deren Hauptbestandtheil eben die Borfäure ist. Borax verhindert weiter auch, in größeren Mengen gebraucht, die alkoholische Gährung dadurch, daß der Hefepilz lahmgelegt, wenn auch nicht endgültig getödtet wird.

Aus meinen eigenen zahlreichen Versuchen kann ich die starke Verzögerung der Milchsäuerung durch Anwendung von sehr kleinen Mengen von Borfäure bestätigen. Auf der andern Seite habe ich nachgewiesen, daß so kleine und selbst größere Mengen von Borfäure auf den enzymatischen Prozeß der Labgerinnung der Milch ohne Einfluß sind.

Demnach würde sich die Borfäure in dieser Beziehung der Gruppe der Athmungsgifte anschließen, und wie diese sehr wohl gestatten, in einem zweifelhaften Falle experimentell zu entscheiden, ob ein Fermentprozeß den ächten Gährungsercheinungen oder den enzymatischen Prozessen zugerechnet werden muß.

In welcher Weise die aromatischen Säuren, *Benzoësäure*, *Salicylsäure* wirken, ist gleichfalls noch nicht zu sagen, jedenfalls nicht schlechthin als Säuren, da ein Theil der Wirkung gerade wie bei der Borfäure auch nach der Neutralisation erhalten bleibt.

Daß die beiden genannten Säuren Gährungsprozesse verschiedener Art beeinträchtigen, und in größeren Mengen angewandt, unterdrücken, dafür sind viele Beispiele in der Literatur vorhanden. Ich selber habe sehr häufig die Milch durch Zufügen einer kleinen Menge von Salicylsäure oder von benzoësaurem Natron auf einige Tage hinaus vor der Milchsäuregährung beschützt. Vielfache Erfahrungen W. Kühne's¹⁾ lehren, daß große Mengen von Salicylsäure thierische Gewebe vor Fäulniß durch Bakterien schützen, dagegen ein weit weniger sicheres Mittel sind gegen Hefe- und Schimmelbildungen. Die Wirkungen der Enzyme Trypsin und Pepsin werden durch die Anwesenheit von viel Salicylsäure nach demselben Beobachter kaum geschwächt. Daselbe gilt, Schaer²⁾ zufolge, für die Wirkung des Myrosins und namentlich des Emulsins und die beobachtete Schwächung kann, wo sie auftritt, auf Eiweißcoagulation zurückgeführt werden. Nach Heron u. Brown (a. a. O.) wirken größere Mengen von Salicylsäure schwächend ein auf den diastatischen

¹⁾ Verhandl. des naturhistor.-med. Vereins zu Heidelberg, Februar 1876.

²⁾ Journ. für prakt. Chemie, 1876, Bd. 12, S. 123.

Prozeß. Hiernach und nach den vielfachen aber noch nicht genügend anderweitig bestätigten Untersuchungen von Kolbe u. E. v. Meyer bleibt es einigermaßen unsicher, in welche Gruppe von Giften jene aromatischen Säuren zu zählen sind.

Für die Borfäure liegt noch die Beobachtung vor, daß in Verdauungsflüssigkeiten, die 1% davon enthalten, die Fibrinverdauung unbehindert statt hat. Nach L. Wolberg¹⁾ jedoch ist schon bei 1% Borax (welcher ja in der sauren Verdauungsflüssigkeit freie Borfäure geben muß) eine Hemmung von 23% zu constatiren, welche schon bei 4% zur völligen Verhinderung der Verdauung übergeht. Hierbei ist indessen zu berücksichtigen, daß durch soviel Borax endlich die freie Salzsäure der Verdauungsflüssigkeit abgestumpft sein mußte, die, wie viele (auch die in der Anmerkung mitgetheilten) Versuche lehren, nicht durch schwächere Säuren remplacirt werden kann.

¹⁾ Pflüger's Archiv, Bd. 22, S. 304. Ferner meine Versuchsreihe P 9.

Die folgenden Säuren wurden einer vergleichenden Prüfung unterworfen:

- | | | | |
|------------------|-------------------|--------------------|------------------|
| 1. Essigsäure. | 3. Butteräure. | 5. Bernsteinsäure. | 7. Milchsäure. |
| 2. Ameisensäure. | 4. Oxalsäure. | 6. Schwefelsäure. | 8. Salicylsäure. |
| | 9. Salpetersäure. | 10. Weinsäure. | |

Sämmtliche Säuren wurden in einem so verdünnten Grade verwendet, daß sie mit derjenigen Salzsäure, welche eine optimale Wirkung gezeigt hat, titermäßig gleichgestellt wurden. Bei der Salicylsäure, die in kaltem Wasser so sehr wenig löslich ist, war hierzu Verwendung von Wärme nöthig; in der Kälte erfolgte dann wieder eine Auscheidung. Die Säuren waren also alle im Aequivalentverhältniß anwesend, und alle enthielten $\frac{63}{100}$ von dem Gehalte einer $\frac{1}{10}$ normalen Säure oder $\frac{63}{1000}$ ihres Aequivalentgewichts in Grammen im Liter.

In 2 cem dieser Säuren wurden je 2 cg Pepfin aufgelöst, was indessen bei der Bernstein- und Salicylsäurelösung selbst nach 36 Stunden sehr unvollständig erfolgte, dann wieder kleine Eiweißstückchen in der früher beschriebenen Weise eingeführt und tagelang in einem Wasserbade auf ziemlich genau 50° erhalten.

Das Resultat dieser Versuchsreihe war:

Art der Säure.	Verdauung.
Salzsäure (Versuchsreihe 7, 8)	3—5 Stunden.
Salpetersäure	5 »
Oxalsäure	13 »
Schwefelsäure	19 »

Nach 24 Stunden Verdauungswirkung wurde der Versuch abgebrochen, und alsdann zeigten Milch- und Weinsäure starke Einwirkung, so daß die Auflösung als bis zur größeren Hälfte fortgeschritten erachtet werden konnte. Ameisen-, Bernstein- und Essigsäure zeigten eine geringere, aber doch bemerkbare Wirkung. Butter- und Salicylsäure waren ohne Einwirkung geblieben. Noch muß beigefügt werden, daß das verwendete Pepfin frei war von Chloriden, woraus Salzsäure sich hätte bilden können.

Die Säuren haben also ziemlich nach Maßgabe ihrer Stärke gewirkt, die organischen Säuren schwächer als die Mineralsäuren und unter jenen die reinen Säuren stärker als die Alkoholsäuren, diese stärker als die Kohlenwasserstoffsäuren.

Daß die Produkte der enzymotischen Prozesse durch ihre Anwesenheit im Allgemeinen diese Prozesse selber benachtheiligen, ist keine Thatfache, die besonders ausführlich besprochen zu werden verdient, da diese Erscheinung auch bei rein chemischen Prozessen in aller Deutlichkeit wahrzunehmen ist und deren Erklärung ja ziemlich auf der Hand liegt. Wenn man z. B. Kohlenoxyd und Wasserstoff mit einer für die völlige Verbrennung beider unzureichenden Menge Sauerstoff explodirt, so vermindert eine schon vorhandene Menge Wasser die Menge von verbrennendem Wasserstoff (Horstmann).

Was die enzymotischen Prozesse angeht, so ist wahrgenommen, daß die letzten Mengen Dextrin erst dann von der Diastase in Angriff genommen werden, wenn schon gebildete Maltose zuvor entfernt wird, während die Verflüssigung der Stärke selber durch die Anwesenheit dieses Körpers nicht sehr benachtheiligt wird, daß eine größere Menge von Pepton der Pepsinwirkung nachtheilig ist, daß der Prozeß der Intervertirung mit der zunehmenden Menge von Invertzucker langsamer und langsamer verläuft. Eine ähnliche Improportionalität zwischen Zeit und Wirkungseffekt ist auch für das Emulfin wahrgenommen. Dagegen ist das Trypsin verhältnißmäßig sehr unempfindlich gegen anwesendes Pepton (Heidenhain), z. Th. allerdings vielleicht, weil dieser Körper noch nicht das letzte Endprodukt der Trypsinwirkung ist.

Durch die in diesem Abschnitte gesammelten Thatfachen sind wir zu dem Resultate gekommen, *daß es für die enzymotischen Erscheinungen eine Reihe von Substanzen gibt, die sich ihnen bei der bloßen Beimengung zu den Fermentmischungen feindlich erweisen, daß diese Stoffe sämmtlich mit denjenigen, die sich den Lebensprozessen feindlich erweisen, und die wir Gifte nennen, identisch sind, daß aber umgekehrt viele Organismengifte und zumal solche, welche der Athmung des Protoplasmas feindlich sind, den enzymotischen Prozessen gegenüber gleichgültig sind¹⁾.*

¹⁾ Die vielen Thatfachen, die durch eine Reihe von jungen Forschern im pharmaceutischen Institute zu Dorpat in den letzten Jahren in Betreff von Enzym- und Gährungsgiften festgestellt worden sind, waren mir nicht hinlänglich zugänglich, um sie im Texte berücksichtigen zu können. Doch scheinen sie mir nicht mit den hier gemachten Folgerungen im Widerspruch zu stehen. An das Verhalten der Athmungsgifte würden sich darnach noch anschließen: Thymol, Kreosot, Senföl und Eucalyptusöl, während freie Halogene und schwefelige Säure das umgekehrte Verhalten zeigen, indem sie für Enzyme schädlicher sind als für Gährungsorganismen. Vergl. H. Meyer: Ueber das Milchsäureferment etc. Dorpat 1881.

V. Ueber die Wirkung der Enzyme. Unterschiede von den Gährungserrscheinungen.

Der Chemismus, welchen die Enzyme bewirken, ist in den meisten Fällen ziemlich genau gekannt — sicherlich auch ein Zeichen dafür, daß die Chemiker sich keine Mühe haben verdrießen lassen, den enzymotischen Prozessen mit allen Hilfsmitteln ihrer Kunst nachzugehen, und daß daher der negative Erfolg in Betreff der chemischen Constitution der Enzyme selbst, wovon wir im II. Abschnitte zu berichten hatten, sehr dafür spricht, daß die Charakterisirung dieser merkwürdigen Körperklasse nicht auf dem Gebiete der reinen Chemie liegt, sondern auf dem einer anderen Wissenschaft — wie ich dafür halte — der Physiologie.

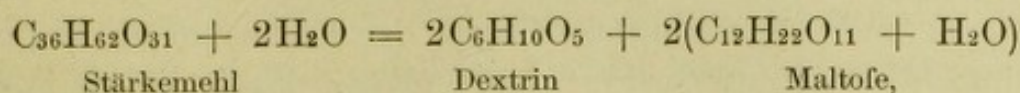
Die *zuckerbildenden Enzyme* spalten alle, wie der Name ausagt, Zucker ab, und zwar ist dieser Zucker meistens *Traubenzucker* (Dextrose) oder der ihm ganz nahestehende Zucker, die *Maltose*. Ersterer hat bekanntlich eine Zusammensetzung, welche durch die Formel $C_6 H_{12} O_6$ ausgedrückt wird, und eine Constitution als Polyglycol und zugleich als einwerthiger Aldehyd aus der Reihe der gesättigten Kohlenwasserstoffe. Die Maltose ist als ein äußeres Anhydrid des Traubenzuckers aufzufassen von der Formel des Rohrzuckers $C_{12} H_{22} O_{11}$, enthält aber das ihm zum Uebergang in Traubenzucker nöthige Molekul Wasser schon als Hydratwasser.

Bei der enzymotischen Umwandlung des Inulins entsteht ohne Zweifel *Laevulose*, eine Zuckerart von der Zusammensetzung des Traubenzuckers, aber anders constituirt. Da jedoch dieser Prozeß niemals rein für sich untersucht worden zu sein scheint, so würde es voreilig sein, denselben als einen genügend bekannten darzustellen.

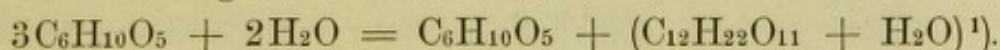
Bei jedem enzymotischen Prozesse dieser Kategorie entsteht außer Dextrose oder Maltose noch immer wenigstens *ein anderer Körper*, der aber je nach der Natur des fermentirenden Substrats außerordentlich verschieden sein kann. In vielen Fällen ist dieses Beiprodukt ein anderes Kohlehydrat und selbst der Dextrose nicht sehr ferne stehend. In diesem Fall charakterisirt sich das Substrat als ein Paarling zweier oder mehrerer Kohlehydrate, wofür die Constitution des Rohrzuckers das reifste Beispiel ist. Ist der neben Zucker entstehende Körper ein fremder, so gehört das Substrat in die große nicht weiter als eben durch diese Paarlingschaft charakterisirebare Gruppe der *Glycoside*. Da alle die hierhergehörigen

Paarlinge, gleichgültig, ob sie ausschließlich aus der Gruppe der Kohlehydrate gebildet sind, oder ob sie zu den Glycosiden gehören, als (gemischte äußere) Anhydride aufzufassen sind, so erscheint zugleich für den enzymotischen Prozeß noch die Aufnahme von Wasser als charakteristisch.

Der diastatische Prozeß scheint auf die folgende Weise vorgestellt werden zu müssen:



wofür auch die einfachere, aber sicherlich mehr von der Wahrheit abweichende Formel gesetzt werden kann:



Die Stärke wird am besten in der Form von Kleister dargeboten, da die unzertrümmerten Stärkekörner theils wegen der wenigen Berührungspunkte, theils wegen der Schwerlöslichkeit der obersten Schicht mehr oder weniger Schwierigkeit darbieten.

Dieser Prozeß ist einer der complicirteren und nicht sehr geeignet, die Wesenheit eines enzymotischen Vorgangs der in Rede stehenden Kategorie klarzulegen. Auch tritt noch die weitere Complication hinzu, daß Dextrin und Maltose nicht in einem ganz bestimmten Verhältnisse entstehen, sondern bei weniger energischer Einwirkung des Enzyms (übertrieben hohe Temperatur u. dgl.) mehr vom ersteren, unter umgekehrten Verhältnissen mehr vom letzteren.

Dies rührt z. Th. daher, daß Dextrin selber weiter durch Diaftase in Zucker verwandelt werden kann²⁾, mithin ebensowohl Zwischenstufe wie Spaltungsprodukt darstellt, und daß nur der endgültige Uebergang von allem zuckerbildenden Stoffe in Zucker durch die Anwesenheit dieses Endproduktes der Art verzögert wird, daß unter gewöhnlichen Umständen nur die Hälfte oder zwei Drittel des Stärkemehls in Zucker verändert wird. Wird z. B. durch die Gährung Zucker hinweggenommen, wie ja bei der Gährung der Brauntweinmaische geschieht, so führt — wenn nicht das rapide Entstehen von Milchsäure durch Milchsäuregährung die Reaktion verhindert — die noch vorhandene Diaftase, nach der Beseitigung dieses Hindernisses auch noch den größten Theil des Dextrins in Zucker über.

¹⁾ Die ältere Darstellungsweise, wonach gleiche Theile Dextrin und Zucker gebildet werden sollen, beruht auf der Annahme, daß der Zucker das Reduktionsvermögen des Traubenzuckers habe, während daselbe bei der Maltose um $\frac{1}{3}$ geringer ist.

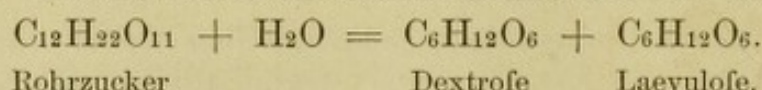
²⁾ Vergl. Märcker: Handbuch der Spiritusfabrikation, 1877, S. 430.

Nach den neueren Untersuchungen von Brown u. Heron¹⁾ liegt die Sache noch complicirter, indem hoch erhitzter oder mit Salicylsäure behandelter Malzextrakt wohl noch die Ueberführung von Stärke in Dextrin ermöglichen, während die weitere Ueberführung in Dextrose schon sehr geschwächt erscheint — Thatfachen, offenbar nur zu erklären durch die Anwesenheit verschiedener Fermente, die verschiedenes bewirken.

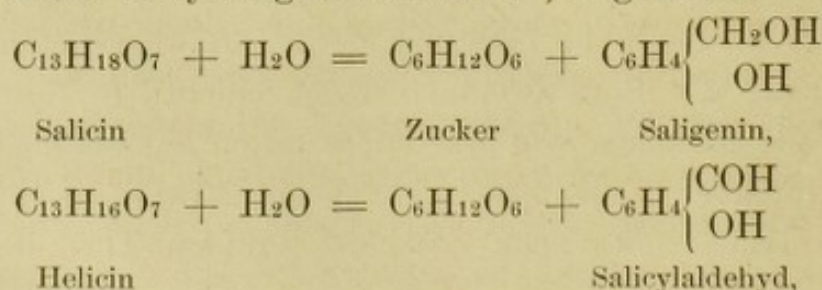
Ptyalin und das *diastatische Enzym der Pankreasdrüse* scheinen in ganz ähnlicher Weise auf das Stärkemehl einzuwirken²⁾. Auch in diesem Falle findet man nach Beendigung der Reaktion beinahe 50%, genauer 45—48% eines Zuckers von dem Reduktionsvermögen des Traubenzuckers. Da aber auch in diesem Falle dieser nicht wirklich selber entsteht, sondern Maltose oder ein maltoseähnlicher Körper von geringerem Reduktionsvermögen, so ist die Ausbeute an Zucker etwa zu 70% anzunehmen. Das *Dextrin*, welches daneben gebildet wird, ist die auf Jod nicht reagirende Modification, das sog. *Achroodextrin*.

Was die enzymotische Verwandlung des *Glycogens* angeht, so hat Nasse dieselbe bei der Benutzung von Bauchspeichelferment der von Stärkemehl ganz analog gefunden, während bei Gebrauch von *Ptyalin* nur ungefähr 50% eines Zuckers von dem Reduktionsvermögen der Maltose gefunden wurde.

Sehr einfach kann die *Wirkung von Invertin auf Rohrzucker* formulirt werden. Dieselbe erscheint identisch mit der von Säuren.



Das *Emulfin* gehört zu denjenigen Enzymen, von denen eine vielseitige Wirkung angenommen wird, und viele dieser Wirkungen sind chemisch genau erörtert. Die folgenden werden z. B. von Hoppe-Seyler in dessen «Physiologische Chemie»³⁾ angeführt:



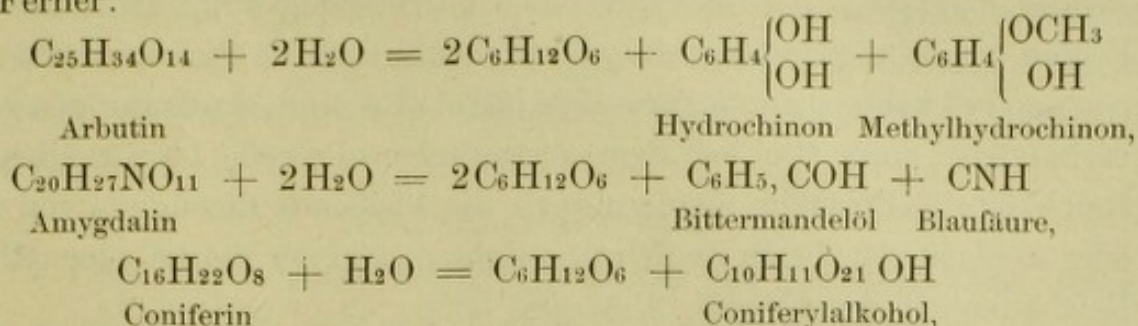
und ebenso entsteht aus dem Glycofid der Salicylsäure diese Säure selber.

¹⁾ Annal. der Chem. u. Pharm., Bd. 199, S. 165.

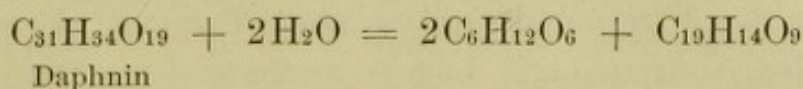
²⁾ Vergl. Naffe: Pflüger's Archiv, Bd. 14, S. 473.

³⁾ 1880, S. 117.

Ferner:

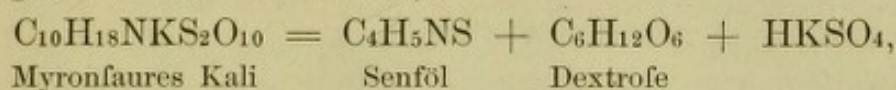


und ebenso entsteht die Vanillefäure $\text{C}_8\text{H}_5\text{O}_4$ aus dem zugehörigen Glycofid. Ferner:

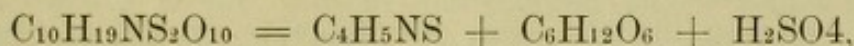


und ganz analog auch die Spaltung des Convolvulins.

War aus allen den bisherigen Fällen die Regel abzuleiten, daß die Wirkung der zuckerbildenden Enzyme in einer Spaltung eines ätherartigen Anhydrids unter Wasseraufnahme bestehe¹⁾, so erleidet diese Regel eine Ausnahme, oder doch wenigstens nur eine zweifelhafte Bestätigung, wenn wir die Wirkung des Myrosins in Augenschein nehmen. Wird dieselbe doch durch die Experimentatoren über diesen Gegenstand in der folgenden Weise formulirt²⁾:



wofür man freilich auch setzen kann:



da auch die freie Myronfäure der gleichen Spaltung zugänglich ist.

Da aber die Constitution der Myronfäure noch nicht ganz aufgeheilt ist, da ferner die Fermentationsprodukte noch nicht quantitativ bestimmt sind, so bestehen — sei es in einer Abänderung der Formel innerhalb der von den Analysendaten gegebenen Grenzen, sei es in dem Uebersehen weiterer Spaltungsprodukte — noch Möglichkeiten, daß auch in diesem Falle Wasseraddition charakteristisch sei und die Regel keine Ausnahme erleidet³⁾.

Was die *peptonbildenden Enzyme* angeht, so besteht die Wirkung des

¹⁾ Die Art und Weise wie Nencki die Betheiligung des Wassers an den Fermentprozessen als bestehend in einer Spaltung in Wasserstoff und Hydroxyl hinstellt, scheint mir des Eigenthümlichen zu wenig zu bieten, um auf diese Darstellungsweise einzugehen. Vergl. Journ. für prakt. Chemie. N. F. Bd. 17, S. 103.

²⁾ Will u. Körner: Liebig's Annalen, Bd. 125, S. 263.

³⁾ Franchimont hat selbst in seinem «Kort Leerboek» der organ. Chemie 1880 dieser Auffassungsweise positiv das Wort geredet.

Pepsins endgültig in einer einfachen Ueberführung von Eiweißstoffen in Pepton, wobei regelmäßig einige Zwischenstufen, wie Syntonin und Parapepton beschriftet zu werden scheinen. Es sind Andeutungen dafür vorhanden, daß, wie bei dem diastatischen Prozesse, nicht allein die Raschheit des Prozesses, sondern auch die bleibende Erzeugung von mehr oder weniger von diesen Zwischenprodukten, von der Stärke oder näheren Beschaffenheit des Enzyms abhängig sei¹⁾.

Das *Trypsin* bildet erst Pepton, dann neben Antipepton Leucin und Tyrosin, die als weitergehende Spaltungsprodukte der Peptone aufzufassen sind und für die Wirkung des pflanzlichen Trypsins, des Papains, ist wenigstens das Auftreten von Leucin nachgewiesen. Daß nun Pepton mehr wiegt als Eiweiß, aus dem es hervorgegangen, ist kürzlich nachgewiesen worden, und dies bedeutet mit einiger Sicherheit, was man schon lange vermuthete, daß die Peptone durch Spaltung unter *Wasser-aufnahme* aus den Eiweißstoffen entstehen.

Am wenigsten deutlich scheint die gleiche Frage hinsichtlich der Käsegerinnung zu liegen. Indessen wenn wir Gebrauch machen von den neuen, schönen Entdeckungen auf diesem Gebiete durch O. Hammarsten, Danilewsky u. Radenhausen, so muß eine Beantwortung nicht für unmöglich gehalten werden.

Wir müssen von der nunmehr feststehenden Thatfache ausgehen, daß die Gerinnung der Milch durch das betreffende Enzym eine ganz andere Erscheinung ist, als wenn wir eine für das Auge ganz ähnliche Reaktion mittelst Säurezusatz bewirken. Im ersteren Falle haben wir es mit einer tiefer greifenden Umwandlung zu thun, denn aus dem Labgerinnfel können wir keine Flüssigkeiten von den Eigenschaften der Milch regeneriren. Im zweiten Falle können wir dies leicht nach der Methode von Hammarsten und können das wiederaufgelöste Gerinnfel noch einmal und definitiv durch das Ferment oder beliebig oft durch Säuren niederschlagen. Hammarsten spricht im ersten Falle von Käse, im zweiten von Casein. Die natürliche Milch enthält Casein, aber nicht Käse; durch das Lab wird das Casein in Käse verwandelt. Auch die Theorie von Danilewsky und Radenhausen²⁾ trägt dieser wichtigen Thatfache Rechnung³⁾.

¹⁾ Finkler: Pflüger's Archiv, Bd. 10, S. 372 und B. 14, S. 128.

²⁾ Forschungen auf dem Gebiete der Viehhaltung, Heft 9.

³⁾ Von der einstweilen noch nicht zu deutenden, durch H. Köster ermittelten Thatfache, daß neben Käse eine kleine Menge eines peptonartigen Körpers gebildet wird, wird gleich noch die Rede sein. Vergl. Biolog. Centralbl., Bd. II, Nr. 2.

Ich habe nun besondere Versuche angestellt, um einige Unterschiede zwischen Käse und Casein (nach der eben erläuterten Definition) kennen zu lernen, namentlich was die Mengenverhältnisse der beiden Auscheidungen anlangt.

Versuchsreihe L 32.

$\frac{1}{2}$ Liter Milch wurde bei 37° C. mit so viel Labextrakt zur Gerinnung gebracht, daß, wie voraus berechnet war, 25 Minuten zu dieser Gerinnung nöthig waren.

$\frac{1}{2}$ Liter Milch, genau wie die erste, wurde mit derselben Menge Lab versetzt, aber nur die halbe Zeit, nämlich 12 Minuten, der Einwirkung desselben überlassen. Ungefähr zur Hälfte mußte in dieser Zeit das Casein in Käse umgewandelt worden sein. Dann wurde rasch so viel Essigsäure beigemischt, als zur völligen Gerinnung nöthig war, wozu $\frac{1}{2}$ ccm einer concentrirten Essigsäure nöthig war.

Ein dritter halber Liter der gleichen Milch wurde direkt mit Essigsäure zum Gerinnen gebracht, wozu $1\frac{1}{4}$ ccm der gleichen Säure nöthig war.

Die Gerinnfel wurden mittelst Filtriren durch Leinwand gesammelt und die folgenden Mengen im lufttrockenen Zustande erhalten:

1. Labfällung	31.39 g
2. Gemischte Fällung	30.27 »
3. Säurefällung	29.64 ».

Die abfiltrirte Molke war in den beiden ersten Fällen heller wie bei der Säurefällung, deren Molke nach dem mikroskopischen Bilde auch fettreicher zu sein schien.

In den beiden ersten Fällen klärte sich die Molke noch weiter durch Abscheidung eines unbedeutenden flockigen Coagulats.

Die drei Gerinnfel wurden dann einer weiteren Analyse (auch hinsichtlich ihres Wassergehaltes) unterworfen, und hieraus berechnen sich schließlich die folgenden Zahlen:

Aus 1 Lit. Milch niederge schlagen.	1. Labfällung.	2. Gemischte Fällung.	3. Säurefällung.
Fett	24.92 g	24.10 g	21.82 g
Eiweißstoffe und Spuren anderer organ. Stoffe	25.70 »	25.36 »	25.16 »
Asche	1.90 »	1.58 »	1.22 »
Hierin Kalk	0.79 g	0.60 g	0.32 g
» Phosphorsäure	0.97 »	0.80 »	0.63 »
Zusammen:	52.52 g	51.04 g	48.20 g.

Hieraus ergibt sich das Folgende, wobei wohl die Thatfache, daß Versuch 2 überall in der Mitte steht, einige Beruhigung hinsichtlich der Sicherheit des Resultats gewährt.

Die Menge von Eiweißstoffen, welche durch Säuren einerseits, durch Labferment andererseits aus Milch gefällt wird, ist nicht sehr verschieden, dagegen wird bei der Labgerinnung eine größere Menge von Fett mit niedergerissen, vermuthlich da bei der ruhigeren Entstehung dieses Coagulats die Maschen, welche die Fettkügelchen umspannen, sich fester schließen, gerade wie der Blutkuchen die Blutkörperchen in sich einschließt, das unter Peitschen abgeschiedene Fibrin aber nicht¹⁾.

Noch auffallender ist der gleiche Unterschied hinsichtlich der Aschenbestandtheile und namentlich der Basen, und einer der Unterschiede zwischen Käse und Casein wird sein, daß, wie schon Mulder wußte, für den ersteren der Besitz einer größeren Menge von Aschenbestandtheilen charakteristisch ist. Am meisten scheint dieser Unterschied die Basen zu betreffen, von denen über die Hälfte dem Casein entzogen ist, natürlich weil die Säure zumeist auf diese Bestandtheile ihre chemische Anziehung ausübt, und gerade hierdurch die Fällung des ohne basische Bestandtheile unlöslichen Caseins herbeiführt. Aber mit dem Kalke geht auch ein Theil der Phosphorsäure denselben Weg.

Das für uns in diesem Augenblick wichtigste Resultat ist aber wohl dies, daß Käse auch nach Abzug der Asche ein etwas größeres Gewicht hat als Casein. Das Plus bei der Labfällung ist nun ohne Zwang so zu deuten, daß auch das Entstehen von Käse aus Casein in einer Hydratirung besteht. Und um so sicherer wird dieser Schluß gemacht werden dürfen, wenn man berücksichtigt, daß bei der Käsegerinnung nach den ganz neuen Untersuchungen von H. Köster eine kleine Menge eines peptonartigen Körpers mit abgespalten wird, wodurch das Gewicht des Käses vermindert werden mußte. Aus den Elementaranalysen dieses Forschers und von Hammarsten²⁾ von Casein, Käse und des peptonartigen Körpers ergibt sich freilich keine ins Auge fallende Veränderung des Gehalts an den Elementarbestandtheilen der beiden ersteren Körper, dagegen ist der peptonartige Körper entschieden kohlenstoff- und stickstoffärmer, so daß dann die Hydratirung bei der Labgerinnung

¹⁾ Daneben ist wohl, wenn man den Versuch 2 beachtet, anzunehmen, daß das Labgerinnfel eine größere Adhäsion zum MilCHFETT besitzt, als das durch Säuren niedergeschlagene Casein.

²⁾ a. a. O.

auch bestehen und sich nur auf dies Spaltungsprodukt beschränken würde.

In Bezug auf den Labgerinnungsprozeß ist auch noch als erwiesen anzusehen, daß, obschon der gebildete Käse plötzlich aus der Milch herausfällt, der Vorgang dennoch, ganz wie bei den anderen Prozessen, ein kontinuierlicher ist. Vor Allem beweisend hierin sind die schönen Versuche von Hammarsten, welcher eine Kunstmilch bereitete, die arm war an Kalksalz, und in derselben die fermentative Veränderung äußerlich unsichtbar bewirkte, worauf dann durch Zusatz von Chlorcalcium der fertige Käse plötzlich ausgefällt werden konnte. Beweisend in dieser Richtung ist auch die folgende Versuchsreihe von mir.

Versuchsreihe L 29

angestellt mit 3 halben Litern frischer Milch, die zunächst bei 37° einen Zusatz von der gewöhnlichen Menge von je 0,2 ccm frischem Hanfenschen Labextrakt erhielten. Nachdem das Ferment 20 Minuten gewirkt hatte, wurde die Milch von zwei Gläsern rasch auf die gewöhnliche Zimmertemperatur abgekühlt, das eine bei dieser Temperatur belassen, das andere wieder auf 37° erwärmt, und auf die Zeit bis zur Gerinnung in allen drei Fällen geachtet.

Das Resultat dieser Versuchsreihe war nun:

Behandlung der Milch.	Zeit bis zur Gerinnung (nur die Zeit, wo die Milch wärmer war als 25°, gerechnet).	Gesamtzeit bis zur Gerinnung.
Bei 37°	39 Min.	39 Min.
ebenso, nach 20 Min. auf 19° abgekühlt	gerinnt nach 6 Stunden nicht.	—
ebenso, abgekühlt u. wieder auf 37° zurück	33 Min.	57½ Min.

Das Resultat dieses Versuchs ist sehr deutlich. Die Gerinnungszeit im dritten Falle ist beinahe die normale und würde sich derselben noch mehr nähern, wenn man das bei den niedrigen Temperaturen langsam stattfindende Fortschreiten des Gerinnungsprozesses mit in Anrechnung bringen wollte. Es ist keine Frage, die durch das Lab während der ersten 20 Minuten einer der Gerinnung günstigen Temperatur geleistete Arbeit ist nicht verloren, und die Unterbrechung ist für den Gesamteffekt durchaus unfühlbar geworden, außer etwa, daß das Ge-

rinnfel in Folge der bei dem Abkühlen unvermeidlichen Erschütterung eine mehr flockige Konsistenz erhalten hat.

Es bleibt nur das Bedenken, ob der Fermentprozeß durch die Abkühlung auf niedrige Temperaturen wirklich als abgebrochen gelten kann, da er sich dabei, wenn auch sehr langsam, fortsetzt, wie sich aus anderweitig mitgetheilten Versuchen ergibt. Aber dieser Einwurf besteht nur scheinbar zu Recht, denn die Kontinuität der Wirkung wird ebenso unterbrochen, ob diese ganz aufhört oder ob sie bis auf ein Minimum geschwächt wird. Bestände der Grund dafür, daß eine gewisse Zeit verfließen muß, bis der Endeffekt erreicht wird, darin, daß ein Vorrath der hierzu nöthigen lebendigen Kraft angesammelt werden müßte, wie eine uns verwerflich erscheinende Hypothese unterstellt, dann müßte jede Schwächung der Energie als ein dauernder Verlust an aufgewendeter Kraft, nicht bloß als eine Verschiebung der Erscheinung sich fühlbar machen. Wenigstens verhält es sich so mit allen Beispielen, die für diese Art der Wirkung bekannt sind, mit der Entzündungstemperatur, mit dem Anlaufe, mit dem Zerbrechen durch gesteigerte Schallschwingungen. Ueberall schadet die Schwächung des vorbereitenden Prozesses nicht bloß nach Maßgabe dieser Schwächung, sondern weit darüber hinaus.

Also denke ich, daß der Nachweis der diskontinuirlichen Fortsetzbarkeit des Gerinnungsprozesses als ein Beweis dafür angesehen werden kann, daß während der früheren Stadien des Prozesses eine wirkliche, stoffliche Veränderung der Milch schon geschieht. Es ist mir später geglückt, die Beweise für die Richtigkeit dieser Auffassung noch weiter zu häufen, indem gezeigt werden konnte, daß halbgeronnene Milch sich auch in anderer Beziehung chemisch anders verhält als ungeronnene, indem sie beispielsweise sehr viel weniger Säurezusatz nöthig hat zur Caseinausscheidung, als noch nicht im Voraus mit Labferment behandelte.

Die eben angerührte Mitwirkung von Kalksalzen bei dem Milchgerinnungsprozeß zeigt sich auch in der großen Abhängigkeit desselben von der Verdünnung. Schon ein verhältnißmäßig geringer Wasserzusatz ist im Stande, die Milchgerinnung durch Lab (nicht die durch Säuren) zu verzögern und endlich ganz unmöglich zu machen, wie schon Hammarsten zeigte und ich in mehreren Versuchsreihen bestätigen konnte¹⁾.

¹⁾ Milchzeitung, a. a. O.

Doch habe ich selber bei der ersten Publikation dieser Thatfache darauf hingedeutet, daß diese Beweisführung noch keine strenge ist. Dieser letztere Passus in Parenthese und mehr um die weniger Kundigen auf den jetzigen Standpunkt der Milchgerinnungstheorien zu bringen.

Es ergibt sich, wenn wir das Wichtigste des in diesem Abschnitte Mitgetheilten zusammenfassen, aus einer ziemlich ansehnlichen Reihe von Thatfachen, die meistens einen hohen Grad von Sicherheit besitzen, daß *die enzymotischen Reaktionen allesammt auf Spaltung ätherartiger Moleküle unter Wasseraufnahme hinauslaufen*, doch muß ich zugleich, um ziemlich verbreiteten Meinungen entgegenzutreten, darauf hinweisen, daß das Stattfinden einer den oben besprochenen umgekehrten Reaktion unter der Mitwirkung von Enzymen niemals beobachtet worden ist. Man findet wohl die Ansicht vertreten, daß die Veränderung von Zucker in Stärkemehl und die andern analogen Prozesse, die ja in den lebenden Organismen ebenfowohl stattfinden müssen als die umgekehrten Prozesse, welche wir außerhalb von Organismen durch Enzyme bewirken können, das Werk von noch unbekannten Fermenten sei. Diese Ansicht beruht aber nicht auf empirischen Belegen und scheint auch einstweilen hinsichtlich ihrer Leistungen als Hypothese zur Unfruchtbarkeit verdammt zu sein.

Die Reaktion der Aetherbildung oder der Wasserentziehung, oder wie wir sie sonst nennen wollen, ist in Betreff der hier in Rede stehenden Körper auch mit Hülfe von anderen Mitteln schwierig zu erreichen oder gänzlich unausführbar. Nur die Fette lassen sich, allgemein gesprochen, unter hohem Drucke bei einem Uebermaße des sauren Bestandtheils künstlich machen. Bei den Kohlehydraten, in Betreff deren man sich lange vergeblich in dieser Richtung bemühte, scheint man nun endlich auf dem richtigen Wege zu sein. Musculus und A. Meyer ist es geglückt, durch Einwirkung einer ziemlich concentrirten Schwefelsäure, also ganz analog der Erzeugung des Aethyläthers, Glycose (Dextrose?) in eine Art von Dextrin zu verwandeln¹⁾. Andere Funde der Art sind zu erwarten. Für eine Enzymwirkung in dieser umgekehrten Richtung fehlt aber jede Andeutung.

¹⁾ Compt. rend., T. 92, p. 528.

Als eine andere Regel in Bezug auf die Enzymwirkungen ergibt sich das Folgende. *Im Allgemeinen zeigen die Fermente durchaus spezifische Wirkungen*, d. h. Diastase wirkt nicht intervertirend auf Rohrzucker, Invertin nicht spaltend auf das Stärkemehl. Indessen hat diese Regel ihre Ausnahmen, und darum müssen die Einzelfälle besprochen werden, sowie auch die Bedeutung dieser Ausnahmen Erörterung verdient. So ist als erwiesen anzusehen, daß sowohl Ptyalin als das entsprechende Ferment der Pankreasdrüse neben dem vegetabilischen Stärkemehl auch das Stärkemehl (oder vielleicht Erythrodextrin) des Thierreichs, das *Glycogen*, auf ganz analoge Weise umzuwandeln vermögen. Ebenso löst das Ptyalin (oder wenigstens der Speichel) die Cellulose des Stärkemehlkorns. Dagegen wirken die diastatischen Fermente nicht auf das Glycosid, Salicin oder Amygdalin, auch nicht auf Rohrzucker, Arabin und Inulin.

Andere Enzyme, so namentlich das Emulfin, haben einen verhältnißmäßig ausgebreiteten Wirkungskreis. Emulfin zerfpaltet Salicin, Helicin, das Glycosid der Salicylsäure und viele andere Glycoside. Ebenso wirkt das Myrofin nicht bloß auf den schwefelhaltigen Körper des schwarzen Senffamens, das myronsaure Kali und Myronsäure selber, sondern auch noch auf viele andere analog konstituirte Körper. Die Wirkung des Myrofins kann aber nicht vertreten werden durch Emulfin oder das Speichelferment.

Ich selber habe festgestellt, daß Invertin unwirksam ist gegenüber Inulin, Arabin, Milchzucker, wie aus den Daten hervorgeht, welche unter der Bezeichnung Versuchsreihe 32 in dem zehnten Abschnitte dieser Monographie mitgetheilt sind.

Die meisten dieser letztgenannten Thatfachen sind ungefähr gleichzeitig auch von Kjeldahl gefunden worden, welcher ferner das Invertin auch dem Dextrin und der Maltose gegenüber indifferent gefunden hat.

Von weiteren Thatfachen ist endlich noch anzuführen, daß das Invertin auch keine Einwirkung auf den der Maltose analogen, aber vielleicht nicht mit derselben identischen Körper, den Nasse Ptyalose genannt hat, besitzt. Daß Ptyalin selber sich diesem Stoffe gegenüber indifferent verhält, versteht sich von selbst.

Aus alledem sehen wir den eben ausgesprochenen Satz als Regel bestätigt, daß nämlich *die Wirkung der Enzyme*, so übereinstimmend sie sind hinsichtlich der Reaktion, die sie bewirken, doch eine *durchaus spezifische* ist. *Zu der Spaltung eines bestimmten Kohlehydrats, Eiweißkörpers oder Neutralfettes unter Wasseraufnahme ist im Allgemeinen ein ganz be-*

stimmter Fermentkörper nöthig; sicherlich sehr im Gegensatz zu den gewöhnlichen chemischen Wirkungen in derselben Richtung; denn die Säuren, die zu ganz denselben Reaktionen im Großen und Ganzen befähigt erscheinen, wirken eine jede, wenn sie nur kräftig genug ist, auf ein jedes der fraglichen Anhydride.

Mit der neuerdings durch Nägeli aufgeworfenen und seitdem vielseitig ventilirten Frage nach der Wärmetönung bei den Fermentprozessen habe ich mich in dieser Monographie nicht beschäftigt aus dem Grunde, weil ich das für die Beantwortung dieser Frage vorliegende erfahrungsgemäße Material für ungenügend erachte.

Ich selbst habe bei meinen enzymotischen Versuchen nur eine einzige Thatfache in dieser Richtung gefunden — eine Thatfache, die auch von anderer Seite ungefähr gleichzeitig festgestellt wurde (G. Muffo). Ich meine die ganz unverkennbare und nicht ganz unbedeutende Wärme-Produktion während der Gerinnung der Milch. Dieselbe tritt ganz plötzlich zur Zeit der sichtbaren Gerinnung auf und nicht schon während des dieser vorausgehenden continuirlich verlaufenden enzymotischen Processes, sagt also gar nichts aus über die endo- oder exothermische Natur dieses oder anderer analoger Vorgänge. Meine persönliche Meinung, die lediglich auf theoretischen Gründen fußt, ist einstweilen entgegen der von Nägeli die, daß es sich wohl in allen Fällen von Fermentprozessen um exothermische Vorgänge handeln wird, und daß in dieser Beziehung kein Unterschied zwischen den beiden großen Klassen: Enzymotische Prozesse und ächte Gährungen bestehen wird. Was ich als wirklichen chemischen Unterschied zwischen diesen beiden Klassen von Erscheinungen ansehe, habe ich an einem anderen Orte klar zu legen versucht¹⁾, nämlich bei den *Gährungen: Neuentstehung von Bindungen zwischen Sauerstoff und Kohlenstoff* bei den *enzymotischen Prozessen: Unverändertbleiben der Anzahl solcher spezifischen Bindungsweisen der in's Spiel kommenden Atome*.

VI. Ueber die für Wirkung der Enzyme günstigsten Temperaturen.

In der Literatur find hie und da, wiewohl nicht gar zu zahlreich Angaben über die Temperaturoptima der enzymotischen Prozesse vor-

¹⁾ Ad. Mayer: Lehrb. der Gährungschemie, 3. Ausg. 1879, S. 209.

handen. So wird als das Optimum der *diastatischen Wirkung* ungefähr 65—69° genannt ¹⁾. Die praktischste Maischtemperatur liegt dagegen erheblich niedriger und wird von verschiedenen Gärungstechnikern zwischen 50 und 61° C. angegeben, aus Gründen, die wahrscheinlich mit später bei meinen Invertinversuchen zu besprechenden Gesetzmäßigkeiten in direktem Zusammenhang stehen. Das diastatische Ferment des Speichels, das *Ptyalin*, wirkt dagegen am besten bei niedrigeren Temperaturen. Kühne gibt an bei 35°, Pafchutin bei etwa 39°. Für das *Emulfin* wird etwa 50° als die optimale Wirkungstemperatur angegeben.

Ich würde dergleichen Angaben sorgfältiger gesammelt haben, wenn nicht meine eigenen Studien über diesen Gegenstand, namentlich am *Invertin*, zu dem Resultate geführt hätten, daß dergleichen optimale Temperaturen eigentlich keine konstanten sind, vielmehr ihre Lage einigermaßen abhängig ist von nebenfächlichen Umständen, unter Anderem von der Mischung der Versuchssflüssigkeiten.

Wir werden daher, ehe wir uns auf eine weitere Besprechung des Gegenstandes einlassen, zuerst dieses experimentelle Material hier darzulegen haben.

Versuchsreihe 11.

Es wurden einige Kubikcentimeter einer, soweit zu beurtheilen, gesättigten Invertinlösung (aus Preßhefe) bereitet, dann filtrirt und mit Wasser auf das doppelte Volumen gebracht. Die so bereitete klare Lösung wurde mit der zehnfachen Menge der 10procentigen Zuckerlösung vermischt, dann die so erhaltenen Mischungen genau auf den verschiedenen Temperaturen, die hinsichtlich der Zweckdienlichkeit für den Invertirungsprozeß untersucht werden sollten, erhalten, nach ca. 5 Stunden rasch auf die Temperatur des Zimmers gebracht und polarisirt. Die dabei erhaltenen Resultate waren die folgenden:

Temperatur der Einwirkung.	Ablefung am Polarisations-Instrumente.	Procentisch intervertirt überhaupt.	pro Stunde.
10°	+ 10.3	31.1	6.2
20°	5.7	51.5	10.3
30°	3.5	61.3	12.2
40°	5.8	51.1	10.2
45°	10.9	28.4	5.7
50°	15.3	9.0	1.8.

Also das Optimum schien bei ungefähr 30° zu liegen. Um den

¹⁾ Pafchutin in Reichert u. Du Bois-Reymond's Archiv, 1871, S. 365.

Verlauf der Kurve jedoch in der Gegend des Optimums genauer verfolgen zu können, wurde bei Temperaturen, die diesem Optimum nahe liegen, eine weitere Versuchsreihe begonnen.

Versuchsreihe 12.

Genau wie die vorige Versuchsreihe, nur daß die Invertinlösungen erst den Zuckerlösungen beigemengt wurden, nachdem die letzteren auf die entsprechenden Intervertirungstemperaturen gebracht waren. Als Resultate dieser Reihe habe ich mitzutheilen:

Temperatur der Einwirkung.	Ablefung nach $\pm$ 5 Stunden.	Procentisch intervertirt überhaupt.	pro Stunde.
20°	+ 7.3	44.4	8.9
24°	6.0	50.2	10.0
28°	5.6	52.0	10.4
32°	5.3	53.3	10.6
36°	6.4	48.4	9.7
40°	8.7	38.2	7.6.

Das Optimum würde also nach diesen Versuchen ungefähr bei 31° C. anzunehmen sein, auffallend niedrig gegenüber den Erfahrungen bei anderen Fermenten.

Ferner fällt bei Befichtigung der Versuchsresultate der ersten Reihe in's Auge, daß die Kurve — und das ist meines Wissens eine Eigenschaft aller Temperaturkurven physiologischer Wirkungen — einen viel rascheren Abfall nach oben zeigt, als das Ansteigen von unten beginnt. 10° ist noch etwas weiter von dem Optimum entfernt als 50°; und doch ist bei ersterer Temperatur die Intervertirung noch günstiger als selbst bei 45°.

Endlich ist vielleicht bemerkenswerth, daß die Kurve ungefähr einen Verlauf hat, als sollte die Wirkung des Invertins schon dicht bei dem Nullpunkt beginnen und ziemlich genau bei der Tödtungstemperatur des Ferments erlöschen.

Es erschien mir von einigem Interesse neben der eben geprüften Abhängigkeit auch die Einwirkung der Temperatur auf die Zuckerintervertirung, wenn dieselbe durch Säuren bewirkt wird, zu studiren.

Zu diesem Zwecke wurden 30 ccm der bekannten 10procentigen Rohrzuckerlösung mit 2 ccm etwa 5procentiger Salzsäure versetzt, bei verschiedenen Temperaturen eine bestimmte Zeit lang erhitzt und dann nach rasch erfolgter Abkühlung polarisirt.

Versuchsreihe 13.

Das Resultat einer solchen Versuchsreihe war:

Temperatur der Einwirkung.	Ablefung nach 3½ Stunden.	Procentisch intervertirt überhaupt.	pro Stunde.
10°	16.7	2.7	0.8
20°	15.1	9.6	2.7
30°	11.0	27.8	7.9
40°	0.1	76.6	21.9
50°	— 4.9	98.6	—
60°	— 5.0	100.0	—

Versuchsreihe 14.

Eine zweite Versuchsreihe wurde auf höhere Temperaturen ausgedehnt und die Zeiten so kurz gewählt, daß noch einigermaßen die fernere Steigerung der Wirkung bei höherer Temperatur wahrzunehmen war.

Die Resultate dieser Versuchsreihe waren:

Temperatur der Einwirkung.	Zeit der Einwirkung.	Ablefung nach beendeter Einwirkung.	Procentisch intervertirt überhaupt.	pro Stunde.
30°	30 Min.	15.9	6.1	12
40°	30 »	13.1	18.5	37
50°	30 »	6.5	47.8	96
60°	30 »	— 1.9	85.0	170
70°	30 »	— 5.2	100.0	> 200
80°	30 »	— 5.2	100.0	> 200
90°	20 »	— 5.2	100.0	> 300
100°	12 »	— 5.2	100.0	> 500.

Man sieht also: die Abhängigkeit der Intervertirung unter dem Einflusse von Säuren hat einen ganz anderen Charakter als die, wovon hier eigentlich die Rede war, nämlich den einer rapiden Steigerung bei höherer Temperatur, und wir wissen, daß diese Steigerung noch über den Kochpunkt fortgeht, indem dergleichen Prozesse im zugeschmolzenen Rohre erst recht geschwind verlaufen. Im Verband mit diesen Versuchen ist das Temperaturoptimum bei der Fermentintervertirung wohl so zu erklären, daß an sich die Intervertirung des Zuckers bei je höherer Temperatur je besser vor sich gehe, daß aber von etwa 31° ab das Ferment eine langsame Zersetzung erleide, die bei 51° absolut plötzlich vor sich geht, und daß durch die Kombination dieser beiden Kurven die tatsächlich beobachtete Kurve mit dem Optimum bei ± 31° resultire.

Uebereinstimmend mit dieser Annahme habe ich später auch gefunden, daß so deutlich die Versuchsreihen 11 und 12 auch sprechen, doch die optimale Temperatur der Wirkung des Invertins als keine feststehende angenommen werden darf, selbst wenn das Ferment aus derselben Sorte von Hefe und auf mehr oder minder dieselbe oben beschriebene Weise gewonnen worden ist. Zuerst stieß ich auf dahingehende Beobachtungen, als ich das Wirkungsoptimum der Temperatur für Invertin aus Bierunterhefe festzustellen unternahm.

Versuchsreihe 15.

0.1 g Invertin aus Bierunterhefe ungefähr (d. h. noch nicht mit Einhaltung von quantitativen Verhältnissen) so dargestellt wie oben beschrieben (aus einer Brauerei zu Göttingen und unter Alkohol versandt), aber von mehr pulveriger Beschaffenheit und von ätherischem Geruch, wurde mit Wasser zu 20 ccm Flüssigkeit aufgelöst. Je 2 ccm dieser Lösung wurden mit 20 ccm der 10procentigen Zuckerlösung bei den Temperaturen 28, 32, 36° und einen Tag später neue Portionen bei den Temperaturen 36, 40, 44° 4½ Stunden lang erhalten und dann die Intervertierung mittelst Polarisation festgestellt. Die dabei erhaltenen Resultate waren:

Intervertierungs- Temperatur.	Polarisation im kurzen Rohre.	Procentisch intervertirt überhaupt.	pro Stunde.
28°	+ 2.0	67	15
32°	+ 0.3	76	17
36°	— 1.5	83	19
36°	— 2.1	86	19
40°	— 3.2	91	20
44°	— 4.2	95	21.

Hier war also schon nach den Versuchen des ersten Tages deutlich, daß das Intervertierungsoptimum über 36° lag. Die Versuche des zweiten Tages lehren sogar, daß es auch bei 44° noch nicht erreicht war.

Natürlich lag die Annahme nahe, daß dies eine Absonderlichkeit des Invertins der Unterhefe sei, obschon es auffallend erscheinen mußte, daß gerade die Unterhefe, die auf niedrigere Temperaturen gezüchtet ist, Enzyme besitzen sollte, die erst bei höheren Wärmegraden mit größter Intensität wirksam sind.

Darum wurden wieder Versuche mit dem Invertin der Branntwein-
oberhefe angestellt, um zu prüfen, ob wirklich ein constanter Unterschied vorhanden ist.

Versuchsreihe 16.

0.1 g Invertin aus Preßhefe übrigens genau auf dieselbe Weise (Abtöden der Hefe in Alkohol, Reiben derselben und Wasserextraktion, Niederschlagen mit Alkohol) dargestellt, wurde mit Wasser auf 20 ccm gebracht und $4\frac{1}{2}$ Stunden genau bei den Temperaturen 26, 31, 36° auf das 10fache Volumen der 10procentigen Zuckerlösung einwirken gelassen. Als Resultat ergab sich:

Intervertirungs- Temperatur.	Polarisation im kurzen Rohre.	Procentisch intervertirt überhaupt.	pro Stunde.
26°	+ 11.7	25	5.6
31°	11.4	26	5.8
36°	11.0	28	6.2.

Also auch hier diesmal ein viel höher liegendes Temperaturoptimum und (soviel zu beurtheilen ist) kein stehender Unterschied zwischen dem Invertin der Ober- und der Unterhefe.

Ich will nun zunächst nicht weitere Versuche anführen, aus welchen die wirkliche Lage des Wirkungsoptimums dieser neueren Invertinforten hervorgehen würde, sondern wir bleiben einstweilen bei der soeben eruirten, wie uns scheinen will, nicht unwichtigen Thatfache stehen, daß *verschiedene Invertinpräparate* aus derselben Hefenorte nach nur wenig abweichenden Methoden bereitet, *recht verschiedene Wirkungsoptima* haben können. Die von uns ermittelten Zahlen würden etwa sein 31° einerseits und $\pm 48^\circ$ andererseits.

Dieser scheinbare Widerspruch ist inzwischen von Seiten anderer Forscher noch verschärft worden. Der Däne Kjeldahl hat¹⁾ von zwei Versuchsreihen Mittheilung gemacht, nach welchen (und zwar zufällig auch bei Anwendung von 10procentiger Rohrzuckerlösung) als optimale Wirkungstemperatur des Invertins aus Unterhefe 52.5°, des Invertins aus Oberhefe 56° gefunden wird, während derselbe Forscher gleichzeitig eine Mittheilung von Barth in Erinnerung bringt, nach welcher das Optimum bei 40° zu suchen wäre. Von Versuchsfehlern kann natürlich bei solchen Abweichungen nicht die Rede sein.

Um den Schlüssel zur Lösung dieses Widerspruchs zu finden, werden wir zurückgreifen müssen auf meine früher mitgetheilten Versuche über die Tödtungstemperatur des Enzyms. An sich ist der Intervertirungsprozeß des Rohrzuckers, dessen Spaltung unter Wasseraddition, ein solcher, der bei höheren Temperaturen bis weit über 100° hinaus günstiger und

¹⁾ Meddelelser fra Carlsberg Laboratoriet. 3. Heft.

günstiger verläuft. Dies lehrt uns die Versuchsreihe 13 und 14 mit Säure. Daß bei der Invertirung durch das Ferment eine Grenze sich ergibt, bei welcher eine weitere Temperaturvermehrung anfängt nachtheilig zu wirken, und etwas höher eine zweite Grenze, bei welcher der bei tieferer Temperatur begonnene Prozeß sogar erlischt, diese Erscheinung, die wir näher durch das Errichten einer Invertirungskurve der Temperatur studiren, wird wohl erklärt werden müssen aus der spezifischen Natur des Ferments. — Richtig, das Invertin ist selber empfindlich gegen höhere Temperaturen weit unterhalb des Kochpunkts, und derselbe zunächst noch lockere Zusammenhang zwischen Tödtungstemperatur und Optimum ist auch für alle anderen bekannten Fermente längst festgestellt.

Die ganz auf der Hand liegende Hypothese ist also diese, daß deshalb ein Optimum vorhanden sei, weil bei dieser Temperatur ein Absterben des Ferments beginne und deshalb eine weitere Temperaturerhöhung mehr schädlich als nützlich sei.

Nun erinnern wir uns aus unsern früheren Mittheilungen, daß die Tödtungstemperatur selber variabel ist, daß sie z. B. steigt mit zunehmender Concentration der Invertinlösung, mit Glycerinzusatz, daß sie fällt mit der Anwesenheit von Alkohol, und ebenso mit der Präparirung des Ferments mit diesem schädlichen Agens. Sollte nicht die Variabilität des Optimums hiermit in Verbindung zu bringen sein?

Schon das bis dahin mitgetheilte Versuchsmaterial gewährt in dieser Richtung einige Anhaltspunkte. Obgleich sich Kjeldahl in seinem französischen Texte darüber nicht ausspricht und ich nicht sicher bin, den ausführlicheren dänischen Text genügend zu verstehen, scheint mir doch dieser Forscher zu dem betreffenden Versuche einfach ein Gemenge von Hefe mit etwas Thymol (dies letztere, um das organisirte Ferment außer Thätigkeit zu setzen) verwendet zu haben.

Der absolute Tödtungspunkt des Invertins in der unveränderten Hefe liegt aber nach meiner Versuchsreihe 9 (vergl. meine erste Veröffentlichung a. a. O. und diese Schrift S. 25) bei etwa 66° für Branntweinhefe. Das Optimum von Kjeldahl bei $52,5^{\circ}$ also ungefähr 14° tiefer. Die Tödtungstemperatur meiner meist benutzten Invertinpräparate lag bei $\pm 53^{\circ}$, was Wunder, daß ich Optima fand, die bis auf einige dreißig Grad heruntergingen!

Immerhin sind das nur Vermuthungen, die durch experimentelle Beweise gestützt sein wollen, wenn sie erwähnenswerth erscheinen sollen.

Von derartigen Experimenten sind nun die folgenden angestellt worden.

Zwei vergleichende Versuchsreihen sind unternommen worden, von denen bei der einen ein größerer Alkoholzusatz gemacht war, während bei der anderen ein gleich großer Glycerinzusatz geschehen war. Da Alkohol die Tödtungstemperatur des Invertins herabdrückt, Glycerin dieselbe eher etwas erhöht, so mußte, wenn anders ein Einfluß der Tödtungstemperatur auf das Intervertirungsoptimum wirklich statt hat, bei der Vergleichung dieser beiden Reihen die verschiedene Lage des Optimums — in den eben mitgetheilten Reihen schon angedeutet — sehr deutlich werden.

Versuchsreihe 17.

10procentige Rohrzuckerlösung, die im kurzen Rohre 17,1° polarifirte, wurde mit 10% einer gefättigten aus holländischer Bieroberhefe bereiteten Invertinlösung und 15% 92procentigem Alkohol versetzt, und bei den Temperaturen 40°, 45°, 50°, 10 Stunden lang der Einwirkung des Ferments ausgesetzt, dann im kurzen Rohre polarifirt.

Die Resultate dieser Reihe sind gewesen:

Temperatur der Intervertirung.	Polarifation.	Procentisch intervertirt	
		überhaupt.	pro Stunde.
40°	+ 6.3	37.4	3.7
45°	+ 13.3	2.0	0.2
50°	+ 14.8 ¹⁾	0.0	0.0.

Ein vergleichender Versuch, bei welchem kein Alkohol, sondern die entsprechende Menge von Wasser zugesetzt worden war, ergab bei 50° eine Polarifation von + 0.2 oder 67.6% Intervertirung.

Hieraus folgt, daß Alkohol in größeren Mengen gebraucht (11% reiner Alkohol war ungefähr bei dem Versuche zugegen) die Wirkung des Ferments sehr erheblich schwächt; ferner, daß bei der Gegenwart von so viel Alkohol das Optimum der Intervertirung tief liegt, denn schon bei 45° war kaum noch eine Wirkung zu konstatiren.

Versuchsreihe 18.

Genau ange stellt wie die vorige. Nur daß an Stelle von 10% Alkohol das gleiche Volum Glycerin der Zuckerlösung zugesetzt wurde.

Das Resultat dieser Reihe ist gewesen:

Temperatur der Intervertirung.	Polarifation im kurzen Rohre.	Procentisch intervertirt	
		überhaupt.	pro Stunde.
40°	+ 5.5	40.8	4.1
50°	+ 4.3	47.2	4.7
50°	+ 5.7	40.4	4.0.

¹⁾ Die etwas zu hohe Ziffer kommt durch eine geringfügige Concentrations-Vermehrung in Folge nicht gänzlich verhinderter Verdampfung.

Hier liegt also das Optimum, wie deutlich zu erkennen ist, dicht bei 45°, bei einer Temperatur also, wo bei der vorigen Reihe (mit Alkohol) die Wirkung schon beinahe erloschen war. *Die erwartete Verschiebung des Optimums ist also eingetreten.*

Auch der Glycerinzusatz hatte die *absolute* Wirkung des Ferments herabgesetzt.

Durch die eben beschriebenen Versuchsreihen dieses Abschnitts wird also nachgewiesen, daß das Temperaturoptimum der Invertinwirkung keine constante Zahl sein kann, daß dasselbe abhängig ist, abgesehen von den Verschiedenheiten der intervertirenden Fermente unter sich, von der Beimischung schädigender Agentien und zwar in der Weise, daß die fermentfeindlichen Agentien, welche die Tödtungstemperatur des Invertins herabsetzen, auch das Temperaturoptimum seiner Wirksamkeit herunterdrücken.

Noch ein weiterer Versuch wurde angestellt, woraus die Wirkung eines Alkoholzusatzes auf die Lage des Optimums der Intervertirung ebenso deutlich hervorleuchtet.

Versuchsreihe 19.

Daselbe Invertin aus Bieroberhefe, welches zu den vorigen Versuchsreihen gedient hatte, wurde benutzt und daraus eine möglichst gesättigte Lösung bereitet.

Zu dieser Lösung wurde so viel Alkohol zugesetzt, daß noch eben keine bleibende Fällung entstand. Wie aus älteren Versuchsreihen (7 und 8) hervorgeht, ist dann ungefähr 10—15% Alkohol in der Fermentlösung anwesend. Diese Fermentlösung wurde mit der zehnfachen Menge 10procentiger Zuckerlösung, die im kurzen Rohre zu 18.9 polarisirte, vermengt, und eine Portion bei 26°, eine bei 34°, 42°, 50° 6 Stunden erhalten. Darnach abgekühlt wurden Resultate erhalten, die sich aus folgender Zusammenstellung erkennen lassen:

Temperatur der Intervertirung.	Polarisation im kurzen Rohre.	Procentisch intervertirt überhaupt.	pro Stunde.
26°	— 2.9	89	15
34°	Versuch verunglückt		
42°	— 3.8	94	16
50°	— 3.3	91	15.

In diesem Versuche ist also das Optimum erreicht und überschritten und wird nahe bei 42° angenommen werden dürfen, wenn auch die weiten Intervalle eine genaue Bestimmung desselben nicht zulassen.

Die Zahlen gewinnen erst wieder Bedeutung, wenn wir sie mit einer Versuchsreihe vergleichen, die genau unter denselben Bedingungen angestellt ist, nur daß kein Alkohol während des Processes gegenwärtig war.

Versuchsreihe 20.

Ganz so wie die vorige, nur daß zur Invertinlösung an Stelle von Alkohol das gleiche Volum Wasser zugesetzt worden war. Die Resultate dieser Reihe sind im Folgenden zusammengestellt:

Temperatur der Intervertirung.	Polarisation im kurzen Rohre.	Procentisch intervertirt überhaupt.	pro Stunde.
26°	— 1.5	83.0	13.8
34°	wegen Trübung nicht abzulesen ¹⁾	86.4	14.4
42°	— 3.0	89.4	14.9
50°	— 2.9	89.0	14.8.

Charakteristisch für diese Reihe gegenüber der vorausgehenden ist, daß für die Intervertirungstemperatur 42° und 50° ungefähr dasselbe Resultat erreicht wurde. Das Optimum muß also in der Mitte liegen und kann ungefähr bei 45° angenommen werden, jedenfalls deutlich höher als bei der Anwesenheit von einer kleinen Menge von Alkohol. Von anderen Folgerungen aus diesen beiden Versuchsreihen soll einstweilen nicht die Rede sein.

Hier interessiert uns zunächst die Thatfache, daß Alkohol das Optimum der Intervertirung herabdrückt — Alkohol, der, wie wir mehrfach gesehen haben, auch die Tödtungstemperatur des Ferments herabsetzt.

Ferner folgt aus der Vergleichung der beiden Versuchsreihen, daß in diesem Falle die Anwesenheit einer kleinen Menge von Alkohol günstig auf den Verlauf der Intervertirung eingewirkt hat. Dies ist insofern auffallend, als durch den Vergleich der Versuchsreihe 8 und 8a und noch mehr aus der Versuchsreihe 17 die umgekehrte Folgerung sich ergibt. Allein der Widerspruch ist nur ein scheinbarer, da nämlich in den verschiedenen Fällen nicht genau die gleichen Mengen Alkohol anwesend waren. Es verhält sich offenbar damit, wie mit dem Kochsalze bei der Labgerinnung²⁾. Ein geringer Zusatz befördert den Prozeß, ein größerer benachtheiligt denselben.

¹⁾ Diese verloren gegangene Zahl war durch Vergleichung mit anderen Versuchsreihen leicht zu ergänzen.

²⁾ Vergl. meine Mittheilungen in «Milchzeitung» 1881, Januar, und in dieser Schrift weiter unten S. 80.

Es dürfte somit als erwiesen anzusehen sein, daß wirklich der Zusammenhang zwischen Tödtungstemperatur und Optimum besteht, wie wir ihn unterstellt haben. Weil nun weiter auch ohne Alkoholzusatz und dergleichen Kunstmittel Invertinpräparate von verschiedenen Tödtungstemperaturen bekannt sind, so müssen denselben auch ebenso verschiedenartige optimale Wirkungstemperaturen entsprechen, und das Bestreben, eine einzige Zahl für ein solches Optimum aufzufinden, muß illusorisch bleiben — so lange wenigstens bis wir gelernt haben, die verschiedenen Invertinforten als solche zu individualisiren und rein darzustellen.

Stellen wir nun die gleiche Untersuchung bei andern Enzymen an.

Versuchsreihe P 4.

Verdauungsproben, bestehend aus 0,012 g Pepfin mit Wasser, das mit $1\frac{1}{2}\%$ rauchender Salzsäure veretzt war, auf $2\frac{1}{2}$ ccm gebracht und darin die kleinen Eiweißstückchen von früher beschriebener und allezeit gleicher Größe eingelegt, wurden bei der in der folgenden kleinen Tabelle aufgezeichneten Temperatur in Wirkung gesetzt. Die Dauer bis zur völligen Verdauung wurde constatirt und findet sich gleichfalls hier unten aufgezeichnet.

Verdauungstemperatur.	Zeit bis zur völligen Verdauung.
20°	in 19 Stunden noch nicht verdaut.
24°	» » » » » »
28°	» » » » » »
32°	» » » » » »
36°	15 St. 09 Min.
40°	18 » 19 » .

Ueber Nacht waren die Verdauungsflüssigkeiten kalt gestellt, und diese Stunden sind nicht mitgezählt. Nach dieser Versuchsreihe, in welcher übrigens die zugesetzte Menge von Salzsäure eine für die Verdauung ungünstig große war, wäre etwa 36° die günstigste Temperatur für die Pepfinwirkung.

Versuchsreihe P 5

wurde mit einer passenderen Menge (0.5 % rauchender) Salzsäure und bei etwas höheren Temperaturen, sonst aber ganz wie die vorige Reihe unternommen. Die Verdauungsflüssigkeit betrug in jedem Falle 2 ccm. Der Versuch gab folgende abweichende Resultate:

Temperatur.	Dauer bis zur völligen Verdauung.
35°	7 St. 50 Min.
40°	6 » 10 »
45°	4 » 45 »
50°	3 » 40 »
55°	3 » — »

Hiernach find, wenigstens bis 55° (wenige Grade darüber erlischt die Fermentkraft des Pepsins), die Wirkungen desselben mit der Temperatur ansteigende. Diese Resultate sind für uns maßgebend, und wir können es einstweilen dahingestellt sein lassen, ob bei dem starken Salzfäuregehalt das Optimum sich so weit nach unten verschiebt.

Daß in diesem Falle Optimum und Tödtungstemperatur so nahe zusammenfallen, ist so zu erklären, daß Pepsin unterhalb seiner Tödtungstemperatur nicht einem langsamen Absterben unterliegt (vergl. Versuchsreihe 39, S. 39).

Weiter haben wir von Versuchen mit Chymosin zu berichten:

Versuchsreihe L 1.

6 halbe Liter derselben frischen Milch wurden in 6 verschiedenen Wasserbädern auf verschiedene Temperaturen zwischen 20 und 50°/o gebracht und annähernd constant erhalten, 0.1 ccm (0.02°/o) Labextrakt¹⁾ hinzugefügt, umgerührt²⁾, dann regelmäßig die Temperatur und die Zeit bis zur eintretenden Gerinnung beobachtet.

Als Eintritt der Gerinnung wurde angenommen der Augenblick, wo die Milch beim Neigen des Becherglases sich in einem deutlichen Rand abhob. Die angeführten Temperaturen sind aus den einzelnen abgelesenen interpolirt.

Es wurde auf diese Weise gefunden:

Temperatur.	Zeit bis zum Gerinnen.
23.5°	178 Min.
29.5°	80 »
33.0°	65 »
38.5°	52 »
44.8°	gerinnt nicht.
50.0°	» »

¹⁾ So kleine Mengen Lab können natürlich nicht direkt, sondern erst nach zuvor stattgehabter bekannter und starker Verdünnung mit einiger Genauigkeit abgelesen werden.

²⁾ Das Unterlassen des Umrührens hat, wie man leicht begreift, und wie ich

Die Milch, auf 50° erhitzt, hat indeffen ihre Gerinnungsfähigkeit nicht verloren; nach Abkühlung auf 35° und nach erneutem Zusatz der gleichen Menge Lab gerinnt sie innerhalb 51 Minuten.

Schon aus der vorliegenden kleinen Reihe ist zu ersehen, welchen Einfluß die Temperatur besitzt. Nicht weit von 38° liegt das Optimum; wenige Grade darüber hat die Wirkung gar nicht statt, obschon, wie frühere Versuche beweisen, unter diesen Umständen das Labferment noch nicht zersetzt wird. Trotzdem kann auch in diesem Falle die naheliegende Grenze mit der Tödtung des Enzyms bei diesen Temperaturen in Zusammenhang gebracht werden, da — wie Versuchsreihe 36 (S. 37) lehrt — das Chymosin auch bei relativ niedrigen Temperaturen rasch eine große Schwächung erleidet. Von 38° abwärts scheint die Intensitätskurve allmählich zu sinken, um unterhalb 30° mit beschleunigter Geschwindigkeit sich dem Nullpunkt zu nähern.

Auch diese Kurve hat also die Gestalt wie alle bis jetzt bekannten «physiologischen Kurven».

Langsameres Aufsteigen bis zu einem gewissen Optimum bei lauwarmen Temperatur, dann sehr viel plötzlicheres Abfallen bei größerem Wärmegrade. Als eine interessante Besonderheit erscheint vielleicht, daß die Kurve ziemlich deutlich die Gestalt besitzt der möglichen Blutwärme der Warmblüter. Ungefähr 37° ist bekanntlich die des gefunden Thieres, Leben ist noch möglich einige Grade darüber und viele Grade darunter (Winterschlaf). Dann nach oben plötzlicher Absturz und nach unten langsames Erlöschen. Ob man darin mehr als eine mnemotechnische Beziehung suchen darf, lasse ich einstweilen dahingestellt.

Es war natürlich zu wünschen, das Optimum der Gerinnung etwas genauer zu kennen. Daher

Versuchsreihe L 2

mit 3 Proben Milch von $\frac{1}{2}$ Liter.

Dieselben wurden mit 0.02 % des gleichen Labextraktes, das zum vorigen Versuche diente, versetzt. Der Versuch wurde diesmal so vorgenommen, daß die Milchproben in demselben Wasserbade auf einige 40° erwärmt wurden. Dann wurde die Flamme gelöscht, und das Ganze der Selbstabkühlung überlassen. Das Labextrakt wurde der ersten Probe

durch einen besonderen Versuch erhärtet habe, nicht bloß ein abnormes und ungleichmäßiges Coaguliren, sondern auch eine Verzögerung desselben zur Folge.

Milch beigelegt, nachdem die Temperatur von 40° erreicht war. Bei einer Temperatur von 36° geschah der Zusatz zur zweiten Probe, bei einer Temperatur von 32° zur dritten Probe. Bis zum Eintritt der jeweiligen Gerinnung wurden weitere Temperaturbeobachtungen gemacht und aus denselben für jede Probe die mittlere Temperatur, welcher die Milch bis zur Gerinnung ausgesetzt war, berechnet. Diese Methode erscheint zulässig, weil wegen der langsamen Abkühlung die mittlere Temperatur nicht sehr verschieden war von der Anfangstemperatur.

Die Resultate lassen sich auf folgende Weise darstellen:

Mittlere Temperatur bis zur Gerinnung.	Zeit bis zur Gerinnung.
39°	35 Min.
33.7°	45 »
30.9°	51 » .

Das Optimum liegt hiernach jedenfalls oberhalb 34° , aber ist nicht genau festgestellt.

Versuchsreihe L 4

bestehend aus 5 Einzelversuchen.

In einem und demselben Wasserbade wurden 5 Bechergläser mit Uhrgläsern bedeckt, ein jedes $\frac{1}{2}$ Liter der gleichen frischen Milch enthaltend, auf 40° erhitzt, dann die Flamme gelöscht und, nachdem das Thermometer 45° bzw. 42 , 39 , 36 , 33° erreicht hatte, je einem Bechergläse 0.04% oder 0.2 ccm frisches Hansen'sches Käseab beigelegt, gut gemischt und bei jeweiliger genauer Temperaturbeobachtung der Zeitpunkt der Gerinnung festgestellt. Ueber den weiteren Verlauf der Versuche geben die folgenden Daten genauen Aufschluß.

Zeit.	Temperatur.	Lab beigelegt.	Gerinnt.
9 h. 18 min.	45°	Glas I	—
— » 22 »	44.2°	—	—
— » 27 »	43.5°	—	—
— » 32 »	42.8°	—	—
— » 39.5 »	42.0°	Glas II	—
— » 52 »	40.6°	—	Milch in Glas I
10 » 3 »	39.6°	—	Milch in Glas II
— » 9 »	39.0°	Glas III	—
— » 19 »	38.2°	—	—
— » 32 »	27.2°	—	Milch in Glas III

Zeit.	Temperatur.	Lab beigelegt.	Gerinnt.
10 h. 48.5 min.	36.0°	Glas IV	—
11 » 3 »	35.05°	—	—
— » 13 »	34.4°	—	Milch in Glas IV
— » 21 »	34.05°	Glas V	—
— » 44 »	32.9°	—	—
— » 58 »	32.3°	—	Milch in Glas V.

Hieraus berechnet sich, was die mittleren Temperaturen angeht, durch geeignete Interpolationen:

Mittlere Gerinnungstemperatur.	Zeit bis zum Gerinnen.
42.6°	34.0 Min.
40.6°	23.5 »
38.1°	23.0 »
35.2°	25.0 »
33.2°	37.0 »

Das Optimum für die Gerinnung liegt also nahe bei 39°, dann (mit Berücksichtigung der ersten Versuchsreihe) sehr rascher Abfall nach oben zu; ein langsamerer nach den tieferen Temperaturen. Eine wesentliche Beschleunigung des Abfalls scheint bei $\pm 33^\circ$ einzutreten.

Keines der Enzyme wirkt also schon bei gewöhnlicher Temperatur am energischsten. Eine Temperaturerhöhung auf die Blutwärme oder in vielen Fällen erheblich darüber ist allemal nöthig. Dagegen ist *nachgewiesen*, daß die Enzyme schon bei gewöhnlicher Temperatur eine, wenn auch sehr geringe Wirkung besitzen, so z. B. durch Dubrunfaut für das Invertin selbst bei dem Gefrierpunkte. Für Diastase ist wenigstens die Wirkungsfähigkeit bei 5° C. nachgewiesen. Ja das diastatische Ferment der Kartoffeln erzeugt gerade bei tiefen Temperaturen große Mengen von Zucker (Süßwerden der Kartoffeln), was übrigens H. Müller-Thurgau, der die einschlagenden Verhältnisse genau untersucht hat, nicht einer erhöhten Wirkung des Ferments, sondern einer unter diesen Umständen vergrößerten Fermentmenge zuschreibt¹⁾.

Mit der Erhöhung der Temperatur tritt eine ziemlich der Wärmeskala proportionale Steigerung der Wirkung ein, bis in die Nähe des Optimums. Der Abfall der Kurve jenseits desselben ist ein viel plötzlicherer. *Die Wirkungskurve der Temperatur hat in allen Fällen eine Form, die den physiologischen Kurven der Temperatur eigenthümlich ist.*

¹⁾ Landw. Jahrb. 1882.

Ferner folgt aus den Thatfachen dieses Abschnitts, daß die optimalen Temperaturen der Wirkksamkeit der Enzyme keine constanten sind, sondern in ähnlicher Weise variiren, wie die Tödtungstemperaturen derselben. Mittel, die die letzteren verändern, haben auch auf die ersteren einen analogen Einfluß.

VII. Ueber die Beimengungen, welche sich für die Wirkung der Enzyme günstig erwiesen haben.

Viele Angaben liegen vor über die günstige Beeinflussung enzymatischer Prozesse durch beigemengte Körper. Aber nicht leicht wird es sein, bestimmte Regeln in Betreff dieser vielfältigen Thatfachen aufzufinden. Z. Th. mag das auch daran liegen, daß die meisten dieser beeinflussenden Körper nur in einem bestimmten Verhältniß angewendet worden sind, und daß darum die so gewonnene Erfahrung keine allgemeinere Bedeutung besitzt. Es ist mir nämlich in einigen Fällen zu zeigen möglich gewesen, daß ein Variiren der Verhältnisse eine vordem günstige Beeinflussung in ihr Gegentheil verkehren konnte und umgekehrt. Einige Thatfachen in dieser Richtung sollen alsbald mitgetheilt werden. Zugleich wollen wir Mittheilung machen über das Hauptfachliche, was vordem in der Literatur vorlag.

O. Naffe¹⁾ hat mehrere Beobachtungen mitgetheilt, wonach Kohlenfäure einen begünstigenden Einfluß sowohl auf den Fermentprozeß des *Invertins*, als auch auf den des *Ptyalins* haben soll. Nach Baswitz²⁾, der eine ähnliche Regel zunächst auch für den *diastatischen* Prozeß fand, ist diese Regel indessen nicht ohne Ausnahme, indem die günstige Einwirkung von der Stärkeforte abhängig ist, und überhaupt die Wirkung durchaus noch nicht aufgeklärt³⁾.

In anderen Versuchen⁴⁾ hat der erstgenannte Forscher den Einfluß

¹⁾ Pflüger's Archiv, Bd. 15, S. 471.

²⁾ Deutsche chem. Ber., 1879, S. 1827.

³⁾ Nach Naffe soll sogar in reiner Luft, Stickstoff, Sauerstoff und Kohlenoxyd gar kein Intervertirungsprozeß möglich sein und alle Intervertirung unter gewöhnlichen Umständen auf die kleinen Mengen CO₂ zurückzuführen sein, die sich in der ungereinigten Luft befinden — sicherlich ein Versuchsergebnis, das nur unter bestimmten Umständen (vermuthlich, wenn die Versuchssubstanz einer kleinen Anfäuerung bedarf) richtig ist, und ohne eine große Erweiterung der Versuche nicht verallgemeinert werden darf.

⁴⁾ a. a. O., 1875, Bd. 11, S. 138 und bef. 154.

sehr verschiedener *Salze* und auch von *Alkaloiden* auf mehrere enzymotische Prozesse erörtert. Dabei ergab sich, daß die fermentative Intervertierung des Rohrzuckers durch verschiedene der gewöhnlichsten *Ammoniaksalze* in 4procentiger Lösung stark begünstigt wird, während einige im übrigen analog constituirte *Alkalisalze*, namentlich *Chlorkalium* eine ganz entgegengesetzte Wirkung ausübten. Außerordentlich wurde der gleiche Prozeß begünstigt durch schwefelfaures *Veratrin* und durch *Curare*.

In einem Falle fand Naffe die Invertinwirkung durch 10⁰/₀ Chlorammonium in der Flüssigkeit selbst verfünffacht¹⁾.

Auf die Menge des Zusatzes, der auf seinen Einfluß geprüft werden soll, ist in allen Fällen genau zu achten. Habe ich doch gezeigt, daß durch einen Zusatz von 1—1½⁰/₀ Alkohol — einem in größeren Mengen sehr schädlichen Agens für den Intervertierungsprozeß —, derselbe um einige Procente gesteigert werden kann. Vergleiche die im vorigen Abschnitte mitgetheilte Versuchsreihe 19 u. 20, dagegen auch 17 u. 18.

Bei anderen enzymotischen Prozessen war die Wirkung zuweilen ähnlich, zuweilen recht abweichend. Für den *diastatischen* Prozeß ergaben sich sehr ähnliche Regeln, nur konnte schon Naffe nicht verborgen bleiben, daß ein und daselbe Salz, wie z. B. Kochsalz in gewissen Concentrationen (4⁰/₀) einen förderlichen Einfluß, in anderen, 8⁰/₀ und höher, einen nachtheiligen ausübt. Ich kann aus eigener Erfahrung hinzufügen, daß auch das Chlorkalium, das von Naffe zu den ungünstig wirkenden Salzen gestellt wird, unter Umständen eine günstige Wirkung auf den diastatischen Prozeß auszuüben vermag.

Diese Umstände waren: 10 g Stärke mit 5 cem Malzextrakt (aus 1 g Malz bereitet) und Wasser auf ½ Liter gebracht und dann bei 55° C. 10 Minuten aufeinander einwirken gelassen. Der Gehalt an Zucker wurde sonach mit titrirter Fehling'scher Lösung festgestellt und nach Abzug für den schon im Malzextrakt vorhandenen Zucker 2.69 g Zucker gefunden. Der gleiche Versuch wurde wiederholt nach Zusatz von 0.2 g Chlorkalium, wonach 2.88 g Zucker auf die gleiche Weise gefunden wurde.

In einem dritten Versuche wurde der Chlorkaliumzusatz auf 1 g erhöht, und unter diesen Umständen ein weiterer Zuwachs an Zucker, nämlich 2.92 g erhalten.

¹⁾ Pflüger's Archiv, Bd. 14, S. 475.

Diese Versuchsresultate widersprechen keineswegs denen von Naffe, indem dieser das Chlorkalium in 4procentiger Lösung einwirken ließ. Ich dagegen hatte es nur mit Concentrationen von 0.04 und in letzterem Falle von 0.2 % in Bezug auf Chlorkalium zu thun. Eine so kleine Menge scheint also den diastatischen Prozeß zu begünstigen. Größere Mengen benachtheiligen denselben.

Die Wirkung des *Ptyalins* wird u. A. sehr unterstützt durch die gleichzeitige Anwesenheit von den Acetaten von Chinin, Strychnin und Morphin, ebenso von Curare. Eine bestimmte theoretische Beziehung erhellt aus diesen Thatfachen einstweilen nicht. Der diastatische Prozeß wird nach Beobachtungen von Kjeldahl durch die Anwesenheit von kleinen Mengen von Säuren (bis zu 0.025 % Schwefelsäurehydrat) begünstigt¹⁾, durch die von größeren nicht, aber in dem ersteren Falle wohl nur, weil Säure und Diastase in einer und derselben Richtung wirken. Größere Mengen von Säuren thun aber, wie wir früher gesehen haben, dem Fermente selber Nachtheil. Größere Zusätze von Atropin heben nach Detmer die diastatische Wirkung auf.

Die Wirkung des *Trypsins* wird begünstigt durch die Anwesenheit von Chlornatrium und von glykollsaurem Natron, ebenso durch 1 % Soda in der pankreatischen Flüssigkeit, vermuthlich weil die unmittelbaren Produkte dieser Verdauung sich in diesen Salzen leicht lösen (Heidenhain).

Andere Beobachtungen beziehen sich auf die Milchgerinnung durch Lab. Schon O. Hammarsten²⁾ hatte erwiesen, daß ein geringer Zusatz von Kochsalz (0.25 %) die Milchgerinnung durch das Labferment begünstigt. Ich selber fand das Optimum des Zusatzes erheblich höher (etwa 0.9 %). Aber da Milch und Milch verschiedene Dinge sind, so haben derartige Differenzen nichts Auffallendes. In anderen Versuchen hat Hammarsten denn auch thatsächlich höhere Optimalziffern gefunden.

In diesem speziellen Falle erscheint auch eine Theorie der betreffenden Einwirkung nicht allzuschwierig. Da nämlich bei der Käsegerinnung Mineralsalze nothwendig mitwirken, so kann es nicht Wunder

¹⁾ Auf die schon im Texte mitgetheilten Thatfachen sind auch die Angaben von Detmer zurückzuführen über Einwirkung von organ. Säuren und Kohlensäure auf den diastatischen Prozeß. Vergl. Sitzungsber. der Jena'schen Gesellsch. für Medicin und Naturw., 1881.

²⁾ Vergl. dessen: Zur Kenntniß des Cafeins etc. Upsala 1877, S. 70.

nehmen, daß auch solche Salze, find es auch nicht gerade diejenigen, die selber bei der Gerinnung mit niederfallen, einen sekundären Einfluß auf den Prozeß (durch Umsetzungen der die Salze constituirenden Bestandtheile) gewinnen können.

Sehr ausführliche Versuche liegen ferner von L. Wolberg¹⁾ über die Beeinflussung der *Pepfinwirkung* durch verschiedene Alkalifalze vor; und diese Versuche erscheinen von besonderem Werth, weil sie mit sechserlei Concentrationen von $\frac{1}{2}$ —8 0/0 der Salze durchgeführt sind.

Verdaunungssubstrat war Fibrin, dessen unverdauter Antheil nach Abschluß des Versuchs zurückgewogen und wonach der quantitative Effekt bemessen wurde. Sieht man von Differenzen unterhalb eines Procentes ab — und auf solche ist sicherlich gar kein Gewicht zu legen — so beweisen die Versuche, daß nur durch die Anwesenheit von $\frac{1}{2}$ 0/0 Kochsalz²⁾ in der Verdauungsflüssigkeit der Fermentprozeß begünstigt wurde, daß im Uebrigen aber bei der großen Variation von Salzen nur hemmende oder gleichgültige Wirkungen zu verzeichnen sind. Um auch über die letztgenannten eine Ueberlicht zu geben, so kann kurz gesagt werden, daß in stärkeren Concentrationen alle Alkalifalze hemmend wirken, am wenigsten noch die Ammoniakfalze — was mit den Studien von Nasse am Intervertirungsprozeß in Uebereinstimmung steht. — Ferner, daß bei schwächeren Concentrationen (bis zu 4 0/0) die meisten Alkalifalze ohne Einwirkung sind, und daß unter diesen Umständen nur die Sulfate einen fermentfeindlichen Charakter besitzen. Bei noch kleineren Concentrationen ist dagegen schon entschieden schädlich der Borax, der eben in die Gruppe der gährungs- und fermentfeindlichen Substanzen gehört.

Auch mit Alkaloïden hat der gleiche Forscher gearbeitet, hat aber allein für das schwefelsaure Chinin mit einiger Wahrscheinlichkeit eine minimale Begünstigung des enzymotischen Processes durch Pepfin constatirt.

Die *Fibringerinnung* wird nach Alex. Schmidt³⁾ unter Umständen durch Zusatz von einer kleinen Menge (0.2—0.5 0/0) Kochsalz begünstigt.

So bunt die in diesem kurzen Abschnitt skizzirten Thatfachen erscheinen mögen, so ist doch Eines durchaus charakteristisch, d. i. die

¹⁾ Vergl. Pflüger's Archiv, Bd. 22, S. 291.

²⁾ Noch günstiger wirken kleinere Mengen von Kochsalz nach Grützner, ebenda, Bd. 12, S. 299.

³⁾ Pflüger's Archiv, Bd. 13, S. 111.

außerordentliche Empfindlichkeit aller enzymotischen Prozesse für gewöhnliche Neutralsalze und andere chemische Körper, welche in keiner Weise sichtlich an denselben sich betheiligen. Man halte hierneben, wie sich ein gewöhnlicher chemischer Prozeß, am liebsten ein solcher, der ein gleiches Endresultat mit einem enzymotischen Prozesse besitzt, den gleichen Beimengungen gegenüber verhält.

Nasse hat zufällig auch vergleichende Versuche neben der Rohrzuckerinvertirung durch Invertin, mit der gleichen Invertirung durch Schwefelsäure angestellt und gleichfalls Alkalisalze in den üblichen Concentrationen beigelegt. Wenn er 4% Sulfat, ziemlich gleichgültig ob von Kali, Natron oder Ammoniak, beilegte, so sank die Invertirungsgröße auf ziemlich genau ein Drittel der ursprünglichen und auch bei Verminderung des Zusatzes wurde niemals ein positives Resultat erreicht. Wurde dagegen Invertin angewendet, so verdoppelte Ammonsulfat (zu 4% angewendet) die Wirkung, Natronsulfat verstärkte sie um 10%, Kalisulfat schwächte sie um 10%.

Wir haben mithin zu constatiren: *spezifische Einwirkungen der mannigfaltigsten, schwierigst zu übersehenden Art, wie sie rein chemischen Prozessen fremd zu sein pflegen, welche dagegen in ähnlicher Weise mehrfach bei physiologischen Prozessen beobachtet worden sind.*

VIII. Quantitative Beziehungen zwischen der Menge von angewendetem Enzym und dem Wirkungseffekt. Wird das Enzym durch seine fermentative Thätigkeit zerstört?

Es ist keine unwichtige Sache für die Theorie der enzymotischen Wirkungen, quantitativ das Verhältniß zwischen Menge anwesenden Ferments und dem Wirkungseffekte festzustellen; denn es leuchtet ja ein, daß dies Verhältniß mit der Frage nach der unbegrenzten Wirkung der Enzyme in Zusammenhang steht.

Bei mehreren Fermentkörpern bin ich in dieser Richtung thätig gewesen, und auch das vordem schon anwesende experimentelle Material ist gar nicht unbedeutend.

Auch solche Versuchsreihen werden dabei mit in Betracht gezogen werden dürfen, bei welchen nicht der in einer gegebenen Zeiteinheit sich darstellende Wirkungseffekt als solcher gemessen ist, sondern umge-

kehrt die Zeiten bestimmt wurden, innerhalb deren eine gewisse Wirkung sich vollzog, wenn nur in diesem Falle die Proportionalität zwischen Zeit und Wirkung bei Anwesenheit einer und derselben Enzymmenge durch besondere Experimente festgestellt, oder der Einfluß einer Abweichung in dieser Beziehung auf das Resultat genügend erörtert ist.

Umgekehrt ist es dagegen bei denjenigen Versuchsreihen, bei welchen die Fermentwirkung in ihrer Abhängigkeit von der anwesenden Menge Enzyms festgestellt wurde, gleichgültig, ob ein bekanntes Verhältniß zwischen Zeit und Wirkung existirt oder nicht, da ja in derartigen Versuchen die Zeiten gleichgemacht sein müssen, und also auch verwickelte Funktionen der Zeit aus den Gleichungen eliminirt werden. Allerdings müssen wir uns bei derlei Betrachtungen vor einer allzu mechanischen Behandlung der Zeitfunktion, wozu wir durch einfache Herübernahme der entsprechenden Formeln aus der theoretischen Physik wohl geneigt sind, hüten, uns vielmehr fragen, warum etwa eine unproportionale Wirkung in der Zeit möglich sei. Dann werden wir uns sagen müssen, weil mit der Zeit entweder etwas Ferment zerstört oder dessen Wirkung durch sich anhäufende Zerfallsprodukte schwieriger wird. Wir werden auf diesen Punkt noch zurückkommen.

Anlangend die *quantitativen Verhältnisse der diastatischen Wirkung* geben die mehrerwähnten Versuche des Dänen Kjeldahl einigen Aufschluß. Verwendete er unter übrigens gleichen Verhältnissen 2 ccm Malzextrakt, so erhielt er 0.313 g Zucker; nahm er 4 ccm, so erhielt er 0.596 g. Bei der Verdreifachung der ursprünglichen Menge von Ferment wird das gemessene Produkt 0.864 g. Das ist, was man nennen kann, eine etwas *abgeschwächte Proportionalität*¹⁾. Der Grund der Abschwächung liegt auf der Hand, da in einer begrenzten Menge von Lösung bald ein Ueberschuß des wirkfamen Agens keine Arbeit mehr findet. Diese Erklärungsweise leuchtet am besten ein, wenn man die Zahlenreihen genauer prüft, da gerade bei den kleinsten Mengen von Ferment die Proportionalität sich beinahe ungetrübt zeigt, während bei steigender Fermentmenge endlich die Menge desselben beinahe jeglichen Einfluß verliert.

Wenn wir bei Versuchsergebnissen die Abweichung von der Theorie aus bekannten Gesichtspunkten befriedigend erklären können, dürfen wir

¹⁾ Ganz ähnliche Erfahrungen hat Baßwitz bei analogen Versuchen gemacht. Vergl. Ber. der deutschen chem. Gesellsch. 1879, S. 1830.

von jener abstrahiren und die Resultate als mit der Theorie in Uebereinstimmung erklären. So können wir behaupten, daß experimentell erwiesen sei, das diastatische Ferment wirke in der Zeiteinheit proportional seiner Menge.

Auf eine etwas andere sehr bequeme aber freilich auch nicht sehr genaue Weise hat Paschutin¹⁾ dergleichen Versuche mit dem Ptyalin angestellt. Er wählte nämlich die Wirkungszeiten proportional den Verdauungsgraden und constatirte qualitativ die ungefähr gleichstarke Zuckerreaktion. Abgesehen von der geringen Genauigkeit sind diese Versuche nur indirekt beweisend für den debattirten Satz, da erst eine proportionale Wirkung in der Zeit vorausgesetzt werden muß. Es gelten daher hierfür die Bemerkungen, die weiter unten beim Chymosin wiederholt worden sind.

Für das diastatische Enzym des Thierkörpers, das *Ptyalin*, hat der genannte dänische Forscher ganz ähnliche Verhältnisse festgestellt als bei der vegetabilischen Diastase, wie beistehende kleine Uebersicht zeigt.

Angewendete Menge Speichel.	Producirter Zucker.
0.25 ccm	0.40
0.5 »	0.82
0.75 »	1.21
1.0 »	1.55
1.5 »	2.16.

Erst bei der sechsfachen Menge der ursprünglichen erleidet die Proportionalitätsregel eine Abschwächung, aber nur weil man sich nahe an der Grenze des Möglichen befindet; denn auch 5 ccm Speichel vermochten unter den gleichen Verhältnissen nur eine Menge Zucker zu erzeugen, die durch die Zahl 2.57 ausgedrückt ist.

Dieselben quantitativen Beziehungen beim *Invertin* zu erörtern, habe ich zum Gegenstande besonderer Untersuchungen gemacht.

Versuchsreihe 23.

0.1 g Invertin wurde mit Wasser in Lösung und auf 10 ccm gebracht, diese Lösung, nachdem dieselbe noch filtrirt worden war²⁾, so dann mit der zehnfachen Menge der 10procentigen Rohrzuckerlösung vermisch. Dieselbe Invertinlösung wurde mit Wasser auf $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$,

¹⁾ Reichert u. Du Bois-Reymond, Archiv 1871, S. 359.

²⁾ Unterläßt man dieses, so werden die Zahlen etwas unregelmäßiger. Vergl. Zeitschr. für Spiritusindustrie, 1882, Nr. 2.

$\frac{1}{16}$ verdünnt und diese verdünnten Lösungen im gleichen Verhältnisse mit der Zuckerlösung vermischet. Nach 4 Stunden wurde polarisirt und dabei die folgenden Resultate erhalten:

Menge des Invertins vom Zucker.	Ablefung nach $\pm$ 4 Stunden.	Procentisch intervertirt überhaupt.	pro Stunde.
1 ‰	+ 1.6	70.0	17.5
0.5 »	7.8	38.2	9.5
0.25 »	12.4	21.8	5.5
0.12 »	14.5	12.5	3.1
0.06 »	15.8	6.7	1.7.

Nach 24 Stunden wurden die folgenden Zahlen gefunden:

Menge des Invertins vom Zucker.	Ablefung nach $\pm$ 24 Stunden.	Procentisch intervertirt überhaupt.	pro Stunde.
1 ‰	— 5.6	100	—
0.5 »	— 4.2	95.3	4.0
0.25 »	+ 2.8	64.4	2.7
0.12 »	+ 8.9	37.3	1.6
0.06 »	+ 14.0	14.7	0.6.

Eine volle Proportionalität zeigen diese Zahlen nicht und können sie nicht zeigen, da ein Uebermaß von Invertin am Ende keine Arbeit mehr findet. Aber innerhalb der rationellen Grenzen kann auch hier sehr annähernd das Gesetz bestätigt gelten, daß die Wirkung proportional ist der Menge des anwesenden Invertins.

Von Interesse erscheint noch, daß die Wirkung in Reihe 23 durchgehends schwächer ist als in anderen Reihen, bei denen die Enzymlösung nicht zuvor filtrirt worden war, woraus sich ergibt, daß die abfiltrirten Theile der 1 procentigen Invertinemulsion noch wirksames Ferment enthielten, sei es, daß 1 Theil Invertin mehr als 100 Theile Wasser bedarf, um sich zu lösen, oder, was wahrscheinlicher ist, die aufgelösten Theile einer fremden Beimengung Ferment der Lösung entzogen, welches erst nach der Vermengung mit Zuckerlösung nach und nach in Lösung ging und zur Wirksamkeit gelangte¹⁾.

Bei dem *Invertin* wurde weiter noch eine Versuchsreihe ausgeführt,

¹⁾ Die Barth'schen Versuche (Ber. der deutschen chem. Gesellsch. 1878), in welchen wohl die Menge von Zucker gegenüber einer gleichbleibenden von Invertin variiert wurde, bei denen aber immer nur die gleiche Wassermenge zugegen war, sind für die vorliegende Erörterung nicht zu brauchen. Sie lehren nur das Optimum der Concentration = $12\frac{1}{2}$ ‰ Zucker (nach Kjeldahl 20 ‰) für den Intervertirungsprozeß kennen.

welche die Frage nach der *Proportionalität der Wirkung des Invertins mit der Zeit* zum Gegenstand hatte.

Versuchsreihe 1.

20 cem Rohrzuckerlösung mit 2 cem einer sehr verdünnten Invertinlösung (Präparat nach Donath) vermischt, wurde tagelang bei gewöhnlicher Zimmertemperatur stehen gelassen und von Zeit zu Zeit durch Polarifiren der Grad der Invertirung nachgegangen:

Zeit.	Ablefung im langen Rohre.	Procentisch intervertirt überhaupt.	in 1 Stunde.
Unmittelbar . . .	+ 34.2	1	1.0
nach 1 Stunde	+ 33.9	1.6	
» 17 $\frac{1}{2}$ »	+ 26.4	18.2	1.0
» 22 $\frac{1}{2}$ »	+ 24.1	23.4	
» 44 »	+ 16.6	39.8	0.8
» 95 »	+ 4.7	66.2	0.5
» 120 »	+ 1.1	74.4	0.3
» 145 »	— 2.9	83.2	0.35
» 169 »	— 6.2	90.6	0.35.

Der Prozeß verläuft also *keineswegs proportional* der Zeit, sondern immer *langfamer und langfamer* und nur die ersten beiden Tage und dann zuletzt, nachdem er schon bis $\frac{2}{3}$ beendet ist, einigermaßen constant.

Wir haben nun zwar in der Einleitung zu diesem Abschnitte gesehen, daß dieses Verhalten, theoretisch aufgefaßt, vielleicht gleichgültig ist für die Beweiskraft derjenigen Versuchsreihen, welche (wie 23) die annähernde Proportionalität zwischen Fermentmenge und Wirkung beweisen. Allein wir bedürfen diese Reihe für spätere Schlußfolgerungen.

Als Ursache für den unproportionalen Verlauf des Processes mit der Zeit sind drei Möglichkeiten in's Auge zu fassen:

1. Es könnte das Ferment durch seine Thätigkeit selber regelmäßig eine Zerstörung erleiden — eine Möglichkeit, die noch am Schlusse dieses Abschnitts ausführlich experimentell widerlegt werden wird.

2. Eine andere Möglichkeit, durch welche sich die beobachtete Unproportionalität nur zu einer scheinbaren gestalten würde, nämlich daß die Polarisationen nicht als wirklicher Maßstab für die verrichtete chemische Veränderung zu gebrauchen wäre, etwa dadurch, daß das Drehungsvermögen der erzeugten Produkte sich noch nachträglich änderte, ist bei der Einfachheit der Invertirungsreaktion nicht sehr wahrscheinlich

und die einzige Erfahrung, die hinsichtlich der Dextrose in dieser Richtung bekannt ist — nachträgliche Verminderung der Rotation — würde in einem dem beobachteten umgekehrten Sinne wirken.

3. Bleibt also nur die schädliche Einwirkung der Produkte der enzymatischen Wirkung auf diese Wirkung selber. In Bezug auf diesen Punkt sind nun thatsächlich Versuchsreihen angestellt, wenn auch nicht ausschließlich zu diesem Zwecke. So lehrt Versuchsreihe 26, von der gleich die Rede sein wird, eine kleine Schwächung in Folge von anwesendem Invertinzucker kennen. Besseren Aufschluß gibt aber die folgende nicht anderweitig verwerthete Versuchsreihe.

Versuchsreihe 41.

Zwei Portionen 10procentiger Rohrzuckerlösung von 50 ccm wurden mit 5 ccm einer ungereinigten wässrigen Invertinlösung versetzt, einen Tag lang bei den günstigen Temperaturen von 32—34° erhalten und wiederholt polarisirt, mit dem folgenden Resultate:

Mischung.	Polarisirt nach Stunden.	Im langen Rohre.	Abnahme pro Stunde.
1	0	+ 33.9	} } } 2.0 % 2.2 % 1.2 %
1	1	+ 31.9	
1	4	+ 25.0	
1	23 Std. 40 Min.	+ 5.2	
1a	0	+ 33.9	} 1.4 %
1a	22 Std. 50 Min.	+ 1.3	

Also wieder die Erscheinung der sich langsam vermindern den Abnahme und nicht allzu ungleichmäßig in den beiden gleichartigen Versuchen.

50 ccm der gleichen Rohrzuckerlösung wurde mit der gleichen Menge mit Hülfe von Schwefelsäure bereiteten und sodann wieder gereinigten Invertinzuckerlösung vermischt, auch mit 5 ccm der gleichen Invertinlösung versetzt, und die Polarisation in diesem Falle wie folgt gefunden.

Nach Stunden.	Im langen Rohre.	Abnahme pro Stunde.
0	+ 12.3	} } 0.3 % 0.4 %
4	+ 11.2	
22 Std. 30 Min.	+ 3.2	

Die letzteren Abnahmen müssen verdoppelt werden, da sie mit procentisch halb so viel Invertin erzeugt sind, als die erst mitgetheilten

Zahlen, und das Invertin bei so großer Verdünnung proportional wirkt der vorhandenen Menge. Wir finden dann, daß die ursprüngliche Wirkung, im Mittel 1.3 durch die Anwesenheit des Invertzuckers vermindert ist auf 0.8.

Es scheint sonach wirklich die *beobachtete Schwächung* in dem Verlauf der Reaktion ihre Erklärung zu finden in *der Anhäufung der Zersetzungsprodukte*, wie ja auch beim diastatischen Prozesse, bei welchem im Uebrigen die Verhältnisse minder durchsichtig liegen, die Anwesenheit von Maltose, die endgültige Verwandlung alles Dextrins in dieses Endprodukt des Prozesses unmöglich macht.

Dies ist ein weiterer Grund, den wir vorhin bei Besprechung der Versuchsreihe 23 noch nicht berücksichtigt haben, warum bei den höheren Concentrationen die Proportionalität zwischen Enzymmenge und dem Effekt des Prozesses die Abschwächung erleiden mußte, die in den Versuchsergebnissen sich zu erkennen gab.

Auch das bekannteste der *peptonbildenden Enzyme* wurde von mir in der gleichen Richtung untersucht. Wir haben hier anzuführen:

Versuchsreihe P 3,

in welcher das Folgende festgestellt wurde. Mit Glycerin und Alkohol in früher besprochener Weise dargestelltes Pepfin wurde in Salzsäure in der Art gelöst, daß alle dargestellten Portionen von je 2½ ccm gleiche Mengen von Salzsäure enthielten, aber Mengen von Pepfin von 1 mg zu 20 mg aufsteigend.

In jede der Lösungen wurde ein Eiweißstückchen, 8 mg schwer, gebracht, und alle in ein gemeinschaftliches Wasserbad, das auf Bluttemperatur erhalten wurde, eingesenkt.

Eine Verdauung der Eiweißstückchen wurde erzielt in den folgenden Zeiten:

Pepfin angewendet.	Zeit bis zur vollendeten Verdauung.
0.001 mg	15 Std. 05 Min.
0.002 »	12 » 35 »
0.005 »	7 » 30 »
0.01 »	6 » 20 »
0.02 »	5 » 20 »

Ein Einfluß der Menge des Pepfins ist in dieser Reihe deutlich zu erkennen, aber es wäre falsch, dabei von einer Proportionalität reden zu

wollen. Außerdem ist hier nothgedrungen¹⁾ die Zeit, in welcher sich gleiche Wirkungen vollzogen, als Maßstab genommen, und nicht diese Wirkungen selber in der Zeiteinheit.

Es ist klar und auch im Laufe der Darstellung dieses Gegenstandes ausgesprochen, daß dieses Quiproquo bloß zulässig ist, wenn außerdem nachgewiesen ist, daß die Wirkung einer und derselben Fermentmenge proportional der Zeit sei; oder aber wenigstens nachgewiesen ist, daß eine in dieser Richtung bestehende Unproportionalität nicht veranlaßt wird durch eine während des Prozesses eintretende Zerstörung von Enzym. Dies zu erörtern ist nun bei der Pepfinwirkung nicht wohl thunlich, da uns ein Maßstab fehlt, um den Verdauungsakt in allen seinen verschiedenen Stadien dem Grade seiner Vollendung nach abzuschätzen. Dazu müßten wir ein Mittel haben, die gebildeten Peptone in jedem beliebigen Augenblicke quantitativ zu bestimmen. Eine derartige Methode ist aber zur Zeit nicht ausgearbeitet.

Alles in Allem genommen kann die Versuchsreihe mit Pepfin keine Stütze abgeben für die Regel, welche wir in Betreff der Wirksamkeit mehrerer anderen Enzyme bestätigt finden. Aber sie spricht auch keineswegs gegen die Regel, denn wenn wir annehmen, daß die Wirkung einigermaßen proportional der Zeit erfolge, oder aber, daß wie bei der Invertinwirkung eine deutlich erkennbare Abschwächung, die indessen nur herrührt von der Anhäufung der Zeretzungsprodukte, vorliege, dann ist die Abweichung der Zeiten, in welchen verschiedene Pepfinmengen die Verdauung vollenden, von der Proportionalität mit diesen Mengen dem Sinne nach eine solche, wie sie sich bei dem Vorhandensein einer beschränkten Zahl von Angriffspunkten von dem gelösten Enzyme einem ungelösten Substrate gegenüber voraussehen läßt.

Die genauesten und vielfältigsten Versuche in Bezug auf diese quantitativen Verhältnisse der Wirksamkeit stehen uns in Bezug auf das Enzym des Labes, das *Chymosin*, zu Gebote.

Ich führe hier nur meine Versuche an, obgleich älteren Versuchen, u. A. denen von Soxleth, die Priorität zukommt.

¹⁾ Man könnte in diesem Falle allerdings auch die in gleichen Zeiten unverdaut gebliebenen Eiweißstoffe als experimentelle Daten gebrauchen — wie dies von anderen Experimentatoren zu anderen Zwecken auch geschehen ist. Allein, da es Zwischenprodukte gibt, zwischen ungelöstem Eiweiß und Fibrin und fertigem Pepton, so ist damit die Aufgabe noch keineswegs gelöst.

Versuchsreihe L 5.

Zu je $\frac{1}{2}$ Liter frischer Kuhmilch wurde 0.05—0.3% Hansen'sches Labextrakt zugefügt und bei constanter Temperatur von 35° die Zeit bis zur Gerinnung beobachtet.

Es wurde gefunden:

Menge von Lab.	Zeit bis zur Gerinnung.	Produkte beider Größen.
0.05 %	146 Min.	7.3
0.10 »	72 »	7.2
0.20 »	34 »	6.8
0.30 »	22.5 »	6.75.

Die Proportionalität ist also so vollständig, als sie bei dergl. Versuchsanstellungen immer zu erwarten ist. Aber es handelt sich wieder um eine umgekehrte Proportionalität der Zeit, die bis zur Vollendung des Processes verstreicht, nicht um eine direkte Proportionalität der Wirkung selber mit der Menge anwesenden Enzyms. Wir sehen uns zu dieser Darstellungsweise gezwungen, weil der Milchgerinnungsprozeß sich noch schwieriger wie der Verdauungsprozeß in jedem Stadium unterbrechen und quantitativ constatiren läßt.

Die Gerinnung selber ist zwar nach den Versuchen von Hammarsten und meinen eigenen erst der letzte Abschluß eines langsam sich entwickelnden Processes, aber wir kennen keine anderen Symptome dieses, als eben die wirkliche Gerinnung.

Es fragt sich also wieder, hat der Prozeß in seinen unbekannten Einzelheiten einen Verlauf proportional der Zeit? Die Beantwortung dieser Frage scheint nach dem eben angedeuteten Zustande unserer Kenntnisse unmöglich.

Und doch, welch' ein merkwürdiger Zufall würde es sein, wenn sich zwei Unregelmäßigkeiten, Unproportionalität von Zeit und Wirkung und Unproportionalität von Menge von Enzym und Wirkung, sich compensirten zu einer so vollständigen Proportionalität, wie die angeführte und andere Versuchsreihen sie darlegen¹⁾. — Erwägt man dies, so gewinnt man auch aus den betreffenden Versuchen einen Beitrag für die Regel, *daß enzymotische Prozesse im Allgemeinen verlaufen mit einer Intensität, direkt proportional mit der anwesenden Menge von Enzym.*

¹⁾ Um die Größe dieser Unwahrscheinlichkeit zu begreifen, thut man wohl, die betreffenden Sätze mathematisch zu formuliren.

Wird das Enzym durch seine fermentative Thätigkeit zerstört?

Eine weitere mit dem Vorigen in Zusammenhang stehende wichtige Frage, die ich mir speziell bei meinen Invertinversuchen zu beantworten vorgesetzt hatte, ist die, ob das Enzym während des Fermentationsprozesses eine Zersetzung erleidet. Die betreffende Frage ist mehrfach für andere Fermente, jedoch wohl nicht immer mit dem nöthigen Ernste ventilirt oder sogar in dem einen oder dem andern Sinne beantwortet. Bei dem Pepsin hat man wahrgenommen, daß die schon erlöschende Verdauung durch neuen Zusatz von Salzsäure und Verdünnung mit Wasser wieder angeregt werden kann; aber es erscheint bei Außerachtlassen aller quantitativen Verhältnisse wohl etwas voreilig, daraus zu schließen, daß das Pepsin völlig intakt geblieben sei, indem es fraglich ist, ob die vorher eintretende Siftirung des Prozesses der Abstumpfung der Säure und der hemmenden Wirkung der Peptone *allein* in die Schuhe geschoben werden darf, wenn auch mit Sicherheit erwiesen ist, daß sie Theil daran haben. — Für das fettspaltende Enzym der Pankreasdrüse hat man positiv behauptet, daß die Wirkung desselben keine unendliche sei. Ebenso Panchutin für das Ptyalin, Grützner für das Pepsin und andere Enzyme; indessen auch in diesem Falle ohne bindende Beweise¹⁾.

Bei dem Labferment hatte ich früher geglaubt, für eine ähnliche Entscheidung eintreten zu müssen, da durch Lab geronnene Milch keinen erheblichen Einfluß auf weitere Milchgerinnung zu besitzen scheint.

Versuchsreihe L 30.

$\frac{1}{2}$ Liter frische Milch wurde auf gewöhnliche Weise mit 0.2 ccm Hanfen'schem Labextrakt bei 37.5° zur Gerinnung gebracht. Zugleich wurde versucht, ob eine Kleinigkeit früher zum Gerinnen gebrachter Milch Einfluß auf die Gerinnung von frischer Milch hatte, und als dies nicht der Fall war, wurde die soeben geronnene Milch mit der gleichen Menge frischer gut vermengt und die erneute Gerinnung abgewartet. War das Labferment noch intakt, so konnte bei diesem letzten Versuche wohl wegen der größeren Vertheilung eine kleine Verzögerung der Gerinnung eintreten. Auch konnte die Gerinnung wegen der Anwesenheit schon geronnener Theilchen etwas abnorm verlaufen. Aber die Verzögerung durfte nicht das Vielfache der ursprünglichen Gerinnungsdauer betragen.

¹⁾ Vergl. Pflüger's Archiv, Bd. 12, S. 301.

Das Resultat des Versuchs war aber das folgende:

	Gerinnungszeit.
$\frac{1}{2}$ Liter Milch mit 0.2 ccm Labextrakt	23 Minuten.
» » » » 5 ccm gestern geronnener Milch	400 »
» » » » 5 ccm gestern geronnener Milch und 0.2 ccm Labextrakt	22 »
» » » » $\frac{1}{2}$ Liter der eben geronnenen Milch	200 »

Es ist also deutlich, daß das Lab nach der Gerinnung beinahe alle Fermentkraft verloren hat, ganz abgesehen davon, daß Gerinnungen, die erst nach Stunden erfolgen, stets halb auf spontane Milchsäuregerinnung hinauslaufen.

Das gewonnene Resultat läßt aber noch die zweifache Deutung zu, daß das Enzym wirklich und dauernd zerstört, oder aber, daß dasselbe mechanisch mit dem Käsegerinnfel niedergerissen sei, und dadurch an der weiteren Wirksamkeit verhindert werde.

Dieses Objekt ist also nicht besonders geeignet, die Frage zu entscheiden, da geronnene Milch keinen einer guten Vertheilung günstigen Aggregatzustand besitzt, ja das Ferment durch den gebildeten Käse mit niedergerissen werden wird, und ungelöste Fermente natürlich unwirksam sind. Die Frage wieder an einem besser geeigneten Objekte aufzunehmen, ist augenscheinlich nicht ohne Wichtigkeit; denn wie kann man daran denken, eine allgemeine Theorie der chemischen Fermentwirkungen aufzustellen, ohne zu wissen, ob das Ferment wirklich intakt bleibt. Der alte oft wiederholte Ausspruch, daß die Fermentwirkung in's Unendliche gehe, ist ohnehin mehr ein Bild als eine streng präzisirte wissenschaftliche Meinung; denn sonst würde derselbe durch die Entdeckung der sogenannten «organisirten Fermente», die sich nähren und vermehren, und jedenfalls eine endliche Wirksamkeit zeigen, umgestoßen worden sein. Wir können einstweilen, ohne das Gebiet der Erfahrung zu verlassen, nur behaupten, daß die Wirkung der Fermente ihrer Masse gegenüber ungewöhnlich ausgedehnt sei.

Die Methode, nach welcher die Frage im vorliegenden Falle zu bearbeiten war, erschien vorgezeichnet. Invertin nach stattgehabter Wirkung aus der Invertzuckerlösung zu isoliren, ohne daß dabei ein Verlust eintreten durfte, erschien nicht ausführbar. Man mußte also die ohne Zweifel hemmende Wirkung des Fermentationsprodukts mit in Kauf nehmen. Aber man konnte diese Wirkung durch einen vergleichenden Versuch ebenfalls mit Invertzuckerfatz aber unter Anwendung von frischem

Invertin eliminiren. In diesem vergleichenden Versuche mußte der Invertzucker durch Säure dargestellt, die Säure dann später entfernt werden.

Versuchsreihe 24.

20 ccm einer 10 procentigen Rohrzuckerlösung, die genau wie die früher bereitete polarisirte, wurde mit 2 ccm einer concentrirten und sodann mit Wasser auf die Hälfte verdünnten Invertinlösung bei günstiger Temperatur ($28-30^{\circ}$ C.) einige Stunden lang in Berührung gelassen, bis man — nach vorausgehenden Untersuchungen war man hierzu im Stande — annehmen konnte, daß die Intervertirung vollendet sei.

20 ccm der gleichen Lösung wurde mit 2 ccm einer 5 procentigen Schwefelsäure eine halbe Stunde bis nahe auf den Kochpunkt erhitzt, wodurch derselbe Effekt erzielt sein mußte. Die Schwefelsäure wurde durch Ausfällen mit Barytwasser entfernt und die schwach alkalische Reaktion, durch einen unbedeutenden Ueberschuß des Fällungsmittels erzeugt, nachher wieder mit Kohlenäure weggenommen. Die Invertzuckerlösung wurde dann durch Abfiltriren und sorgfältiges Auswaschen von den Barytsalzen befreit und völlig gewonnen auf das alte Volumen von 22 ccm eingedampft. Sie war schwach gelblich von Aussehen, zeigte aber nahe normale Polarisation (-4.5 im kurzen Rohre).

Beide Lösungen nun, mit Invertin und ohne dasselbe, wurden mit einer neuen Menge, 20 ccm Rohrzuckerlösung und 2 ccm der wie oben beschriebenen verdünnten Invertinlösung vermisch, $4\frac{1}{2}$ Stunden in demselben Wasserbade bei 32° und etwas darunter belassen und dann die Resultate durch Polarisation festgestellt.

	Polarisation im kurzen Rohre.	Procentisch intervertirt überhaupt.	pro Stunde.
Invertin, das schon gewirkt hatte, in der Lösung an- wesend	$- 1.7$	68	15
Kein altes Invertin anwesend	$+ 1.2$	44	10

Man sieht, die Wirkung des noch von der ersten Intervertirung übrigen Invertin ist sehr deutlich zu erkennen. Die Leistung desselben ist selbst 50% vom neu zugesetzten. Die doppelte Wirkung wäre in keinem Falle zu erwarten gewesen, da bei stark concentrirten Fermentlösungen die Wirkung nicht mehr proportional dem anwesenden Fermente steigt. Wir brauchen nur Versuchsreihe 23 (S. 85) nachzusehen und die entsprechenden Concentrationen, 0.5 und 0.25% vom Zucker zu ver-

gleichen, um ganz ähnliche Verhältnisse anzutreffen. Die Frage freilich, ob das schon in Wirkung gewesene Invertin auch keinerlei Schwächung seines Fermentvermögens erfahren habe, läßt sich auf Grund dieser Versuchsreihe nicht mit Sicherheit entscheiden.

Versuchsreihe 25.

Eine neue Reihe wurde unternommen mit der einzigen Modification, daß die schon in Wirksamkeit gewesene Invertin enthaltende Zuckerlösung keinen neuen Zusatz von Ferment erhielt, sondern einfach mit 10% Wasser versetzt wurde. Außerdem wurde die für eine genauere Berechnung unerläßliche Maßregel genommen, daß auch nach der ersten Invertirung die präsumptiv vollständige Invertirung durch Polarisation geprüft wurde. Diese Polarisation war nach Behandlung mit Schwefelsäure und Entfernung der letzteren im kurzen Rohre — 4.4 statt — 5.2, nach der Behandlung mit Invertin — 4.1 statt — 5.2.

Die Wirkung hatte also in beiden Fällen nahe die mögliche Grenze erreicht. Dann wurde also beiden Flüssigkeiten eine der ursprünglichen Zuckerlösung gleiche Menge Rohrzuckerlösung zugegeben, die in dem Falle der Vermischung der mit Schwefelsäure bereiteten Invertzuckerlösung mit 10% der halbgefättigten Invertinlösung, im andern Falle, wo noch die gleiche Menge von schon in Thätigkeit gewesenem Invertin zugegen war, nur mit einem gleichen Volumen Wasser versetzt war. Die zweite Einwirkung dauerte 3 Stunden bei Optimaltemperatur. Das Resultat dieser Versuchsreihe ist gewesen:

	Polarisation im kurzen Rohre.	Procentisch intervertirt überhaupt.	pro Stunde.
Frisches Invertin	+ 4.4 . . .	18 . . .	6
Gebrauchtes Invertin	+ 4.7 . . .	17 . . .	5.8.

Bei dieser viel beweiskräftigeren Versuchsreihe konnte also gar keine erhebliche Verschiedenheit in der Wirksamkeit schon gebrauchten Ferments gegenüber frischem constatirt werden.

Es ist mithin anzunehmen, daß das *Invertin durch seine Wirksamkeit in seiner Fermentkraft nicht beeinträchtigt wird, resp. beeinträchtigt zu werden braucht*¹⁾. Diese Schlußfolgerung wird bestätigt durch das Resultat

¹⁾ Eine wenn schon dunkle Andeutung dieser Gesetzmäßigkeit findet sich bei einem Versuche Pafchutins (Reichert u. Du Bois-Reymond's Archiv 1871, S. 361/62) obgleich dieser Forscher anlangend die Conservirung des Speichelferments zu dem entgegengesetzten Resultate kommt.

späterer Polarisationen der gleichen Versuchsfüssigkeiten, nachdem dieselben über Nacht bei gewöhnlicher Temperatur gestanden und dann noch 35 Minuten lang auf die für die Invertirung optimale Temperatur erhitzt worden waren. Darnach wurde gefunden:

	Polarisation im kurzen Rohre.	Procentisch intervertirt überhaupt.	pro Stunde ¹⁾ .
Frisches Invertin	— 0.8 . . .	64.8 . . .	4.9
Gebrauchtes Invertin	— 1.1 . . .	68.4 . . .	5.1.

Mithin wieder sehr übereinstimmende Zahlen, nur daß die zu vernachlässigende Abweichung diesmal im umgekehrten Sinne statt hat. Wie sie entstanden ist, vermag ich nicht anzugeben, doch ist darauf hinzuweisen, daß die Flüssigkeit, in welcher die erste Intervertirung mittelst Schwefelsäure vorgenommen wurde, nach der Behandlung mit Baryt etwas gelblich gefärbt zu erscheinen pflegt. Hierdurch wird die Genauigkeit der Ablefung in diesem Falle etwas beeinträchtigt. Genug, die vorgefundenen Unterschiede fallen gänzlich in's Bereich der Versuchsfehler, die man im vorliegenden Falle zugestehen muß.

Noch ein dritter Versuch in der gleichen Richtung wurde auf folgende Weise angestellt.

Versuchsreihe 26.

a) Invertzucker, aus 2 g Rohrzucker auf dieselbe Weise, wie oben beschrieben, bereitet, wurde auf 22 ccm gebracht und polarisirte in dieser Verdünnung im kurzen Rohre — 4.8. Diese Lösung wurde vermisch mit 20 ccm 10procentiger Rohrzuckerlösung, welche eine Polarisation von + 18.9 unter gleichen Umständen zeigte, und 2.25 ccm einer aus Bieroberhefe bereiteten (nicht sehr kräftigen) Invertinlösung.

b) Zum vergleichenden Versuche wurden 20 ccm der 10procentigen Rohrzuckerlösung genommen, mit 2 ccm der gleichen Invertinlösung versetzt, 24¹/₂ Stunden bei 32° C. belassen, von einer kleinen Bakterien-trübung abfiltrirt, und im kurzen Rohre polarisirt. Resultat: — 2.2, so daß also die Intervertirung noch nicht ganz vollständig beendet war. Diese Lösung wurde nun wieder vermisch mit 20 ccm der ursprünglichen Rohrzuckerlösung und 2 ccm Wasser.

Beide Lösungen nun, von denen die erste eine Kleinigkeit mehr noch ungebrauchten Invertins enthielt, die zweite solches, das schon

¹⁾ Dabei die 20 Stunden gewöhnliche Temperatur in ihrer Wirkung gleichgesetzt mit 10 Stunden optimaler Temperatur.

24 Stunden lang mit Erfolg wirksam gewesen war, und welche beide nahe die Hälfte Invertzucker neben Rohrzucker befaßen, wurden bei der für die Invertirung sehr günstigen Temperatur $+ 32^{\circ}$ C. 24 Stunden lang im gleichen Wasserbade belassen, dann die geringen Mengen durch Verdampfung verlorenen Wassers ersetzt, filtrirt und polarisirt.

Das Resultat war:¹⁾

- a) frisches Invertin — 3.2
b) gebrauchtes Invertin . . — 4.4.

Das Resultat des Versuchs ist wiederum, daß das Invertin — wenn man nicht, wie dies wohl in früheren Versuchsreihen geschehen, unnöthig hohe Temperaturen verwendet — während es seine Wirkung ausübt, nicht zerstört wird.

Ist dieses Resultat einmal auch nur für ein einzelnes Enzym mit der nöthigen Sicherheit erlangt, so ist die allgemeine Frage im Principe eigentlich beantwortet. Denn die fragliche Hypothese sagt ja mit Nichten aus, daß Enzyme nicht zerstört werden können, und es ist auch von ihr ausgehend nichts Wunderbares dabei, daß in anderen Fällen mehr oder weniger Enzym verloren geht. Es handelt sich ja lediglich darum, daß dies nicht durch den enzymatischen Prozeß selber erfolgt, sondern durch andere nebenfächliche Umstände. Hierin liegt der entscheidende Punkt gegenüber den gewöhnlichen chemischen Prozessen, bei welchen so etwas nicht der Fall sein kann.

¹⁾ Eine weitere Umrechnung auf Procente erscheint nicht nöthig. Es ist deutlich, die Wirkung war im zweiten Falle noch etwas stärker als im ersten. Der Grund für diese kleine Differenz mag z. Th. in der etwas größeren Menge von zu intervertirendem Rohrzucker im ersten Falle liegen, z. Th. darin, daß der mit Schwefelsäure intervertirte Zucker in Folge der Behandlung einige z. Th. bräunlich gefärbte Beimengungen enthielt, die hemmend wirken konnten. Daß diese Hemmung übrigens in diesem Falle nur klein war, geht aus dem Vergleich des Versuchs *b* am ersten Versuchstag mit dem Versuch *a* am zweiten Versuchstag hervor. Im ersten Falle Intervertirung von $+ 18.9$ auf $- 2.2$ oder nach Korrektur wegen des Zusatzes von 10% Flüssigkeit $- 2.4$, also gleich 21.3.

Im zweiten Falle von $+ 6.8$ auf $- 3.5$ unter Anbringung der gleichen Korrektur, also gleich 10.3.

Diese letztere Zahl muß aber zur richtigen Vergleichung verdoppelt werden, da die gleiche Polarisationsdifferenz für die doppelte Menge Flüssigkeit auch den doppelten Effekt bezeichnet. Also das Verhältniß ist $= 21.3 : 20.6$, oder eigentlich, da die Menge von verwendetem Invertin im Verhältniß stehen, wie $2 : 2.25 = 10.6 : 9.1$.

Dies beiläufig, um etwas zur Erklärung der kleinen Differenz beizutragen.

Ich habe eingangs dieses Abschnitts auf die Beziehung der vorliegenden Frage zu den quantitativen Verhältnissen zwischen Enzym, Wirkung und Zeit hingedeutet. Machen wir Gebrauch von derselben, so haben wir noch weiteres Material für die Prüfung des oben gewonnenen Satzes. Mehrere Enzyme wirken in der Zeit proportional ihrer Menge, andere vollenden eine bestimmte Wirkung in einer Zeit, die umgekehrt proportional ist der angewendeten Menge. Würden diese Gesetzmäßigkeiten möglich sein, wenn durch die Wirkung selber Zerstörung stattfände? — Sicherlich nein. Denn in beiden Fällen müßte die Proportionalität verschoben werden durch die Zerstörung von Ferment proportional der Wirkung, wodurch die schwächeren Enzymlösungen relativ stärker getroffen würden. Wir schließen also auch hieraus, *die Enzyme werden durch ihre Wirkung als solche nicht gestört.*

IX. Einwirkung von Enzymen und enzymotischen Prozessen aufeinander. Verhalten derselben gegen Gährungserreger und andere niedere Organismen.

Seit durch von Nägeli die Frage der Einwirkungen von Gährwirkungen auf einander besprochen und wahrscheinlich zu machen versucht worden ist, daß eine jede der anderen schädlich sei, besitzt natürlich die gleiche Frage auch für die enzymotischen Prozesse, die soviel Aehnlichkeit mit jenen zeigen, gleichwohl aber durch eine immer fester werdende Grenzlinie von ihnen geschieden erscheinen, ein bedeutendes Interesse.

Gewisse Erfahrungen in dieser Richtung sind durch eine Reihe von zufälligen Beobachtungen gegeben. Der Pankreasfaft enthält bekanntlich mehrere sehr verschiedenartig wirkende Enzyme, die, so weit wir sehen, angewiesen sind, in demselben Speisebrei gleichzeitig ihre Wirkung zu äußern.

Für das Chymosin und Pepsin des Magenfaftes gilt wohl daselbe, obwohl diese Meinung angesichts der Unzuträglichkeit einer stark sauren Reaction für das erstere zweifelhaft ist. Eine Beobachtung in umgekehrter Richtung hat W. Kühne gemacht, da er zeigte, daß Trypsin in verdauenden Pepsinmischungen seine Wirksamkeit einbüßt. Das sieht also aus wie ein Verhalten analog den Nägeli'schen Aufstellungen. Doch wird in diesem Falle das Trypsin nicht bloß in seiner Wirkung lahm-

gelegt, sondern selber verdaut, was nichts Anderes beweist, als daß dies Enzym als chemischer Körper aufgefaßt den Eiweißverbindungen nahe steht. Umgekehrt ist dagegen Pepsin in Trypsinlösungen beständig.

Ebenso haben die Amerikaner Chittenden u. Griswold die Verdauung des Ptyalins durch das Pepsin experimentell erwiesen¹⁾.

Da dies zufällig vorhandene Material für ungenügend erachtet wurde die aufgeworfene Frage zu beantworten, so habe ich einen besonderen Versuch, der entscheiden sollte ob es durchgängig sei, daß ein Enzym das andere hinsichtlich seiner Wirkung unterdrücke, in Thätigkeit gesetzt. — Derselbe bestand darin, Milchgerinnung durch Chymosin und Ueberführung von Stärkekleister in Maltose und Dextrin durch Diastase gleichzeitig in einer und derselben Flüssigkeit in's Werk zu setzen.

Versuchsreihe 40.

100 ccm frische Kuhmilch wurde vermengt mit 10 ccm Kleister, dazu so schnell als möglich 1 ccm eines so stark verdünnten Hanfen'schen Labextrakts gefügt, daß er die vorhandene Milch in ungefähr einer halben Stunde festlegen mußte. Ferner wurden noch 2 ccm einer so verdünnten diastatischen Flüssigkeit beigelegt, daß in etwas mehr als in einer halben Stunde das Verschwinden der Stärkereaktion zu erwarten war.

Gleichzeitig wurden noch 4 andere Mischungen mit Weglassung des einen oder des anderen Agens bereitet und alle in einem gemeinschaftlichen Wasserbade erst auf 33°, dann bei langsam steigender Temperatur bis 39° erwärmt.

Die gebrauchten Mischungen waren die folgenden:

	Milch.	Lab.	Kleister.	Diastaselösung.
Nr. 1.	100 ccm	1 ccm	10 ccm	2 ccm
» 2.	100 »	1 »	10 »	— »
» 3.	100 »	— »	10 »	2 »
» 4.	100 »	1 »	— »	— »
» 5.	— »	— »	10 »	2 »

In diesen Mischungen trat nun Gerinnung ein:

Nr. 1. Nach 30 Minuten.

» 2. » 31 »

» 3. Keine Gerinnung.

» 4. Nach 29 Minuten.

Nr. 4 ist hier der Normalversuch ohne weitere Beimengungen. Die

¹⁾ Deutsche chem. Ber. 1882, S. 736.

bloße Beimischung von Kleister hat eine sehr geringe Gerinnungsverzögerung herbeigeführt, ähnlich wie es Wasser auch gethan haben würde. Die Anwesenheit von Diastase aber, die, wie wir gleich sehen werden, wirksam war und wegen der Anwesenheit von Kleister auch wirken konnte, hat diese Verzögerung keineswegs vergrößert. Die Diastase ist also ohne Einwirkung auf die Thätigkeit des Chymosins gewesen.

Etwas anders verhielt es sich mit dem Verschwinden der Bläuung.

Nr. 1. Die Bläuung ist nach 2 Stunden noch nicht völlig verschwunden.

» 2. Die Bläuung bleibt unverändert.

» 3. » » ist nach 2 Stunden völlig verschwunden.

» 5. » » » » 2 » » » »

Normalversuch ist hier Nr. 5 und dieser lehrt uns, daß die Diastase überhaupt etwas langsamer wirkte, als beabsichtigt war. Der Zusatz von Milch allein war auch für diese Wirkung nicht schädlich (Versuch 3). Anders verhält sich Versuch 1; denn eine entschiedene Verzögerung macht sich hier geltend, aber derselbe unterscheidet sich doch ganz und gar vom Versuche 2, in welchem keine Diastase zugegen war. Kein Zweifel besteht also, die Diastase hat gewirkt.

Die immerhin constatirte Verzögerung ist vielleicht auch durch die inzwischen coagulirte Milch, die Diastase mit niedergeschlagen haben muß, bewirkt worden, und nicht dadurch, daß ein anderes Enzym der Diastase in die Quere kam. Aber wir haben hierüber keine Sicherheit, und ich sah auch wenig Möglichkeit, den Versuch so zu variiren, daß dergleichen Schwierigkeiten aus dem Spiele blieben.

Wie dem auch sei, das *eine Ferment ist unverändert geblieben in seiner Wirkungsgröße, das andere jedenfalls auch nicht gänzlich unterdrückt*, wie Nägeli dies für Gährungsorganismen als charakteristisch hinstellt¹⁾. Es besteht also sicherlich nicht ein allgemeines Gesetz, welches ausagt, daß zwei Enzyme in derselben Lösung derartig mit einander in Konkurrenz treten, daß das eine oder das andere in seiner Wirkung unterdrückt wird.

Ferner muß in diesem Kapitel noch die Rede sein von der Beeinflussung der Enzyme durch niedrige Organismen.

Was diese Einwirkung angeht, so habe ich viele Beweise für die *große Unempfindlichkeit der Enzyme*. Allerdings erwähnt Kühne einige Fälle, wo Pepsin und Trypsin durch massenhafte Wucherung von Bakterien

¹⁾ Eine experimentelle Kritik dieser Aufstellung werde ich demnächst in der «Zeitschrift für Biologie» veröffentlichen.

zerstört werden können. Dem gegenüber stehen aber die folgenden genau erörterten Thatfachen.

Versuchsreihe 30.

Von einer so viel wie möglich gefättigten *Invertinlösung* wurde die eine Hälfte kalt gestellt, die andere Hälfte in der Wärme mit einer Kleinigkeit Käse versetzt und so der Fäulniß anheimgegeben. Nach 13 Tagen wurden die Lösungen filtrirt und mit der 10fachen Menge 10procentiger Zuckerlösung versetzt und die letztere bei 32° 3 Stunden auf dieselben wirken gelassen.

Das Resultat war:

Vorausgehende Behandlung der Fermentlösung. Polarisation im kurzen Rohre.

Gefault — 3,2

Ungefault — 1,3.

Die Wirkung der gefaulten Lösung war also noch eine Kleinigkeit kräftiger. Die gewöhnlichen Fäulnißbakterien schädigen also das Invertin nicht in seiner Wirksamkeit.

Ferner:

Versuchsreihe P 6.

Es wurde eine Portion *Pepsinlösung* von geprüftem Verdauungsvermögen kalt gestellt. Eine andere Portion derselben Lösung wurde mit sehr wenig Käse versetzt und bei warmer Zimmertemperatur sich selber überlassen. Nach 17 Tagen, nachdem diese zweite Portion längst von niedrigen Organismen wimmelte, wurde dieselbe filtrirt und zwei Tage später, sowohl mit dieser Lösung als mit der unveränderten in der mehrfach beschriebenen Weise ein Verdauungsversuch angestellt. Verdauungstemperatur 50°. Das Resultat war:

	Verdauungszeit.
Unveränderte Pepsinlösung	4 Std. 15 Min.
Gefaulte »	4 » 35 » .

Die beobachtete Verzögerung ist so unbedeutend, daß sie ohne Bedenken einem Versuchsfehler, vermuthlich durch die Anwesenheit von aus dem Käse gebildeten Verdauungsprodukten, zugeschrieben werden kann.

Auch mit *Labextrakt*, der eine sehr große Neigung besitzt, sich mit Bakterien zu bevölkern, sind durch mich Versuche angestellt worden. Von getrocknetem Kälbermagen wurden zweimal 14 g abgewogen, je 30 g Kochsalz zugefügt und dann mit Wasser auf $\frac{1}{2}$ Liter gebracht.

Eines der Extrakte wurde der winterlichen Temperatur¹⁾ im Freien ausgesetzt, das andere bei Zimmertemperatur erhalten, in Folge davon es schon am 3. Tage durch starke Bakterienentwicklung trübe wurde, während das andere Extrakt hell blieb.

Nach 5 Tagen wurden mit beiden Extrakten Gerinnungsversuche angestellt. Zu jedem Versuch wurde 1 Liter ganz frische Milch genommen und 1 ccm Extrakt. Versuchstemperatur 34—38° C.

Die Resultate dieses Versuchs waren:

Extrakt.	Beginn der Gerinnung.
Ohne Bakterien	nach 17 Min.
Mit » 	» 12 » .

Dann blieben beide Extrakte noch weitere 7 Tage im warmen Raume stehen, worauf auch in dem früher kalt gestellten Extrakte eine Bakterienentwicklung begann. Ein neuer Gerinnungsversuch mit der halben Menge Extrakt ergab dann für das Extrakt mit eben beginnender Bakterienentwicklung 47 Minuten, für das andere mit dauernder Bakterienentwicklung 36 Minuten Gerinnungsdauer.

Manche Bakterienforten unterstützen also die Milchgerinnung, worauf z. Th. die Brauchbarkeit von altem Käse für diese Gerinnung zurückzuführen ist, und woraus wir bereits früher in Uebereinstimmung mit Duclaux die Folgerung gezogen haben, daß manche niedere Organismen Producenten von einem chymosinartigen Fermente sind.

Von einer Schädigung des Enzyms durch niedere Organismen, ist aber in keinem Versuche etwas beobachtet worden. Daher kann es auch nicht Wunder nehmen, daß in einem anderen Versuche von mir das Verfetzen des Labextrakts mit einer tüchtigen Portion von Staub ohne allen Einfluß auf die Fermentkraft desselben war.

Nur sekundär konnte ich zuweilen eine sehr bedeutende Schädigung von Labextrakten durch niedrige Organismen wahrnehmen, wenn nämlich durch dieselben die *Reaktion* in die *alkalische* verändert wurde. Dann ist es aber allein das freie Alkali, das schädlich wirkt. Hierfür die folgenden Belege:

Versuchsreihe L 26.

Am Ende des Jahres 1879 waren eine Reihe Hanfen'scher Labextrakte, dem Handel entnommen, in dem Laboratorium der Versuchs-

¹⁾ Starke Kälte ist natürlich ohne Einwirkung auf Enzymlösungen. Nachgewiesen am Ptyalin bis — 20° C. (Pafchutin).

station sowohl was chemische Zusammensetzung als Fermentvermögen angeht, untersucht worden. Daselbe war geschehen mit einigen Präparaten, die von einem holländischen Fabrikanten Namens Viffer herührten. Die Mehrzahl dieser Präparate waren feither auf einem Regale im Hintergrunde eines Zimmers lose verstopft stehen geblieben und konnten im Sommer 1880 wieder zu vergleichenden Versuchen herangezogen werden.

Die folgende kleine Tabelle enthält die Resultate dieser vergleichenden Versuche in der Weise, daß nicht die zur Gerinnung nöthigen Zeiten, sondern diejenigen mit jenen proportionalen Mengen Lab mitgetheilt werden, welche nöthig sind, um genau in einer Stunde die Milch festzulegen. Diese Mengen von Labextrakt sind dabei in Volumpromillen ausgedrückt.

Für normale Gerinnung war nöthig:

Labextrakt von	Hanfen			Viffer.		
Nr. des Präparats	18	23	26	24	27	
Datum: 2./9. 1879	0,12	—	—	—	—	—
» 24./11. »	—	0,10	—	0,04	—	—
» 4./12. »	—	0,12	0,10	0,06	—	0,06
» 15./6. 1880	—	—	0,35	—	—	—
» 16./6. »	0,18	—	0,31	0,25	—	0,28
» 16./6. »	0,13	—	0,25	0,21	—	0,21.

Von der ursprünglichen Gerinnungs-Kraft ist übrig:

80 % — 32 % 22 % 27 %.

Vergleichen wir mit diesen Resultaten den chemischen und mikroskopischen Befund der verschiedenen Labextrakte:

Hanfen.	
Nr. des Präparats	18 26
Reaktion	Schwach sauer Schwach alkalisch.
Durchsichtigkeit	Hell Nicht ganz hell.
Organismen	Keine Bakterien Viele Bakterien; wenig Schimmel.

Viffer.	
Nr. des Präparats	24 27
Reaktion	Schwach sauer Schwach alkalisch.
Durchsichtigkeit:	Sehr trübe Wenig trübe.
Organismen	Keine Bakterien Wenig Bakterien; Inseln v. Schimmel.

Man sieht schon hieraus, daß die endgültige Reaktion der Extrakte maßgebend gewesen ist für ihr mehr oder minder gutes Konserviren.

Aber halten wir damit zusammen die ursprüngliche Beschaffenheit

der Extrakte zur Zeit, als die ersten Gerinnungsversuche mit ihnen angestellt worden sind:

		Hanfen.	
Nr. des Präparats	 23		 26
Reaktion	 Schwach sauer		Sehr sauer.
Durchsichtigkeit	 Beinahe hell		Hell.
Organismen	 Keine		Keine.
		Viffer.	
Nr. des Präparats	 24		 27
Reaktion	 Schwach alkalisch		Schwachalkalisch.
Durchsichtigkeit	 Beinahe hell		Trübe.
Organismen	 Keine		Keine.

Nr. 18 ist früher nicht untersucht worden. Man sieht also, die Präparate, herrührend aus der Fabrik von Viffer, sind ursprünglich schwach alkalisch, vermuthlich herrührend von einem Zusatze von Borax, für welches Salz der Fabrikant zweckmäßig freie Borsäure wählen würde, und deßhalb gehen sie besonders schnell zurück, ziemlich gleichgültig, ob sie sich dabei stärker oder schwächer trüben oder ob Organismen-Entwicklung in ihnen mehr oder minder überhand nimmt. Bei den Hanfen'schen Präparaten ist dieses anders. Diese reagiren schwach sauer, sind auch nicht so übermäßig stark (wodurch, wie man angibt, das Zurückgehen auch etwas befördert wird) und bleibt ihnen diese Reaktion erhalten, so erleiden sie wie Nr. 18 nur eine schwache Reduktion ihres Fermentvermögens. Bestehen aber, wie dies zu erwarten ist, die vorhandenen Säuren nur zu einem kleinen Bruchtheile aus organischen, die durch niedrige Organismen verzehrt werden können, so ist das Auftreten von solchen Organismen entscheidend für die Haltbarkeit, insofern durch sie die günstige schwach saure Reaktion in die schädliche alkalische verändert werden kann. Die bleibende Haltbarkeit, wenigstens so wie sie bei Nr. 18 zufällig sich ergeben hat, wäre nur dadurch mit Sicherheit zu erreichen, daß man entweder die vorhandenen organischen Säuren nur einen Bruchtheil der freien Säuren werden läßt, oder daß man durch stärkere Konservierungsmittel vor einem Befallen durch niedrige Organismen schützt. Hierbei handelt es sich also um sekundäre Wirkungen. Daß die *Enzyme in der Regel direkt unempfindlich seien gegen niedere Organismen* wird auch von Hüfner bestätigt¹⁾. Endlich ist auch das Fortwirken der Diastase in der Branntweinmaische ein guter Beleg hierfür.

¹⁾ Journal für prakt. Chemie. N. F., Bd. 10.

X. Zur Theorie der enzymotischen Prozesse.

In Betreff der Rolle, welche die Enzyme bei den Fermentprozessen spielen, erscheinen einstweilen verschiedene Ansichten als möglich.

Eine erste Hypothese ist durch mehrere der in den vorhergehenden Abschnitten mitgetheilten Thatfachen nahegelegt. Dieselbe würde bestehen in der Annahme, daß die Enzyme, welche, wie wir gesehen haben, im Stande sind andere Körper zu hydratificiren, für sich selber mit Wasser den optimalen Temperaturen ausgesetzt auch für sich selber Wasseraddition erführen. Darnach würde unter allen Umständen — bei An- und Abwesenheit von einem Substrat — ein und derselbe Prozeß sich vollziehen, und dieser Prozeß würde sein *eine Hydratificirung* — mit oder ohne Spaltung des wasseraddirenden Körpers. Die Eigenthümlichkeit des Enzyms würde nur darin bestehen, daß es einen anderen Körper zur Wasseranziehung disponirte.

Daraus würde sich eine Fermenttheorie ergeben, ähnlich der von Traube vor langer Zeit ausgearbeiteten¹⁾; nur daß in dieser Alles auf die vermittelnde Anziehungskraft von Sauerstoff seitens der fermentartig wirkenden Körper zurückgeführt werden sollte.

An passenden Beispielen aus der unorganischen Chemie fehlt es auch für eine derartige Hypothese keineswegs, und eines derselben habe ich selber experimentell erörtert, wie folgt:

Reines Kochsalz an sich ist wenig hygroskopisch. In einem unvollständig mit Wasserdampf gesättigten Raume niedergefetzt, zeigt es nur langsame Gewichtsvermehrung. Dagegen ist die hervorragende Hygroskopicität von Chlorcalcium bekannt genug. Beimengungen von diesem oder von ähnlich sich verhaltenden Salzen zu Kochsalz machen auch dieses hygroskopisch, so daß dieses, mit dergleichen Beimengungen versehen, fogar zerfließen kann.

Ist diese zunächst noch rohe Wahrnehmung richtig, so würde der Vorgang nur dadurch erklärt werden können, daß Chlorcalcium das seinerseits angezogene Wasser auf das Kochsalz überträgt, um selber von Neuem Wasser aus der Luft anzuziehen. Die Annahme einer solchen Uebertragung hat nichts Fremdes, da viele Beispiele aus allen Theilen der Chemie vorliegen, daß Stärke der chemischen Affinität und das Geltendmachen derselben unter bestimmten äußeren Umständen zwei sehr verschiedene Dinge sind. Beim Kochsalz kann recht wohl die erstere überwiegen, beim Chlorcalcium das Letztere zutreffen. Das Schwefeligsäureanhydrid hat ohne Zweifel eine größere Affinität gegenüber Sauerstoff als Stickoxyd, aber das Letztere macht seine kleinere Affinität bei gewöhnlicher Temperatur besser geltend. Hierauf beruht der Schwefelsäureprozeß. An Beispielen ähnlicher Art ist die erwähnte Schrift Traube's reich genug.

Allein bei der Wichtigkeit, die Prämissen zu einer auszuarbeitenden Theorie

¹⁾ M. Traube: Theorie der Fermentwirkungen, Berlin 1858.

recht von Grund aus zu erörtern, schien es mir unumgänglich, die fragliche Rolle des Chlorcalciums beim Zerfließen des Kochsalzes genau festzustellen. Durch Versuche war offenbar nachzuweisen, daß *Kochsalz vermischt mit etwas Chlorcalcium mehr Wasser aus der Atmosphäre anzuziehen vermag*, als jedes für sich allein. Nur in diesem Falle ist ausgemacht, daß das Zerfließen des Gemenges nicht etwa veranlaßt wird lediglich durch die unveränderte Wasseranziehung des Chlorcalciums.

Versuchsreihe 31.

1 g Kochsalz wurde auf einem Uhrgläschen unter eine nicht völlig schließende Glocke gebracht, in der sich auch ein Bechergläschen mit Wasser befand.

0.1 g Chlorcalcium wurde genau denselben Bedingungen ausgesetzt.

Eine durch Reiben dargestellte innige Mischung von 1 g Kochsalz und 0.1 g Chlorcalcium wurde ebenso behandelt.

Bei dieser Behandlung wurden in den angegebenen Zeiten die folgenden Gewichtsvermehrungen wahrgenommen:

	Nach 24 Stunden.	Nach 48 Stunden.	Nach 72 Stunden.
Kochsalz	5 mg	36 mg	126 mg
Chlorcalcium	196 »	212 »	224 »
Gemenge beider	310 »	463 »	550 » .

Das erwartete Resultat ist deutlich genug. Die Wasseranziehung der vereinigten Salze ist viel bedeutender als die eines jeden für sich allein. Und, was beinahe noch auffälliger ist, das Chlorcalcium für sich allein hat bald seine Sättigung erreicht, während es mit dem Kochsalz viel längere Zeit in derselben Richtung fortwirkt.

Indessen das Kochsalz selber zieht noch zuviel Wasser an, um den Versuch als elegant gelten lassen zu können. Wie eine qualitative Prüfung ergab, schien dies herzurühren von einer Verunreinigung mit Kalk- und Magnesiumsalzen. Das Kochsalz wurde also durch UmkrySTALLISIREN gereinigt und dann

Versuchsreihe 31a

angestellt, welche im Uebrigen genau in derselben Weise wie die vorige erfolgte, und wovon wir also nur die Resultate der Gewichtsvermehrungen anzuführen brauchen.

	Nach 24 Stunden.	Nach 48 Stunden.	Nach 72 Stunden.
Kochsalz	28 mg	106 mg	183 mg
Chlorcalcium	187 »	216 »	223 »
Gemenge beider	283 »	405 »	513 » .

Die Resultate sind genau dieselben wie bei dem ersten Versuch. Das Kochsalz war vermuthlich noch nicht genügend gereinigt und wurde einer neuen UmkrySTALLISATION ausgesetzt.

Dann wurde in der gleichen Weise

Versuchsreihe 31b

angestellt.

	Gewichtsvermehrung.	
	Nach 24 Stunden.	Nach 72 Stunden.
Kochsalz	15 mg	146 mg
Chlorcalcium	179 »	224 »
Gemenge beider	284 »	656 » .

Es erschien also sehr schwer, dem Kochsalz seine Hygroscopicität zu benehmen. Dieselbe tritt namentlich an den späteren Tagen hervor, wenn das Chlorcalcium,

unter derselben Glocke stehend, nicht mehr viel Wasser entzieht, und dadurch die Luft in einem höheren Grade der Feuchtigkeit verkehrt. Das erwartete Resultat, daß Kochsalz und Chlorcalcium vereinigt unter den gleichen äußeren Umständen mehr anziehen, als beide für sich allein zusammengekommen, ist übrigens in dem Resultate von 8 verschiedenen Differenzwägungen deutlich genug.

Noch bessere Beispiele finden sich indessen in der organischen Chemie und zwar solche, bei denen Wasser nicht einfach addirt, sondern ebenso wie bei den enzymotischen Prozessen unter Spaltung addirt wird: Hydrolyse unter Einwirkung von kleinen Mengen von Körpern, die selber einige Neigung zu einer solchen Wasserspaltung besitzen¹⁾.

Die Postulate für eine auf diesen Analogieen fußende Theorie der Enzymwirkungen würden sein:

1. *Das Enzym muß unter denselben Umständen, unter welchen es bei Anwesenheit eines passenden Substrats Wirkksamkeit äußert, Wasser addiren.*

2. *Es muß unter diesen Umständen sein Fermentvermögen verlieren.*

3. *Dies Fermentvermögen müßte vermuthlich durch die Anwendung wasseranziehender Agentien wieder hergestellt werden können.*

4. *Das Fermentvermögen muß bei genügender Anwesenheit eines passenden Substrats durch die Wirkung selber keine Einbuße erleiden, d. h. wie man zu sagen pflegt, in's Unendliche gehen.*

Von diesen Postulaten, die alle durch mich experimentell geprüft worden sind, hat sich zumal bei Versuchen am Invertin Nr. 4 als richtig ergeben.

Postulat 3 ist weder für das Invertin noch für ein anderes Ferment nachgewiesen, ist aber auch nur ein Postulat der Wahrscheinlichkeit; d. h. es würde durch seine Erfüllung viel zu der Umwandlung der fraglichen Hypothese in eine wirkliche Theorie, die sich sehen lassen darf, beitragen. Bei deren Nichterfüllung braucht aber die Hypothese noch nicht fallen gelassen zu werden; denn es läßt sich denken, daß das hydratifirte Ferment bei Abwesenheit von wasserentziehendem Rohrzucker sogleich weitergehenden Veränderungen unterliegt, wonach eine Rückbildung nicht mehr möglich ist.

Es kommt mithin sehr viel darauf an, die Postulate 1 und 2 auf

¹⁾ Vergl. Wallach: Ber. der deutschen chem. Gesellsch., J. 10, S. 2120. Blausäure wird als ein solcher fermentartig wirkender Körper genannt, der für sich geneigt mit Wasser in Ammoniak und Kohlenoxydhydrat (Ameisensäure) zu zerfallen, in Mischung mit Glyoxalsäure dieselbe theilweise zu Oxalsäure oxydirt, theilweise durch Wasserstoffaddition Glycolsäure bildet.

ihre Zulässigkeit zu prüfen, und dies ist denn auch in mehrfach variirten Versuchen beim Invertin geschehen.

Den chemischen Prozeß bei der Invertirung kennen wir genau. Er besteht in einer Hydratirung des Rohrzuckers, und in Folge dessen erleidet sein Molekül eine Spaltung. Sollte die Tödtung des Invertins, die bei den optimalen Temperaturen seiner Wirkung beginnt, bei noch höher liegenden sich rasch vollendet, auch durch Hydratirung erfolgen? Dann würde die Fermentwirkung des Invertins wirklich aufzufassen sein ähnlich wie die Wirkung des Stickoxyds bei der Schwefelsäurefabrikation. Schwefeligsäureanhydrid für sich allein oxydirt nicht an der Luft, Stickoxyd wohl. Beide vereinigt, oxydirt das Erstere, das Letztere bleibt endgültig intakt.

Versuchsreihe 28.

Ein Präparat von lufttrockenem Invertin wurde bei 100° getrocknet (wodurch, wie wir früher gesehen haben, keine Gewichtsvermehrung eintritt), dann mit Wasser gekocht, wieder eingedampft und getrocknet. Dabei ergab sich eine Gewichtsvermehrung von 2.7%. Allein bei späteren Wiederholungen des Versuchs erwies sich diese Zunahme als keineswegs constant. Bei einem anderen Präparate war die Zunahme nur 0.5%. Ein drittes Mal war bei einem (mit dem zu dem ersten Versuche gebrauchten) Präparate sogar eine Abnahme bemerklich. Ein viertes Mal betrug die Zunahme nur 0.1%.

Die Methode wurde variirt und eine Invertinlösung in zwei gleiche Theile getheilt, die eine mit der fünffachen Menge Alkohol niedergeschlagen, die andere eine Stunde lang zwischen 60—70° erhalten, dann ebenso behandelt. Nach dem Erhitzen wurde weniger erhalten. Dies Resultat allein erweist freilich Nichts gegen die erörterte Hypothese, da die bei der Zerstörung des Invertins entstehenden Stoffe leichter löslich in Alkohol sein können.

Alle diese Resultate stehen auch nicht in Widerspruch mit der Annahme einer Hydratirung; denn die Präparate sind kein reines Invertin, enthalten vielmehr verhältnißmäßig wenig davon. Durch ein anderes Verhalten der beigemischten Stoffe kann die Erscheinung verwischt werden. Aber auch der positive Beweis ist unter diesen Umständen nicht beizubringen. Derselbe erscheint vielmehr abhängig von einer vorausgehenden Reindarstellung des Invertins oder wenigstens von einer Darstellungsweise, durch welche dies nahezu erreicht wird.

Da dies einstweilen nicht zu erreichen ist, so wird es gut sein sich umzusehen, ob die Zerstörung des Invertins durch Hydratificirung nicht auf eine andere Weise wahrscheinlich zu machen ist. Folgende Thatfachen, früher durch uns dargelegt, würden in dieser Richtung beachtenswerth erscheinen.

1. Die Zerstörung des Invertins durch höhere Temperatur tritt nur in wässriger Lösung ein. Das trockene Präparat wird *ceteris paribus* nicht alterirt.

2. Wasserärmere Invertinlösungen werden schwieriger (erst bei höheren Temperaturgraden) angegriffen, gleichgültig, ob ein Theil des Wassers durch ein anderes Lösungsmittel (Glycerin) ersetzt wird, oder ob dasselbe Resultat durch ein engeres Verhältniß von Invertin und Wasser erreicht wird.

Ebenso gut also, als man einen Prozeß, der nur in einer sauerstoffhaltigen Atmosphäre erfolgt und um so leichter und vollständiger erfolgt, je sauerstoffreicher die Atmosphäre ist, mit einigem Recht als einen Oxydationsprozeß ansehen darf, ist auch der Zuwachs an Sauerstoff für das Substrat noch nicht analytisch zu erweisen, ebenso würde man auch im vorliegenden Falle mit einiger Wahrscheinlichkeit schließen dürfen, daß die fragliche Zerstörung des Invertins mit einer Hydratificirung des selben zusammenfalle.

Mir erschien trotzdem diese Art von Beweisführung, eingedenk der vielseitig vermittelnden Rolle des Wassers, als höchst problematisch und ich halte es für besser offen einzugestehen, daß alle diese beschönigenden Erwägungen keine thatächliche Grundlage für eine solide Theorie abzugeben vermögen.

Versuche, ob Fermente bei den für ihre Wirkung günstigen Temperaturen Wasseraddition zeigen, sind auch von Wurtz¹⁾ und zwar beim Papaïn unternommen worden. Derselbe zeigte in der That, daß wenn man die (wie wir nicht vergessen dürfen, unreinen) Präparate dieses Enzyms wochenlang bei 50° in wässriger Lösung behandelt, der Kohlenstoffgehalt des Alkoholniederfalls etwas vermindert, sein Wasserstoffgehalt zunimmt: C 52.2, später C 50.5 %, H 7.1, später 7.4 %. Dieselbe Erscheinung tritt auch ein bei 100° und zwar noch um Vieles rascher.

Wurtz äußerte auch einige theoretische Anschauungen über die Wirkungsweise des Papaïns. Dieselben fußen aber einigermaßen auf der

¹⁾ Compt. rend., T. 91, p. 787.

anderen Thatfache, daß das Enzym z. Th. unauswaschbar auf dem Fibrin, das man ihm darbietet, sich fixirt, und erst nach stattgehabter Verdauung wieder zu weiterer Wirkung frei kommt. Dasselbe Verhalten hat Wurtz auch neuerdings für das Pepfin erwiesen.

Hieraus wird gefolgert, daß die unendlich große Wirkung des Enzyms, die beim Papaïn bis zur 2000fachen Gewichtsmenge an Fibrin festgestellt werden konnte, durch eine immer fortwährende Fixirung auf das Substrat und auf ein Freikommen nach stattgehabter Wirkung zurückzuführen wäre, d. h. es findet eine Erklärungsweise statt analog der Schwefelsäure bei der Aetherbildung. Von dieser Hypothese wird weiter unten die Rede sein.

Für die hier in Rede stehende Hypothese der vermittelnden Wasseraddition, resp. Zerspaltung durch die Enzyme beweist der Wurtz'sche Versuch der Hydratirung des Papaïns wenig, da gerade das Papaïn, welches bis jetzt nur in sehr unreinen Präparaten bekannt ist, wenig geeignet für derartige Versuche ist.

Als ein mehr allgemein gültiges Beweismittel dafür, daß die Enzyme eine große Neigung besitzen, Wasser zu addiren, könnte vielleicht noch am ehesten ihre Wirkung auf Wasserstoffhyperoxyd genannt werden, aus der sie, wie es scheint, sammt und sonders den anderen constituirenden Bestandtheil, den Sauerstoff, frei machen. Aber dagegen spricht wieder, daß wie Baranetzy gefunden, diese Eigenschaft auch noch nach dem Kochen bei der Diafase in schwachem Grade erhalten bleibt.

Das zuletzt Erörterte zusammenfassend, müssen wir aussprechen, daß es uns nicht gelungen ist, für das Postulat 1 irgendwie bindende Beweise zusammenzubringen. Ich würde mir indessen mit der soeben mitgetheilten Erörterung dieser Grundlagen nicht haben genügen lassen und eine bestimmtere Antwort zu erzielen gesucht haben, wenn ich nicht bei der Bearbeitung der Zulässigkeit von Postulat 2 eine ganz entschiedene negative Antwort erzielt hätte, die mich ohnehin gezwungen hat, die vorgeschlagene Theorie ganz und gar fallen zu lassen.

Nehmen wir einen Augenblick an, die Wasseraddition der Enzyme am eigenen Leibe — gleichgültig, ob Hydrolyse oder einfache Addition — erfolge, wenn man sie mit Wasser auf eine optimale Temperatur ihrer Wirksamkeit oder darüber hinaus digerirte, so müßte doch nothwendig unter diesen Umständen eine Zerstörung der Enzyme (als enzymotisch wirkende Körper) bleibend oder vorübergehend eintreten, gerade im

Gegensätze zu ihrer (unter gewissen Umständen) nachgewiesenen Conservirung, wenn unter im übrigen vergleichbaren Umständen ein Substrat des enzymotischen Processes zugegen war. Mit anderen Worten, die Enzyme müssen *ceteris paribus während ihrer Thätigkeit erhalten bleiben, während ihrer Unthätigkeit zerstört werden.*

Daß dies Erstere, allgemein gesprochen, der Fall ist, haben wir in Abschnitt VIII gesehen, und im Laufe dieser Darstellung in Erinnerung gebracht, indem wir das Postulat 4 als zutreffend bezeichnet haben.

Ebenso haben wir in Abschnitt III gesehen, daß manche Enzyme und speziell das Invertin durch das einfache Erwärmen ihrer wässrigen Lösungen auf optimale Temperaturen ihrer Wirksamkeit häufig eine langsame Zerstörung erleiden.

Wollte man die Frage so obenhin behandeln, so könnte man leicht durch das Zusammenhalten dieser beiden Erfahrungen eine Beantwortung des Postulats 2 im positiven Sinne erzielen. Allein das wäre leichtfertig, da wir ja beide Reihen von Erscheinungen gar sehr von begleitenden Umständen abhängig gefunden haben. Sehen wir näher zu, so stoßen wir auf die entgegenstehende Erfahrung: daß Enzyme während ihrer Thätigkeit manchmal an ihrem Vermögen Einbuße erleiden; und ebenso haben wir Fälle mitgetheilt, wo auch bei dem Alleindigeriren kein Zurückgang stattfindet. Bei dem Pepsin ist das Letztere sogar die Regel; aber auch bei dem empfindlicheren Invertin hatten wir einen derartigen Fall namhaft zu machen.

Das Experimentum crucis ist mithin, dem Verhalten einer und derselben Fermentlösung unter ganz gleichen Umständen nachzugehen, nur das eine Mal mit dem dazugehörigen Substrate gemischt, das andere Mal in Unthätigkeit, und in einer zweiten Versuchsreihe dann die Kraft des Enzyms zu untersuchen. Ein solcher Versuch nun wurde von mir mit dem Invertin nach Analogie der in Abschnitt VIII mitgetheilten Versuchsreihen 24—26 ausgeführt, und das Resultat war — ein damals von mir unerwartetes —, daß die für sich allein erwärmten Invertinlösungen *keineswegs an Wirkungsfähigkeit abgenommen hatten*, ein Fall, der damals von mir noch nicht beobachtet worden war, der aber alsdann in Abschnitt III beschrieben wurde.

Unter diesen Umständen ist es wohl an der Zeit, die ohnehin schwach fundirte in Rede stehende Hypothese fallen zu lassen.

Ich erwähne nur noch kurz einige andere Erfahrungen, die mit derselben schwierig in Einklang zu bringen gewesen wären.

Vor Allen die Regel, daß die Enzyme meistens eine so einseitige Wirkung auf einen ganz bestimmten chemischen Körper ausüben.

Als hierhin gehörige Thatfachen, aus der Literatur oder selber beigebracht, sind einige in einem der früheren Abschnitte gesammelt worden. Es können zwar Emulfin und Myrofin auf sehr verschiedene Glycoside fermentirend wirken. Allein das ist doch eigentlich eine Ausnahme, die der allgemeinen Regel widerspricht. Kjeldahl hat speziell für das Invertin nachgewiesen, daß es nicht auf eine Reihe von Kohlehydraten hydratirend und spaltend einwirkt; sind es auch solche, welche durch Säuren leicht die betreffende Umwandlung erfahren. Unter diesen Kohlehydraten werden aufgeführt: Maltose, Inulin, Dextrin, Arabin¹⁾.

Ich selber habe experimentirt mit Milchzucker, Dextrin, Arabin und Inulin, wie sich aus folgender Versuchsreihe ergibt.

Versuchsreihe 32.

Es wurden von Milchzucker, Dextrin, Arabin und Inulin 5procen-tige Auflösungen bereitet. Diese drehten die Polarisationsebene im kurzen Rohre wie folgt:

Milchzucker		+ 7.6.
Dextrin		+ 20.7.
Arabin		— 3.2.
Inulin		— 3.0.

Hieraus berechnen sich Drehungswinkel für normale Verhältnisse, welche ziemlich mit dem bekannten Drehungsvermögen der fraglichen Stoffe übereinstimmen.

$\frac{1}{10}$ Volum einer kräftigen Invertinlösung wurde beigemischt und damit 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen, dann noch einmal 5 Stunden auf 30° erhitzt.

Die Resultate waren:

	Ursprünglich.	Nach 24 Stunden.	5 Stunden auf 30°.
Milchzucker	 + 6.9	 + 7.1	 + 7.3.
Dextrin	 + 18.6	 + 18.7	zwischen 18 u. 20.
Arabin	 — 2.9	 — 2.8	zwischen 1 u. 2.
Inulin	 — 2.7		war nicht abzulesen.

Die beiden letzten mit Invertin behandelten Kohlehydrate zeigten auch keine Kupferreduktion gegenüber der Fehling'schen Lösung.

¹⁾ Meddelelser fra Carlsberg Laboratoriet, III Hefte.

Anders verhielt sich das Dextrin, welches aber schon vorher die gleiche Reaktion befaß.

Die ausgeführte Versuchsreihe ist jedenfalls geeignet, uns eine Thatfache in's Gedächtniß zurückzurufen, welche bei Spekulationen über Fermentwirkungen nicht immer genug vor Augen gehalten wird. Nimmt man Wasseranziehung seitens des Fermentkörpers und Uebertragung des erworbenen Wassers als Grundlage einer Hypothese der Fermentwirkungen an, so müssen bekannte Fälle aus der reinen Chemie, sei es nun der Wasserübertragung, wie durch Chlorcalcium, oder der Sauerstoffübertragung, wie durch eine sehr große Reihe von Körpern, als Prototyp dienen können. Für alle diese Fälle gilt aber als gemeinschaftliche Regel, daß die *durch sie erörterten Wirkungen sehr allgemeiner Natur* sind. Bei den eigentlichen Enzymen dagegen ist die Regel die umgekehrte. Fast ein jeder veränderungsfähiger Körper hat sein spezifisches Ferment oder besser eine Reihe von spezifischen Fermenten — ein Umstand, der sehr sonderbar erscheinen muß, wenn wir uns entschließen wollten, die freilich schon aus anderen Gründen fallen gelassene Hypothese zu adoptiren.

Weiter müssen in diesem letzteren Falle die Fermentstoffe vorausichtlich eine Gruppe sehr wohl charakterisirbarer chemischer Individuen und unter Umständen den Fermentirungs substraten selber ähnlich sein, da sie sich ja von diesen durch nichts zu unterscheiden brauchen, als durch die größere Leichtigkeit, sich vorübergehend Wasser zu addiren. Daß dies in keinem Falle zutrifft, da für die Fermentstoffe vielmehr charakteristisch ist, daß sie sich chemisch ganz und gar nicht charakterisiren lassen, weist uns ebenso wie die Thatfache, daß sie ungefähr wie Organismen selber durch höhere Temperaturen bleibend getödtet werden können, mit unseren Hypothesen in's Gebiet der *Physiologie*.

Allein bevor wir uns zu einer so weitgehenden Verzichtleistung auf eine rationelle Erklärung — wie wir dies nennen — verstehen, wollen wir noch *eine andere* naheliegende *Hypothese* versuchen, ich meine die — analog der *Wirkung der Schwefelsäure bei der Aetherbildung*.

Bekanntlich wirken Säuren in vielen Fällen hydratirend und wasserentziehend, häufig beides zugleich, je nach der Concentration, und kleine Mengen von ihnen bringen so große Wirkungen zu Stande, daß wir von *fermentartigen* Prozessen reden. Soweit die Natur derartiger Vorgänge aufgeklärt ist, sind wir dabei zu der Annahme berechtigt, daß die Säure vorübergehend eine Verbindung mit einem der sich addirenden

oder abspaltenden Körper bildet, wovon indessen zwei Moleküle sich untereinander selber zersetzen, sodaß als Endresultat die Säure intakt bleibt. Im strengen Sinn des Worts kann sie freilich nicht intakt bleiben, denn sie muß ja Wasser abgeben oder anziehen; aber sie bleibt es wenigstens als Säure, wenn auch nicht hinsichtlich der Hydrationsstufe.

So wirkt bekanntlich concentrirte Schwefelsäure bei der Aetherbildung aus Alkohol, bei der Esterbildung aus Alkohol und Säuren. Sehr verdünnte Säure, die keine sehr große Anziehungskraft zu Wasser mehr besitzt, wirkt häufig im umgekehrten Sinne; und es ist wohl sehr wahrscheinlich, daß sie und andere Säuren auch auf diese Weise bei der Intervertirung der Kohlehydrate wirken, indem ja die Kohlehydrate alkoholische Körper sind, die sich mit Säuren verbinden können. Mehrere Verbindungen stärkerer Säuren mit den Zuckern sind auch wirklich dargestellt.

Ich finde es keinen sehr glücklichen Gedanken von C. v. Nägeli, wenn er auch der Wirkung von Säuren auf Kohlehydrate einen Platz in seiner im Uebrigen so tiefsinnigen Fermenttheorie anweist, wenigstens so lange in einer solchen von molekularen Stößen und dergl. die Rede ist. Wir eröffnen damit für eine jede zur Zeit räthselhafte chemische Reaktion einer sehr bequemen Scheinerklärung Thür und Thor und schwächen den Geist geduldiger chemischer Forschung.

Ebenfowenig finde ich es ersprießlich, wenn man sich anlangend alle möglichen fermentartigen Wirkungen mit dem Satze von einer Resultante verschiedener Anziehungskräfte begnügt und das eine Fermenttheorie nennt¹⁾.

Müssen wir auch vielleicht mit der Erklärung der Wirkung der chemischen Fermente auf das Gebiet der Physiologie zurückkehren, indem wir den Vergleichungspunkt in der Aktionsweise des lebenden Protoplasmas suchen, so liegt doch nicht der mindeste Grund vor, den gleichen salto mortale für die Wirkung der Säuren auf die Kohlehydrate zu thun. Weit entfernt davon, daß hier die rein chemische Erklärung abgeschnitten wäre, liegt diese vielmehr beinahe auf der Hand. Wohl aber liegt es umgekehrt sehr nahe, die Fermentwirkung analog der Schwefelsäurewirkung aufzufassen. Ja wir sind zu diesem Versuche ver-

¹⁾ Ich ziele hiermit auf die Hufner'sche Theorie, die, wenn sie zulässig wäre, eine viel allgemeinere Anwendung in der Chemie besitzen müßte, als wofür sie ursprünglich erdichtet wurde.

pflichtet, da es überall unsere Aufgabe ist, das Unerklärliche auf das relativ Erklärliche zurückzuführen und so eine möglichst kleine Zahl von Hypothesen in Anspruch zu nehmen.

Wir haben also die Frage zu prüfen, ob beispielsweise das Invertin eine spezifisch chemische Verwandtschaft zu einem der Spaltungsprodukte des Rohrzuckers besitzt.

Versuchsreihe 33.

Je 8 ccm einer concentrirten Invertinauflösung wurden vermischt:

1. mit 20 ccm einer 5procent. Lösung von gereinigtem Traubenzucker,
2. mit der gleichen Menge einer gleich concentrirten Lösung von Rohrzucker,
3. mit der gleichen Menge Wasser,

Dann wurde in allen drei Fällen zu den Mischungen Alkohol zugefügt, so lange noch eine Vermehrung des entstehenden Niederschlags zu bemerken war und hernach in allen Fällen der Alkoholzusatz gleichgemacht, wozu ziemlich ein Liter 92procentigen Alkohols nöthig war¹⁾.

Die erhaltenen Niederschläge wurden abfiltrirt, mit Alkohol gewaschen und gewogen. Ich erhielt:

1. Zusatz von Dextrose	0.041 g.
2. » » Rohrzucker	0.072 »
3. Kein Zucker	0.047 ».

Nicht bei der Anwesenheit der Dextrose, wohl aber bei der von Rohrzucker war also der Niederschlag merklich größer. Es war in demselben indeffen keine die Fehling'sche Lösung reducirende Substanz nachweisbar, auch nachdem zuvor mit Salzfäure gekocht worden.

Versuchsreihe 33a.

Der gleiche Versuch wurde später noch einmal mit Laevulose (nach der Vorschrift von Dubrunfaut, die sich als sehr brauchbar erwies, dargestellt) wiederholt. Auch Laevulose vergrößerte sichtlich die Menge des Invertinniederschlags durch Alkohol. Ja es gelang mir selbst nachzuweisen, daß Invertin, durch Alkohol so viel als möglich niedergeschlagen, mit einer ebenso alkoholhaltigen Lösung von Laevulose einen langsam entstehenden deutlichen flockigen Niederschlag erzeugt. Allein

¹⁾ Für sich allein gab Alkohol in derselben Menge angewandt mit Rohrzucker keinen, mit Dextrose nur einen ganz unbedeutenden Niederschlag organischer Natur (Spuren von Dextrin).

diese Niederschläge enthalten weder Zucker noch ein wasserärmeres Kohlehydrat¹⁾.

Die Betheiligung von Laevulose und von dem Aether dieses Polyglycols, den wir Rohrzucker nennen, am Niederschlage muß demnach so aufgefaßt werden, daß durch die Anwesenheit dieser Körper das Invertin oder einige daselbe verunreinigende Stoffe unlöslicher werden. Auch ist die Menge des Niederschlags in allen Fällen so gering, daß derselbe recht gut aus den Stoffen des verwendeten Invertinpräparats allein abgeleitet werden kann.

Die angestellten Versuche geben uns also keinerlei Anhaltspunkt für die Bestätigung einer Theorie, wonach das Invertin nach Analogie der Säuren wirken sollte.

Ebenso wenig kann dies gesagt werden in Betreff der Wurtz'schen Versuche mit Papaïn und Pepsin, aus denen hervorgeht, daß sich diese Enzyme auf den festen, durch sie zu verdauenden Eiweißstoffen zuvor fixiren. Ein ähnliches Haften der Enzyme an Eiweißniederschlägen ist auch nachgewiesen für solche, die nicht im Stande sind, dieselben nachträglich zu verändern, wie für diastatische Fermente und Chymosin, und ist mithin voraussichtlich eine Eigenschaft, die mit der enzymotischen Wirkung als solcher Nichts zu thun hat.

Als eine *dritte Hypothese* erschien mir noch die folgende beachtenswerth.

Invertin und andere chemischen Fermente wirken *durch Erhöhung der molekularen Temperatur* des Zuckers oder derjenigen Körper, deren Spaltung sie bewirken.

Veranlassung zu dieser Hypothese bot mir der Erfahrungssatz, daß viele Fermentreaktionen in ähnlicher Weise verlaufen, als wenn bloß Wasser bei höherer Temperatur angewendet worden wäre. Die Wirkung des Pepsins kann bekanntlich dadurch ersetzt werden, daß man die Eiweißstoffe mit Wasser in eine Röhre einschließt und auf eine bestimmte Temperatur über 100° (170—180°) erhitzt.

Fette, die durch ein Ferment des Pankreasflusses zerspalten werden können, werden ebenso durch Wasser bei höherer Temperatur verseift.

¹⁾ An diese Möglichkeit war zu denken, seit erwiesen ist, daß durch concentrirte Schwefelsäure Dextrose in eine dextrinartige Substanz zurückverwandelt werden kann, und so lange man an einer Analogie zwischen Säure- und Fermentwirkung festhielt. Wie dort durch Verstärkung der Säureconcentration die Reaktion umgekehrt werden konnte, so hier möglicherweise durch Anwesenheit des Ferments gleichzeitig mit einem wasserentziehenden Mittel, dem Alkohol.

Für Glycoside sind ähnliche Reaktionen bekannt¹⁾. Inulin erleidet durch dauerndes Kochen mit Wasser schon eine entschiedene Intervertirung zu Laevulose.

Ich habe mich mit dem Gedanken beschäftigt, ob diese Regel eine durchgehende sei und daher die oben formulierte Hypothese aufgestellt. Die wichtigsten Beispiele waren noch nicht geliefert. Zwar war es mir möglich in der Literatur die Thatfache aufzufinden, daß auch der Rohrzucker im zugeschmolzenen Rohre eine wirkliche Intervertirung erleidet. Aber das, was über das Verhalten von Stärke und der Milch unter diesen Umständen bekannt war, schien durchaus widersprechend. Daher wurden die folgenden Versuche angestellt.

Versuchsreihe 34.

Frische Milch wurde in zugeschmolzenen Röhren einige Stunden lang erhitzt auf 140°. ²⁾ Sie zeigte sich darnach unregelmäßig geronnen und Coagulat sowohl als Flüssigkeit braun gefärbt. Der gleiche Versuch wurde wiederholt bei 125°. Bei dieser Temperatur trat keine Gerinnung wohl aber eine leicht braune Färbung ein. Die so behandelte Milch zeigte noch das Vermögen, mit verdünnter Salzsäure einen Niederschlag zu geben, obwohl dieser Niederschlag abweichend von der gewöhnlichen Säuregerinnung fein flockig war und eine durchaus klare Flüssigkeit über sich ließ.

Da es wohl wahrscheinlich war, daß die beobachtete störende Braunfärbung dem Milchzucker zuzuschreiben war, so wurden die Versuche mit künstlicher zuckerfreier und beinahe fettfreier Milch wiederholt. Diese wurde auf die folgende durch Danilewsky u. Radenhausen empfohlene Weise bereitet. Frische Milch mit Wasser auf das 10fache verdünnt mit verdünnter Salzsäure niedergeschlagen, das Casein auf einem Tuch gesammelt und gewaschen, wieder in wenig Ammoniak aufgelöst und zur Entfernung der größten Menge von Fett filtrirt. Alsdann wurde das Casein nochmals niedergeschlagen, durch Waschen bis zum Verschwinden der Chlorreaktion von Chlorammonium befreit, in Kalkwasser zu einer hellen Flüssigkeit aufgelöst; dann Phosphorsäure bis zur amphoteren Reaktion beigemengt. Die so erhaltene stark opalescirende Kunstmilch, welche in der Kochhitze keine Ausscheidung gab, aber mit

¹⁾ Myronfaurer Baryt erleidet z. B. beim Kochen mit Wasser die für die enzymatische Wirkung des Myrosins charakteristische Spaltung, während die freie Säure und das Kalisalz sich anders verhalten.

²⁾ Ich habe später gefunden, daß dieser Versuch schon gemacht war, u. A. durch Zahn (Pflüger's Archiv, 1869, S. 610).

Lab völlige Coagulirung zeigte, wurde nun wieder in zugefchmolzenen Röhren einige Stunden lang auf 130° erhitzt. Dabei trat Coagulation ein¹⁾, die etwa der Abcheidung von Eiweiß aus einer Lösung von Hühnereiweiß glich; die Braunfärbung aber unterblieb²⁾.

Dies Coagulat war nicht mehr auflöslich in Kalkwasser und einer Lösung von neutralem phosphorsauren Natron, worin Cafein (durch Säuren ausgeschieden) leicht löslich ist und Käse (durch Lab ausgeschieden) schwer löslich ist. Es war also durch das Erhitzen auf 130° das Resultat der Labgerinnung noch übertroffen. Aber man kann wohl sagen, daß die Wirkung in der gleichen Richtung geht, zumal wenn man erwägt, daß nach Danilewsky u. Radenhausen³⁾ die Labwirkung in einer Ueberführung des reinen Cafeins (Cafeoprotalbstoffe) in Albumin (Cafeoalbumin) besteht.

Man darf also wohl den Schluß machen, daß in diesem Falle die Fermentwirkung etwas Aehnliches leistet, was auch durch höhere Temperatur erzielt werden kann⁴⁾. Merkwürdig erscheint nur bei Berücksichtigung

¹⁾ Eine Bestätigung dieser Thatfache bei Hammarsten: Zur Kenntniß des Cafeins, S. 12.

²⁾ Die überstehende Flüssigkeit, die eine schwach saure Reaktion angenommen hatte, gab keine Gerinnung mehr mit Lab.

³⁾ Vergl. Forschungen auf dem Gebiete der Viehhaltung, Heft 9.

⁴⁾ Bei dieser Gelegenheit wurden einige der Versuche wiederholt, die ich früher mit Kunstmilch angestellt und in der Milchzeitung (1881, Nr. 2) beschrieben habe. Das Resultat dieser Versuche ist gewesen, daß auch Kunstmilch bei etwa 75° eine Veränderung erleidet, wodurch ihre Gerinnungsfähigkeit mit Lab verloren geht. Ich habe diesmal kleine Portionen von Kunstmilch in Reagirgläsern, welche in einem gemeinschaftlichen Wasserbade sich befanden, langsam erwärmt und je bei den folgenden Temperaturen eine der Portionen herausgenommen. 65° , 70° , 75° , 80° , 85° . Nach der Abkühlung auf 35° wurden sie alle mit Mengen eines Labextrakts versetzt, welche nach der Berechnung ausreichen mußten nach wenigen Minuten eine Gerinnung einzuleiten. Das Resultat dieser Versuchsreihe war:

Kunstmilch zuvor erhitzt auf:	Gerinnungsdauer.
65°	8 Minuten.
70°	8 „
75°	gerinnt nur theilweise.
80°	nach $\frac{3}{4}$ Stunden noch unvollständiger.
85°	gerinnt nicht.

Die Erklärung dieser schon früher besprochenen Erscheinung kann nur darin gesucht werden, daß die albuminartigen Bestandtheile der gewöhnlichen Milch, die in größerem Verhältnisse in derselben vorkommen, als man früher glaubte, bei der gewöhnlichen Eiweißgerinnungstemperatur eine Veränderung erleiden, welche sie zwar (in ihrer innigen Vermischung mit dem Cafein) nicht zur sichtbaren Auscheidung bringt, aber doch bewirkt, daß sie die Salze an sich reißen, die bei jeder Albu-

der untenstehenden Anmerkung, daß die hochehitzte Milch, die schon beim Passiren von 75° ihre Fähigkeit zur Labgerinnung eingebüßt hat, bei noch höherer Temperatur eine analoge Erscheinung soll aufweisen können und so wenigstens die Auffassung als Analogie, als willkürlich. Allein da die Labgerinnung selber als nichts Anderes aufzufassen ist, als wie ein Uebergang von sauren und leichtlöslichen Eiweißkörpern in die aschenreiche und schwerlösliche Modifikation des coagulirten Albumins, also als eine der gewöhnlichen Albumingerinnung ganz analoge Erscheinung, so bleibt die Thatfache bestehen, daß in Milch Lab bei Blutwärme eine ähnliche Veränderung zu bewirken vermag, als eine Temperatur von etwa 130° . Daß zwischen diesen Temperaturen Veränderungen in der Milch eintreten, welche den ersteren Prozeß nachmals verhindern, sind Complicationen der Erscheinung, die eines näheren Studiums überwerth sind, aber der Analogie, auf die es uns ankommt, keinen Abbruch thun.

Weiter haben wir das Verhalten des *Stärkemehls*, mit Wasser auf höhere Temperaturen erhitzt, studirt. Die Literatur bot über diesen Punkt sehr unvollständige Notizen. Sachsse, der das Hierhingehörige sehr vollständig gesammelt zu haben scheint¹⁾, spricht von den Versuchen von O. Loew und von Hoppe-Seyler, wonach bei $160-170^{\circ}$ Stärke mit Wasser sich vollständig zersetze, wobei Kohle abgeschieden und Kohlensäure, Ameisensäure und Huminsubstanz gebildet werden soll. Bei noch höherer Temperatur werde Brenzkatechin gebildet. Stärke für sich erhitzt verwandelt sich bekanntlich bei ähnlichen Temperaturen in Dextrin. Von einer Bildung von Zucker ist dabei nirgends die Rede. Auch wenn in der Analytik ein Erhitzen stärkemehlhaltiger Materialien im Druckfläschchen, behufs späterer Bestimmung in der Form von Zucker anempfohlen wird, so geschieht dies stets nur, um die Stärke leicht löslich zu machen, und eine nachherige Verzuckerung mittelst Säure ist unumgänglich. Bei der Unzulänglichkeit der mir zugänglichen Arbeiten wurden neue Versuche in Gang gesetzt.

mingerinnung eine Rolle spielen, und die in Folge dessen für die Labgerinnung nicht mehr zur Verfügung stehen. Diese Interpretation wird unterstützt durch die zufällige Beobachtung einer meiner Assistenten, wonach das mit Salzsäure niedergeschlagene Casein straflos mit heißem Wasser gewaschen werden kann und dann doch eine Kunstmilch liefert von normaler Gerinnungsfähigkeit. Ich darf übrigens nicht verschweigen, daß es mir in zwei darauf bezüglichen Versuchen nicht geglückt ist, der gekochten Kunstmilch durch Zufügen von Kalkwasser und Phosphorsäure ihre normale Gerinnungsfähigkeit durch Lab wieder zu ertheilen.

¹⁾ Die Chemie und Physiologie der Farbstoffe u. ff., 1877. S. 108/9.

Versuchsreihe 35.

Stärkemehl von Kartoffeln wurde bei den unten angegebenen Temperaturen mehrere Stunden lang mit einem Ueberschusse von Wasser erhitzt und dabei die folgenden Resultate erhalten:

	Erhitzt auf 140°,	auf 160—165°,	auf 170°.
<i>Jodreaktion</i> . . .	Stark blau . . .	Stark blau . . .	Purpurroth.
<i>Aggregatzustand</i> . .	In der Kälte nach und nach wieder kleisterbildend.	In der Kälte nach und nach wieder dickflüssig.	Bleibt leichtflüssig.
<i>Dextrose-Reaktion</i> .	Keine	Sehr schwache . .	Starke.
<i>Mit Barfoed-Reagens</i>	Reaktion	Reaktion	Reaktion.
<i>Mit Alkohol</i> . . .	In allen Fällen weißer Niederschlag.		
<i>Gährung</i>	Gährungsfähig.		
<i>Braunfärbung</i> . .	Nicht	Wenig	Etwas braun und einige Humus- flocken ausgeschie- den.

In Folge der Gährung bei der auf 170° erhitzten Partie wurde innerhalb einiger Tage 0.3% Alkohol gebildet, während die doppelte Quantität Hefe mit unverändertem Stärkekleister wohl etwas Kohlensäure entwickelte, gebildeter Alkohol aber nicht nachzuweisen war.

Das Resultat ist also sehr deutlich¹⁾. Unmittelbar vor der Tem-

¹⁾ Ich habe später gefunden, daß schon von Hoppe-Seyler angegeben wird, daß der Zerfall von Stärkemehl in der Weise, wie er für die diastatischen Fermente charakteristisch ist, bei 170° im zugeschmolzenen Rohre erfolge, doch mit dem Zusatz «unter schnellem weiteren Zerfall bei Bildung von Brenzkatechin». Der obige Versuch zeigt, daß die erstere Reaktion doch quantitativ bestimmbare Verhältnisse annehmen kann. — Dagegen hat Soxhlet die gleiche Beobachtung gemacht, gibt derselben aber eine andere Deutung. Derselbe fand nämlich, daß das Stärkemehl des Handels häufig kleine Mengen von Säure (Milchsäure oder dergl.) enthält. Diese Säure konnte an dem Prozeß der Intervertirung betheiligt sein. Er suchte daher die Säure durch vorausgehende Präparirung des Stärkemehls zu beseitigen, fand aber auch nach deren Beseitigung noch eine wiewohl schwächere Zuckerbildung bei höherer Temperatur im zugeschmolzenen Rohre. Ich glaube nun, es gibt Zeugniß von einer gewissen Voreingenommenheit, wenn aus diesem Versuchsresultat geschlossen wird, daß diese Zuckerbildung noch von Resten nicht beseitigter Säure herühre, anstatt zu schließen, daß Säure, wie wir seit lange wissen, den Prozeß zwar beschleunige, aber daß derselbe auch bei Abwesenheit von Säure sich wiewohl viel langsamer vollziehe. — Das Stärkemehl, das von mir zu dem beschriebenen Versuche benutzt wurde, zeigte nur eine äußerst schwach saure Reaktion. Daß diese Spur Säure relativ unbetheiligt war, ergibt sich wohl daraus, daß sie in dem Versuche bei 140° nichts zu leisten vermochte, während doch bekanntermaßen Säure schon bei viel niedrigeren Temperaturen Wirkung zeigt und diese letztere nur bei Ansteigen der Temperatur entsprechend gesteigert wird.

peratur, bei welcher der Constitution aller Kohlehydrate eine tiefgreifende Veränderung bevorsteht, wird das Stärkemehlmolekül in einer ähnlichen Weise, wenn auch quantitativ zurücktretend zu Zucker hydratisirt, und wir sind im Besitze eines weiteren Beleges für die analoge Wirkung der Fermente und höherer Temperaturen, auf deren Suche wir ausgegangen waren.

Alle die im Vorhergehenden gesammelten Thatfachen, die kaum mehr eine Lücke erkennen lassen, ermuthigen zu der Hypothese, daß *die Moleküle der Substrate eines enzymotischen Prozesses durch die Anwesenheit der Enzyme in einen ähnlichen Zustand versetzt wurden als durch eine höhere Temperatur.*

Temperaturerhöhung wird bewirkt, wie wir annehmen müssen, durch Verstärkung sowohl der Molekularbewegungen als auch der intramolekularen Bewegungen der Atome. Daß bei den enzymotischen Wirkungen eine erhebliche Temperaturerhöhung keineswegs aufzutreten pflegt, kann so erklärt werden, daß die Enzyme die intramolekulare Bewegung der Atome der sich zersetzenden Moleküle allein zu steigern befähigt sind.

Chemische Fermente oder Enzyme würden demnach solche Körper sein, welche in Bezug auf die Schwingungsverhältnisse spezifischer anderer Körper selber Bewegungszustände besitzen, welche diese Schwingungen zu steigern geeignet sind.

Da Fermente nur in Organismen auftreten, so scheinen *derartige Atomcomplexe, die die spezifische Molekulartemperatur anderer Verbindungen zu steigern vermögen, nur im lebenden Protoplasma entstehen zu können* und voraussichtlich sind sie Bestandtheile der complicirt aufgebauten Protoplasamoleküle selber. Dann könnte man den bestehenden Verband zwischen Leben und Fermenten auch so ausdrücken, daß die letzteren Organismenreste oder Protoplasmasplitter seien, vielleicht von sehr wechselnder Zusammensetzung aber noch mit einem Theil der charakteristischen intramolekularen Bewegungen begabt, welche in dem Organismus für einen Theil das Leben ausmachen.

Die so sich gestaltende Hypothese hat offenbar große Aehnlichkeit mit der zuerst von Nägeli (Theorie der Gährung, S. 27) ausgesprochenen. Nur erscheint mir deren Uebertragung auf die fermentartige Wirkung von Säuren ganz unstatthaft. Und ferner glaube ich neue kräftige Belege zu Gunsten der fraglichen Hypothese beigebracht zu haben.

Die letztere hat auch Berührungspunkte zur Hoppe-Seyler'schen Auffassung, wonach Gährungsercheinungen und noch verwickelte

physiologisch-chemische Prozesse auf die Summe der Wirkungen von chemischen Fermenten zurückzuführen wären. Nur daß durch Hoppe unserer Meinung nach nicht genügend unterschieden wird, zwischen der qualitativ viel schwächeren Wirkung der isolirbaren Fermente und den viel tiefer greifenden Reaktionen, die vom lebenden Protoplasma selbst ausgehen. Unseres Erachtens bleiben beim Zerfall des Letzteren nur Atomgruppen, begabt mit sehr untergeordneten Bewegungsercheinungen, gespart, und auch diese haben ein labiles Gleichgewicht, so daß sie kräftigeren Einflüssen, denen die Organismen selber erliegen, nicht Trotz zu bieten verstehen.

Haben französische Forscher (vielleicht doch nicht so ganz unpassender Weise) die Gährungsorganismen «*geformte Fermente*» genannt, so möchte ich eher den Spieß umkehren, und die Fermente «*ungeformte Organismen*» (genauer Organismenreste)¹⁾ nennen.

Die Aehnlichkeit der Enzyme in ihren Existenzbedingungen mit wirklichen vollständigen Organismen ist auffällig genug. Ihr Verhalten erhöhter Temperatur gegenüber ist geradezu identisch. Gegen Gifte sind jene wohl häufig widerstandsfähiger, aber manche Klassen von Giften sind beiden gemeinsam, und genug besagt im Grunde die Thatfache, daß wir auch in Bezug auf die Enzyme ohne Widerstreben die Bezeichnung Gift, also einen Ausdruck von rein physiologischer Bedeutung, in den Mund nehmen können. Daß gewisse Organismengifte nicht zugleich auch Enzymgifte sind, ist leicht so zu erklären, daß sie die charakteristische Constitution anderer Theile der Protoplasmamoleküle (sit venia verbo) durch Zersetzung

¹⁾ Der Ausdruck «Organismenreste», dessen ich mich im Texte bedient habe, mag wohl erinnern an die «Hemiorganismen» von Fremy (vergl. dessen Entgegnungsschrift gegen Pasteur: Sur la génération des ferments, 1875), aber wie man leicht erkennen wird, ist der Begriff ein anderer. Fremy versteht unter Hemiorganismen organifirte Materie, welche im Stande ist niedere Gährungsorganismen aus sich zu erzeugen, nach einer Hypothese, welche als eine moderne Auflage der älteren Needham'schen Anschauungen gelten kann und mit der in Deutschland durch Carsten und dessen Schüler Harz vertretenen große Aehnlichkeit hat, und das Casein der Milch gilt ihm als Repräsentant für diese Klasse von Körpern. Ohne die der Fremy'schen Hypothese zu Grunde liegende Anschauung von dem Ursprung der Fermente als unwissenschaftlich bezeichnen zu wollen, so ist doch seine Kenntniß der empirischen Details der gesammten Fermenterscheinungen noch so ungenügend, daß er nicht einmal die Nothwendigkeit einer Scheidung von Gährungsfermenten und Enzymen empfindet. Daraus folgt wohl zur Genüge, daß sein Begriff von den Hemiorganismen mit meinem von den Enzymen als Organismenresten nichts gemein hat, als höchstens die Meinung, daß mit Vernichtung der Zellstruktur nicht alle und jede vitale Erscheinung erloschen sei.

oder durch Substitution bedrohen, als gerade die enzymotisch begabten. Ja, selbst diese Beziehung läßt sich für unsere Theorie verwerthen, indem es einleuchtend ist, daß — mögen wir uns die Wirkung der Protoplasma-gifte als durch vorübergehenden Eintritt in die Constitution desselben oder auf eine andere Weise zustandekommend vorstellen — das complicirt constituirte Protoplasma den Giften mehr Angriffspunkte bieten wird, als dieses oder jenes organisirte Bruchstück desselben. Dem völlig entsprechend scheint auch keine allgemeine Klassifikation der Gifte in Protoplasma- und Fermentgifte möglich zu sein, sondern nur die Regel zu bestehen, daß Fermentgifte auch allemal Protoplasmagifte sein müssen, während die ersteren in den verschiedenen Fällen recht verschiedene sein können. So wirkt (wie einer meiner Assistenten kürzlich gefunden hat) Chloroform sehr schädigend auf die Pepsinverdauung aber gar nicht auf den diastatischen Prozeß und die Speichelyverdauung.

Ferner kommt hier die Erfahrung zu statten, daß die verschiedensten Fermente¹⁾ nicht durch Bakterien angegriffen werden. Sind die Fermente organische Spaltungsprodukte im gewöhnlichen chemischen Sinne des Worts, so ist diese Thatfache sehr befremdlich. Sind es aber noch halb belebte Massen, so ordnet sie sich ein in die bekannte Regel, daß Organisirtheit ein Schutzmittel ist gegen fremde Assimilation.

Je mehr wir so fortfahren, die Hauptresultate unserer früheren Abschnitte zu resumiren, um so mehr finden wir unsere Theorie durch weitere Thatfachen gestützt.

Die Herkunft aller Enzyme ist ein lebender Organismus selber; so wenig man bisher eine elternlose Zeugung der Organismen kennt, so wenig ist dies also auch für die Enzyme der Fall, während wir sagen können, daß wir auf dem Wege sind alle Klassen von chemischen Individuen künstlich zu machen. Noch keine Gruppe von diesen hat den Angriffen unserer modernen Chemiker bleibend Stand gehalten — ein Grund mehr, die Enzyme, welche sich auch im Uebrigen chemisch nicht einmal charakterisiren lassen, aus der Chemie in das Gebiet der Physiologie zu verweisen.

Auch darin gleichen die Enzyme nicht chemischen Körpern, daß sie, wenn sie zu einer Reaktion nöthig sind, ungefähr proportional mit der Menge ihre Wirkung ausüben, gerade als ob es sich um eine Kraft handelte, welche zu einem Prozesse mitwirken muß, und die sich in

¹⁾ Durch mich erwiesen für Lab, Pepsin, Invertin. Vergl. Abschnitt IX.

einem im Uebrigen chemisch recht verschiedenen Stoffe aufgespeichert findet, während bei chemischen Agentien bald ein gewisses Optimum, das gewöhnlich durch das Gesetz der Aequivalenz gegeben ist, erreicht wird, über welches hinaus die Vermehrung des wirkamen Stoffes wenig mehr nützt. Man vergleiche in dieser Richtung die in der Anmerkung mitgetheilten Versuche und Bemerkungen anlangend Pepsin und Salzsäure bei dem Verdauungsprozesse¹⁾.

Uns sind allerdings eine Reihe von chemischen Reaktionen bekannt, deren Resultat mehr oder weniger mit der Zeit proportional ist, aber nicht mit der Zeit der Anwesenheit irgend eines chemischen Agens, sondern mit der der Mitwirkung einer äußeren Kraft.

So wirkt das Licht bei der Photographie, auf das Chlorknallgas, auf das grüne Protoplasma proportional der Zeit, oder die Einheit Licht hat die doppelte Zeit nöthig um den gleichen Effekt zu leisten wie die doppelte Menge Licht. Ganz ebenso der Effekt des galvanischen Stroms.

¹⁾ Versuche mit Pepsin und zwar anlangend die optimale Menge von Salzsäure geben noch Veranlassung zu dem folgenden Vergleichungspunkte:

Aus meinen Versuchen in dieser Richtung geht hervor, daß 2‰ Salzsäure ungefähr das Optimum bezeichnen. Es ist wohl beachtenswerth, daß es anlangend den Salzsäurezusatz viel genauer auf einen bestimmten Gehalt ankommt als in Bezug auf den Pepsingehalt. Dieser kann, wie in Versuchsreihe 3 gezeigt worden ist, um das Doppelte variiren, ohne daß der Verdauungsvorgang im gleichen Maße alterirt wird. Bei der Salzsäure kann die Vermehrung oder Verminderung im Verhältnisse wie 2:1 den Effekt in einem viel größeren Verhältnisse umändern (vergl. Versuch 1 und 3 der 7. Versuchsreihe, oder Versuch 2 und 3 der 8. Versuchsreihe: Zeitschrift für Biologie u. a. O.).

Salzsäure spielt darum eine ganz andere Rolle bei der Verdauung als Pepsin, ich möchte sagen, mehr die einer unerläßlichen Verdauungsbedingung, denn einer Urfache der Verdauung. Denn zwischen Urfache und Wirkung sind wir gewohnt, nicht bloß den gewöhnlichen qualitativen Causalnexus des Nacheinander oder Miteinander zu sehen, sondern auch eine Uebereinstimmung dem Grade nach, so daß wir z. B. beim sog. Assimilationsprozesse eine gewisse Temperatur und Anwesenheit von Kohlensäure Assimilationsbedingungen, das Licht aber die Assimilationsurfache nennen können. In diesem Sinne sind die Fermente Urfachen der Fermenterscheinungen. Im Allgemeinen, und sind die übrigen Bedingungen erfüllt, findet Proportionalität statt zwischen Menge von Ferment und Umfang des Fermentprocesses. Bei der Verdauung ist das Verhältniß abgeschwächt durch die beschränkte Anzahl von Angriffspunkten bei einem ungelösten Stoffe. Das umgekehrte Verhältniß oder gar eine Beeinträchtigung des Processes durch Vermehrung der wirkenden Substanz, wie eben bei der Salzsäure constatirt, hat mit einer derartigen Wirkung keinerlei Uebereinstimmung.

Wir sprechen daher besser nicht von einer vereinigten Wirkung des Pepsins und der Salzsäure, sondern von der Wirkung von Pepsin auf Eiweißstoffe, die einer Flüssigkeit von ungefähr 2‰ Salzsäure suspendirt sind.

Ganz ähnlich auch die Zufuhr von Wärme bei Reaktionen, die nur bei gesteigerter Temperatur in der gewünschten Richtung verlaufen. In diesen Fällen liegt freilich diese Beziehung platt auf der Hand; denn sie ist ja eigentlich nichts als die Umstellung des Satzes von der Proportionalität zwischen Kraft und Leistung, der seinerseits wieder nichts ist als eine Consequenz des Gesetzes der Erhaltung der Energie.

Man ist in Folge dessen mehr geneigt, die Enzyme mit diesen Kräften zu vergleichen, oder besser mit einem Magazin solcher Kräfte, etwa mit einem Planté'schen Elemente, welches man auch analysiren kann und aus Blei und Bleisuperoxyd zusammengesetzt findet, ohne damit das Räthsel seiner Wirksamkeit aufzulösen.

Endlich, aber nicht zuletzt, besteht *die* Analogie zwischen Enzymen und dem lebendigen Protoplasma, daß auch das Letztere im Stande ist, gegenüber organischen von ihm eingeschlossenen Körpern Erscheinungen hervorzurufen, die im Uebrigen nur bei höherer Temperatur in derselben Richtung verlaufen. Ich meine natürlich die Verbrennung, welche wir in diesem Falle Athmung nennen, und die bei Abschluß von Sauerstoff zur Gährung (der physiologischen Form der trockenen Destillation) wird.

Man sage uns nicht, durch die Heranziehung des Organismus als Vergleichungspunkt seien keine Räthsel aufzulösen, denn jener sei selber ein Räthsel, dessen rationelle Elemente in der Physik und in der Chemie zu suchen seien. Noch aber hat die Sphinx des Organismus ihren Oedipus nicht gefunden, und so lange sie nicht in den Abgrund gestürzt ist, haben wir mit ihr zu rechnen.

Ich glaube, es ist vorsichtiger, wenn wir das Räthsel als Räthsel erkennen, und so einstweilen eine Gruppierung der Thatfachen vornehmen, auf welche Thätigkeit doch all' unser wissenschaftliches Thun am Ende hinausläuft, als wenn wir voreilig und gewaltsam das Geheimnißvolle als Alltägliches bestempeln. So lange eine selbständige Wissenschaft, die wir Physiologie oder Biologie nennen, abgeschieden von den physikalischen Grunddisciplinen, besteht, ist ja ohnehin der Strich durch die «Lebenskraft» mehr eine wohlfeile volksthümliche Phrase, als eine wissenschaftliche That, die wir mit Stolz in unseren Annalen aufzeichnen dürften.







