

[Istituto d'Igiene sperimentale della R. Università di Roma.]

Ueber die Enzyme.
Vergleichende Studie.

Von

Dr. Claudio Fermi, und Dr. Leone Pernossi.
Assistent.

Obwohl man die Enzyme vielfach studirte, blieb dessenungeachtet noch sehr viel bezüglich der Eigenthümlichkeiten derselben zu thun, und sodann geradezu alles, um über ihre chemische Natur in's Klare zu kommen.

Da wir jedoch glaubten, diesem letzteren Probleme besser, als auf directem chemischen Wege, durch das Studium der Eigenthümlichkeiten der Enzyme begegnen zu können, so wird sich die vorliegende Arbeit eigens mit diesem Studium befassen.

Wir werden über diese Untersuchungen schematisch und in möglichster Kürze in folgender Ordnung berichten:

- I. Wirkung der Wärme auf die Enzyme im trockenen Zustand und in Chloroform, Aether, Amyl-Alkohol, Benzol u. s. w.
- II. Wirkung des Sonnenlichtes auf die Enzyme, wie oben.
- III. Wirkung einiger Gase.
- IV. Wirkung verschiedener chemischer Substanzen.
- V. Verhalten gegen das Porzellanfilter.
- VI. Verhalten gegen die Thiermembranen.
- VII. Wechselwirkung der proteolytischen Enzyme auf einander.
- VIII. Schicksal der Enzyme im Organismus.
- IX. Giftigkeit der Enzyme.

I. Wirkung der Wärme auf die Enzyme.

Man hat die Wirkung der Temperatur auf Pepsin, Trypsin, Ptyalin, auf die Diastase, auf Emulsin, wie auch auf das fibrinogene Ferment und auf das proteolytische Enzym verschiedener Mikroorganismen studirt.

Was wir darüber wissen, ist das Folgende.¹

a) In Gegenwart von Wasser verlieren ihre Wirksamkeit:

1. Das Pepsin erwärmt eine Stunde hindurch bei 65 bis 70° C.
2. Das Trypsin erwärmt eine Stunde hindurch bei 50° C. oder während 24 Stunden bei 37° C., löst nicht mehr das Fibrin, obschon noch die Gelatine. Das Trypsin erwärmt eine Stunde hindurch bei 60° C., wird auch für diese Zeit unwirksam.
3. Das Ptyalin erwärmt während 30 Minuten bei 73° C.
4. Das fibrinogene Ferment erwärmt während 30 Minuten bei 80° C.
5. Die proteolytischen Fermente der Bakterien erwärmt eine Stunde hindurch bei 55 und 70° C.²

b) Im trockenen Zustande verlieren ihre Giftigkeit:

1. Das Pepsin erwärmt bei 100° C. während 4 Stunden (Salkowski und Hoppe-Seyler)³ oder bei 170° C. während 15 Minuten (Hüppe).⁴
2. Das Trypsin erwärmt eine Stunde hindurch bei 159 bis 162° C. (Hüppe).⁴
3. Die Diastase erwärmt 30 Minuten bei 158° C. (Hüppe).⁴
4. Das proteolytische Ferment des Vibrio Finkler-Prior erwärmt bei 140° C. 30 Minuten lang (Fermi).⁵

Unsere Untersuchungen über diesen Gegenstand hatten folgende Zwecke:

1. Zu studiren die Veränderungen in der Wirksamkeit, welche von der Wirkung der Wärme auf das Trypsin im trockenen Zustande hervorgerufen wurden.
2. Zu studiren die Wirkung der Temperatur auf das Pepsin, auf das Trypsin, auf das Ptyalin und Emulsin in Chloroform, Aether, Amylalkohol und in Benzol ausserhalb der dissociirenden Wirkung des Wassers.

¹ C. Fermi, I fermenti peptici e diastatici dei microbi. *Giornale della R. Accademia di medicina di Torino*. 1890. Nr. 1—2.

² C. Fermi, a. a. O.

³ Salkowski u. Hoppe-Seyler. *Virchow's Archiv*. Bd. CLXXXVII. S. 552.

⁴ F. Hüppe, Ueber das Verhalten der ungeformten Fermente gegen hohe Temperatur. *Mittheilungen a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte*. S. 160—165.

⁵ C. Fermi, a. a. O.

A. Wirkung der hohen Temperatur auf das Trypsin in trockenem Zustande.

Man vertheilte in Proben 0.1^{grm} von vorher bei 80° C. und über Schwefelsäure getrocknetem Trypsin; einige Proben setzte man 30 Minuten hindurch der Temperatur von 130° C. aus, andere der von 140° C. und wieder andere endlich der von 155 und 160° C. Alsdann prüfte man vermittelst der Gelatine die Wirksamkeit des den obengenannten Temperaturen unterworfenen Trypsins und verglich sie mit jener des nicht erwärmten Trypsins. Hierzu löste man die verschiedenen Proben von Trypsin, jede gesondert, in 100^{ccm} Carbolwasser (1 Procent) und machte dann von jeder der vier Lösungen in der gewöhnlichen Weise drei Proben in Gelatine. Nach 10 Tagen mass man die Schichten von gelöster Gelatine und erhielt das folgende Resultat:

Proben	Controle	130° C.	140° C.	155° C.	160° C.
1	6 ^{mm}	4	3	1	0
2	6 „	4	3 ^{1/2}	1	0.
3	6 „	4 ^{1/2}	3	1	0

Hieraus ergibt sich also, dass das Trypsin erwärmt eine halbe Stunde hindurch bei 130° C. circa $\frac{1}{3}$ seiner Wirksamkeit, bei 140° C. die Hälfte, bei 155° C. $\frac{5}{6}$ verliert und bei 160° C. völlig zerstört wird.

Sicherlich werden sich die verschiedenen Trypsin-Präparate, welche nicht denselben Grad von Wirksamkeit besitzen, anders verhalten bei der Wirkung der Wärme, sowie bei jener der physischen und chemischen Agentien.

B. Wirkung der hohen Temperatur auf das Pepsin und auf das Trypsin im Zustande der Trockenheit in Amyl-Alkohol, in Aether, in Chloroform und in Benzol.

Mit diesem Experiment wollten wir nicht nur die Wirkung der Wärme auf die oben genannten Enzyme ausserhalb der dissociirenden Wirkung des Wassers und in indifferenten Flüssigkeiten studiren, sondern auch jene dieser Substanzen auf die genannten Enzyme bei hoher Temperatur.

Um einerseits die Verdampfung dieser Flüssigkeiten und andererseits den Hinzutritt von wässrigem Dampfe zu vermeiden, bedienten wir uns an der Lampe geschlossener Glasröhrchen.

Man nahm Röhren von 25^{cm} Länge und 4^{mm} Weite, schloss sie an einem Ende mit der Lampe und vertheilte in jedes einzelne 0.1^{g^{mm}} der obengenannten Enzyme im Zustande völliger Trockenheit.

Die an den Innenwänden der Röhren zurückgebliebenen Theilchen wurden durch Erglühung zerstört.

Alsdann vertheilte man in die Röhren 1.5^{ccm} der verschiedenen obengenannten Flüssigkeiten, verschloss jene mit der Lampe und setzte sie für eine Stunde der Temperatur von 80° C. im Mariabade aus und bei 100° C. dem Wasserdampfe im Koch'schen Apparat.

Hierauf nahm man die Röhren heraus, schnitt den unteren, den Brei enthaltenden Theil ab und löste die Masse in 100^{ccm} Carbolwasser; nunmehr prüfte man die Wirksamkeit des Pepsins mit Fibrin und jene des Trypsins mit Gelatine.

Das erlangte Resultat giebt die folgende Tabelle:

Flüssigkeiten	Pepsin		Trypsin	
	80° C.	100° C.	80° C.	100° C.
Chloroform	wirksam	unwirksam	wirksam	unwirksam
Aether	unwirksam	„	unwirksam	„
Amylalkohol	wirksam	wirksam	wirksam	wirksam
Benzol	„	unwirksam	„	unwirksam
Wasser	unwirksam	„	unwirksam	„

Aus dieser Tabelle geht hervor, dass das Pepsin und das Trypsin unter den oben dargelegten Bedingungen widerstanden bei 80° C. während einer Stunde in Chloroform, Amylalkohol und in Benzol, und dass alle beide zerstört wurden in Aether. Nur in Amylalkohol widerstanden die beiden Enzyme während derselben Zeit auch bei 100° C.

II. Wirkung des Sonnenlichtes auf die Enzyme.

Die Wirkung des Sonnenlichtes auf die Enzyme ist, soviel uns bekannt, noch nicht studirt worden.

Die Untersuchungen, welche wir hierüber anstellten, hatten den Zweck, die Wirkung des Sonnenlichtes mit und ohne Hinzutreten der Wärmewirkung des Pepsins und des Trypsins zu studiren, und zwar:

1. In wässriger Lösung und in Gegenwart verschiedener Säuren und einiger Salze.

2. Unter Ausschluss der dissociirenden Wirkung des Wassers, indem man die beiden Enzyme im Zustande völliger Trockenheit der Sonne aussetzte.

3 Indem man das Wasser durch indifferente Flüssigkeiten, wie Chloroform, Aether, Amylalkohol und Benzol ersetzte.

Schliesslich studirte man auch die Wirkung des directen Sonnenlichtes auf das proteolytische Ferment verschiedener Mikroben.

1. Wirkung des Sonnenlichtes auf das Trypsin und das Pepsin in Gegenwart verschiedener Säuren und einiger Salze.

Eine Lösung von Trypsin und von Pepsin zu drei pro Mille wurde in Proben von je 5^{cem} vertheilt, und alsdann fügte man zu jeder derselben 5^{cem} von Lösungen der unten bezeichneten Säuren und Salze. Von diesen Proben präparirte man vier gleiche sowohl für das Trypsin, wie für das Pepsin und verfuhr dann mit denselben auf die folgende Art.

a) Eine Probe setzte man dem Lichte oder der directen Wärmewirkung der Sonne aus (höchste Temperatur am schwarzen Actino-Thermometer circa 54 bis 56° C.).

b) Eine zweite Probe setzte man dem Sonnenlichte in der Weise aus, dass die Temperatur am gewöhnlichen Thermometer 37° C. nicht überschritt (höchste Temperatur am schwarzen Thermometer circa 47° C.).

c) Eine dritte Probe hielt man im Dunkeln im Brütoven bei einer Temperatur von 42° C.

d) Die vierte Probe hielt man auch im Dunkeln, aber bei der gewöhnlichen Temperatur (25 bis 28° C.).

Nach 10 Tagen, während deren die ausgesetzten Proben für circa 50 Stunden an der Sonne blieben, prüfte man in der üblichen Weise sowohl die Wirksamkeit des Trypsins, als jene des Pepsins und erlangte die folgenden Resultate (siehe umstehende Tabelle S. 88).

Aus dieser Tabelle ergibt sich:

1. Dass sowohl das Trypsin wie das Pepsin, sei es in Gegenwart von Säuren oder Salzen, wie einfachem Wasser, viel mehr abgeschwächt werden, wenn sie dem Sonnenlichte ausgesetzt, als wenn sie im Dunkeln gehalten werden.

Die Abschwächung ist grösser bei der Sonnenlichttemperatur von 44 bis 56° C., als bei der von 37 bis 47° C. Auch bei den im Dunkeln gehaltenen Proben ist die Abschwächung bei der Temperatur von 40 bis 42° C. grösser, als bei der von 25 bis 28° C.

L ö s u n g e n	Dunkel 25—28° C.			Dunkel 42° C.			Sonnenlicht 37—47° C.			Sonnenlicht 44—56° C.		
	Trypsin	Pepsin		Trypsin	Pepsin		Trypsin	Pepsin		Trypsin	Pepsin	
		Gelatine	Fibrin		Gelatine	Fibrin		Gelatine	Fibrin		Gelatine	Fibrin
1. Chlorwasserstoffsäure .	0	0	gelöst	0	0	gelöst	0	0	gelöst	0	0	gelöst
2. Phosphorsäure	0	8	„	0	6	„	0	6	„	0	5	„
3. Milchsäure	5	8	„	2	8	„	0	5	„	0	3	„
4. Weinsäure	0	10	„	0	6	„	0	8 1/2	„	0	7	„
5. Oxalsäure	0	19	nicht gelöst	0	12	nicht gelöst	0	15	nicht gelöst	0	12	nicht gelöst
6. Essigsäure	3	7	gelöst	2	6	gelöst	2	7	gelöst	0	6	gelöst
7. Propionsäure	1	5	„	1 1/2	4	„	4	2 1/2	„	0	0	„
8. Buttersäure	9	4	„	4	4	„	1	2	„	0	0	„
9. Valeriansäure	11	0	„	1	0	„	2	1 1/2	„	0	0	„
10. Kohlensaures Natron .	9	—	—	7	—	—	3	—	—	1 1/2	—	—
11. Chlornatrum	13	—	—	10	—	—	10	—	—	2 1/2	—	—
12. Wasser	8	—	—	8	—	—	2	—	—	1/2	—	—

2. Die Abschwächung des Trypsins ist grösser in Gegenwart von Säuren, als in der von kohlen-saurem Natron und Chlornatrium.

3. Unter den Säuren üben Chlorwasserstoff-, Phosphor-, Milch-, Oxal- und Weinsäure eine viel abschwächendere Wirkung auf das Trypsin aus, als es Propion-, Essig-, Butter- und besonders Baldriansäure thun.

4. Von den Salzen bewahrt Chlornatrium besser die Wirksamkeit des Trypsins als kohlen-saures Natron.

5. In Wasser schwächt sich das Trypsin viel mehr ab, als in Gegenwart der beiden obengenannten Salze und vielleicht auch der Butter- und Baldriansäure.

6. Das Pepsin verliert viel schneller seine proteolytische Kraft über die Gelatine und über das Fibrin, wenn es der Chlorwasserstoffsäure und vielleicht auch der Baldriansäure ausgesetzt, als wenn es der Phosphor-, Wein-, Milch- und Essigsäure ausgesetzt ist.

7. Das Pepsin, der Oxalsäure ausgesetzt und in Gegenwart derselben, entwickelte eine grössere verflüssigende Energie auf die Gelatine, als wenn es anderen Säuren ausgesetzt wurde oder sich in Gegenwart derselben befand. Das Gegentheil geschah bei seiner Wirkung auf das Fibrin, wo es dasselbe in Gegenwart jener Säure fast gar nicht löste.

8. Während das Pepsin, wenn es der Chlorwasserstoff-, der Propion-, der Butter- und Baldriansäure ausgesetzt wird, sich unwirksam auf die Gelatine erweist, bewahrt es statt dessen noch seine Wirksamkeit auf das Fibrin, auch wenn es directem Sonnenlichte ausgesetzt wird.

2. Wirkung des Sonnenlichtes auf die Enzyme im Zustande völliger Trockenheit.

Wenn die Wirkung des Sonnenlichtes fähig ist, die Enzyme und mehrere andere Substanzen (Sparteïn, Conin, Nicotin, Tetanusgift u. s. w.) ziemlich schnell in Gegenwart der dissociirenden Wirkung des Wassers zu verändern, so wirkt jenes hingegen sehr schwach oder gar nicht auf die Substanzen, welche sich im Zustande völliger Trockenheit befinden. Um zu sehen, wie sich in dieser Beziehung die Enzyme verhalten, stellten wir die folgenden Untersuchungen an:

Wir vertheilten in 20 Proben je 0.1 g^{m} der beiden obengenannten Fermente und brachten sie dann für eine Stunde zum Trocknen in den Brütöfen bei 90° C. und für 5 Tage in einen Trockenapparat mit Schwefelsäure. Man verschloss sie hermetisch und in horizontaler Lage; um dem Lichte eine breitere Fläche auszusetzen, setzte man die Proben wie oben theils directem Sonnenlichte aus (Temperatur 44 bis 56° C.), theils dem Sonnenlichte bei einer Temperatur nicht über 37° C. (höchste Temperatur am dunkeln Thermometer 47° C.); andere Proben wurden zur Controle aufbewahrt im Dunkeln bei gewöhnlicher Temperatur.

Nach 5 bis 10 bis 20 bis 30 Tagen und drei Monaten prüfte man die Wirksamkeit des Pepsins und des Trypsins mit den gewöhnlichen Reactiven und fand, dass die beiden Enzyme zweifellos noch wirksam waren. Bei dem directem Sonnenlichte ausgesetzten Trypsin konnte man nur eine leichte Abschwächung nachweisen. Es ist also auch in Bezug auf das Licht das Trypsin viel empfindlicher als das Pepsin.

3. Wirkung des directen Sonnenlichtes auf das Ptyalin, auf die Diastase und auf Emulsion in trockenem Zustande.

Die drei obengenannten Fermente in der vorher befolgten Art ausgesetzt, ergaben bei dem Studium der Lichtwirkung auf das Pepsin und das Trypsin gleiche Resultate, wie die für diese selben Enzyme erlangten. Auch nach einem Monat waren die drei Fermente noch nachweisbar wirksam.

4. Wirkung des Sonnenlichtes auf Pepsin, Trypsin, Ptyalin, auf die Diastase und auf Emulsin im Zustande völliger Trockenheit und in Gegenwart von Chloroform, Aether, Amylalkohol und Benzol.

Wenn das Licht seine zerstörende Wirksamkeit auf die Enzyme ausübt in Gegenwart von Wasser, was geschieht dann, wenn man dieses letztere durch eine indifferente Flüssigkeit, wie Chloroform, Aether, Benzol und Amylalkohol ersetzt?

Um auf diese Frage zu antworten, stellten wir die folgenden Untersuchungen an:

Sei es, um die obengenannten Flüssigkeiten, mit Ausnahme des Amylalkohol zu verflüchtigen, sei es, um den Zutritt von Wasserdampf zu hindern, schlossen wir die fünf obengenannten Enzyme in Röhren, und zwar nahmen wir weder mehr, noch weniger als bei dem Studium der Wirkung der Wärme.

Die Röhrchen wurden der Wirkung des directen Sonnenlichtes ausgesetzt (höchste Temperatur am schwarzen Thermometer 56° C.) 200 Stunden hindurch.

Nach dieser Zeit wurden die einzelnen Enzyme mit den geeigneten Reactiven geprüft und alle wirksam befunden. Wir schlossen also, dass die genannten Enzyme, directem Sonnenlichte ausgesetzt, in den obengenannten Flüssigkeiten ihre Wirksamkeit über 200 Stunden bewahren können.

5. Wirkung des Sonnenlichtes auf die proteolytischen Enzyme verschiedener Mikroben.

Nicht uninteressant stellte sich uns das Studium der Wirkung des Sonnenlichtes auf die proteolytischen Enzyme der Mikroorganismen dar. Diese Untersuchungen dienten dazu, das Studium der Wirkung des Sonnenlichtes auf die Enzyme im Allgemeinen zu vervollständigen und das Studium der Eigenthümlichkeiten derselben fortzusetzen.

Man vertheilte in Proben flüssig gemachte Gelatine von Culturen verschiedener fluidificanter Mikroben, jede zu 5^{ccm}, und setzte sie dann 200 Stunden hindurch dem Sonnenlichte aus. Eine Probe für jedes mikrobische Enzym wurde zur Controle im Dunkeln gehalten. Nach Ablauf der genannten Zeit prüfte man mittels der gewöhnlichen Röhrchen mit Carbolsäure-Gelatine die Wirksamkeit jedes einzelnen Enzyms und erlangte das folgende Resultat:

Bakterische Enzyme	Sonnenlicht 200 Stunden		Bakterische Enzyme	Sonnenlicht 200 Stunden	
	mm	Dunkel		mm	Dunkel
1. <i>V. cholerae</i> Massauae . . .	12	25	8. <i>Bacillus prodigiosus</i> . . .	4	28
2. „ „ Hamburg . . .	9	23	9. „ Kiel	4	16
3. „ Deneki	5	10	10. „ <i>pyocyaneus</i> . . .	8	22
4. „ <i>Milleri</i>	10	29	11. „ <i>indicus</i>	24	25
5. <i>Bacillus antracis</i>	3	9	12. <i>Proteus vulgaris</i>	2½	7
6. „ <i>radiciformis</i>	2	10	13. <i>Staphyloc. pyogenes albus</i>	8	10
7. „ <i>subtilis</i>	0	4	14. „ „ <i>tenuis</i>	16	18

Aus dieser Tabelle erhellt, dass die proteolytischen Enzyme der Bakterien, 200 Stunden directem Sonnenlicht ausgesetzt, alsdann, wenn sie auch nicht völlig zerstört werden, doch viel von ihrer Wirksamkeit verlieren.

Von diesen bakterischen Enzymen sind gegen das Sonnenlicht am empfindlichsten die folgenden:

1. Das Enzym des Bac. prodigiosus, dessen Wirksamkeit reducirt wird auf $\frac{1}{7}$
2. " " " " Kiel, " " " " " $\frac{1}{4}$
3. " " pyocyaneus, " " " " " $\frac{1}{3}$
4. " " subtilis, " " " " " $\frac{1}{3}$
5. " " des Proteus vulgaris, " " " " " $\frac{1}{3}$

Das Enzym des Bacillus indicus und der Staphylokokken bewiesen sich gegen die Wirkung des Lichtes am resistantesten.

III. Wirkung einiger Gase auf die Enzyme.

Man weiss wenig über die Wirkung der Gase CO_2 , CO , O , H_2S auf die Enzyme. Nasse¹ zufolge würden Sauerstoff und Kohlenoxyd eine schädliche Wirkung auf das Invertin ausüben, während sich Wasserstoff und Kohlenanhydrid indifferent zu demselben verhalten würden. Letzteres würde Podolinski² zufolge die Umbildung des Zymogen in Trypsin behindern, eine Umbildung, die vom Sauerstoff begünstigt werden würde. Unter den verschiedenen Gasen übt nur das Schwefelwasserstoffgas eine wahrhaft schädliche Wirkung auf das proteolytische Ferment einiger Bakterien aus, wie z. B. auf jenes des Bac. prodigiosus, des Bac. pyocyaneus und des Koch'schen Vibrio, während das Kohlenanhydrid nur eine leichte abschwächende Wirkung auf das Enzym des Bacillus Miller, des Cholera-Vibrio und des Deneke'schen Vibrio ausüben würde.

Das schwefelsaure Gas, als dasjenige, welches eine sichere und leicht nachweisbare Wirkung auf die Enzyme ausübt, wurde bei den von uns angestellten Untersuchungen gelöst. Es wurde die Wirkung dieser Gase studirt auf Trypsin, auf Pepsin, auf Ptyalin, auf die Diastase und auf Emulsin, wie auch auf die proteolytischen Enzyme verschiedener Mikroben.

Anstatt die Wirkung der Enzyme auf Fibrin, auf Gelatine u. s. w. in Gegenwart des genannten Gases zu studiren, wie es bereits von einem der Unserigen (Fermi)⁴ geschah, unterwarfen wir vorher für eine

¹ Otto Nasse, Pflüger's *Archiv*. Bd. XVI. S. 471—481.

² Serge Podolinski, *Jahresbericht der Thierheilkunde*. Bd. VI. S. 175.

³ C. Fermi, *Weitere Untersuchungen über die tryptischen Enzyme der Mikroorganismen*.

⁴ C. Fermi, a. a. O.

gegebene Zeit das Enzym der Wirkung des Schwefelwasserstoffes und prüften dann die Wirksamkeit des Fermentes selbst mit den geeigneten Reactiven (Fibrin, Gelatine, Stärke u. s. w.).

a) Wirkung des Schwefelwasserstoffes auf das Trypsin.

Man liess durch Röhren, welche 5^{cem} einer Trypsinlösung 1:200 enthielten, einen Strom von schwefelsaurem Gas zwei Stunden lang passiren und prüfte dann die Wirksamkeit des Trypsins auf Gelatine. Nach 7 Tagen wurde die Schicht von fluidificirter Gelatine in Millimetern gemessen und erhielt man das folgende Resultat:

Proben	Trypsin unter der Wirkung des Gases	Controle
1	9 ^{mm}	10 ^{mm}
2	9 [„]	10 [„]
3	9 [„]	10 [„]

Bei zweimaliger Wiederholung desselben Experimentes erlangte man das gleiche Resultat; wir schliessen daher, dass ein Strom von schwefelsaurem Gas, dessen Dauer bis auf zwei Stunden verlängert wird, nur eine leicht abschwächende Wirkung auf das Trypsin ausübt.

b) Wirkung des Schwefelwasserstoffes auf das Pepsin.

Man liess durch Proben, deren jede 5^{cem} einer Lösung von Pepsin zu 1 Procent enthielt, zwei Stunden hindurch einen Strom Schwefelwasserstoffgas passiren und prüfte dann die Wirksamkeit des so behandelten Pepsins mit dem Fibrin. Nach 7 Stunden war das Fibrin völlig gelöst, daher zog man den Schluss, dass das Schwefelwasserstoffgas keine nachweisbare Wirkung auf das Pepsin ausübt.

c) Wirkung des H₂S auf Ptyalin, auf die Diastase und Emulsin.

Man liess durch Röhren, deren jedes 5^{cem} von Lösungen zu 1 Proc. der drei obengenannten Enzyme enthielt, einen Strom von Schwefelwasserstoff zwei Stunden hindurch passiren und prüfte dann die Wirksamkeit des Ptyalins und der Diastase mit Stärke, jene des Emulsins mit Amygdalin.

Die Reactionen waren für alle drei obengenannten Enzyme positiv; man schloss daher, dass auch das Ptyalin, die Diastase und das Emulsin nicht nachweisbar geschädigt werden von einem Strome

von Schwefelwasserstoffgas, dessen Dauer auf zwei Stunden verlängert wird.

Nachdem die vorgängigen Experimente wiederholt worden waren, unterwarf man die fünf Enzyme der Wirkung desselben Gases für 15 Stunden; das Resultat war dem vorhergehenden nicht ungleich.

Die fünf obengenannten Enzyme können also die Wirkung eines Stromes von Schwefelwasserstoffgas, dessen Dauer auch auf 15 Stunden verlängert wird, ertragen.

d) Wirkung des Schwefelwasserstoffgases auf das proteolytische Ferment einiger Mikroben.

Man vertheilte in eine Reihe von Proben 5^{cem} fluidificirter Gelatine von Culturen verschiedener verflüssigender Mikroben, fügte in jedem Röhrchen andere 5^{cem} 2 procent. Carbollösung hinzu und unterwarf dann die Proben eine Stunde lang einem Strome von H₂S. Nach einer Stunde prüfte man die Wirksamkeit der so mit Carbonsäure-Gelatine behandelten proteolytischen Enzyme, und nach fünf Tagen mass man die fluidificirten Schichten in Millimetern. Dasselbe Experiment wurde mit anderen Culturen derselben Mikroben wiederholt, indem man die Wirkung des obengenannten Gasstromes auf zwei Stunden verlängerte und nur nach 10 Tagen die Schicht von verflüssigter Gelatine mass. Die Resultate beider Experimente giebt die nachstehende Tabelle:

Bakterische Enzyme	Nach 5 Tagen		Nach 10 Tagen	
	Wirkung des Gases H ₂ S	Controle	Wirkung des Gases	Controle
	mm	mm	mm	mm
1. V. Cholerae Massanae .	3	6	3	11
2. Andere Cultur desselben	5	6	—	—
3. Bac. Finkler-Prior . . .	6	10	7	12
4. Andere Cultur desselben	7	15	—	—
5. Andere Cultur desselben	9	18	—	—
6. Bac. Milleri	6	7	12	14
7. Vibrio Deneke	3	5	6	10
8. Vibrio Metschnikovi . .	5	7	6	7
9. Bacillus prodigiosus . .	0	5	0	10
10. Bacillus Kiel	8	10	2	7
11. Proteus vulg., alte Cultur	1	3	0	5
12. Andere Cultur	0	2	—	—
13. Bacillus antracis	2	3	5	6
14. Bacillus indicus	4	17	8	25
15. Bacillus Tetani	7	8	14	15
16. Bacillus pyocyaneus . .	4	5	4	6

Conclusionen.

1. Die proteolytischen Enzyme der Bakterien bezeigen unter einander eine verschiedenartige Empfindlichkeit gegen das Schwefelwasserstoffgas.

2. Sehr empfindlich sind: Das Ferment des Bac. prodigosus, jenes des Proteus vulgaris und jenes des Bac. indicus, welche völlig ihre Wirksamkeit verloren.

3. Die resistentesten sind: Das Ferment des Bac. pyocyaneus, jenes des Tetanusbacillus, jenes des Milzbrandbacillus, jenes des Vibrio Metschnikoff, jenes des Vibrio Miller.

4. Das Ferment des Vibrio Metschnikoff und jenes des Vibrio Miller sind resistenter als jenes des Vibrio Finkler-Prior und als jenes des Cholerabacillus.

5. Das proteolytische Enzym des Bac. prodigosus ist sowohl gegen die Wärme, wie gegen das Licht und den Schwefelwasserstoff am empfindlichsten von allen.

e) Wirkung des Kohlendioxyds auf das proteolitische Enzym des Vibrio der Cholera Massaua, des Bacillus Miller und des Bac. Deneke.

Man liess durch Proben, die auf dieselbe Art, wie bei den vorhergehenden zwei Experimenten, präparirt wurden, einen Strom von Kohlendioxyd während 15 Stunden passiren. Als man die Wirksamkeit der so behandelten Enzyme mit der gewöhnlichen Gelatinemethode nach 10 Tagen prüfte, gelangte man zu dem folgenden Resultat:

Bakterische Enzyme	Ausgesetzt dem Kohlendioxyd	Controle
1. Vibrio d. Cholera Massaua	10 mm	12 mm
2. „ Miller	15 „	19 „
3. „ Deneke	8 „	10 „

Das proteolytische Enzym der drei Vibrionen wird also nur leicht abgeschwächt von der auf 15 Stunden verlängerten Wirkung des Kohlendioxyds.

IV. Wirkung verschiedener chemischer Substanzen auf Pepsin und Trypsin.

Unsere Kenntnisse von der Wirkung der verschiedenen chemischen Substanzen auf die Enzyme sind spärlich und ungewiss. Was man weiss, ist ungefähr das Folgende:

1. Das Pepsin würde nach Sundberg nicht niedergeschlagen werden von den folgenden Substanzen: Sublimat, Bleiacetat, eisencyansaures Kali und Essigsäure, Platinchlorür, Silbernitrat, Tannin, Jod; und aus der Thatsache, dass es keineswegs die Reaction des Xantoprotein giebt, schliesst der Autor, dass das Pepsin keine Eiweisssubstanz sei.

2. Ueber das Trypsin und die anderen Enzyme weiss man wenig Genaueres. Man weiss nur, dass sie im Allgemeinen niedergeschlagen werden von den metallischen Salzen. Wie bekannt, werden das Trypsin und das proteolytische Enzym der Bakterien, entgegen dem, was bei dem Pepsin geschieht, von den organischen, auch verdünnten (1procentigen) Säuren geschädigt. Das inversive Enzym der Saccharomyceten und des *Aspergillus niger* hingegen würde unwirksam bleiben in Gegenwart von Spuren von Alkalien, die kaum mit dem Lackmuspapier¹ nachweisbar sind; diese Enzyme wirken viel besser in einem leicht sauren Mittel.

Wir studirten die Wirkung der verschiedenen chemischen Agentien auf Trypsin und Pepsin. Wir lassen die betreffenden Untersuchungen sogleich folgen:

A. Wirkung verschiedener chemischer Substanzen auf das Trypsin.

Die Veränderungen in der Wirksamkeit des Trypsins, welche von der Wirkung der verschiedenen chemischen Agentien hervorgebracht wurden, konnte man mit grosser Genauigkeit nachweisen, indem man sich der Gelatine als Reactiv bediente.

Wir vertheilten eine Trypsinlösung 1:200 in Proben zu je 5^{cem}, fügten zu jeder 5^{cem} einer Lösung der nachfolgend angeführten chemischen Substanzen und setzten dann die Proben der Temperatur von 37° C. aus. Nach 48 Stunden und nach 10 Tagen prüfte man die Wirksamkeit des Trypsins der einzelnen Proben mit der gewöhnlichen Gelatinemethode. Sei es nun, um nicht eine zu concentrirte Trypsinlösung zu prüfen, sei es, um nicht eine zu grosse Quantität der verschiedenen chemischen Substanzen mit derselben zusammenzubringen, die uns durch Vermehrung

¹ A. Fernbach, Sur l'invertine ou sucrase de la levure. *Annal. de l'Institut Pasteur.* 1890. p. 641.

Wirkung verschiedener chemischer Substanzen auf das Trypsin.

Portl. Nr.	Chemische Substanzen	Procentualer Gehalt von chemischer Substanz in d. Trypsinlösung		Trypsinlösung 1:10000		Lösung 1:40000 nach 48 Stunden	Wirkung der chemischen Substanzen auf die Gelatine		Niederschlag
		mm	mm	nach 48 Std. nach 10 Tagen	mm		fluidificirt?	fluidificabel?	
1	Chlornatrium, 0.5 Procent	6	1	1	1	1	nein	—	nein
2	Glycerin	6	2	2	1	1	„	ja (4 mm)	„
3	Alkohol	10	10	10	5	5	„	ja (6 „)	ja
4	Phosphorsäure	0	0	0	0	0	„	—	nein
5	Chromsäure	0	0	0	0	0	„	nein	ja
6	Pikrinsäure	0	0	0	0	0	„	ja (6 mm)	„
7	Phosphormolybdänsäure	0	0	0	0	0	„	ja (4 „)	„
8	Phosphorwolframsäure	0	0	0	0	0	„	nein	stark
9	Borsäure	9	2	1	1	1	„	—	nein
10	Salicylsäure	0	0	0	0	0	„	—	„
11	Tanninsäure	2	0	0	0	0	„	nein	stark
12	Gallussäure	10	0	0	1	1	„	—	nein (?)
13	Quecksilber-Bichlorür	8	3	3	3	3	„	nein	ja
14	„	0	0	0	0	0	„	„	stark
15	Zinkchlorür	0	0	0	0	0	„	„	ja
16	Kobalt-Chlorür	3	0	0	0	0	„	„	„
17	Kadmium	0	0	0	0	0	„	„	schwach
18	Strontium	3	0	0	0	0	„	ja (5 mm)	nein (!)
19	Calcium	9	4	4	3	3	„	ja (5 „)	(ja)
20	Baryum	3	0	0	1	1	„	ja (5 „)	nein
21	Eisen	6	1	1	4	4	„	nein	ja
22	Eiacetat	4	1	1	0	0	„	„	„

Wirkung verschiedener chemischer Substanzen auf das Trypsin. (Fortsetzung.)

Forts. N ^o	Chemische Substanzen	Procentualer Gehalt von chemischer Substanz in d. Trypsinlösung	Trypsinlösung 1:10000		Lösung 1:40000 nach 48 Stunden	Wirkung der chemischen Substanzen auf die Gelatine		Niederschlag
			nach 48 Std. mm	nach 10 Tagen mm		fluidificirt?	fluidificabel?	
23	Kupferacetat	5 Procent	—	—	—	nein	nein	stark
24	Kupfersulfat	5 "	0	0	0	"	"	mehrb. Wärme
25	Zinksulfat	10 "	0	0	0	"	"	Spuren
26	Aluminiumsulfat	10 "	0	0	0	"	"	Spur. b. Wärme
27	Silbernitrat	gesättigt	0	0	0	"	ja (6 mm)	stark b. Wärme
28	Wismuthnitrat.	—	0	0	0	"	nein	ja
29	Kalichromat	10 Procent	7	3	1	"	ja (7 mm)	nein
30	Eisencyansaures Kali	gesättigt	5	1	1	"	ja (5 "	ja
31	Hyper-mangansaures Kali	5 Procent	0	0	0	"	nein	?
32	Jod-Kali	5 "	6	1	1	"	ja (5 mm)	Spur. b. Wärme
33	Jod (alkohol. Lösung)	5 "	0	0	0	"	ja (5 "	Spuren
34	Tartarus stybiatus	5 "	8	4	0	"	—	nein
35	Baryhydrat	gesättigt	0	0	0	"	ja (6 mm)	ja (bei Wärme)
36	Kalkwasser	"	2	5	0	"	ja (6 "	—
37	Magnesiumoxyd	—	4	0	1	"	—	—
38	Tymol (alkohol. Lösung)	10 Procent	6	1	0	"	—	nein
39	Aseptol desgl.	10 "	0	0	0	"	ja (5 mm)	ja (bei Wärme)
40	Cresol desgl.	10 "	0	0	0	"	ja (3 "	nein (?)
41	Cresylol (wäss. Lösung)	10 "	0	0	0	"	ja (5 "	Spuren
42	Lysol desgl.	5 "	0	0	0	"	ja (4 "	"
43	Creolin	—	2	0	0	"	ja (5 "	"
44	Carbolwasser (alkohol. Lös.)	5 Procent	0	0	0	"	ja (5 "	nein

oder Verminderung der Lösbarkeit der Gelatine zu falschen Resultaten hätte führen können, verdünnten wir die einzelnen Proben wie folgt:

In einer ersten Lösung befand sich das Trypsin im Verhältniss von 1:10 000 und in einer zweiten im Verhältniss von 1:40 000. Da das Trypsin bei 1:40 000 auch mit Gelatine kaum nachweisbar ist bei der Prüfung nach 10 Tagen, so machte man die einzige Verdünnung 1:10 000.

Um gewiss zu sein, dass die chemischen Substanzen bei dem Experiment in der oben angegebenen Verdünnung nicht für sich allein fähig wären, die Gelatine flüssig zu machen oder sie unlöslich zu machen, bereitete man die beiden anderen folgenden Proben: Man brachte die genannten Substanzen in Verbindung mit der Gelatine in einer Concentration, die 100 mal stärker als die erste obengenannte Verdünnung, und als man nach 5 Tagen beobachtet hatte, dass die Gelatine flüssig geworden war, goss man die Substanzen aus und ersetzte sie mit derselben Menge einer Trypsinlösung von 1:500, d. h. 20 mal stärker als die ebengenannte erste Verdünnung.

Nach 10 Tagen wurden die einzelnen Proben beobachtet und die Schicht verflüssigter Gelatine gemessen; daraus ergab sich die vorstehende Tabelle, auf welcher in einer besonderen Colonne auch das Niederschlagen des Trypsins bei Kälte und bei Wärme in Verbindung mit den verschiedenen chemischen Substanzen erscheint.

Zusammenstellung der Ergebnisse.

Es zerstörten also völlig das Trypsin unter den oben angeführten Bedingungen die folgenden Substanzen:

Säuren . . .	{	Phosphorsäure	5	Procent
		Chromsäure	5	„
		Pikrinsäure		
		Phosphorwolframsäure		
		Salicylsäure		
Salze . . .	{	Sublimat	2.5	„
		Zinchlorür	5	„
		Cadmiumchlorür	5	„
		Kupfersulfat	5	„
		Zinksulfat	10	„
		Aluminiumsulfat	10	„
		Silbernitrat		
Wismuthnitrat				
		Hypermannansaures Kali	5	„

}	Jod (alkohol. Lös.)	5	Procent
	Barythydrat		
}	Aseptol	10	„
	Cresylol	5	„
	Lysol	5	„
	Cresol	5	„
	Carbolsäure (alkohol. Lös.)	5	„

Kobaltchlorür, Kalichromat, Phosphormolybdänsäure, wie auch Tymol und Creolin zerstörten das Trypsin nicht.

In Gegenwart einiger dieser Substanzen erhielt sich das Trypsin auch nach 10 Tagen viel besser, als in Wasser und in Gegenwart von anderen chemischen Agentien, wie z. B.:

	Flüssige Gelatineschicht	
	nach 48 Std.	nach 10 Tagen
	mm	mm
Trypsin in Wasser	6	1
„ „ Glycerin	6	2
„ „ Kalichromat	7	3
„ „ Calciumchlorür	9	4
„ „ Tartarus-Stybiat	8	4
„ „ Alkohol	10	10

Hieraus resultirt, dass Alkohol und sodann Calciumchlorür als die in gegebenen Concentrationen zur Erhaltung des Trypsins wirksamsten Substanzen figuriren.

Von den gebrauchten chemischen Substanzen gaben einen Niederschlag mit der Trypsinlösung die folgenden: Alkohol, Chromsäure, Pikrinsäure, Phosphormolybdänsäure, Phosphorwolframsäure (stark), Tanninsäure, Sublimat (stark), Kobaltchlorür, Cadmiumchlorür (schwach), Eisenchlorür (schwach), Bleiacetat (stark), Kupfersulfat, Kupferacetat (stark), Silbernitrat, Wismuthnitrat (schwach), eisencyansaures Kali, Jod und Jodkali (schwach).

Keine der chemischen Substanzen in der gebrauchten Concentration hatte für sich allein die Kraft, die Gelatine zu verflüssigen.

Es machten hingegen die Gelatine durch das Trypsin influidificabel die folgenden: Phosphorwolframsäure, Tanninsäure, Sublimat, Zinkchlorür, Cadmiumchlorür, Eisenchlorür

und Bleiacetat, Kupferacetat, Kupfersulfat, Zinksulfat, Aluminiumsulfat, Wismuthnitrat, hypermangansaures Kali.

Baryhydrat, Kalkwasser und besonders Kalichromat und Aetzkali verdünnt würden die Gelatine leichter fluidificabel machen.

B. Wirkung verschiedener chemischer Agentien auf das Pepsin.

Die Gelatine ist das empfindlichste und sicherste Reactiv, welches man kennt, um das Trypsin nachzuweisen; sie ist es aber nicht wegen der Säure, die sie begleitet, für den Nachweis des Pepsins, für welches das Fibrin von frischem Rindvieh immer das bessere Reactiv bleibt. Aus diesem Grunde werden wir uns im vorliegenden Falle, um die in dem Pepsin stattgefundenen Veränderungen aufzudecken, des obengenannten Reactivs bedienen.

Man vertheilte eine Pepsinlösung 1:100 in Proben von je 5^{cem}, fügte zu jeder 5^{cem} einer der weiter unten angegebenen chemischen Substanzen hinzu und brachte dann die Proben in den Brütöfen bei der Temperatur von 37° C. Nach 48 Stunden nahm man die Röhren aus dem Brütöfen und prüfte die Wirksamkeit des Pepsins der einzelnen Proben in der folgenden Weise.

Da einige der Substanzen auch verdünnt durch Unlöslichmachung des Fibrins zu irrigen Resultaten führen konnten, so machten wir die Fibrinproben, indem wir in Proben, welche je 10^{cem} HCl zu 5 Procent und ein Stückchen Fibrin von ca. 0.1^{grm} enthielten, soviel von den verschiedenen Mischungen gossen, dass wir die folgenden Verdünnungen erhielten:

	Chemische Substanzen		
	Pepsin	Substanzen zu 5 Procent	Substanzen zu 10 Procent
Mischung Nr. 1 . . .	1:2000	1:200	1:100
„ „ 2 . . .	1:4000	1:400	1:200
„ „ 3 . . .	1:8000	1:800	1:400
„ „ 4 . . .	1:40000	1:4000	1:2000

Hierauf brachten wir die Proben mit Fibrin in den Brütöfen bei 40° C. und nach 24 Stunden und nach 5 Tagen beobachtete man den Zustand des Fibrins und machte die Peptonprobe mittels der Biuretreaction. Als Gegenprobe, um klarer zu sehen, ob die chemischen Substanzen auf das Pepsin wirkten oder nicht vielmehr auf das Fibrin, prüfte man auch die Wirkung des Pepsins auf das Fibrin unmittelbar nach den Compositionen der obigen Mischungen.

Wirkung verschiedener chemischer

Fortl. Nr.	Substanzen	Procentualer Gehalt der chemischen Substanzen in der Pepsin- lösung	1. Verdünnung	2. Verdünnung
			Pepsin 1 auf 1000 Substanzen 1 auf 100	Pepsin 1 auf 2000 Substanzen 1 auf 200
1	Wasser (Controle)	—	gelöst	gelöst
2	Chromsäure	5 Procent	intact	intact
3	Pikrinsäure	gesättigt	„	„
4	Phosphormolybdänsäure	„	zum Theil	zum Theil
5	Molybdänsäure	„	gelöst	gelöst
6	Phosphorwolframsäure	„	intact	„
7	Borsäure	10 Procent	gelöst	„
8	Tanninsäure	gelöst	„	„
9	Gallussäure	5 Procent	„	„
10	Quecksilberbichlorür	0·5 p. mille	„	„
11	Zinkchlorür	5 Procent	„	„
12	Kobaltchlorür	gesättigt	intact	intact
13	Cadmiumchlorür	5 Procent	„	„
14	Calciumchlorür	5 „	gelöst	„
15	Bleiacetat	10 „	intact	„
16	Kupferacetat	gesättigt	„	„
17	Zinksulfat	10 Procent	gelöst	„
18	Aluminiumsulfat	10 „	„	„
19	Wismuthnitrat	—	intact	zum Theil
20	Kalichromat	10 Procent	„	intact
21	Eisencyansaures Kali	5 „	„	„
22	Hyperpermangansaures Kali	5 „	„	„
23	Jodkali	5 „	gelöst	gelöst
24	Jod (alkohol. Lösung)	5 „	intact	zum Theil
25	Baryhydrat	gesättigt	„	intact
26	Magnesiumoxyd	—	gelöst	gelöst
27	Aseptol (alkohol. Lösung)	10 Procent	intact	intact
28	Cresylol	10 „	„	„
29	Creolin	10 „	„	„
30	Carbolsäure	5 „	zum Theil	gelöst

Substanzen auf das Pepsin.

3. Verdünnung	4. Verdünnung	5. Verdünnung	Gegenprobe	Niederschlag	
				Pepsin	Pepton
Pepsin 1 auf 4000 Substanzen 1 auf 400	Pepsin 1 auf 8000 Substanzen 1 auf 800	Pepsin 1 auf 40 000 Substanzen 1 auf 4000			
gelöst	gelöst	gelöst	gelöst	nein	—
intact	intact	intact	gelöst 1. Verdünn.	„	ja
„	zum Theil	zum Theil	gelöst mit der 3., 4. Verdünnung	„	„
zum Theil	„ „	„ „	gelöst	„	„
gelöst	gelöst	gelöst	„	„	—
zum Theil	zum Theil	„	„	„	ja
gelöst	gelöst	„	„	„	nein
„	„	„	„	„	„
„	„	„	„	„	„
„	„	„	„	„	Spuren
„	„	„	„	„	nein
intact	zum Theil	zum Theil	—	„	„
„	gelöst	gelöst	gelöst	„	„
„	„	zum Theil	„	„	„
„	zum Theil	—	—	„	„
„	gelöst	gelöst	gelöst	„	„
„	„	„	„	„	Spuren
„	„	„	„	„	nein
gelöst	„	„	„	Spuren	„
intact	intact	intact	intact	nein	„
„	„	„	zum Theil	„	„
„	„	„	gelöst mit der 1., 2., 3. Verdünnung	—	—
gelöst	gelöst	gelöst	gelöst	nein	nein
„	„	„	„	Spuren	ja
intact	intact	intact	„	nein	nein
gelöst	gelöst	gelöst	„	„	„
„	„	„	„	„	„
intact	intact	intact	„	„	„
„	„	zum Theil	gelöst mit der 3. und 4. Verdünnung	„	„
gelöst	zum Theil		gelöst	„	„

Die Resultate dieser Experimente, vereinigt mit jenen, die sich auf den Niederschlag des Pepsins und des Peptons beziehen, wenn sie der Wirkung der in Rede stehenden chemischen Substanzen ausgesetzt sind, figuriren auf der vorstehenden Tabelle.

Zusammenstellung der Resultate.

1. Es wirkten auf das Pepsin unter den oben dargelegten Bedingungen die folgenden Substanzen:

Chromsäure	}	zerstörten das Pepsin.
Pikrinsäure		
Kalichromat		
Eisencyansaures Kali		
Barythydrat		
Kobaltchlorür	}	schwächten das Pepsin.
Cadmiumchlorür		
Phosphorwolframsäure		
Bleiacetat		
Kupferacetat		
Wismuthnitrat		
Jod (alkohol. Lös.)		
Aseptol		
Cresylol		
Creolin		

2. Es verminderten die Lösbarkeit des Fibrins die folgenden Substanzen:

Chromsäure (1:4000)	Wismuthnitrat
Pikrinsäure (1:100)	Eisencyansaures Kali . . (1:4000)
Phosphorwolframsäure . . (2:100)	Hyper mangansaures Kali . (1:400)
Kobaltchlorür (2:100)	Aseptol (1:200)
Cadmiumchlorür (2:100)	Cresylol (1:200)
Bleiacetat (2:100)	Creolin (1:100)
Kupferacetat (1:100)	

3. Keine der verschiedenen geprüften Substanzen, mit Ausnahme vielleicht der alkoholischen Jodlösung, schlug das Pepsin nieder.

Diese Thatsache, welche vielleicht von einer gewissen Wichtigkeit ist, würde verdienen, dass sie weiterhin studirt würde.

4. Die Zerstörung des Pepsins von Seiten der verschiedenen chemischen Agentien geschah ohne Niederschlagung desselben.

5. Das Pepton konnte man nur nachweisen in jenen Fällen, in welchen man das Fibrin gelöst hatte.

Wirkung der Alkalien auf Pepsin¹ und auf Trypsin.

Die Thatsache, dass die Wirksamkeit des Trypsins begünstigt wird von der Gegenwart von Alkalien und dass jene des Pepsins hingegen davon geschädigt wird, würde dazu führen, der Wirkung der Alkalien von Seiten des Trypsins eine viel grössere Resistenz zuzuschreiben als von Seiten des Pepsins, man hätte alsdann den ersten Fall einer geringeren Resistenz des Pepsins gegenüber dem Trypsin.

Herzen² bewies die zerstörende Wirkung der Alkalien auf das Pepsin; eine vergleichende Studie übrigens mit dem Trypsin, um auf die Frage zu antworten: ob in Wahrheit das Pepsin gegen die Alkalien empfindlicher sei als das Trypsin, fehlte vollständig. Man hielt es deshalb für keineswegs unnützlich, zwei Untersuchungen hierüber anzustellen.

Die gebrauchten Alkalien waren: kohlenensaures Natron, Kali und Aetzkali in verschiedenen Concentrationen.

Zum Vergleich nahm man ein indifferentes Salz wie das Magnesiumsulfat.

Da es sich um eine einfache vergleichende Studie handelte, so wurden die vorgenannten Alkalien in procentualen Lösungen gebraucht.

Die Wirksamkeit des Pepsins wurde geprüft mit Fibrin und jene des Trypsins wie gewöhnlich mit Gelatine.

Die Mischungen der beiden Enzyme mit den Alkalien wurden bewahrt bei der Temperatur von 18 bis 20° C.; die Proben des Pepsins mit Fibrin brachte man in den Brütöfen bei einer Temperatur von 40° C., jene des Trypsins und der Gelatine bei einer Temperatur von 22° C.

Die geprüften alkalischen Lösungen begannen bei 0.25 Procent und stiegen für das kohlenensaure Natron wenigstens bis zu der gesättigten Lösung. Die Wirkung der Alkalien auf die beiden Enzyme verlängerte sich von 1 Stunde bis zu 10 Tagen.

Ohne hier alle Ergebnistabellen der zahlreichen Proben wiederzugeben, berichten wir nur die erlangten Resultate. Diese sind:

1. Sowohl das Pepsin wie auch das Trypsin ertragen die Wirkung des kohlen-sauren Natrons zu 30 Procent auch über 5 Tage hinaus, ohne ihre Wirksamkeit zu verlieren.

2. Das Trypsin, für 24 Stunden in einer gesättigten Lösung von kohlen-saurem Natron gehalten, würde circa $\frac{4}{5}$ seiner Wirksamkeit verlieren.

¹ Untersuchungen von einem der Unserigen (Fermi) im hygienischen Laboratorium der Königl. Universität zu München 1891.

² Herzen, Ueber die Wirkung der Alkalien auf das Pepsin. *Annali di chim. e farm.* Vol. VIII. p. 302.

3. Die beiden obengenannten Enzyme werden zerstört von Kali und Aetzkali schon in der Concentration von 1 Procent in 24 Stunden und widerstehen hingegen für verschiedene Tage jener von 0.25 Procent.

4. Das Pepsin ist daher gegen die Alkalien nicht viel empfindlicher als das Trypsin.

V. Verhalten der Enzyme gegen das Porzellanfilter.

Nicht ohne Wichtigkeit ist das Studium des Verhaltens der Enzyme gegen das Porzellanfilter.

Aus dem mehr oder weniger leichten Passiren durch das in Rede stehende Filter würden wir schliessen können, ob das Enzym mehr oder weniger löslich in Wasser ist, ob es ein mehr oder weniger colloider Körper und ob es in dieser Beziehung Unterschiede giebt zwischen Enzym und Enzym.

Wir wissen thatsächlich schon jetzt, dass, während das Trypsin, das proteolytische Ferment der Mikroben und jenes inverse der Saccaromyceten mit mehr oder weniger Leichtigkeit filtriren, das inverse Enzym des *Aspergillus niger* (Fernbach)¹ und jenes des *Bac. megaterium* (Fermi)² keineswegs passiren.

Die von uns hierüber angestellten Untersuchungen bezogen sich besonders auf das Trypsin und auf das Pepsin.

Verhalten des Trypsins gegen das Porzellanfilter.

I. Untersuchung. Wir bereiteten eine Lösung von 1:500 von Trypsin, enthaltend 5 Procent Chlornatrium, um zur selben Zeit die Wirkung dieses Salzes auf die in Rede stehende Filtrirung zu studiren.

Man filtrirte die Lösung im Chamberlandfilter bei zwei Atmosphären Druck und bestimmte dann die Wirksamkeit mit der Gelatinemethode.

Von jeder Lösung, vor und nach der Filtrirung, machte man drei Proben in carbolisirter Gelatine.

Nach 10 Tagen mass man die Schichten flüssiger Gelatine und erhielt das folgende Resultat:

¹ A. Fernbach, Sur l'invertine ou sucrase de la levure. *Annal. de l'Institut Pasteur.* 1890. p. 641.

² C. Fermi, Contributo allo studio degli enzimi diastatici ed inversivi dei microorganismi. *Annali dell' Istituto d'igiene sperimentale della R. Università di Roma.* Vol. II. Fasc. II.

Proben	Vor der Filtrirung	Nach der Filtrirung
1	22 mm	10 mm
2	22 „	10½ mm
3	22 „	10 „

Das Trypsin also in der Lösung 1:500 passirt das Porzellanfilter bei zwei Atmosphären Druck und verliert circa die Hälfte seiner Wirksamkeit.

II. Untersuchung. Man wiederholte dasselbe Experiment mit einer mehr concentrirten (1:200) Trypsinlösung ohne die Gegenwart von Chlornatrium.

Nach 10 Tagen hatte man bei den Gelatineproben das folgende Resultat:

Proben	Vor der Filtrirung	Nach der Filtrirung
1	15 mm	12 mm
2	16 „	13 „
3	16 „	11 „

Auch in diesem Falle passirte das Trypsin das Porzellanfilter, indem es etwas von seiner Wirksamkeit verlor.

III. Untersuchung. Bei Wiederholung des Experimentes mit einer Trypsinlösung 1:200, enthaltend 2 Procent kohleensaures Natron, erlangte man dasselbe Resultat:

Proben	Vor der Filtrirung	Nach der Filtrirung
1	11 mm	4 mm
2	11 „	4 „
3	11½	4 „

Die Lösung in diesem dritten Falle verlor über die Hälfte ihrer Wirksamkeit.

Wie erklärt sich dieser Verlust an Wirksamkeit der filtrirten Trypsinlösung?

Bleibt das Trypsin im Filter, weil die unvollständige Lösung noch Theilchen von ungelöstem Trypsin enthält?

Wird das Trypsin, obwohl vollständig gelöst, aufgehalten in den Poren des Filters?

Lassen wir eine dritte sehr unwahrscheinliche Hypothese bei Seite, wie jene, dass das filtrierende Trypsin zum Theil zerstört wurde, so finden wir die beiden anderen Hypothesen sehr wahrscheinlich und besonders die erste.

Um die vorliegende Frage zu entscheiden, entnahmen wir eine Trypsinlösung $\frac{1}{200}$ einer dreifachen Filtrirung, indem wir Sorge trugen, dass der Druck eine Atmosphäre nicht überschritt, und dann bestimmten wir die Wirksamkeit der drei Filtrate mit der gewöhnlichen Methode. Nach 10 Tagen erhielt man das folgende Resultat:

Proben in Gelatine	Nicht filtrirte Lösung	1. Filtrirung	2. Filtrirung	3. Filtrirung
1	9 mm	6 mm	4 mm	3 mm
2	10 „	6 „	4 „	3 „
3	9 „	6 „	4 „	3 „

Nach diesem Experiment erscheint klar, dass der Verlust an Wirksamkeit der filtrirten Trypsinlösung, auch falls er sich ereignet, wenn die Lösung keine ungelösten Theilchen von Trypsin mehr enthält, nur verursacht werden kann von einer Anziehung der Trypsinmoleküle von Seiten des Filters. Ob dann das Trypsin mit colloiden Substanzen gemischt ist, welche die völlige Filtrirung desselben hindern, bleibt noch zu entscheiden.

Wir ziehen also den Schluss: dass das Trypsin das Porzellanfilter passirt, dass sodann, wenn man die Filtrirung derselben Lösung mehrmals (4 bis 5) wiederholt, das Trypsin ganz und gar im Filter verbleiben kann.

Das Porcellanfilter bietet also bei der Sterilisation von Trypsinlösungen diese nicht geringfügige Inconvenienz.

Verhalten des Pepsins gegen das Porzellanfilter.

Die grössere Lösbarkeit des Pepsins einerseits und andererseits der Umstand, dass dasselbe von keiner der vielen Substanzen niedergeschlagen wird, welche doch leicht die anderen Enzyme, das Albumin und das Pepton niederschlagen, führte uns dazu, das Verhalten dieses Enzyms gegen das Porzellanfilter zu prüfen.

Da das Pepsin löslicher ist in den chloresäuren Lösungen, und sodann Glycerin und Chlornatrium nach Rumpf und Regeczy das Passiren der Eiweisskörper durch die Thiermembranen erleichtern, so experimentirten auch wir mit Pepsinlösungen, welche diese Substanzen enthielten.

Wir präparirten die folgenden Pepsinlösungen zu 0.5 Procent:

1. 200 ^{ccm} einer Lösung in destillirtem Wasser;
2. 200 ^{ccm} einer gesäuerten Lösung (HCl, 5 Procent);
3. 200 ^{ccm} einer glycerinischen Lösung zu 3 Procent;
4. 200 ^{ccm} einer Lösung, enthaltend 3 Procent Chlornatrium.

Wir unterwarfen diese Lösungen einer doppelten Filtrirung und bestimmten dann die Wirksamkeit, indem wir uns an die möglichst kleinste, mit einer gegebenen Quantität Fibrin noch nachweisbare Quantität von Pepsinlösung hielten. Sodann vertheilte man in Proben, deren jede 10 ^{ccm} HCl zu 5 Procent und ein Stück Fibrin von ca. 0.1 ^{grm} enthielt, die Pepsinlösungen im Verhältniss von 1—5—10—15—20—25—30—35—40 Tropfen für jede und setzte dann die Proben der Temperatur von 39 bis 40° C. aus. Nach 48 Stunden war das Fibrin in allen 48 Proben völlig gelöst. Nur in der Lösung von zum zweiten Male filtrirtem Pepsin fand man eine Verminderung in der Wirksamkeit. Durch ein Porzellanfilter, welches schon zur Filtrirung colloider Substanzen diente, passirte das Pepsin sehr viel schwieriger.

Das Pepsin passirt also leichter als das Trypsin und als die anderen Enzyme das Filter, ohne wie das Pepsin an seiner Wirksamkeit zu verlieren.

VI. Verhalten der Enzyme gegen die Thiermembranen.

Dieses Studium ist von keiner geringen Wichtigkeit, weil man aus dem so oder so gearteten Verhalten der Enzyme gegen die Dialyse schliessen kann, ob dieselben colloide Substanzen sind oder nicht.

Wir geben sogleich, was wir hierüber wissen:

Nach alten Untersuchungen (Wittich) würde das Pepsin die Thiermembranen passiren. Spätere Experimente übrigens, die von Hammarsten¹ und von Wolffhügel² mit grösserer Genauigkeit und mit Pergament von besserer Qualität angestellt wurden, führten zu völlig entgegengesetzten Resultaten. Die beiden obengenannten Forscher schlossen ausdrücklich, dass das Pepsin nicht dialysirt.

Das Invertin, das Trypsin und die proteolytischen Enzyme der Mikroben³ passiren gutes Pergament nicht; auch wenn man die Probe für mehrere Tage verlängert.

¹ Otto Hammarsten, Ueber die Undiffusibilität des Pepsins. *Jahresbericht der Thierchemie*. Vol. III. p. 160.

² Wolffhügel. *Ebenda*. Bd. III. S. 168.

³ C. Fermi, Weitere Untersuchungen über die tryptischen Enzyme der Mikroorganismen. *Archiv für Hygiene*. 1892. Bd. XIV.

Indess forschte keiner dieser Autoren nach, ob unter besonderen Umständen die obengenannten Enzyme dialysiren konnten. Ueber die chemische Natur der Fermente wussten wir fast nichts. Dass dieselben gemischt sind mit colloiden (Albuminoid-)Substanzen ist übrigens gewiss; ehe man jedoch behauptete, dass die genannten Körper absolut nicht dialysirbar seien, musste man beweisen, dass die mit ihnen gemischten colloiden Substanzen nicht so innig mit denselben vereinigt seien, um eine einzige colloide und nicht dialysirbare¹ Substanz herzustellen. Diese von den obengenannten Autoren unterlassenen Experimente stellten wir an. Wir versuchten einerseits diese mit den Enzymen vereinigte hypothetischen colloiden Substanzen frei zu machen, indem wir die Lösung mit Agentien behandelten, welche die Albuminoide niederschlagen, wie Tannin, Bleiacetat etc. Andererseits suchten wir die Dialyse zu erleichtern durch Hinzufügung von Säuren und verdünnten Alkalien, wie auch durch Dialysirung in Gegenwart von Salzen und Glycerin.² Obwohl es unnütz scheinen konnte, auch das zur Dialyse mit Tannin, Bleiacetat — Substanzen, welche keinen Niederschlag mit Lösungen des in Rede stehenden Enzyms geben — bestimmte Pepsin zu behandeln, so unterliessen wir dennoch diese Probe, wie zur Vervollständigung unserer Untersuchungen, nicht.

Die gebrauchten Säuren waren: Essigsäure, Weinsäure, Propionsäure, Milchsäure zu 1 und zu 5 Procent und Chlorsäure für das Pepsin zu 5 Procent.

Die gebrauchten Salze waren Chlornatrium, Karbonat und doppelt-kohlensaures Natron zu 5 Procent. Man prüfte auch Aetzkali zu 0.25 Proc. und auch die combinirte Wirkung der mit Säuren niedergeschlagenen Agentien, die Salze und das Glycerin wurde keineswegs vergessen.

Die Dialysatoren wurden präparirt mit cylindrischen Recipienten aus Glas von ca. 100^{cem} Rauminhalt und mit dickem Pergament oder mit dem gebräuchlichen Papier de la Rue.

Die Proben machte man auf folgende Art:

¹ Die verschiedene Leichtigkeit, mit der die Enzyme das Porzellanfilter passiren können, die verschiedene Art, wie sie sich gegen die verschiedenen Agentien verhalten, welche die Albuminoide niederschlagen (das Pepsin wird, entgegen dem, was bei den anderen Enzymen geschieht, fast von keiner Substanz niedergeschlagen), wie auch der verschiedene Löslichkeitsgrad würden in dieser Vermuthung bestärken können.

² Nach Rumpf (*Deutsche medicin. Wochenschrift*, 1889, Nr. 43) und Regeczy würden die Salze (NaCl) und das Glycerin die Dialyse der Albuminoidsubstanzen erleichtern.

Man goss 20^{cem} der Lösung des Ferments in das Gefäss, schloss dasselbe mit der dialysirbaren Membran, indem man diese fest umband, stülpte dann den betreffenden Recipienten um und brachte ihn in eine Kapsel, welche andere 20^{cem} der sogenannten Mediumflüssigkeit, bestehend aus einer sauren, alkalischen oder salzigen Lösung mit und ohne Glycerin, enthielt. Nach 2 bis 5 Tagen suchte man mittels der Gelatine und des Fibrins die beiden obengenannten Enzyme in dem Dialysat.

Die Untersuchungen mit dem entsprechenden Resultat sind auf der nachfolgenden Tabelle verzeichnet.

I. Pepsin.

A. Säuren 1 Procent.

1. Essig- säure	{	Essigsäure im Dialysator . .	} Pergament, negatives Resultat,	
		„ ausserhalb . .		} Papier de la Rue, positives
		„ innerhalb und ausserhalb . .		
2. Propion- säure	{	Propionsäure, innerhalb . .	} Pergament, negatives Resultat,	
		„ ausserhalb . .		} Papier de la Rue, positives
		„ innerhalb und ausserhalb . .		
3. Wein- säure	{	Weinsäure, innerhalb . .	} Pergament, negatives Resultat,	
		„ ausserhalb . .		} Papier de la Rue, positives
		„ innerhalb und ausserhalb . .		
4. Milch- säure	{	Milchsäure, innerhalb . .	} Pergament, negatives Resultat,	
		„ ausserhalb . .		} Papier de la Rue, positives
		„ innerhalb und ausserhalb . .		
5. Chlor- säure, 0.5 Procent	{	Chlorsäure, innerhalb . .	} Pergament, negatives Resultat,	
		„ ausserhalb . .		} Papier de la Rue, positives
		„ innerhalb und ausserhalb . .		

Aus dieser ersten Reihe von Experimenten geht also hervor, dass das Pepsin sowohl in Gegenwart von Wasser, wie in Gegenwart der verschiedenen Säuren immer durch das Papier de la Rue passirt, aber nicht durch gutes Pergament. In Gegenwart von Säuren bemerkten wir übrigens eine grössere Diffusion des obengenannten Ferments.

B. Chlornatrium 5 Procent. Das Experiment, in derselben Weise wie das vorhergehende ausgeführt, gab das gleiche Resultat. Auch in diesem Falle passirte das Pepsin nur durch Papier de la Rue.

C. Glycerin 5 Procent. Gleiches Resultat. Das Pepsin passirte nur Papier de la Rue.

D. Chlornatrium und Glycerin 5 Procent. Resultat dem vorhergehenden gleich.

E. Combinirte Wirkung der Säuren mit Chlornatrium und Glycerin. 5 Procent.

Zu den in der oben angegebenen Weise mit Säuren präparirten Proben fügte man auch hinzu das Glycerin und das Chlornatrium und zwar innerhalb des Dialysators soviel wie ausserhalb desselben.

Das Resultat war auch in all' diesen Fällen stets gleich dem vorhergehenden. Das Pepsin passirte durch Papier de la Rue und wurde aufgehalten von gutem Pergament.

F. Combinirte und isolirte Wirkung mit allen obengenannten Substanzen und mit Tannin und Bleiacetat. Diese beiden Substanzen fügte man nur innerhalb des Dialysators hinzu im Verhältniss von 5^{ccm} der Lösungen zu 10 Procent. Entgegen dem, was in den vorhergehenden Fällen geschah, passirte das Pepsin keineswegs das Papier de la Rue.

Die beiden obengenannten Agentien, das Tannin und das Bleiacetat, sei es, dass sie sich mit den Membranen verbinden, sei es, dass sie niederschlagen oder sich mit dem Ferment verbinden, hindern die Dialyse.

Ein Experiment, welches in der oben befolgten Weise mit den gewöhnlichen Solventien der Alkaloide, wie Chloroform, Aether, Benzol, Amylalkohol und gewöhnlichem Alkohol gemacht wurde, gab, wie man a priori wissen konnte, ein völlig negatives Resultat. Auch durch Papier de la Rue passirte das Pepsin nicht in Gegenwart einer der obengenannten Flüssigkeiten. Das Pepsin wie die anderen Enzyme sind in denselben unlöslich.

II. Trypsin.

Die mit dem Trypsin angestellten Untersuchungen wurden in derselben Weise geführt, wie bei den Untersuchungen mit dem Pepsin. Auch bei den Experimenten behufs der Dialyse des Trypsins prüften wir die Essigsäure, Propionsäure, Milch- und Weinsäure, aber in der Concentration von $\frac{1}{2}$ Procent. Die Chlorsäure wurde sodann absolut bei Seite gelassen. Ausser den Säuren prüften wir bei dieser zweiten Reihe von

Untersuchungen auch die Alkalien, wie das Karbonat, zu 3 Procent und das Aetzkali zu 0.25 Procent.

Mit Glycerin und Chlornatrium, jedes isolirt, wie combinirt untereinander mit den Säuren und mit den Salzen, wurde auch experimentirt. Tannin und Bleiacet liess man bei Seite.

Ohne andere Tabellen zu geben, welche den vorhergehenden nicht unähnlich sein würden, sagen wir nur: dass die Resultate ungefähr denjenigen gleich sind, die wir bei dem Studium der Dialyse über das Pepsin erlangten.

Das Trypsin passirt nur durch Papier de la Rue. Für das Trypsin konnten wir übrigens eine grössere Diffusion constatiren in Gegenwart von Glycerin und Chlornatrium, als in Gegenwart von Wasser, von Säuren und nur von Salz. Aus diesen Untersuchungen ziehen wir also folgende Schlüsse:

1. Pepsin und Trypsin verhalten sich zur Dialyse wie die Albuminoidsubstanzen und das Pepton;

2. Diese beiden Enzyme passiren langsam das Papier de la Rue und werden völlig aufgehalten von einem guten Pergament.

3. Chlornatrium und Glycéerin mit einander vereinigt erleichtern sicher die Dialyse des Trypsins.

VII. Wechselwirkung der proteolytischen Enzyme aufeinander.

Das Studium der Wechselwirkung der proteolytischen Enzyme aufeinander interessirt nicht nur an und für sich, sondern auch, weil es uns zur Kenntniss von Thatsachen führen kann, welche im Stande sind, uns über die chemische Natur dieser unbekanntten Körper aufzuklären; denn falls man fände, dass in Folge der Wirkung des Pepsins auf das ihm ausgesetzte Trypsin oder umgekehrt, der Wirkung des Trypsins auf das Pepsin, eines der beiden Enzyme von dem anderen zerstört worden sei — heute ist es gewiss, dass die proteolytischen Enzyme nur auf Albuminoidsubstanzen wirken —, so würde man daraus nicht ohne Grund folgern können, dass die obengenannten Fermente selber den Albuminoidsubstanzen angehören.

Das entgegengesetzte Resultat würde uns übrigens nicht direct zu dem entgegengesetzten¹ Schluss führen können. Und dies, weil, wenn es

¹ Marcus und Pinet (*Jahresbericht der Thierchemie*, 1880, S. 416) schlossen voreilig aus der Thatsache, dass das Pepsin weder das Ptyalin, noch die Diastase zerstörte, dass diese beiden Enzyme keine Albuminoid-Substanzen sein könnten.

einerseits sicher ist, dass die obengenannten proteolytischen Enzyme nur auf die Eiweisssubstanzen wirken, es doch auch andererseits wahr ist, dass auf sie mehrere derselben keine nachweisbare Wirkung ausüben. Bezüglich dieser letzteren erinnern wir an: Condrin, Chitin, Fibroin, Elasticin, Spongine, Conchiolin, Nuclein, Mucin, die verschiedenen Pigmente, Virchow's Amyloidsubstanz etc.

Und auch auf andere Albuminoidsubstanzen wirken die in Rede stehenden Enzyme nicht mit gleicher Leichtigkeit. Wenn z. B. das Fibrin von Seiten des Pepsins und die Gelatine von Seiten des Trypsins mit grosser Leichtigkeit gelöst werden, so geschieht nicht dasselbe mit dem Eiereiweiss, mit dem Casein und den vegetabilischen Albuminen. Schwieriger noch wirken die beiden obengenannten Enzyme auf dieselben Substanzen, wenn diese der Wirkung der Erhitzung ausgesetzt wurden, und fast gar nicht, wenn die Substanzen mit absolutem Alkohol, mit Tannin und besonders mit einigen metallischen Salzen (Bleisalz, Quecksilbersalz, Kupfersalz etc.) behandelt werden. Die in Rede stehenden Enzyme würden übrigens auch ein schon völlig hydratisirtes Albuminoid darstellen können, wie das Pepton, ein Albuminoid, das also nicht mehr empfänglich wäre für eine spätere Aenderung von Seiten der Enzyme; oder auch die betreffenden Enzyme könnten schliesslich besondere noch unbekanntes Albuminoide sein.

Wirkung des Pepsins auf das Trypsin.

Nach Marcus und Pinet¹ würde den Magensaft zerstören das Ptyalin und Emulsin. Nach Kühne,² Corvisat und Baginski³ würde das Pepsin das Trypsin zerstören. Nach Krückenberg⁴ würde das tryptische Ferment einige Artropoden und jenes des *Lombricus terrestris* vom Pepticum zerstört werden, und schliesslich nach Mees würde das Trypsin in alkalischer⁵ Lösung das Pepsin zerstören.

Wenn diese Thatsachen bestätigt würden, so wären wir zu dem Schluss gezwungen, dass die Enzyme Albuminoid-Substanzen sind, und zwar zu jenen von den Enzymen leicht veränderlichen gehören.

¹ Marcus und Pinet. *Jahresbericht der Thierchemie*. 1880. S. 416.

² Kühne. *Verhandlungen des naturhist.-medicin. Vereins zu Heidelberg*. Nr. 7. Fasc. 3.

³ Baginsky, Ueber das Vorkommen und Verhalten einiger Fermente. *Jahresbericht der Thierchemie*. 1884. Bd. XIII. S. 416.

⁴ Krückenberg, Zur Verdauung bei den Krebsen. *Ebenda*. 1879. Bd. IX. S. 274.

⁵ Mees, Ueber Ausscheidung und Umsetzung von Digestionsfermenten. *Ebenda*. 1887. Bd. XV. S. 26.

Indess, wie schon einer von uns in einer anderen Arbeit bemerkte,¹ wenn es einerseits wahr ist, dass der Magensaft das Trypsin zerstört, und dass auch die Mischung von Alkalien und Trypsin das Pepsin zerstören kann, so bleibt doch immer zu beweisen, dass in den beiden oben angeführten Fällen die zerstörende Wirkung in Wahrheit dem Enzym zuzuschreiben sei und nicht der Chlorsäure und dem Alkali.

Das Trypsin ist, wie bekannt, in der That sehr sensibel gegen die Wirkung der Chlorsäure (2·5 bis 5 Procent), und das Pepsin seinerseits wird, wie wir schon sahen, rapid zerstört von den Alkalien (Aetznatron und Aetzkali, 0·5 Procent).

Man begreift wohl, dass es keine leichte Sache war zu entscheiden, ob die zerstörende Wirkung des Magensaftes auf das Trypsin wirklich dem Pepsin und nicht der Chlorsäure zuzuschreiben sei, wenn man bedenkt, dass das Pepsin nur in Gegenwart von Säuren wirkt, und dass die Säuren ihrerseits das Trypsin schädigen. Wir mussten eine Säure finden, welche in einer gegebenen Lösung, auch indem sie die Wirkung des Pepsins unterstützte, jene des Trypsins nicht zerstörte; zu diesem Zwecke stellten wir die folgenden Untersuchungen an:

A. Wirkung des Pepsins auf das Fibrin in Gegenwart von Milchsäure, Ameisensäure, Aepfelsäure, Citronensäure, Essigsäure, Propion- und Valeriansäure in der Concentration von 1 und von 0·5 Procent.

Petit² studirte die Wirkung des Pepsins auf das Fibrin in Gegenwart verschiedener organischer Säuren und fand für jede von ihnen als besten Grad der Concentration was folgt:

Milchsäure	2 Procent
Weinsäure	4 „
Citronensäure	4 „
Aepfelsäure	4 „
Ameisensäure	1 „

Diesem Autor zufolge würden sodann Essigsäure, Buttersäure, Magensäure nicht fähig sein, die Wirkung des Pepsins zu unterstützen. Indem wir diese Experimente wiederholten, bestätigten wir die Resultate des obengenannten Autors bezüglich der Magen- und der Buttersäure, nicht

¹ C. Fermi, I fermenti peptici e diastatici etc. *Giornale della R. Accademia di med.* 1890. No. 1—2. — Weitere Untersuchungen u. s. w. *Archiv für Hygiene.* 1892. Bd. XIV.

² A. Petit, Studien über die Verdauungsfermente. *Jahresbericht der Thierchemie.* 1881. Bd. X. S. 308.

Säuren	Zustand des Fibrins und Reaction des Peptons			
	nach 24 Stunden		nach 5 Tagen	
	Fibrin	Pepton	Fibrin	Pepton
Chlorsäure	5 pro mille	gelöst	—	—
Ameisensäure	1 Procent	völlig gelöst	—	—
	0.5	"	—	—
	"	"	—	—
Apfelsäure	1 Procent	völlig gelöst	—	—
	0.5	"	—	—
	"	"	—	—
Milchsäure	1 Procent	völlig gelöst	—	—
	0.5	"	—	—
	"	"	—	—
Oxalsäure	1 Procent	völlig gelöst	völlig gelöst	völlig gelöst
	0.5	"	"	"
	"	"	—	—
Essigsäure	1 Procent	gelöst	—	—
	0.5	"	—	—
	"	"	—	—
Weinsäure	1 Procent	unvollständig gelöst	—	—
	0.5	"	—	—
	"	"	—	—
Propionsäure	1 Procent	unvollständig gelöst	unvollständig gelöst	Spuren
	0.5	fast intact	fast intact	"
	"	intact	intact	negativ
Buttersäure	1 Procent	"	"	"
	0.5	"	"	"
	"	intact	"	"
Baldriansäure	1 Procent	"	"	"
	0.5	"	"	"
	"	intact	"	"
Bernsteinsäure	1 Procent	"	"	"
	0.5	"	"	"
	"	intact	"	"
Borsäure	1 Procent	"	"	"
	0.5	intact	"	"

aber für die Essigsäure, für welche, wie für Milch-, Ameisen-, Aepfel-, Citronen-, Oxal-, Valerian- und Propionsäure, wir fanden, dass sie auch in der Verdünnung von $1\frac{1}{2}$ Procent, wenn auch in geringerem Grade, die Wirkung des Pepsins unterstützen kann.

Das Fibrin (vom Blute des Rindviehes) wurde völlig gelöst, schlug nicht nieder, als man es mit Salpetersäure behandelte und gab auch die Reaction des Peptons. Wir geben sogleich die Untersuchung:

Man vertheilte Verdünnungen zu 1 und $\frac{1}{2}$ Procent der obengenannten Säuren in Proben von je 10^{cem} und fügte dann hinzu 1^{cem} einer Pepsinlösung zu 0.5 Procent und ein Stückchen frisches Fibrin vom Blute des Rindviehes (nicht vom Schweine, weil dies in den Säuren löslich) im Gewichte von circa 0.2^{gramm} .

Nach 24 Stunden und nach fünf Tagen beobachtete man den Zustand des Fibrins und machte die Biuret-Probe. Das Resultat siehe Tabelle S. 116.

Aus dieser Tabelle geht hervor, dass sich das Pepsin löst und das Fibrin peptonisirt in Gegenwart von Ameisensäure, Aepfelsäure, Milchsäure, Oxalsäure, Weinsäure, Essigsäure und auch, obwohl mit weniger Leichtigkeit, in Gegenwart von Propionsäure. Mit Buttersäure, Valeriansäure, Magensäure und Borsäure hingegen bleibt es fast völlig unwirksam. Wir notiren beiläufig auch, dass, wenn das Fibrin innerhalb der 24 Stunden nicht gelöst und peptonisirt worden ist, das Resultat auch nach verschiedenen Tagen sich keineswegs ändert.

Indem wir von den nunmehr gegebenen Resultaten ausgingen, unternahmen wir alsbald zu studiren:

Die Wirkung des Pepsins auf Trypsin in Gegenwart von einigen der obengenannten Säuren.

Man vertheilte Lösungen zu 1 und zu 0.5 Procent der genannten Säuren in Proben zu je 5^{cem} und fügte hinzu 1^{cem} Pepsin zu 1 Procent und 1^{cem} Trypsin zu 0.5 Procent. Eine zweite Reihe von Proben, gleich der ersten, wurde präparirt zum Vergleich mit Trypsin, das der Erhitzung ausgesetzt worden. Wir brachten die Proben in den Brütöfen bei 28 bis 30° C. und nach drei Tagen prüfte man mittels Röhren mit Carbol-Gelatine die Wirksamkeit des Trypsins. Von diesen Proben machte man zwei Reihen. In der einen liess man die Probe sauer, in der anderen neutralisirte man sie.

Zu diesem Zwecke goss man — nachdem man die verschiedenen Proben ebenso oft (10mal) agitirt hatte —, von jeder Probe 1^{cem} in ein

entsprechendes Röhrchen, das Carbol-Gelatine enthielt, und nach sieben Tagen mass man die Schicht gelöster Gelatine.

Dasselbe Experiment wurde mit einer Pepsinlösung zu 2 Procent wiederholt, d. h. mit einer Lösung, die 4mal stärker als jene des Trypsins (0.5 Procent) war. Nach 3 Tagen prüfte man die Wirksamkeit des Trypsins und nach 5 Tagen, anstatt nach 7, mass man die Schicht gelöster Gelatine. Die Resultate dieser beiden Experimente siehe Tabelle S. 119. nachfolgenden Tabelle.

Aus dieser Tabelle, welche die Resultate der gemachten Experimente enthält, heben wir Folgendes hervor.

A. Wirkung der beiden Enzyme auf die Gelatine in Gegenwart der Säuren.

Die Verflüssigung der Gelatine in Gegenwart der Säuren konnte nicht nur von dem Trypsin herrühren, sondern auch von dem Pepsin. In allen Fällen, wo man die Verflüssigung erlangte und das Pepsin zerstört worden war, war die Verflüssigung dem Trypsin zuzuschreiben. Dies war der Fall z. B. bei den Proben mit Essigsäure und Buttersäure zu $\frac{1}{2}$ Procent und mit unwirksamem Pepsin.

In all' den anderen Fällen, wo man die Verflüssigung nur in Gegenwart von Säuren und wirksamem Pepsin erlangte, muss man die Verflüssigung für das Werk des Pepsins halten. Zur Bestätigung dessen beobachteten wir, dass die Verflüssigung grösser gewesen ist, wenn das Pepsin in concentrirterer Lösung war, zu 2 Procent, obwohl die Zeit der Wirkung auf die Gelatine nur 5 Tage betrug, anstatt 7, wie bei dem ersten Experiment.

Dass sich das Trypsin in den beiden oben vermerkten Fällen wirksam erwies, ist dem Umstande zuzuschreiben, dass die schwachen und sehr verdünnten Säuren ihre abschwächende und inhibirende Wirkung auf das obengenannte Enzym nicht ausüben.

B. Wirkung der beiden Enzyme auf die Gelatine in alkalischer Reaction.

In diesem Falle, in welchem die Verflüssigung nur dem Trypsin zuzuschreiben ist, bemerkten wir, dass das Trypsin sich wirksamer erwies in den Fällen, wo das Pepsin zerstört worden war und in Gegenwart der schwächeren Säuren, und um vieles dagegen abgeschwächt, wo das Pepsin wirksam war und von den energischeren und geeigneteren Säuren unterstützt wurde.

Säuren	Procente der Lösungen	Mischungen	Proben in Gelatine			
			Saure Mischung Pepsin 1 Proc. mm	Alkal. Mischung Pepsin 1 Proc. mm	Saure Mischung Pepsin 2 Proc. mm	Alkal. Mischung Pepsin 2 Proc. mm
Milchsäure	1 Procent	Pepsin wirksam	1	1	3	0
	1 "	" unwirksam	0	10	0	2
	0.5 "	" wirksam	1	8	3	1.5
	0.5 "	" unwirksam	1	8	0	3.5
Ameisensäure	1 Procent	Pepsin wirksam	0	0	4	0
	1 "	" unwirksam	0	4	0	0
	0.5 "	" wirksam	0	2	3	0
	0.5 "	" unwirksam	0	9	0	2.5
Essigsäure	1 Procent	Pepsin wirksam	2	8	2	3
	1 "	" unwirksam	0	10	0	5
	0.5 "	" wirksam	2	8	1	3
	0.5 "	" unwirksam	1	10	0	5
Propionsäure	1 Procent	Pepsin wirksam	1	10	3	2
	1 "	" unwirksam	0	8	0	5
	0.5 "	" wirksam	0	10	0	3
	0.5 "	" unwirksam	0	10	0	5
Baldriansäure	1 Procent	Pepsin wirksam	2	4	0	1
	1 "	" unwirksam	0	9	0	4
	0.5 "	" wirksam	0	8	1	2.5
	0.5 "	" unwirksam	0	7	0	4.5
Buttersäure	1 Procent	Pepsin wirksam	0.5	10	2	1.5
	1 "	" unwirksam	0	10	0	3
	0.5 "	" wirksam	0	9	1	2.5
	0.5 "	" unwirksam	1	9	0	5.5

Zufolge dieser Thatsache, welche von einer unbestreitbaren Beredsamkeit ist und uns nicht wenig überraschte, würden wir gezwungen sein, unter Bestätigung der Resultate von Kühne, Baginski und Corvisart zu schliessen, dass das Pepsin auf das Trypsin wirkt. Indess bei weiterem Nachdenken fiel uns bei, dass wir während der Zerstörung des Pepsins auch die Säuren der Erhitzung unterwarfen.

Würden nun nicht dieselben, insbesondere vereinigt mit einer colloiden Substanz, wie es das Pepsin ist, viel von ihrer Energie verloren haben können? Wenn dies geschehen wäre, so hätten wir das Pepsin der nicht erhitzten Proben abgeschwächer finden müssen, als jenes der Proben, welche der Erhitzung unterworfen worden waren.

All' dies, was mehr als wahrscheinlich war, wurde klar bewiesen von den folgenden Untersuchungen.

Wir prüften in der oben dargelegten Weise die Wirksamkeit der genannten, der Erhitzung ausgesetzten und nicht ausgesetzten Säuren

1. auf Trypsin allein,
2. auf Trypsin vereinigt mit Pepsin.

In dieser dritten Reihe von Untersuchungen betrug die Verdünnung der Säuren, deren wir uns bedienten, nur 1 Procent, allein die Ameisensäure, als zu energisch, brauchte man zu 0.5 Procent. Das Trypsin brauchte man zu 1 Procent und das Pepsin zu 2 Procent.

Die Proben in Gelatine, welche nur nach vorgängiger Neutralisation der Säuren gemacht und nach 10 Tagen beobachtet wurden, gaben das folgende Resultat:

	Milch- säure mm	Ameisen- säure mm	Essig- säure mm	Propion- säure mm	Valerian- säure mm	Butter- säure mm
A. Wirkung der der Erhitzung nicht ausgesetzten Säuren auf Trypsin allein.	1	1/2	3	3 1/2	4	5
B. Wirkung der der Erhitzung ausgesetzten Säuren auf Trypsin allein.	5 1/2	4	7	7 1/2	9	9 1/2
C. Wirkung der der Erhitzung nicht ausgesetzten Säuren mit dem Pepsin auf Trypsin.	1	1/2	3 1/2	3 1/2	4	5
D. Wirkung der der Erhitzung ausgesetzten Säuren mit dem Pepsin auf Trypsin.	5	4 1/2	7	8	9	9 1/2

Aus dieser Tabelle geht klar hervor:

1. Dass die obengenannten Säuren, im Wasserbade der Erhitzung unterworfen, viel von ihrer zerstörenden Gewalt über das Trypsin verlieren.

2. Dass das Pepsin keine nachweisbare Wirkung auf das Trypsin ausübt.

VIII. Schicksal der Enzyme im Organismus.

Das Trypsin würde sich nach den Untersuchungen von Brücke, Walter Leo, Hans Leo, Hoffmann, Stadelmann u. s. w., zum Unterschied des Pepsins nicht in dem Urin finden. Aber das von ihnen zur Untersuchung dieses Enzyms gebrauchte Reactiv (Fibrin) war viel zu wenig sicher und sensibel, um damit Spuren davon nachweisen zu können. Einer von uns (Fermi) hat das Studium dieser Frage wieder aufgenommen, indem er sich der Gelatine bediente, welche, wie ja bewiesen worden, das sensibelste Reactiv ist, um die Gegenwart des Trypsins anzuzeigen, da es sie auch in der Verdünnung 1:40000 beweist. Die angestellten Untersuchungen bestanden in dem Nachweis des Trypsins im Urin von fleischfressenden Thieren (saurer Urin) und in dem von Pflanzenfressern (alkalischer Urin), überdies im Urin von an den Nieren kranker Menschen. Wenn das Trypsin im Urin von fleischfressenden Thieren nicht gefunden worden war, konnte man vermuthen, dass dasselbe zerstört worden wäre von der Säure dieses Urins; es war daher nothwendig, es auch in dem alkalischen Urin von Pflanzenfressern zu suchen. Da sodann das Trypsin eine Substanz ist, welche sich sehr den Albuminoiden nähert, und man deshalb vermuthen kann, dass dasselbe auf dieselbe Art, wie die Albumine und Peptone überhaupt, unter normalen Bedingungen nicht in den Urin übergehe, sondern nur unter pathologischen Bedingungen, so hielt man es für unnütz, das Trypsin auch in dem Urin der Nierenkranken zu suchen. Man unterwarf der Prüfung grosse Quantitäten von Urin, um den Verdacht zu beseitigen, dass die zu kärgliche Quantität des Enzyms die Ursache der negativen Resultate wäre. Die Proben wurden ausgeführt, indem man sich gewöhnlicher Messcylinder bediente, deren jeder 100^{cem} carbolisirter Gelatine enthielt. In jeden brachte man 900^{cem} der verschiedenen Urine (Urin vom gesunden Menschen, vom Nierenkranken, Hundeurin, Rindviehurin, Pferdeurin, Schafurin).

Das Resultat war beständig negativ, in keinem Falle erlangte man die Verflüssigung der Gelatine. .

Die Experimente wurden wiederholt mit viel grösseren Quantitäten von bei niedriger Temperatur im Vacuum concentrirtem Urin.

5 bis 10 Liter wurden auf 100^{cem} reducirt und in der oben beschriebenen Art geprüft. Die Resultate waren negativ dasselbe.

Nun konnte man hier denken, dass diese negativen Resultate, mehr als dem Mangel der Elimination des Trypsins in den Urinen, einer von diesen auf das Ferment ausgeübten zerstörenden Wirkung zuzuschreiben seien. wie von Hoffmann¹ behauptet worden war.

¹ Pflüger's *Archiv*. 148--149.

Die Untersuchungen aber, welche einer von uns (Fermi) machte, indem er Trypsin 1:1000 und sogar 1:10000 mit Urin vom Menschen, vom Rindvieh, vom Schaf, vom Pferde mischte, bewiesen, dass der Urin auch nach 48 Stunden keine schädliche Wirkung auf das Ferment hatte.

Da so bewiesen worden, dass das Trypsin durch die Urine nicht ausgeschieden war, so blieb immer noch das Problem, zu erkennen, welches das spätere Schicksal desselben im Organismus sei; ob nämlich die Wiederaufnahme von Seiten des Darmes fehlte und es in situ von dem Darminhalt zerstört (Galle, Mikroben) oder mit den Fäces ausgeschieden würde, oder auch, ob es wieder absorbiert zerstört würde in der Darmwand oder in dem übrigen Organismus.

A priori schien es seltsam, dass der Darm, welcher alle colloiden Substanzen und die verdauten oder auch nicht verdauten Albuminoide, wie das Casein, das gelöste Myosin, die Albuminalkalien, das Eiereiweiss mit Chlornatrium, die Gelatine (Brücke, Voit, Bauer, Eichorst, Czerny und Latschenberger) wieder aufnehmen kann, das Trypsin nicht hätte wieder aufnehmen können.

Man wusste übrigens durch Experimente mit der Galle des Menschen, des Rindviehes und des Pferdes, dass diese Ausscheidung keine zerstörende Macht auf das Trypsin ausübt und viel weniger die Mikroben. Eine Zerstörung in situ war daher nicht annehmbar. Andererseits wusste man sodann durch die Untersuchungen von Walter Leo,¹ dass das Trypsin nicht mit den Fäces ausgeschieden wird. Es blieb also als wahrscheinlichste Hypothese, dass das Trypsin entweder durch die Darmwände zerstört würde, wie einige Gifte (Alkaloide, Tetanin) und das Pepton, das in Albumin umgewandelt wird, oder auch, dass es im Blute oder in den Organen zerstört würde.

Um behaupten zu können, dass das Trypsin von der Darmwand zerstört wurde, musste man beweisen, dass keine Wirkung von Seiten der Organe dabei in Frage käme.

Zur Aufhellung dieses Punktes machten wir die folgenden Experimente:

1. Wir injicirten das Trypsin direct in das Thier und nach einiger Zeit suchten wir dasselbe in den Organen und in dem Blute, indem wir uns als Reactivs der Gelatine bedienten. Von der anderen Seite unterwarfen wir das Trypsin der directen Wirkung der Organe und des Blutes ausserhalb des Thieres (in vitro).

Da wir aus vorgängigen Experimenten wissen, dass die behauptete Giftigkeit der Enzyme zum grossen Theil nur den mit denselben ge-

¹ Pflüger's *Archiv*. 148—149.

mischten Mikroben zuzuschreiben ist, so experimentirten wir, indem wir den Thieren Trypsinlösungen injicirten, auch mit Lösungen von sterilisirtem Trypsin.

Erstes Experiment. — Man injicirt 9 Meerschweinchen ungefähr von derselben Dicke mit Trypsin. Dreien injicirt man subcutan 2^{grm}, anderen drei in's Peritoneum 2^{grm}, den übrigen 1/2^{grm} in die Jugularvene. Die Meerschweinchen werden getödtet, bezw. nach 5 Minuten, nach einer halben Stunde, nach einer Stunde. Man sucht das Trypsin mit der Gelatinemethode im Blute, im Herzen, in den Lungen, in der Leber, in der Milz, in den Nieren, im Gehirn.

Die Resultate waren die folgenden. In dem in die Jugularvene injicirten und 5 Minuten nach der Injection getödteten Thierte, konnte man das Trypsin mit Sicherheit nachweisen. Bei den anderen beiden auf demselben Wege injicirten und nach einer halben und nach einer ganzen Stunde getödteten fand man keine Spur von Trypsin. In den auf anderem Wege injicirten fand man das Trypsin nur an der Stelle der Injection auch nach einer halben Stunde, aber nicht anderswo.

Zweites Experiment. — Man injicirte einem Meerschweinchen an 7 auf einander folgenden Tagen 2^{grm} Trypsin täglich. Nachdem man das Meerschweinchen 10 Minuten nach der letzten Injection getödtet, suchte man das Trypsin mit dem gewöhnlichen Mittel, aber das Resultat war völlig negativ.

Etwas länger war das Trypsin in den Fröschen nachweisbar.

Drittes Experiment. — Man nahm 12 Frösche, injicirte denselben 2^{ccm} einer Trypsinlösung zu 2 Procent; nach 15 Minuten, nach 1, 5, 10, 20, 30 Stunden tödtete man je 2 Frösche und suchte mit dem gewöhnlichen Mittel das Trypsin im Herzen, in den Lungen, in der Leber, in der Milz, in den Nieren und in den Muskeln und erlangte die folgenden Resultate:

Organ	15 Minuten	1 Stunde	5 Stunden	10 Stunden
Lunge	positiv	positiv	negativ	negativ
Herz	„	„	„	„
Leber	„	„	„	„
Milz	„	„	„	„
Nieren	„	„	„	—
	„	„	„	—

Um die Wirkung der Organe auf das Trypsin besser aufzuklären und zu sehen, ob sie das Werk der lebenden Zellen wäre, wie es in ähnlicher Weise der Fall ist bei einigen Giften (Alkaloiden) von Seiten der Leberzellen, ging man zu anderen Experimenten über, indem man das Enzym der Wirkung des Blutes und des Organismus ausserhalb desselben (in vitro) unterwarf. Man tödtete 4 Meerschweinchen, zerrieb gesondert die Organe (Leber, Milz, Muskeln) und unterwarf von 2 Meerschweinchen die zerriebenen Organe der Erhitzung. Man vertheilte sodann alle gesondert in zwei Reihen Kapseln, goss über dieselben 10 Tropfen Trypsin zu 2 Procent in der Art, dass diese Tropfen nicht mit den Kapselwänden in Contact kamen und statt dessen mit den Organen selbst wohl gemischt wurden. Eine Reihe von Kapseln, welche gekochte und nicht gekochte Organe enthielten, wurde sogleich der Prüfung mit Gelatine¹ unterzogen; die andere Reihe hielt man im Brütöfen bei der Temperatur von 30°, und nach 24 Stunden machte man die Prüfung derselben auf die gleiche Art. Beide Reihen wurden für 5 Tage im Brütöfen gehalten und dann der Temperatur von 0° ausgesetzt, um zu sehen, ob in irgend einer der Kapseln die Gelatine die Eigenschaft verloren hätte, unter der Wirkung der niedrigen Temperatur fest zu werden.

Das Resultat war das folgende: Die Gelatine war völlig gelöst in den sogleich gemachten Proben, sowohl von gekochten, wie von nicht gekochten Organen. Flüssig war sie auch in den Proben von nicht gekochten Organen, die nach 24 Stunden gemacht wurden; völlig solid hingegen in jenen Proben mit nicht gekochten Organen, die auch nach 24 Stunden gemacht wurden.

Dieselben mit den Organen gemachten Proben machte man auch mit dem Blute und erlangte immer dieselben Resultate.

Hieraus schliessen wir, dass das Trypsin von den Organen nicht nur im Organismus, sondern auch in vitro zerstört wird.

Wie erklärt sich diese Thatsache? Der Umstand, dass das Trypsin zerstört wird ausserhalb des Organismus von den Organen im frischen Zustande, und nicht von jenen, die der Erhitzung unterworfen waren, würde auf den Gedanken einer zerstörenden Wirkung des Protoplasmas, auch des todten, auf das Enzym bringen, eine gewiss nicht leicht zu erklärende Sache, weil wir wissen, dass das Trypsin wie die anderen proteolytischen Fermente die Albuminoide modificirt, aber von denselben nicht modificirt und zerstört wird. Wir wären vielleicht versucht, mehr

¹ Man goss davon 10^{ccm} in die Kapsel und mischte sie recht gut mit der Mischung.

als an eine wirklich zerstörende Wirkung, daran zu denken, dass wenn das Trypsin Molecül für Molecül an die Albuminoidsubstanzen gebunden wäre, es nicht mehr frei auf die Gelatine wirken und von derselben nachgewiesen werden könnte. Unter diesen Voraussetzungen versuchten wir die Molecüle des Trypsins von den Albuminoiden der Organe zu separiren, indem wir uns bemühten das Trypsin zu isoliren, weder mehr noch weniger, als man es macht, wenn man das Trypsin aus dem Pancreas extrahirt. Diese Proben, übrigens verschiedene Male und auf verschiedene Arten wiederholt, gaben immer negative Resultate, indem es niemals gelang, das Trypsin in den verschiedenen Organen nachzuweisen. Man musste also hieraus schliessen, dass die frischen Organe auch ausserhalb des Organismus und nicht der Erhitzung unterworfen, wenn sie mit dem Trypsin in Contact gebracht werden, es nicht mehr nachweisbar machen auch mit dem sensibelsten Reactiv wie mit der Gelatine.

Man suchte auch zu erfahren, ob das unter die Haut oder in die Venen injicirte Trypsin in den Urin überginge, wie es mit dem Pepton, dem Albumin und den verschiedenen colloiden Substanzen geschieht, welche, in den Organismus injicirt, durch den Urin ausgetrieben werden, während sie, physiologisch absorbirt vom Darne, keineswegs in dem Urin nachweisbar sind; ebensowenig ist es das auf diesem Wege absorbirte Trypsin nach den angestellten Untersuchungen.

Man injicirte also subcutan einem Meerschweinchen eine Woche hindurch täglich 2^{grm} Pepsin, sterilisirt bei 120° und gelöst in 20^{cem} sterilisirtem Wasser. Täglich suchte man das Trypsin in dem Urin. Das Resultat war völlig positiv. Man konnte alle Tage Spuren von Trypsin in dem Urin nachweisen. Das Trypsin wurde auch an zwei aufeinander folgenden Tagen einem Meerschweinchen injicirt, und nach einer Pause von 4 Tagen wiederholte man die Injection an zwei aufeinander folgenden Tagen. In den Tagen der Pause wurde das Trypsin gesucht, aber man fand es nicht wieder.

Uebergang des in den Organismus injicirten Pepsins in den Urin. — Es ist aus den Arbeiten von Kühne u. A. bekannt, dass in dem Urin ein peptisches Ferment aufgefunden worden ist. Von den meisten Autoren wird angenommen, dass dieses Ferment nichts anderes als Pepsin sei. Indess Schnaupauff¹ gab das Pepsin in starker Dosis Thieren und konnte es in dem Urin nicht wieder finden. Diese Frage, die schon von Grützner bezweifelt wurde, ward auch von uns geprüft. Wir nahmen als Experimentsthier das Meerschweinchen, in dessen Urin

¹ *Dissertation.* Rostock 1888.

nach unseren Untersuchungen in der Regel kein Pepsin vorkommt. Wir injicirten letzteres subcutan, anstatt durch das Maul. 2 Meerschweinchen wurden täglich mit 2 ^{grm} sterilisirtem Pepsin injicirt. Jeden Tag suchte man 10 Stunden nach der Injection das Pepsin in dem Urin und fand beständig Spuren davon. Das Pepsin daher, wie das Trypsin, subcutan injicirt, geht in den Urin über, aber sehr langsam; deshalb ist es sehr wahrscheinlich, dass es, durch das Maul eingenommen, sich in dem Urin nicht immer in nachweisbaren Quantitäten findet. Wir suchten das Pepsin auch in den Organen dieser getödteten Meerschweinchen und fanden es nur in mit dem Fibrin kaum nachweisbaren Spuren.

Passiren des Ptyalins, der Diastase und des Emulsins durch die Nieren. — Die Resultate der an diesen Fermenten mit derselben Methode gemachten Proben waren positiv. Auch die Diastase, das Ptyalin und das Emulsin in den Organismus injicirt, passiren die Nieren, aber sehr langsam.

IX. Giftigkeit der Enzyme.

Dieser Gegenstand ist schon anderwärts¹ behandelt worden. Wir bringen aber von den vorgängigen Arbeiten das Folgende zur Stelle.

Die von Bechamp und Baltus, von Nencki und Sahli,² von Bergmann, Angeres, Hildebrand, Filehne u. s. w. behauptete Giftigkeit der Enzyme, die schon an und für sich sehr discutabel, wurde von unseren Untersuchungen völlig bestritten.

Bevor man einer Substanz eine besondere Wirkung zuschreibt, ist es nothwendig, dass sich dieselbe im Zustande völliger Reinheit befinde, oder dass man genau die Wirkung der anderen Substanzen kennt, welche sie begleiten. Dies bedachten die vorgenannten Autoren nicht. Die Fermente, welche in starker Dosis direct in die Adern injicirt wurden, waren mit unbekanntem Substanzen gemischt, und überdies, da sie nicht sterilisirt worden waren, enthielten sie Bakterien in grosser Quantität. Die von uns angestellte Prüfung von Trypsin-, Ptyalin- u. s. w. Präparaten erlaubt

¹ C. Fermi, Weitere Untersuchungen über die tryptischen Enzyme der Mikroorganismen. *Archiv für Hygiene*. 1892. Bd. XIV.

¹ C. Fermi u. Pernossi, Sul veleno del tetano. Studio comparativo. *Annali dell' Istituto d'Igiene sperimentale della R. Università di Roma*. Vol. IV. Nuova serie Fasc. I. p. 34.

² Nencki u. Sahli, Die Enzyme in der Therapie. *Correspondenzblätter für Schweizer Aerzte*. Nr. 20.

uns diese Behauptung. Das Trypsin, wie man es mit den gewöhnlichen Methoden erlangt, ist reich an Bakterien. Das von Manchen beobachtete Fieber, wie auch die starke Entwicklung der Bakterien im Blute, welche auf die intravenösen Pepsinjectionen folgen würde, und welche von Rosenberg¹ irrig als eine Wirkung einer prädisponirenden Macht des Pepsins zu septicämischen Infectionen interpretirt wurde, würde unsere Art zu sehen stützen. Wenn man die intravenösen Injectionen von gewiss nicht kleinen Quantitäten von Enzymen, wie jene von 0.1 bis 2 ^{grm} (Hildebrand) und von 0.15 bis 0.35 ^{grm} für jedes Gewichtskilo des Thieres (Nencki und Sahli) von Fermenten, welche jede Keimsorte enthalten, ersetzt durch subcutane Injectionen selbst in stärkerer Dosis (von 2 bis zu 5 ^{grm}) von sterilisirten Enzymen, so ertragen die Thiere sie, ohne irgend eine Wirkung davon zu spüren. Wir injicirten Meerschweinchen (siehe den vorhergehenden Paragraphen „Ueber das Schicksal der Enzyme im Organismus“) täglich mit 1 bis 2 ^{grm} sterilisirtem und für eine Woche wirksamem Pepsin und Trypsin und zur Bestätigung der von einem von uns bei diesem Gegenstand² erlangten Resultate, beobachteten wir keine Wirkung auf das Thier. Dagegen starben nach 24 bzw. 48 Stunden alle die Controlthiere, welche mit Lösungen der oben genannten nicht sterilisirten Enzyme injicirt worden waren. Der Mangel an Giftigkeit wird auch durch die Thatsache bewiesen, dass die Enzyme des Speichels, die gastrischen Enzyme, die pankreatischen und jene des gastro-enterischen Canals sich im Organismus beständig erhalten, ohne dass man dadurch irgend eine Störung zu bemerken hätte. Und dass dieser Uebergang von dem gastro-enterischen Canal in den Blutumlauf stattfindet, beweist die Thatsache, dass das Ptyalin und das Pepsin in dem Urin nachweisbar sind.

¹ M. Rossbach, *Jahresberichte der Thierchemie*. 1882.

² C. Fermi, Weitere Untersuchungen u. s. w. *Archiv für Hygiene*. 1892. Bd. XIV.