

Zur Kenntnis der «Schüttelinaktivierung» des Labs.

II. Mitteilung.

Von

Signe und Sigval Schmidt-Nielsen.

Mit einer Kurvenzeichnung im Text.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Christiania.)

(Der Redaktion zugegangen am 29. Juli 1910.)

Zur Zeit unserer ersten Mitteilungen (in der Biologischen Gesellschaft zu Christiania am 9. Dezember 1908¹⁾) über unsere im Frühjahr 1908 angefangenen Versuche über Inaktivierung von Lablösungen durch Schütteln, waren wir damit völlig unbekannt, daß Abderhalden und Guggenheim²⁾ in einer kurz vorher erschienenen Arbeit über Tyrosinase nebenbei berichtet haben, daß Tyrosinase, Hefepreßsaft wie Pankreassaft durch Schütteln in 24 Stunden an Wirksamkeit bedeutend abnehmen. Die Erscheinung der «Schüttelinaktivierung», wie wir das Phänomen bezeichnet haben, war somit nicht völlig neu, wie wir damals glaubten. Wir sind jedoch die ersten, die über dies Phänomen ausführlich berichtet haben, und völlig unabhängig von der Beobachtung von Abderhalden und Guggenheim.

Kurz nach unserer ersten Mitteilung in der Biologischen Gesellschaft zu Christiania berichteten Shaklee und Meltzer in der «Society for Experimental Biology and Medicine of New York» über Versuche,³⁾ wonach Pepsin durch Schütteln zer-

¹⁾ Signe und Sigval Schmidt-Nielsen, Om mekanisk Paa-virkning av Enzymer. Aarsberetning for det Biologiske Selskab i Kristiania for 1908, S. 45 u. f. *Nyt Mag. f. Naturv.*, Bd. XLVII. Vgl. auch diese Zeitschrift, Bd. LX.

²⁾ E. Abderhalden u. M. Guggenheim, Versuche über die Wirkung der Tyrosinase aus *Russula delica* auf Tyrosin, tyrosinhaltige Polypeptide usw. Diese Zeitschrift, Bd. LIV, 1908.

³⁾ A. O. Shaklee und S. J. Meltzer, Die mechanische Beeinflussung von Pepsin. *Zentralbl. f. Physiologie*, Bd. XXIII (1909), S. 3. (Vgl. ebenda, S. 31.)

stört wird. Wie aus einer im November 1909 von diesen Verfassern veröffentlichten Arbeit zu ersehen ist, sind diese Untersuchungen im Herbst 1908 ausgeführt. Die in unserer ersten Mitteilung veröffentlichten Untersuchungen datieren aus dem Frühjahr 1908. Im Sommer 1909 wurde ferner eine Arbeit über «Schüttelinaktivierung» von Ptyalin von Harlow und Stiles¹⁾ veröffentlicht. Ehe wir auf unsere Versuche näher eingehen, möchten wir zuerst die Resultate der erwähnten Forscher kurz besprechen.

Abderhalden und Guggenheim (l. c.) fanden, daß Tyrosinaseextrakte, Hefepreßsaft wie Pankreassaft durch Schütteln in 24—48 Stunden bedeutend an Wirksamkeit abnehmen, und mehr bei Körpertemperatur als bei Zimmertemperatur. «Es ist sehr wahrscheinlich», sagen die genannten Forscher (l. c. S. 352), daß die sich bildenden Fällungen Fermente mit sich reißen. «Da jedoch auch klar gebliebene Oxydaselösungen stark gehemmt waren, ist offenbar eine direkte Ausfällung nicht notwendig, um die Wirkung von Fermentlösungen aufzuheben oder doch zu vermindern.»

Durch Schütteln in einigen wenigen Minuten bis auf Stunden von in Flaschen eingeschlossenen Enzymlösungen konnten Shaklee und Meltzer²⁾ für Pepsin und Trypsin wie Lab eine bedeutende Herabsetzung der Wirksamkeit konstatieren.

Diese Verfasser bestätigen im großen ganzen unsere früheren Befunde in bezug auf das Lab. Es bestehen jedoch, wie auch von Shaklee und Meltzer erwähnt wird, in unseren Befunden auf zwei Punkten eine nicht unwesentliche Nichtübereinstimmung. Während wir gezeigt haben, daß eine ganz geringe Menge von Salzsäure und den verschiedensten anderen Säuren imstande ist, die Schüttelinaktivierung zu vermindern, und zwar mit der zunehmenden Säuremenge mit vermehrter

¹⁾ Marie M. Harlow and Percy G. Stiles, Notes on the Effect of Shaking upon the Activity of Ptyalin. The Journal of Biological Chemistry, Bd. VI, 1909.

²⁾ A. O. Shaklee and S. J. Meltzer, The destructive Effect of Shaking upon the proteolytic Ferments. American Journal of Physiology, Bd. XXV, 1909.

Intensität,¹⁾ fanden Shaklee und Meltzer Salzsäure fördernd auf die «Schüttelinaktivierung» des Labs; diese Verfasser fanden ferner, daß der Vorgang kein reversibler war, und dies ist dem völlig entgegengesetzt, was wir gefunden und schon in unserer ersten Mitteilung erwähnt haben. Shaklee und Meltzer haben wahrscheinlich²⁾ mit Schweinemagenlab gearbeitet, somit mit Parachymosin und nicht wie wir mit dem wirklichen Chymosin aus Kalbsmagen. An und für sich braucht die Salzsäure beim Schütteln dieser verschiedenen Enzyme nicht in derselben Weise einzuwirken, wir heben jedoch hervor, daß, wenn, wie wir es weiter unten zeigen, unsere Erklärung der «Schüttelinaktivierung» als ein Oberflächenphänomen (Adsorption an Luftbläschen wie sonstigen Oberflächen) richtig ist, es ganz selbstverständlich erscheint, daß die Säuren die «Schüttelinaktivierung», oder richtiger ausgedrückt, die Möglichkeit derselben herabsetzt.

Die von den verschiedenen Verfassern als «Schüttelinaktivierung» beschriebenen Erscheinungen brauchen wohl, was wir besonders hervorheben möchten, nicht immer derselben einheitlichen Natur gewesen zu sein. Es scheint uns nämlich aus den in der Literatur veröffentlichten recht spärlichen Versuchsdaten bei weitem nicht sichergestellt, daß die verschiedenen Forscher ihre Versuchsanordnungen so getroffen haben, daß wirklich die mechanische Bewegung der Enzymlösung das ausschließlich Maßgebende gewesen ist. Die Möglichkeit liegt ganz nahe, daß sowohl Alkaliwirkung (z. B. in einigen von den Versuchen von Harlow und Stiles) wie eine Säurewirkung (z. B. in den Labversuchen von Shaklee und Meltzer) an und für sich eine Destruktion an dem stets gegen Alkali und bei Körpertemperatur gegen Säuren sehr empfindlichen Lab hervorgerufen haben kann, und diese chemische Wirkung somit den Schein einer »Schüttelinaktivierung« be-

¹⁾ Signe und Sigval Schmidt-Nielsen, «Über den Einfluß der Säuren auf die «Schüttelinaktivierung» des Labs». Zeitschr. f. physikalische Chemie, Bd. LXIX, 1909, S. 552.

²⁾ Sie geben an (l. c., S. 100), daß gegen Lackmus neutralisierte 1^o ige Pepsinlösungen verwendet wurden.

wirkt. Die Versuchsanordnungen der genannten Forscher sind aber nicht so genau angegeben, daß diese Momente sich mit voller Sicherheit beurteilen lassen. Aus den Versuchsergebnissen von Shaklee und Meltzer läßt sich, scheint es uns, indessen schließen, daß sie, jedenfalls zum Teil, eine chemische Wirkung gehabt haben. Diese Verfasser haben nämlich im Gegensatz zu unseren Befunden angegeben, daß sie beim Lab gar keine Reversibilität beobachten können. Wie wir weiter unten zeigen, ist eben die Reversibilität eine Kardinal-eigenschaft der «Schüttelinaktivierung» als mechanisches Phänomen. Bei einer chemischen oder thermischen Inaktivierung darf man dagegen keine Reversibilität erwarten.

Um die Erscheinung der reinen «Schüttelinaktivierung» zu erklären, könnte man, wie von Shaklee und Meltzer in der oben erwähnten Arbeit hervorgehoben wird, entweder daran denken, daß die Enzyme von den sich etwa bildenden Fällungen mitgerissen oder von den Glaswänden adsorbiert werden. Letztere Auffassung, die von Harlow und Stiles vertreten wird, wird von Shaklee und Meltzer unbedingt verworfen. Betreffs der Bildung von Fällungen und Adsorption an denselben sagen Shaklee und Meltzer, daß eine solche Auffassung sich gewiß auf die «Schüttelkoagula» Ramsdens stützen kann, aber diese werden wohl, sagen Shaklee und Meltzer, von Pepsinsalzsäure oder von Trypsinalkali verdaut, seien sie nun makro- oder mikroskopisch.

Shaklee und Meltzer vertreten die Ansicht, daß die Enzymmoleküle während des Schüttelns wirklich zerschüttelt werden, daß die mechanische Bearbeitung «attacks their structure».

Wir können, wie oben angedeutet, uns dieser Auffassung gar nicht anschließen, müssen vielmehr eine ganz entgegengesetzte Erklärung geben, die nämlich, daß es sich nicht um eine Vernichtung, sondern nur um eine neue Verteilung des Enzyms handle.

Nach unseren ersten Versuchen fanden wir uns dazu veranlaßt, die «Schüttelinaktivierung» vorläufig als ein neues Phänomen zu bezeichnen. Das anfangs erstaunliche Phänomen scheint jetzt hauptsächlich, d. h. in bezug auf das Resultat

der rein mechanischen Bearbeitung der Enzymlösung, auf einer durch Oberflächenspannungen veranlaßte neue Verteilung des Enzymes zu beruhen, und ist somit ein physikalisches Phänomen. Eine Vernichtung (eventuell eine Inaktivierung) der Enzymmoleküle durch chemische Agenzien (Alkali wie Säure), eventuell durch Hitze ist etwas ganz anderes, kann aber bei nicht hinreichender Beachtung in den Versuchsanordnungen das Bild der wirklichen «Schüttelinaktivierung» stören oder verwischen, z. B. verhindern, daß die eben charakteristische Reversibilität hervortritt.

Der Rückgang der «Schüttelinaktivierung».

In unserer ersten Mitteilung über die «Schüttelinaktivierung» sagen wir zum Schluß (l. c. S. 442), daß der Vorgang unter gewissen Umständen einen reversiblen Prozeß darzustellen scheint. Dieser Angabe lag die Beobachtung zugrunde, daß, wenn die geschüttelten Lablösungen in der Versuchsröhre stehen blieben, sie nach einiger Zeit (Minuten bis auf ein paar Stunden) eine vermehrte Koagulationsfähigkeit zeigten.

Dies war die Ursache, weshalb wir in sämtlichen Versuchen über die Reaktionsgeschwindigkeit des Vorganges und ihre Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren die Koagulationsversuche an Milch sofort nach dem beendeten Schütteln anstellten (l. c. S. 428).

Die in den folgenden Tabellen I—III wiedergegebenen Versuchsdaten zeigen, daß die sofort nach dem beendeten Schütteln herausgenommenen Proben stets eine geringere Koagulationsfähigkeit gegen Milch besitzen als die während einiger Zeit im Versuchsrohr zurückbehaltene Flüssigkeit. Die Koagulationsfähigkeit nimmt, wie man aus den abnehmenden Koagulationszeiten ersieht, binnen gewisser Grenzen mit der Zeit der Aufbewahrung wieder zu.

Tabelle I.

Rückgang der «Schüttelinaktivierung».

Versuch am 20. X. 1908.

Zeit nach dem beendeten Schütteln Minuten	Koagulationszeit Minuten	(a—x)
0.7	67	10,7
1.5	60	12,0
2,2	57	12,6
2.6	47,7	15,1
3.1	43,5	16,6
3,5	36,7	19,6
16	13,2	54,5
32	9,8	73,5
nicht geschüttelte Kontrollprobe	7.2	100

Tabelle II.

Rückgang der «Schüttelinaktivierung».

Versuch am 8. XII. 1908.

Zeit nach dem beendeten Schütteln Minuten	Koagulationszeit Minuten	(a—x)
1.2	82	9,4
2.3	50,8	15,2
3,5	31	24,8
5.8	26,7	28,8
9,5	22,8	33,8
16	19	40,5
37,8	19	40,5
59	19,5	39,5
72,5	20,7	37,2
nicht geschüttelte Kontrollprobe	7.7	100

Tabelle III.

Rückgang der «Schüttelinaktivierung».
Versuch am 11. III. 1909.

Zeit nach dem beendeten Schütteln Minuten	Koagulationszeit Minuten	(a—x)
2	20,8	35,6
8	20,2	36,6
14	18,3	40,4
17	17,3	42,8
20	16,5	44,8
27	12,3	60,2
38	9,7	76,3
49	8,7	85,1
60	7,5	98,7
69	6,5	113,8
nicht geschüttelte Kontrollprobe	7,4	100

Die für diese Versuche wie übrigens auch für die folgenden verwendete Versuchsanordnung ist die nämliche, welche in unserer ersten Mitteilung (l. c. S. 427—428) angegeben ist. Wir erinnern daran, daß in dem ca. 40 ccm fassenden Röhrchen 25 ccm des verdünnten Glycerinextraktes (aus frischen Labmagen) eingebracht waren, daß ein Rührer, aus vier durchlöcherten Ebonitplatten an einer silbernen Stange befestigt, schnell auf und ab bewegt wurde, sodaß die Flüssigkeit heftig mit Luft geschüttelt wurde. Ferner müssen wir daran erinnern, daß das Versuchsröhrchen vor jedem Versuche nicht nur sorgfältig gewaschen, sondern auch mit destilliertem Wasser ausgekocht wurde, daß der Rührer ebenfalls sorgfältig gewaschen und mit kochend heißem Wasser sorgfältig abgespült wurde, daß die Koagulationsversuche mit 10 ccm frischer Vollmilch und 2 ccm der Lablösung bei 37° C. angestellt wurden, und daß wir uns bemüht haben, die Versuche so gleichförmig wie möglich anzustellen. Der Wert (a—x) ist aus der Koagulationszeit vor der Schüttelung, t_0 , und der Koagulationszeit, t_1 , der in der Zeit τ geschüttelten Probe unter der Voraussetzung berechnet, daß $a \cdot t_0 = (a-x) t_1$ ist.

Außer den in den Tabellen I—III wiedergegebenen Versuchsprotokollen verfügen wir über eine Reihe von anderen hier nicht anzuführenden Versuchen, die es unzweifelhaft erscheinen läßt, daß die «Schüttelinaktivierung» des Labs teilweise einen reversiblen Prozeß darstellt. Aus den Tabellen ersieht man leicht, daß die Geschwindigkeit des Rückganges in diesen orientierenden Versuchen eine sehr variierende gewesen ist. Während in Tabelle I 62,8% in 32 Minuten «reaktiviert» sind, zeigt Tabelle II, die einen Versuch mit derselben Lösung darstellt, in der mehr als doppelten Zeit nur 27,8%. In Tabelle III ist die Lösung nach 69 Minuten kräftiger als vor dem Schütteln. Letztere anfangs sehr auffallende Erscheinung rührt daher, daß das «reaktivierte» Lab in einem kleineren Volumen verteilt wird, indem stets von der Lösung Proben entnommen werden.

Diesen unseren positiven Befunden stehen die negativen Befunde von Shaklee und Meltzer entgegen (l. c. S. 101). Diese Verfasser konnten selbst binnen 6 Tagen keine Reversibilität ihrer Lablösungen beobachten, was gewiß auf die getroffenen Versuchsanordnungen zurückzuführen ist. (Bemerkenswert ist es jedenfalls, daß die verdünnten Lablösungen so lange haltbar gewesen sind; wir können unsere verdünnten neutralen Lablösungen selbst im Eisschranke höchstens ein paar Tage unverändert aufbewahren.)

Auch wir besitzen Schüttelversuche, wo keine Reversibilität nachweisbar war; dies beruht jedoch auf der getroffenen Anordnung von gewissen Versuchsfaktoren (vgl. unten) und ist nicht so zu deuten, daß der Vorgang in dem gegebenen Falle ein anderer und nicht reversibler sei. Wird nämlich nach dem beendeten Schütteln ein Teil von der Lablösung aus dem Versuchsröhrchen mittels einer Pipette herausgenommen und in einem anderen Rohr aufbewahrt, so zeigt sich, daß die Lablösung nunmehr nicht an Wirksamkeit zunimmt, während die im Versuchsröhrchen als Kontrolle zurückgehaltene Lösung an Wirksamkeit zunimmt (und wie oben angegeben sich zuweilen als mehr wirksam als die ursprüngliche Lösung zeigen kann).

Einige diesbezügliche Versuche sind in den Tabellen IV—VI wiedergegeben.

Tabelle IV.

Nicht-Rückgang einer ausgenommenen Probe.
Versuch am 23. XI. 1908.

Zeit nach dem beendeten Schütteln Minuten	Koagulationszeit Minuten	(a-x)
1	100	10,0
3,5	102,5	9,8
9,5	113,5	8,8
25,2	125	8,0
Nicht geschüttelte Kontrollprobe	10	100

Tabelle V.

Nicht-Rückgang einer ausgenommenen Probe.
Versuch am 27. III. 1909.

Zeit nach dem beendeten Schütteln Minuten	Koagulationszeit Minuten	(a-x)
1,0	10,7	76,9
16,5	11,0	74,8
32	10,5	78,4
Nicht geschüttelte Kontrollprobe	8,23	100

Tabelle VI.

Nicht-Rückgang einer ausgenommenen Probe.
Versuch am 21. IV. 1909.

Zeit nach dem beendeten Schütteln Minuten	Koagulationszeit Minuten	(a-x)
1	26,3	19,0
2	26,6	18,8
44	26,5	18,9
73	26,7	18,7
Etwa 1350	26,3	19,0
Nicht geschüttelte Kontrollprobe	5,0	100

Es ist aus diesen und mehreren anderen Versuchen, die das nämliche Resultat gezeigt haben, ersichtlich, daß die Re-

version nicht im ganzen geschüttelten Systeme stattfindet. Sie findet nicht in der herausgenommenen, sondern nur in der im Versuchsrohre zurückgebliebenen Flüssigkeit statt. Nach dieser Erfahrung wurde unsere Aufmerksamkeit auf den sich während des Schüttelns in reichlicher Menge bildenden Schaum gelenkt.

Wird der Schaum sofort nach dem beendeten Schütteln mit einer Pipette ausgehoben und in eine neue Röhre übergeführt, zeigt sich, daß die sich allmählich aus demselben bildende Flüssigkeit bedeutend kräftiger wirksam ist, als die im Versuchsröhrchen zurückgebliebene Flüssigkeit. In diesem Falle findet der Rückgang in der herausgenommenen Probe und nur in geringer Ausdehnung im Versuchsröhrchen statt. Als Beispiel diene der Versuch in Tabelle VII.

Tabelle VII.

Rückgang des entnommenen Schaumes.
Versuch am 1. V. 1909.

Zeit nach dem beendeten Schütteln Minuten	Koagulationszeit der aus dem entnommenen Schaume gebildeten Flüssigkeit Minuten	(a-x)
7	23,0	44,8
47	9,8	105,1
91	9,2	112,0
Koagulationszeit der geschüttelten Flüssigkeit:	77 Min.	13,4
„ „ nicht „ Kontrollprobe:	10,3 „	100

Man ersieht, daß die aus dem Schaum gebildete Flüssigkeit kräftiger wirksam ist als die ursprüngliche (Koagulationszeit 9,2 Minuten gegen 10,3 Minuten). In anderen Versuchen war die Zunahme zuweilen größer (z. B. von 9,6 zu 7,3 Minuten, d. h. eine Vermehrung der Enzymkonzentration von 100 auf 131,5%), zuweilen auch geringer, aber stets zeigte die aus dem Schaume gebildete Flüssigkeit nicht nur eine bedeutend größere Enzymkonzentration als die geschüttelte Flüssigkeit, sondern auch eine größere Enzymkonzentration als die ungeschüttelte Flüssigkeit.

Hieraus ist die Schlußfolgerung zu ziehen, daß während

des Schüttelns eine Konzentrierung von Enzym im Schaume statthat. Es ist also selbstverständlich, daß die sofort nach dem beendeten Schütteln herausgenommenen Proben eine verminderte Koagulationsfähigkeit zeigen müssen. Wenn der Schaum vergeht, wird das Enzym wieder an die Flüssigkeit abgegeben und die Koagulationsfähigkeit nimmt wieder zu und zwar in dem Maße, als der Schaum vergeht.

Nachdem der Schaum völlig vergangen ist, nimmt die Flüssigkeit nicht mehr an Aktivität zu, selbst durch langdauerndes Aufbewahren und dies, obwohl die ursprüngliche Aktivität nicht erreicht ist. Während also ein Teil des ursprünglich vorhandenen Enzymes nur vorübergehend der Flüssigkeit entzogen ist und den Eindruck einer «Inaktivierung» hervorruft, sind andere Teile des Enzymes definitiv verhindert, ihre Wirksamkeit in der Flüssigkeit zu entfalten.

Das Resultat der in diesem Abschnitte mitgeteilten Versuche ist also, daß die «Schüttelinaktivierung» doppelter Natur ist. Ein Teil von dem Enzym sammelt sich im Schaume und veranlaßt dadurch eine Abnahme der Koagulationsfähigkeit der Lösung. Diese Verteilung ist ein reversibler Prozeß und die dadurch bewirkte «Inaktivierung» nur eine scheinbare. Andere Teile von Enzym treten wirklich definitiv außer Wirksamkeit und machen also den Eindruck einer wirklichen «Inaktivierung». Wie wir weiter unten (S. 335) zeigen, ist aber dies wahrscheinlich nicht der Fall. Es handelt sich nur um nicht reversible Adsorptionsvorgänge, wodurch das Enzym definitiv der Flüssigkeit entzogen wird, ohne vernichtet zu werden.

Ehe wir auf die Natur dieser anderen Prozesse eingehen, möchten wir zuerst die Abhängigkeit der Reversibilität von Schüttelzeit und Enzymkonzentration besprechen. Andere Momente, wie Versuchstemperatur und Schüttelgeschwindigkeit, können jetzt nicht berücksichtigt werden.

Die Abhängigkeit der Reversibilität von der Schütteldauer und der Enzymkonzentration.

Durch die im vorigen Abschnitte mitgeteilten Versuche ist bewiesen, daß die «Schüttelinaktivierung» einen teilweise

reversiblen Prozeß darstellt. Um in die insofern doppelte Natur des Schüttelvorganges einen Einblick zu erhalten, haben wir eine Reihe von Versuchen angestellt, um zu sehen, ob der numerische Wert des reversiblen Anteiles konstant oder mit den physikalischen Versuchsbedingungen variabel war.

Die diesbezüglichen Versuche sind in der Weise angestellt, daß von einer und derselben Lablösung zuerst eine Probe (stets 30 ccm) bei einer konstanten Schüttelgeschwindigkeit (von etwa 240 Schüttelungen pro Minute und bei einer konstanten Versuchstemperatur von 17°) in z. B. 1 Minute im Versuchsrohr geschüttelt wurde. In dieser Probe wurde die Koagulationsfähigkeit sofort nach dem beendeten Schütteln bestimmt. Nachdem das Versuchsrohrchen usw. sorgfältig gewaschen und mit destilliertem Wasser ausgekocht worden war, wurde ein zweiter Schüttelversuch in genau derselben Weise angestellt, jedoch mit der Änderung, daß die Koagulationsfähigkeit an Milch erst zirka eine Stunde nach dem beendeten Schütteln festgestellt wurde.

Während dieser Stunde blieb das Versuchsrohrchen mit dem Rührwerke ruhig stehen, mit der Ausnahme, daß das Rohrchen alle 5 Minuten ein paarmal vorsichtig umgekehrt wurde. Durch Vorversuche hatte sich herausgestellt, daß die Zeit von einer Stunde für den Rückgang des Schaumes hinreichend lang ist, und daß nach dieser Zeit die Lösung nicht mehr an Aktivität zunimmt; dies wurde auch in jedem Versuche besonders festgestellt, indem außerdem noch Proben nach 70 oder 80 Minuten entnommen wurden.

Für andere Schüttelzeiten wurde in entsprechender Weise verfahren. In sämtlichen Versuchen wurde das nämliche Versuchsrohrchen und derselbe Rührer verwendet. Da diese Versuche sehr zeitraubend sind, konnten die zu einer Serie gehörenden Versuche nicht an demselben Tage angestellt werden (dies ist die Ursache, weshalb die Kontrollproben derselben Serie variieren). Die verdünnten Lablösungen wurden täglich aus den konzentrierten Glycerinextrakten frisch bereitet. Die unten angeführten 3 Versuchstabellen VIII—X geben Versuche wieder mit variierender Schüttelzeit bei den willkürlich ge-

wählten Enzymkonzentrationen 2, 3 und 4, d. h. Versuche mit Lablösungen, die in 100 ccm respektive 2, 3 oder 4 ccm des nämlichen Glycerinextraktes enthalten.

Tabelle VIII.

Rückgang bei der Enzymkonzentration 2 (Juni 1909).

Schüttel- zeit Minuten	Koagulationszeit der geschüttelten Probe		Nicht geschüt- telte Kontroll- probe. Koagulations- zeit Minuten	(a - x)		Re- versible Labmenge
	sofort Minuten	nach 1 Stunde Minuten		sofort	nach 1 Stunde	
1	38,5	13,3	9,6	24,94	72,18	47,24
2	89,3	21,3	10,83	12,13	50,77	38,64
3	103,7	25,1	10,15	9,79	40,44	30,65
5	148	43,9	10,8	7,30	24,60	17,30

Tabelle IX.

Rückgang bei der Enzymkonzentration 3 (Juni 1909).

Schüttel- zeit Minuten	Koagulationszeit der geschüttelten Probe		Nicht geschüt- telte Kontroll- probe. Koagulations- zeit Minuten	(a - x)		Re- versible Labmenge
	sofort Minuten	nach 1 Stunde Minuten		sofort	nach 1 Stunde	
1	14,9	8,6	6,67	44,77	77,56	32,79
2	24,4	9,75	6,67	30,74	68,41	37,67
3	26,6	11,75	6,32	23,76	53,79	30,03
5	45,5	15,2	6,32	13,89	41,58	27,69

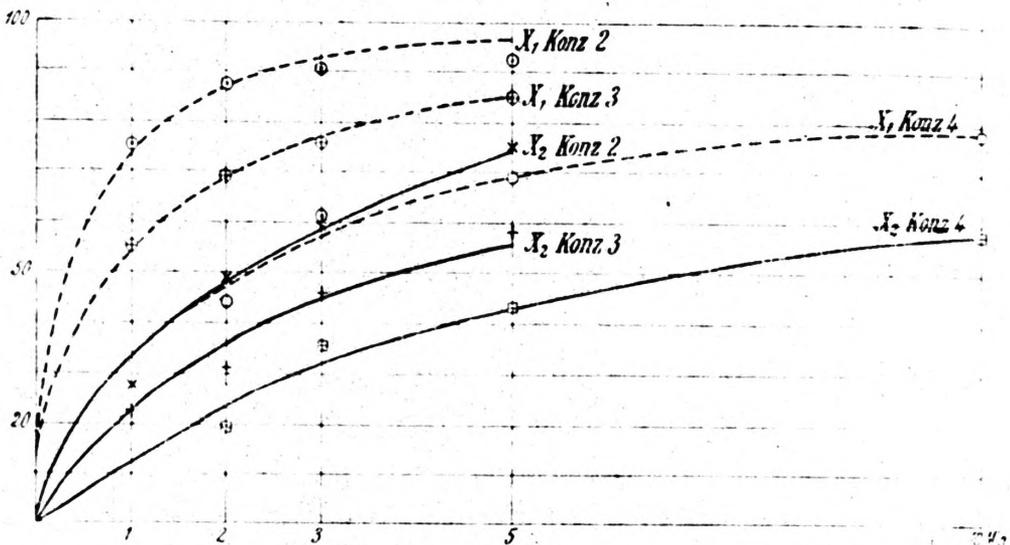
Tabelle X.

Rückgang bei der Enzymkonzentration 4 (Juni 1909).

Schüttel- zeit Minuten	Koagulationszeit der geschüttelten Probe		Nicht geschüt- telte Kontroll- probe. Koagulations- zeit Minuten	(a - x)		Re- versible Labmenge
	sofort Minuten	nach 1 Stunde Minuten		sofort	nach 1 Stunde	
2	8,5	5,87	4,73	55,65	80,58	24,93
3	13,8	8,6	5,5	39,85	63,95	24,10
5	17,8	9,75	5,5	30,90	56,41	25,51
10	25,1	13,3	5,5	21,91	41,35	19,44

Man ersieht aus den mit der zunehmenden Konzentration zunehmenden Werten von $(a - x)$ nach 1 Stunde, daß die nach 1 Stunde inaktive Labmenge in Übereinstimmung mit dem, was wir früher für die sofort nach dem beendeten Schütteln inaktive Labmenge gezeigt haben, mit der zunehmenden Enzymkonzentration abnimmt.

Damit dies Verhalten besser hervortreten mag, haben wir in untenstehender Figur 1 die gewonnenen Versuchsdaten graphisch aufgezeichnet, und zwar die Werte der inaktivierten Labmenge sofort (x_1) und nach 1 Stunde (x_2).



Mit Hilfe der so erhaltenen Kurven haben wir die in den Tabellen VIII—X angeführten Werte der reversiblen Labmenge ($x_1 - x_2$) korrigiert und danach mit Hilfe von der Konzentration statt in Prozenten (wie sämtliche Werte von $(a - x)$, x , und der reversiblen Labmenge in den Tabellen) in absolute, willkürlich gewählte Einheiten umgerechnet.

Tabelle XI.

Unabhängigkeit des Rückganges von der Konzentration. (Vers. Juni 1909)

Zeit des Schüttelns Minuten	Reversible Labmenge in absoluten Zahlen bei den Konzentrationen		
	2	3	4
1	80	95	—
2	77	99	96
3	68	96	100
5	45	89	100

Man ersieht hieraus, daß die reversible Labmenge bei

höherer Konzentration einen konstanten Wert hat. Dies muß so gedeutet werden, daß der Schaum (bei einer bestimmten Versuchsanordnung) maximal eine bestimmte Labmenge aufnimmt, die von der in der Lösung anwesenden Labmenge unabhängig ist, falls diese letztere nur hinreichend groß ist. Wie aus den früher angeführten Versuchen ersichtlich ist, nimmt die Menge des nicht reversiblen Labs mit der Schüttelzeit zu. Bei geringer Enzymkonzentration oder bei langer Schüttelzeit bleibt deswegen nicht hinreichend genug Enzym für den konstanten Wert im Schaume übrig und man bekommt den Eindruck, daß die reversible Labmenge nicht konstant sei.

In unserer ersten Arbeit haben wir in bezug auf die Abhängigkeit der Schüttelzeit gezeigt, daß für die sofort inaktivierte Labmenge durchgehend die Reaktionsformel $\frac{dx}{dt} = k(a-x)^{\frac{3}{2}}$ verwendbar ist; dies war nur ein Ausdruck für die experimentellen Beobachtungen, ohne daß damit eine Vorstellung über die Natur des Vorganges verbunden werden darf. Wenn wir jetzt die Werte für die noch nach einer Stunde inaktive Labmenge nach derselben Reaktionsformel berechnen, zeigt sich ebenfalls die beste, obwohl keine gute, Übereinstimmung bei Verwendung von dem Exponenten $\frac{3}{2}$. Wir legen indessen hierauf kein besonderes Gewicht, denn wenn wir es mit zwei neben einander verlaufenden Prozessen, der reversiblen und der nicht reversiblen «Inaktivierung», zu tun haben, so kann je nach dem Vorherrschen des einen oder anderen der Gesamtprozeß zeitlich verschieden verlaufen.

Wenn die «Schüttelinaktivierung» als ein Adsorptionsprozeß aufgefaßt werden muß, sollte sie nach den gewöhnlichen Adsorptionsformeln berechnet werden können. Wir haben keine solche Prüfung machen können, da die hierzu notwendigen Daten z. B. ein Maß für die Menge des Adsorbens (die adsorbierende Oberfläche des Schaumes und die sonstigen Oberflächen) noch fehlen.

Wir möchten jedoch erwähnen, daß, wenn in der Freundlich'schen Formel

$$\frac{dx}{dm} = \lambda \frac{a-x}{v}$$

das Volumen, v , gleich 1 d. h. konstant angenommen wird, und wenn die Voraussetzung gemacht wird, daß m , die Menge des Adsorbens (die adsorbierende Oberfläche) in jedem Zeitpunkte in einem bestimmten Verhältnis zu der in der Lösung vorhandenen Labmenge steht,¹⁾ d. h.

$$\frac{dm}{dt} = k (a-x)^n$$

man den Ausdruck erhält

$$\frac{dx}{dt} = k_1 (a-x)^{n+1},$$

der, wenn $n = 1/2$, die Reaktionsformel mit dem Exponenten $\frac{3}{2}$ gibt.

Schließlich erwähnen wir, daß wir Versuche angestellt haben über den Einfluß der Temperatur auf die nicht reversible Labmenge, ebenso wie Versuche über den Einfluß der Temperatur auf den Rückgangsprozeß; diese Versuche sind aber noch nicht abgeschlossen.

Der nicht reversible Teil der durch Schütteln inaktivierten Labmenge.

Nachdem der während des Schüttelns gebildete Schaum vergangen ist, nimmt die Lösung, selbst wenn sie längere Zeit aufbewahrt wird, wie oben angeführt, nicht mehr an Aktivität zu. Repräsentiert nun diese, in bezug auf die Koagulationsfähigkeit der Lösung definitiv verschwundene Labmenge im Gegensatz zu der während des Schüttelns an den Luftbläschen adsorbierten eine wirkliche Schütteldestruktion, oder war die Möglichkeit vorhanden, daß ebenfalls diese Labmenge durch ein Adsorptionsphänomen der Lösung entzogen war? Eine dritte Möglichkeit war die, daß dieser Teil vom Enzym weder vernichtet noch adsorbiert worden war, sondern daß durch die

¹⁾ Diese Voraussetzung ist zulässig, wenn man annimmt, daß die Eiweißkörper und sonstige kolloidale Verunreinigungen nicht nur für die Schaumbildung notwendig sind, sondern auch mit dem Enzyme im Schaume adsorbiert werden.

mechanische Bearbeitung eine Koagulation der kolloiden Enzymmoleküle eintritt, was ja in voller Übereinstimmung mit den Schüttelkoagula Ramsdens¹⁾ sein würde. Falls die letztere Erklärung richtig war, mußte man die Annahme machen, daß die koagulierten Moleküle unwirksam (oder als Einzelmoleküle wirksam) seien. Um diesen Fragen näher zu treten, haben wir eine Reihe von Versuchen in der Weise angestellt, daß im Gegensatz zu den früheren Versuchen die Koagulationsversuche nicht mit herausgenommenen Proben ausgeführt wurden, sondern in demselben Rohre, wo die Schüttelung stattfand. Falls die in dieser Weise angestellten Versuche die nämlichen Koagulationszeiten gäben, wie die nicht geschüttelten Kontrollproben, könnte in keiner Weise von einer wirklichen Destruktion und kaum von einer «Koagulation» die Rede sein, das Enzym wäre in diesem Falle nur unregelmäßig verteilt, und die ganze Erscheinung als eine einfache Adsorptionserscheinung zu erklären. Die Versuchsergebnisse gestatten indessen direkt diese Schlußfolgerung nicht. Es zeigte sich nämlich, daß die geschüttelten Proben auch bei dieser Versuchsanordnung nicht die volle ursprüngliche Koagulationsfähigkeit zeigten, selbst wenn sie nach dem beendeten Schütteln in einer für den Rückgang des Schaumes hinreichenden Zeit (z. B. 1 Stunde) aufbewahrt wurden.

Von den diesbezüglichen Versuchen führen wir nur die folgenden an:

Versuch am 18. Juni 1909.

Durch Schüttelung in 2 Minuten von 4 ccm Lablösung zeigte sich an sofort herausgenommenen Proben, daß die Koagulationszeit (2 ccm Enzymlösung auf 10 ccm Milch) von 9,0 auf 35,1 Minuten vermehrt worden ist, d. h. eine Inaktivierung von 74%. Nach Schüttelung in derselben Weise und sofortigen Anstellung des Koagulationsversuches (20 ccm Milch zu den verwendeten 4 ccm Enzymlösung) im Versuchsrohre zeigt sich eine Vermehrung der Koagulationszeit von 9 auf 10,7 Minuten, d. h. eine Inaktivierung von 16%. In Versuchen mit anderen Lösungen zeigte sich

¹⁾ W. Ramsden, Die Koagulierung von Eiweißkörpern auf mechanischem Wege. Arch. f. Physiol., 1894, S. 517. Derselbe, Abscheidung fester Körper in den Oberflächenschichten von Lösungen und Suspensionen. Diese Zeitschrift, Bd. XLVII. 1904, S. 336.

bei Anstellung der Koagulationsversuche im Versuchsröhrchen sofort nach dem beendeten Schütteln, daß von 18—45% inaktiviert worden war.

Versuch am 24. Mai 1910.

Während die nicht geschüttelten Kontrollproben eine Koagulationszeit von 7,5 Minuten zeigten, zeigten die in 2 Minuten geschüttelten Proben, nachdem sie eine Stunde nach dem Schütteln gestanden haben, durch Anstellung des Koagulationsversuches im Rohre selbst, eine Koagulationszeit von 10,85 Minuten (10,8 und 10,9 in 2 verschiedenen Versuchen) d. h. es waren 31% inaktiviert.

Aus diesen Versuchen glauben wir nur schließen zu dürfen, daß das von dem Schaume adsorbierte Enzym zum größten Teil nicht verändert ist, sondern sofort nach dem Schütteln imstande ist, Milch zu koagulieren. In bezug auf den nicht reversiblen Teil der Labmenge geben sie keine Auskunft, indem die gefundenen Werte von dem inaktivierten Lab etwa von derselben Größe sind, wie in Versuchen mit entsprechender Schüttelzeit und Schüttelgeschwindigkeit, wo Proben erst nach dem Rückgang des Schaumes herausgenommen wurden. Für eine Erklärung des Vorganges gaben diese Versuche also ein negatives Resultat.

Wir sind indessen durch andere Versuche zu der Schlußfolgerung gekommen, daß der nicht rückgängige Anteil der durch Schütteln inaktivierten Labmenge durch Adsorption der Lösung entzogen ist.

Falls die Lösung aus dem zu den Schüttelversuchen verwendeten Röhrchen herausgegossen wird, dasselbe ein paarmal mit Wasser gespült und dann für einige Stunden entweder mit gekochter (d. h. völlig inaktiver) Lablösung oder mit destilliertem Wasser hingestellt wird, zeigt sich, daß diese Lösung eine, gewiß nicht erhebliche, jedenfalls aber sicher bestimmbare Labmenge enthält. Diese Labmenge, die von der Glasfläche (und vom Rührer) adsorbiert sein muß und allmählich in die labfreie Lösung hineindiffundiert, entspricht, soweit wir es gefunden haben, etwa 5% der ursprünglichen Labmenge.¹⁾ Sie ist also nicht hinreichend groß, um den gesamten nicht reversiblen Anteil direkt als adsorbiert zu erklären.

¹⁾ Wir möchten an dieser Stelle erwähnen, daß von an demselben Tage mit demselben Apparate in einheitlicher Weise angestellten Ver-

Diese Schlußfolgerung läßt sich dagegen aus den Schüttelversuchen an mit Saponin versetzten Lablösungen ziehen. In diesen, wo die Schaumbildung ein Maximum erreicht, wird man a priori denken können, daß auch die Schüttelinaktivierung ein Maximum erreicht, denn mit der reichlich vermehrten Schaumoberfläche muß eine vermehrte Adsorption, dadurch eine Abnahme der Labmenge in der Lösung stattfinden. Dies erweist sich indessen gar nicht als zutreffend. Im Gegenteil. Es findet gar keine Schüttelinaktivierung statt.

So erstaunlich dies Resultat im ersten Moment schien, findet es seine natürliche Erklärung in der, soweit uns bekannt, zuerst von Ramsden gefundenen Tatsache, daß Saponin Eiweißkörper und dergleichen von den Oberflächen vertreibt (l. c. S. 342). Wenn dies der Fall ist, gibt es keine Möglichkeit für das Lab von Oberflächen (es sei im Schaume, an dem Rührer, der Glasoberfläche) adsorbiert zu werden, es bleibt quantitativ in der Lösung erhalten, wie heftig und wie langdauernd diese geschüttelt wird.

Wir kommen somit zu der Schlußfolgerung, daß der gesamte nicht reversible Teil des schüttelinaktivierten Labs ebenfalls durch eine Adsorption der Lösung entzogen ist; und zwar durch eine anormale Adsorption, wie von früheren Forschern für die Adsorption von Eiweiß gefunden. (Vgl. u. a. L. Michaelis, Dynamik der Oberflächen. Dresden 1909.)

Der Einfluß der Luft.

Nachdem gezeigt worden war, daß die «Schüttelinaktivierung» eine Adsorption darstellt, die in naher Beziehung zu der von dem anwesenden Luftvolumen abhängigen Schaumbildung steht, ergab sich die Frage, ob die «Schüttelinaktivierung» überhaupt ohne eine Schaumbildung d. h. ohne Luft stattfinden kann.

suchen stets der erste eine größere Destruktion zeigt als die folgenden. Die Differenz beträgt etwa 5%. Diese Erscheinung ist wohl so zu erklären, daß ein Teil vom Lab sehr fest adsorbiert wird und nicht in kurzer Zeit weder durch Waschen noch Kochen völlig entfernt werden kann. Wenn das Röhrchen über Nacht mit Wasser steht, diffundiert es jedoch heraus.

In bezug auf den reversiblen Anteil des schüttelinaktivierten Labs war die Beantwortung dieser Frage im voraus gegeben. In bezug auf den nicht reversiblen Anteil ließ sich, obwohl er zum Rückgang des Schaumes nicht in Beziehung zu stehen scheint, jedoch die Möglichkeit nicht ausschließen, daß die Schaumbildung auch für diesen Teil des «schüttelinaktivierten» Enzymes das Maßgebende sei. Wir wissen ja, daß beim Aufbewahren der Lablösungen in reinen Jena- oder Quarzröhrchen keine Adsorption, jedenfalls keine deutliche, an der Gefäßoberfläche respektiv der Luftoberfläche stattfindet. Wenn nun eine solche durch das Schütteln veranlaßt wird, liegt es nahe, die Ursache derselben auf die Konzentrierung des Enzymes an den Schaumbläschen zu suchen und zwar in der Weise, daß diese konzentrierten Labschichten nach dem Platzen der Bläschen an den genannten Oberflächen haften bleiben.

Indessen kann eine «Schüttelinaktivierung» auch ohne Anwesenheit von Luft, d. h. ohne Schaumbildung stattfinden. Als Beispiel dient:

Versuch am 19. Mai 1908, wo das mit einem Kautschukstöpfchen verschlossene Quarzröhrchen mit der Lablösung nebst reinen Quarzkörnchen (resp. Granaten) gefüllt worden war. Nach kräftigem Schütteln während einiger Minuten war die Koagulationszeit von 6,2 Minuten auf 7,2 Minuten vermehrt, d. h. es waren 14% des anwesenden Labs an den Quarzoberflächen adsorbiert.

Inwieweit der in dieser Weise bewirkten Adsorption neben der durch die Schaumbläschen veranlaßten eine Bedeutung für den nicht reversiblen Anteil zukommt, müssen wir dahingestellt lassen.

Nach den in den voranstehenden Abschnitten angeführten Daten ist es unzweifelhaft, daß die Schaumbildung das Wesentliche ist. Wir haben deswegen einige Versuche mit variierender Luftmenge angestellt. Ehe wir dieselben anführen, erwähnen wir zuerst, daß wir sowohl Versuche in mit Lablösung teilweis gefüllten evakuierten Röhren angestellt haben, wie Versuche, wo die Lösung statt mit Luft mit indifferenten Gasen, wie

Wasserstoff oder Stickstoff, geschüttelt wurde. Das Resultat war in diesen Versuchen das nämliche wie in entsprechenden Versuchen mit Luft, d. h. es scheint im großen und ganzen ohne wesentliche Bedeutung zu sein, ob die Lösungen mit Luft oder mit indifferenten Gasen oder bei vermindertem Drucke geschüttelt werden.

Betreffs der Versuche mit variierendem Luftvolumen sei angeführt, daß das Versuchsröhrchen genau 46 ccm faßte. Wurde zu den Versuchen 40 ccm Flüssigkeit verwendet, wurde folglich diese mit 6 ccm Luft geschüttelt, unter Verwendung von 20 ccm Flüssigkeit wurde sie mit 26 ccm Luft geschüttelt usw. In einigen Versuchen wurden die Koagulationszeiten sofort nach dem beendeten Schütteln, in anderen erst nach etwa 1 Stunde, d. h. nach dem Rückgang des Schaumes bestimmt. Die gewonnenen Resultate sind in der Tabelle XII zusammengestellt.

Tabelle XII.

Versuche über den Einfluß des Luftvolumens (Mai 1909).

Im Versuchs- rohre		Koagulationszeiten				(a — x)	
Flüssig- keit ccm	Luft ccm	der Kontroll- probe Min.	sofort nach dem Schütteln Min.	der Kontroll- probe Min.	nach 1 Stunde Min.	sofort	nach 1 Stunde
45	1	9,75	11,5	—	—	84,8	—
40	6	9,75	30,5	10,7	14,6	32,0	73,3
35	11	9,75	53,0	10,0	18,1	18,4	55,2
25	21	9,3	57,1	10,0	22,8	16,3	43,8
15	31	9,3	66,5	10,0	25,0	14,0	40,0
10	36	9,1	53,7	9,7	23,5	16,9	41,3
5	41	9,1	27,6	10,7	27,3	33,0	39,2

Die sofort nach dem beendeten Schütteln bestimmte gesamte inaktivierte Labmenge, ebenso wie der nach 1 Stunde bestimmte nicht rückgängige Anteil derselben nimmt anfangs mit dem vermehrten Luftvolumen zu, um einen Grenzwert zu erreichen, welcher weiterhin vom Luftvolumen unabhängig zu sein scheint. Wird das Luftvolumen noch mehr gesteigert,

z. B. auf 35 ccm oder mehr, d. h. wenn nur 10 ccm oder weniger Flüssigkeit im Röhrchen sind, so nimmt die sofort bestimmte Inaktivierung ab. Die Ursache hiervon ist wahrscheinlich die, daß die mechanische Bearbeitung (d. h. der Schaumbildung) bei der getroffenen Versuchsanordnung bei einem geringeren Flüssigkeitsvolumen nicht so intensiv sein kann, indem nämlich stets ein Teil der Flüssigkeit dem Rührer anhaftet und mitgerissen wird, ohne mit der Luft gepeitscht zu werden. Man kann bei geringem Flüssigkeitsvolumen direkt beobachten, daß die Luftbläschen größer sind, der Schaum nicht so fein, wie wenn Luftvolumen und Flüssigkeitsvolumen etwa gleich groß sind.

Das Verhalten verschiedener Lablösungen.

Die in den voranstehenden Abschnitten, wie die in unseren früheren Mitteilungen besprochenen Schüttelversuche beziehen sich, wie in der Versuchsanordnung angegeben, ausschließlich auf Lablösungen, die wir durch Extraktion mit wässrigem Glycerin aus dem Labmagen junger Kälber bereitet haben.

Während diese konzentrierten Labextrakte nach dem Verdünnen mit Wasser stets die Schüttelinaktivierung zeigten, war dies mit den Labpräparaten des Handels nicht der Fall. Diese letzteren lassen sich bei der von uns getroffenen Versuchsanordnung nicht inaktivieren, selbst wenn die Schüttelung mehrere Stunden dauerte.

Die Handelspräparate werden bekanntlich durch Extraktion mittels verdünnter Salzsäure bereitet und die teilweise neutralisierten Lösungen durch Zusatz von reichlichen Mengen Kochsalz und Borsäure konserviert. Die moderne Form der Labpräparate, die Labpulver (z. B. Glads aus Kopenhagen), bestehen zum größten Teil aus Kochsalz, und wir bekamen somit den Verdacht, daß Elektrolyte die «Schüttelinaktivierung» schädigend beeinflussen könnten.

Es gelang durch Versuche unschwer, die Richtigkeit dieser Vermutung zu erweisen. Durch Zusatz von kleinen Mengen Neutralsalz, besonders aber durch Zusatz von sehr geringen

Mengen von Säuren, konnte das Phänomen der «Schüttelinaktivierung» zurückgedrängt werden.

In der Zeitschrift für physikalische Chemie haben wir (l. c. 551) eine Reihe von Versuchen über den Einfluß der verschiedensten Säuren veröffentlicht. Wir werden jetzt nur auf dieselben hinweisen und daran erinnern, daß die Wirkung nicht in direkter Beziehung zu der Zahl der anwesenden Wasserstoffionen zu stehen scheint.

Die Versuche mit Säuren ergänzen wir hier durch einen solchen (Tabelle XIII) über den Einfluß der Borsäure. Es zeigt sich, daß diese, selbst bei einer Konzentration von $\frac{1}{1}$, keinen sicher nachweisbaren Einfluß ausübt.

Tabelle XIII.
Einfluß der Borsäure.
(Versuche am 2. Februar 1909.)

100 ccm Lablösung enthalten an $\frac{1}{1}$ -mol. norm. Borsäure ccm	Koagulationszeit der		(a — x)
	nicht geschüttel- ten Kontrollprobe Min.	geschüttelten Probe Min.	
0	8,3	92,5	9,0
10	6,75	56,65	11,9
20	6,15	47,4	13,0
50	5,43	37,0	14,7
100	4,2	24,2	17,4

Es ist hieraus ersichtlich, daß das Verhalten der Handelspräparate nicht auf ihren Borsäuregehalt zurückzuführen ist.

In bezug auf die erniedrigende Wirkung der Neutralsalze auf die «Schüttelinaktivierung» führen wir als Beispiel in Tabelle XIV einige Versuche mit Chlornatriumzusatz an.

Man ersieht hieraus, daß die Wirkung mit dem zunehmenden Chlornatriumgehalt abnimmt; die hemmende Wirkung ist jedoch nicht so groß wie in den Versuchen mit Säuren. Ebenso wie Chlornatrium verhält sich Chlorkalium.

Aus den erwähnten Daten über den Einfluß der Elektrolyte auf die «Schüttelinaktivierung» geht hervor, daß diese den Nichteintritt der Inaktivierung der Handelspräparate er-

Tabelle XIV

Einfluß des Chlornatriums.
(Versuche am 15. Februar 1909.)

100 ccm Lablösung enthalten an 1-norm. Chlor- natriumlösung ccm	Koagulationszeit der		(a - x)
	nicht geschüttel- ten Kontrollprobe Min.	geschüttelten Probe Min.	
0	—	—	—
5	6,75	68,5	9,9
10	6,35	41,7	15,2
15	6,25	25,35	24,6
20	6,5	19,1	34,0
30	6,25	13,5	49,3

klären können, indem diese oft schwach sauer sind und stets reichliche Mengen von Salzen enthalten. Wenn nun aber, wie es bei dem Gladschen Labpulver der Fall ist, die Präparate neutral reagieren und dieselben so kräftig wirksam sind, daß sie vor den Versuchen mit destilliertem Wasser z. B. in dem Verhältnis 1 : 4000 verdünnt werden müssen, ist es jedenfalls ausgeschlossen, daß die Säuren eine hemmende Wirkung ausüben, und betreffs der Neutralsalze ist die Konzentration derselben in den verdünnten Lösungen so gering, daß es wohl von vornherein zweifelhaft sein muß, ob sie den ausschlaggebenden Faktor darstellen.

Dies ist auch nachweislich der Fall. Nachdem die konzentrierten Labpräparate durch Dialyse während ein paar Tagen salzarm gemacht worden waren, zeigten sie nach dem Verdünnen durchaus keine «Schüttelinaktivierung», selbst wenn sie ein paar Stunden lang kräftig geschüttelt wurden.

Wenn diese dialysierten Lösungen aber mit Glycerin (z. B. 2 ccm konzentriertem Glycerin auf 100 ccm der verdünnten Lablösung) versetzt wird, lassen sie sich in kurzer Zeit durch Schütteln kräftig beeinflussen. Das Glycerin hat also bei diesen Versuchen nicht nur einen fördernden Einfluß, sondern ist direkt die Bedingung der Inaktivierung. Das Gladsche Labpulver läßt sich in verdünnten Lösungen (1 : 4000)

auch ohne Dialyse durch Glycerinzusatz (5%) in geringem Maße schüttelinaktivieren; bei höherer Konzentration (2 : 4000) war auch hier ein Glycerinzusatz ohne Einfluß.

Wir erinnern hier daran, daß der Glycerinzusatz in den Versuchen mit Glycerinextrakten einen teilweise hemmenden Einfluß hat, wie aus den Daten S. 438 in unserer ersten Mitteilung (Diese Zeitschr. Bd. LX) ersichtlich ist.

Während bei den Handelspräparaten ein recht erheblicher Glycerinzusatz sich als eine notwendige Bedingung einer «Schüttelinaktivierung» gezeigt hat, ist dies bei unseren eigenen durch Extraktion mittels Glycerin bereiteten im großen ganzen nicht der Fall. Diese Extrakte können ein paar Tage lang dialysiert werden, ohne ihre Eigenschaft, der «Schüttelinaktivierung» fähig zu sein, einzubüßen.

Die die «Schüttelinaktivierung» bedingenden Faktoren scheinen hier noch ziemlich komplizierter Natur zu sein, was ja kein Erstaunen erwecken kann, wenn unsere Annahme richtig ist, daß das Phänomen auf Oberflächenspannungen beruhe. Denn es ist ja allgemein anerkannt, daß die Oberflächenspannungen sich von ganz geringen stofflichen Verschiedenheiten kräftig beeinflussen lassen.

Zusammenfassung.

Wenn die durch kräftiges Schütteln teilweise «inaktivierten» Lablösungen im geschüttelten Systeme selbst ruhig stehen bleiben, nehmen sie binnen kurzer Zeit (bis zu einer Stunde) wieder an Aktivität zu. Wird dagegen die geschüttelte Flüssigkeit sofort herausgehoben und in einem neuen Rohre aufbewahrt, nimmt sie nicht an Aktivität zu. Die Ursache hiervon ist darin zu suchen, daß während des Schüttelns eine Konzentrierung des Enzymes an den Oberflächen des gebildeten Schaumes und an den sonstigen Oberflächen des geschüttelten Systemes statthat. Wird statt der Flüssigkeit der gebildete Schaum herausgehoben, zeigt die aus demselben gebildete Flüssigkeit eine vermehrte Koagulationsfähigkeit.

Wenn in dem geschüttelten Systeme der Schaum völlig zurückgegangen ist, nimmt die Flüssigkeit nicht mehr an Ak-

tivität zu, trotzdem sie nicht ihre ursprüngliche Aktivität zurückbekommen hat.

Während also ein Teil des ursprünglich vorhandenen Enzyms nur vorübergehend der Flüssigkeit entzogen ist und also nur scheinbar den Eindruck einer Inaktivierung gibt, sind andere Teile des Enzymes definitiv verhindert, ihre Wirksamkeit in der Flüssigkeit zu entfalten, und machen somit den Eindruck einer wirklichen Inaktivierung.

Die nicht reversiblen Anteile des schüttelinaktivierten Labes nehmen mit der vermehrten Schüttelzeit zu, weshalb man den Eindruck bekommt, daß die reversible Labmenge gleichzeitig abnimmt. Bei hinreichend großer Enzymkonzentration ist dies jedoch nicht der Fall, indem jetzt die reversible Labmenge einen von der Konzentration unabhängigen konstanten Grenzwert (in absoluten Zahlen gemessen) annimmt, was so zu deuten ist, daß der Schaum und die anderen Oberflächen bei einer gegebenen Versuchsanordnung maximal eine bestimmte Labmenge adsorbiert. Es handelt sich hierbei wahrscheinlich nur um eine einfache Adsorption, denn das Enzym ist sofort nach dem beendeten Schütteln imstande, Milch zu koagulieren.

In bezug auf den nicht reversiblen Anteil des «schüttelinaktivierten» Labs glauben wir schließen zu können, daß es sich auch um eine Adsorptionserscheinung handelt. Erstens diffundiert nämlich, wenn das Versuchsröhrchen und der Rührer nach dem beendeten Schütteln ein paarmal mit Wasser ausgespült wird und danach für einige Stunden mit gekochter (d. h. völlig inaktiver) Lablösung oder mit destilliertem Wasser hingestellt wird, in der Lösung Lab in einer Menge von etwa 50% des ursprünglich vorhandenen hinaus. Zweitens, wird die Lablösung mit ein wenig Saponin versetzt, tritt, wie kräftig und langdauernd die Lösung geschüttelt wird, keine Inaktivierung ein, trotzdem die Schaumbildung eine maximale ist. Die Ursache hiervon ist die, daß das Saponin, wie von früheren Forschern festgestellt, die Eiweißkörper (inkl. Enzym) von den Oberflächen vertreibt, und es gibt keine Möglichkeit für das Lab von Oberflächen (es sei nun im Schaum, an dem Rührer, an

der Glasoberfläche) adsorbiert zu werden, weshalb es quantitativ in der Lösung erhalten bleibt.

Wenn das Phänomen der «Schüttelinaktivierung» eine Adsorptionserscheinung ist, ist es selbstverständlich, daß kleine stoffliche Verschiedenheiten, welche bekanntlich die Oberflächenspannungen kräftig beeinflussen können, einen großen Einfluß auszuüben imstande sind. Inwieweit die für einige Elektrolyte und den Einfluß derselben auf die «Schüttelinaktivierung» gefundenen unerwarteten Resultate sich theoretisch verwenden lassen, bleibt dahingestellt. Ebenso ob die «Schüttelinaktivierung» sich für Reindarstellung bzw. Konzentrierung von Enzymen praktisch verwerten läßt.
