

VIII.**Kleinere Mittheilungen.****1.****Erklärungsversuch über die Wirkungsart der ungeformten Fermente.**

Von Dr. L. de Jager zu Metslawier (Niederlande).

Ich habe in meiner Inaugural-Dissertation¹⁾ eine Theorie aufgestellt über die Wirkungsart der ungeformten Fermente. Spätere Versuche haben mir diese Theorie noch wahrscheinlicher gemacht. Ich hätte gern dieselben Versuche mit mehreren Enzymen angestellt, war aber genötigt, vorläufig meine Untersuchungen zu unterbrechen, und bin bis jetzt noch nicht dazu gekommen, meine über ein Jahr verlassene Arbeit zu verfolgen. Ich glaube aber meine Untersuchungen über die diastatische Wirkung des Pankreas der Oefentlichkeit übergeben zu können, weil dieselben ziemlich vollständig sind. Um so mehr glaube ich dies jetzt thun zu können, da Herr A. Fick²⁾ für die Wirkungsart des Lab-Enzyms eine Erklärung aufstellt, welche der meinigen, für alle Enzyme aufgestellten gewissermaassen nahesteht. Die Anordnung seiner Versuche gleicht den meinigen.

Die Kenntniss der durch Fermentation geformten Körper wird in der letzten Zeit immer vollkommener; die Art und Weise, wie die Enzyme wirken, ist noch immer rätselhaft. Nur soviel ist bekannt, dass unter dem Einfluss von Enzymen auf gewisse Stoffe eine Einwirkung zu Stande kommt, welche in so weit abweicht von gewöhnlichen chemischen Prozessen, dass dabei das wirksame Agens chemisch unverändert bleibt. Man hat es daher bei der Fermentation nicht zu thun mit chemischer Affinität, sondern es muss etwas Anderes im Spiele sein.

Lange Zeit hindurch galt die von Berzelius gegebene Erklärung der Gährung auch für Enzyme. Die ebensowenig erklärte Eigenschaft feinvertheilten Platinas, H_2O_2 zu zerlegen, wurde herangezogen. Fermentwirkung war katalytische Kraft.

Liebig stellte eine Theorie auf, nach welcher die Enzym-Moleküle fortwährend Wasser in sich aufzunehmen, um es sogleich den zu fermentirenden Molekülen zu übergeben, etwa wie ein Schwamm.

¹⁾ Iets over den invloed van bacteriën op de digestie. Groningen, Juni 1888.

²⁾ Arch. f. d. ges. Physiol. XLV. S. 293.

Nach der Bunsen - Hüfner'schen Theorie sollte das Enzym-Molecül, nach Art der Schwefelsäure bei der Aetherbereitung, Theile des Molecüls des zu fermentirenden Körpers stärker anziehen, als den Rest, und danach sich selbst restauriren. — Als am meisten wahrscheinlich gilt in der letzten Zeit die Nägeli'sche Moleculartheorie. Die Bewegung des Enzym-Molecüls verursacht in den Molecülen des gährfähigen Materials Schwingungen, welche die chemische Integrität des Molecüls schädigen.

Wir sind da auf der Grenze zwischen Chemie und Physik.

Ich gehe weiter und betrachte die Fermentwirkungen als rein physische.

Die Eigenschaft der Enzyme, chemische Wirkungen zu entfalten, ohne selbst alterirt zu werden, hat bewirkt, dass man für die Enzyme eine absonderliche Klasse chemischer Verbindungen aufgestellt hat. Man will nun erforschen, wie diese Verbindungen zusammengesetzt sind und versucht, je nach dem Resultat der Analyse, die Enzyme in die eine oder andere Klasse hinein zu schmuggeln. Sobald die Analyse anfängt, ist das Enzym aber zerstört. Da man keine reinen Fermente darstellen kann, begnügt man sich mit einer Analyse gewisser Niederschläge, von denen man annimmt, dass sie wohl ziemlich reines Ferment sein könnten.

Das Resultat stimmt da natürlich niemals überein. Der C-Gehalt schwankt zwischen 40,5 pCt. (Invertin) und 52,75 pCt. (Trypsin); der N-Gehalt zwischen 4,6 pCt. (Diastase) und 16,55 pCt. (Trypsin). So enthält Trypsin:

nach Hüfner ¹⁾	43,5 pCt. C,	6,5—6,8 pCt. H,	13,8—14 pCt. N,	
- Loew ²⁾	52,75	-	7,51	16,55

Flügge³⁾ vermutet, Enzyme seien Eiweissstoffe. Kühne⁴⁾ sagt bestimmt, sein Trypsin sei kein Eiweiss. Eugen Hirschfeld⁵⁾ betrachtet pflanzliche Diastase als modifiziertes Gummi d. h. als Kohlehydrat u. s. w.

So lange man annimmt, ein Stoff, der fermentativ wirksam sein kann, sei zerstört, sobald er diese Eigenschaft verliert, wird es unmöglich sein, diesen Stoff zu bereiten. Es ist von diesem Stoff eben keine einzige Eigenschaft bekannt. Die sogenannten Bereitungsmethoden liefern zwar wirksame Niederschläge, aber keine reinen Körper.

Beim Fällen einer Enzymlösung mittelst voluminöser Präcipitate (Kalkwasser, Cholesterin, Collodion u. a. m.) bleibt immer das Filtrat wirksam und der Niederschlag enthält sehr verschiedene Körper.

Die zweite Methode ist die Fällung mittelst Alkohols, der Enzyme nicht lösen soll. Aber Enzyme sind nicht unlöslich in Alkohol. Nicht nur wirkt das Filtrat nach Fällung des Ptyalin aus Speichel noch diastatisch nach Abdampfen des Alkohols, wie schon Löscher⁶⁾ berichtet, sondern es gelang mir, aus gefälltem Ptyalin (mittelst Alkohols) mit absolutem Alkohol ein Ex-

¹⁾ Jahresberichte der Thierchemie. 1872.

²⁾ Pflüger's Archiv. Bd. 27.

³⁾ Die Mikroorganismen.

⁴⁾ Verh. d. Heidelberger naturh.-med. Vereins. N. F. Bd. I. Hft. 3.

⁵⁾ Pflüger's Archiv. Bd. 39.

⁶⁾ Jahresberichte der ges. Medicin. 1868.

tract zu bekommen, das (nach Abdampfen des Alkohols bei niederer Temperatur) diastatisch wirksam ist. Mit demselben Ptyalin kann man den Versuch beliebig wiederholen.

Auch konnte ich aus einem Stückchen eines Schweinepankreas mittelst absoluten Alkohols diastatisches Enzym extrahiren.

Pepsin soll nach Bardet¹⁾ nicht ganz unlöslich sein in 95prozentigem Alkohol. Es gelang mir nicht, Pepsin in Alkohol zu lösen; jedoch benutzte ich das mir damals noch nicht genug bekannte Witte'sche Pepsin, das eigentlich nur unreiner Milchzucker ist.

Nicht nur kann man nicht alles Enzym mittelst Alkohols fällen, sondern der Niederschlag kann (und wird) außerdem viele andere Stoffe enthalten, welche in Wasser sich wieder lösen, wie z. B. Dextrin, Mucin, Glycogen, Pepton, u. A. m. Diese sollten durch Dialyse zu beseitigen sein. Mir aber gelang es nie, Pankreasinfuse, welche immer Pepton enthalten, von diesen durch Dialyse zu reinigen. Wo die Biuret-Reaction versagte, war sie deutlich nach Ausfällen mit Alkohol und Lösen des Niederschlags in Wasser.

Da z. B. Ptyalin wohl durch Membranen diffundirt, ist auch die Nicht-diffundierbarkeit keine Eigenschaft der Enzyme.

Wo durch nichts bewiesen wird, dass sich die Enzyme durch bestimmte Zusammensetzung und Eigenschaften auszeichnen, da hat man keinen Anstand zu unterstellen, dass dies wohl der Fall sein werde.

Vorher wurden alle Kräfte betrachtet als Stoffe, und da man sah, dass sie kein Gewicht besitzen, als imponderable Stoffe. Ich nenne nur den Lichtstoff von Newton, die elektrische Flüssigkeit, welche noch in der Terminologie zu finden ist, der Magnetstoff u. A. m.

Ich glaube, die Enzyme seien diesen imponderablen Stoffen gleich zu stellen. Kein Mensch nennt jetzt mehr Magnet einen Stoff, sondern Eisen mit einem eigenartigen Bewegungszustand seiner Moleküle. Wie beinahe nur allein Eisen magnetisch werden kann, ebenso können möglicherweise auch nur bestimmte Stoffe fermentative Eigenschaften bekommen. Aber ebenso wenig wie magnetisches Eisen ein anderer Stoff geworden ist, ebensowenig brauchen Enzyme bestimmte Stoffe zu sein.

Ein Magnet wird gewöhnliches Eisen, wenn man mit einem Hammer darauf schlägt oder, wenn er erhitzt wird.

Erhitzen zerstört auch die Wirksamkeit der Enzyme, aber man weiß nicht, ob dabei auch chemische Umsetzungen stattfinden. Das Kühne'sche Trypsin lässt durch Kochen zwar coaguliertes Eiweiss und Antipepton entstehen, aber man kann nicht sagen, dass diese Stoffe eben dem Enzym entspringen. Außerdem wird die Wirksamkeit zerstört bei einer um vieles niedrigeren Temperatur, als jene, welche zum Entstehen dieser Zersetzungsprodukte erforderlich ist. Wenn ein Magnet geglüht wird, wird er schwarz, aber das Oxyd hat keinen Zusammenhang mit der entschwundenen Magnetkraft.

Wie es beim Magnet tatsächlich der Fall ist, so wird auch der Schwin-

¹⁾ Bullet. de la société de thérapie. XVIII. 13. 1887.

gungszustand der Enzym-Moleküle um so leichter geändert, je beweglicher dieselben sind. Eine Pepsinlösung wird durch Erwärmen bis 70°C . unwirksam gemacht, während völlig trockenes Pepsin ohne Schaden bis 120°C . bis 160°C . erhitzt werden kann. Ob es dabei chemisch auch intact bleibt, weiss ich nicht, aber ich bezweifle es sehr.

Ebenso wenig wie beim Abkühlen eines Körpers Wärmestoff zerstört wird, ebenso wenig braucht nach längerer Wirksamkeit ein Enzym, d. h. der fermentativ wirkende Stoff, zerstört zu werden. Der Bewegungszustand seiner Moleküle hat sich eben geändert.

Hr. v. Wittich¹⁾ fand, dass Pepsin diffundirt durch Membranen, wenn draussen in das Wasser des Dialysators Fibrin gelegt wurde. Ich glaube, dass das Wasser hier die Schwingungen der Pepsinmoleküle auf den Fibrin übergetragen hat. Dasselbe fand Nägeli²⁾: Gährpilze auf der Fruchtschale erregen im Fleische der Früchte alkoholische Gährung.

Wenn Fibrin in eine Pepsinlösung gelegt wird, kann es nachher peptonsiert werden, ohne Pepsinzusatz. Das Fibrin hat aus der Pepsinlösung Pepsin in sich aufgenommen oder es ist, wie ich meine, nur molekular geändert. Im ersten Fall muss es schwerer geworden sein, als wenn es in einer unwirksam gemachten (etwa durch Erhitzen) Pepsinlösung gelegen hat. Ich habe hierüber Versuche angestellt, aber ohne Resultat. Die gefundenen Zahlen waren eben zu inconstant. Ich benutzte Pepsin von Witte.

Eine gewisse Stütze für diese Theorie finde ich nun in den Untersuchungen des Herrn A. Fick. Derselbe schichtete auf einige Tropfen Labenzymlösung im Reagirglas Milch von 40°C . Innerhalb einer Minute war die Milch bis oben hin geronnen, während doch kaum daran zu denken ist, dass durch blosse Diffusion innerhalb so kurzer Zeit Fermenttheilchen bis in die oberen Schichten gedrungen sein können. Vielmehr hat man hier anzunehmen, dass der Gerinnungsprozess sich von Casein-Molekül zu Casein-Molekül fortpflanzt. Ich weiss nicht³⁾, ob die geronnene Milch selbst wieder andere Milch zur Gerinnung bringen kann. Ist dies nicht der Fall, dann ist gewiss kein Ferment in den oberen Schichten anwesend; ist es aber der Fall, so ist es nicht in Widerspruch mit obiger Erklärung. Die Milch ist dann selbst fermentirungsfähig geworden. Ich habe den Versuch damals in derselben Weise angestellt, nur benützte ich ein aus Glycerin entnommenes und mit Wasser sorgfältig abgespültes Stückchen der Schleimhaut des Kälbermagens, wobei die Diffusion noch weit mehr ausgeschlossen ist. Ich sah auch die Milch gänzlich gerinnen, am ersten in der Umgebung des Stückchens Schleimhaut; zwar nicht so schnell, vermutlich weil ich Milch von Zimmertemperatur benutzt habe. Weiter habe ich diese Versuche nicht verfolgen können.

¹⁾ Pflüger's Archiv V.

²⁾ Theorie der Gährung S. 43.

³⁾ Ich habe leider nicht die Originalarbeit zur Verfügung und muss mich begnügen mit einem Referat im Centralbl. f. d. med. Wissensch. 1889. No. 49.

Gänzlich ausgeschlossen habe ich die Diffusion bei meinen Versuchen mit Pankreas, die hier nun folgen.

Aus einem Schweinepankreas wurden etwa erbsengrosse Stückchen herausgeschnitten und an Fäden gebunden, in eine grosse Quantität von Glycerin gebracht. Nach einiger Zeit (4 Tage bis 8 Wochen) wurde ein Stückchen herausgenommen und in Wasser gelegt, das nach kurzer Zeit abgegossen und durch reines Wasser versetzt wurde, bis keine Spur von Ferment mehr der Oberfläche anhängen konnte. Dann ward es aus dem Wasser genommen, nochmals mit Wasser abgespült, und schnell in ein Kölbchen mit 50 ccm 1 prozentiger Stärkelösung gebracht. Nach Beseitigung des Pankreasstückchens kam das Kölbchen sammt Inhalt in den Brutschrank. Nun wurde untersucht, nach welcher Zeit Zucker auftreten würde, und ob nach 24 Stunden alle Stärke geschwunden wäre. Ich benutzte zu diesen Reactionen frisch bereiteten Fehling's Reagens, bezw. Jodjodkaliumlösung.

Es zeigte sich nun, dass, nachdem das Stückchen während 2 Secunden in der Stärkelösung verweilt hatte, nach 10 Minuten Zucker zugegen war. In einzelnen Proben war nach 24 Stunden aus der nun völlig klaren Lösung alle Stärke geschwunden. In der Regel jedoch war noch Stärke oder Erythrodextrin zugegen.

Darauf wiederholte ich den Versuch, aber statt in Stärkelösung brachte ich das Pankreasstückchen in 25 ccm Wasser, wobei später ebenso viel 2 prozentige Stärkelösung hinzugefügt wurde. Das Resultat war genau dasselbe, wie bei der ersten Versuchsanordnung, auch wenn ich nicht sogleich, sondern erst nach einiger Zeit (5 Minuten bis 6 Stunden) die Stärke hinzufügte. Ganz gleichgültig war es, ob das Kölbchen, bevor die Stärke hinzugefügt wurde, bei Zimmertemperatur oder im Brutschrank gehalten wurde.

Dann brachte ich dasselbe Stückchen schnell hinter einander in 12 verschiedene Kölbchen, in jedes während 2 Secunden. Wenn noch etwas Ferment der Oberfläche anhängen sollte, so würde im letzten Kölbchen später Zuckerbildung eintreten müssen, als im ersten. Dies war niemals der Fall. Immer war nach 10—15 Minuten Zucken zugegen.

Dann untersuchte ich, ob Flüssigkeiten, welche Enzyme nicht lösen, die Fermentwirkung übertragen können. Ich benutzte dazu Aether, welcher auf Stärkelösung geschüttet wurde. Dann wurde das Pankreasstückchen in dem Aether aufgehängt, so dass es die Stärkelösung nicht berühren konnte. Nach 24 Stunden war die Stärke in Zucker umgesetzt. Der abgehebete Aether wirkte nicht diastatisch, auch nicht der nach Abdampfen des Aethers erhaltene Rückstand. Wenn aber Pankreas in Aether aufgehängt und nach Beseitigung desselben der Aether über Stärkelösung gegossen wurde, so fand Zuckerbildung statt. Es ist möglich, dass Tröpfchen von Flüssigkeit aus dem Pankreasstückchen sich durch den Aether senkten. Es ist aber auch möglich, dass der Aether zwar diastatische Wirksamkeit annimmt, dieselbe aber sogleich der unterliegenden Flüssigkeit übergiebt. Wo diese fehlt, behält er seine Wirksamkeit.

Ich konnte diesen Versuch natürlich nicht im Brutschrank vornehmen.

Endlich untersuchte ich, ob Luft die Fermentwirkung zu übertragen im Stande ist. Ich umgab ein Stückchen Pankreas oben mit einem kleinen Kegel aus Filterpapier, um das Abtropfen von Flüssigkeit zu verhindern, und brachte es so nahe als möglich oberhalb einer Stärkelösung. Nach 24ständigem Verweilen im Brutschrank war Zucker anwesend. Ich konnte natürlich nicht fortwährend controliren, ob etwa Flüssigkeit vom Pankreas in die Lösung herabfiel, aber da ich das Stückchen, so oft ich danach forschte, immer nur mässig feucht fand, glaube ich annehmen zu können, dass wirklich Pankreas Stärke zu Zucker fermentirt, ohne damit in Berührung zu sein. Immer fiel der Versuch genau so aus. Dass Fermente flächtig seien, wird doch wohl Niemand behaupten wollen. Dies wäre am wenigsten zu beweisen.

Wenn sich meine Theorie bewährt, so kann es gelingen, aus indifferenten Körpern Enzyme darzustellen. Dies würde mir dann schon gelungen sein mit dem Wasser, in welchem während 2 Secunden Pankreas gewesen war.

Möglicherweise ist bei dem Versuch des Herrn Fick auch Ferment gebildet, wenn nehmlich die geronnene Milch selbst Gerinnung erzeugen kann.

Goldschmidt¹⁾ scheint dasselbe gefunden zu haben. Er verdünnte menschlichen Speichel mit seiner zehnfachen Menge steriler NaCl-Lösung und liess dieses Gemisch während 1 bis 2 Tage bei 40° digeriren. Darauf mischte er 2 ccm davon mit 8 ccm NaCl-Lösung, liess digeriren, verdünnte u. s. w. Denselben Versuch stellte er an mit unwirksamem antiseptischem (er meint wohl: sterilem) Pferdespeichel (Parotis) anstatt mit NaCl-Lösung. Es zeigte sich nun die NaCl-Lösung noch diastatisch wirksam in der neunten Verdünnung, während der antiseptische Speichel schon in der sechsten Verdünnung sich unwirksam erwies. In der noch wirksamen NaCl-Verdünnung konnte höchstens 0 000 007 ccm Speichel zugegen sein (ich finde bei Berechnung pro Cubikcentimeter 0 000 000 256 ccm Speichel). Ich verdünnte Speichel und fand, dass in 10 ccm 1 prozentiger Stärkelösung noch Zucker gebildet wird durch 0,016 ccm Speichel. Wenn man diese Versuche vergleichen darf, so ist seine Erklärung gewiss richtig, „dass sterile NaCl-Lösung Ptyalin stärker reproducirt, als antiseptischer Speichel“. Nur möchte ich „diastatisch wirkende Salzlösung“ an Stelle des „Ptyalins“ lesen, da ja zur Reproduction des letzteren, eines organischen Körpers, die zum Aufbau nöthigen Stoffe fehlen.

Hat man aufgehört die Enzyme zu betrachten als bestimmte chemische Körper, dann kann man untersuchen, welche Stoffe fermentativ wirksam sein können, und auf diese Weise kann es gelingen zu entdecken, an welche Stoffe in den Verdauungsflüssigkeiten die Fermentwirkung gebunden ist.

Ich behalte mir vor, die Versuche noch mit anderen Enzymen zu wiederholen.

¹⁾ Zeitschr. f. physiol. Chemie X.