

Über die Enzyme des Akaziengummis und einiger anderer Gummiarten.

Von

Friedrich Reinitzer.

(Der Redaktion zugegangen am 26. Juli 1909.)

Geschichtliches.

Vor 100 Jahren bemerkte Götting²⁰⁾ und fast gleichzeitig auch Boulay,¹⁰⁾ daß das arabische Gummi die Fähigkeit hat, eine milchige Ausscheidung von Guajakharz in Minzenwasser zu bläuen. Schon ein Jahr später beobachtete Planche³⁶⁾ die gleiche Bläuung durch frische Meerrettigwurzel. Er beschäftigte sich eingehender mit ihr, wies sie bei zahlreichen Pflanzen nach und erklärte sie nicht als Oxydationserscheinung, sondern als die Wirkung eines in den Pflanzen vorhandenen Cyanogens³⁶⁾ und schlug sie auch zum Nachweis einer Verfälschung des Tragants mit arabischem oder Senegalgummi vor. Erst Schönbein⁴¹⁾ erkannte die Guajakbläuung als eine Oxydationswirkung und führte ihre Entstehung auf ein oxydierendes Ferment zurück. Schon im nächsten Jahre gab er die Guajaktinktur als empfindlichstes Reagens auf Fermente an⁴²⁾ und diese Ansicht erhielt sich lange, obgleich schon neun Jahre später Baranetzky³⁾ zeigte, daß es diastatische Fermente gibt, die Guajakharz nicht bläuen. Sie wurde noch mehr gefestigt durch die Angabe Lintners, daß die Guajakbläuung eine für die Malzdiastase charakteristische Eigenschaft sei. Alle diese Erfahrungen wurden aber zunächst noch nicht auf das Gummi angewendet. Als Struwe⁴¹⁾ 1872 beobachtete, daß Pyrogallol durch Gummi zu Purpurogallin oxydiert wird, dachte er nicht an die Anwesenheit eines besonderen Sauerstoffüberträgers und Clermont und Chautart,¹³⁾ die diese

Beobachtung zur Darstellung von Purpurogallin in größerem Maßstabe benützten und den Vorgang genauer studierten, kamen zu der Überzeugung, daß das Gummi hierbei nicht die Rolle eines Fermentes spielen könne, da bei Anwendung gleicher Mengen Pyrogallol die Menge des gebildeten Purpurogallins der zugesetzten Gummimenge proportional ist. Sie beobachteten, daß auch andere Phenole durch Gummi oxydiert werden, konnten aber für die Erscheinung keine Erklärung geben. Bald darauf verfiel Wiesner⁴⁸⁾ durch Zusammenhalten der Beobachtungen von Planche und Schönbein auf den Gedanken, daß im Gummi ein diastatisches Enzym vorhanden sein müsse, das er für den Rest jenes Enzyms hielt, dem das Gummi seine Entstehung in der Pflanze wahrscheinlicherweise verdankt. Er stützte sich dabei außerdem noch auf den Stickstoffgehalt des Gummis, auf das Schäumen seiner Lösungen, das er der Gegenwart des Enzyms zuschrieb, und auf die Fähigkeit des Gummis, Kleister zu verflüssigen und, wie er glaubte, in Dextrin zu verwandeln. Er nannte das Enzym Gummiferment, schrieb ihm die Eigenschaft zu, Cellulose in Gummi zu verwandeln, und glaubte, daß die von C. Reichl³⁹⁾ aufgefundene Kohlenhydratreaktion mit Orcin und Salzsäure von diesem Ferment herrühre. Mit Hilfe dieser Reaktion glaubte er nachgewiesen zu haben, daß das Gummiferment im Pflanzenreich eine weite Verbreitung habe und die meisten durch Gummifluß entstehenden Gummisarten, sowie auch das Holz- und Wundgummi und den Pflanzenschleim der Lein-, Quitten- und Flohsamen erzeuge. Fünf Jahre darauf zeigte ich,³⁸⁾ daß das im Gummi enthaltene Enzym aus Stärkekleister nicht nur Dextrin, sondern auch Zucker erzeugt, daß es nicht imstande ist, Cellulose in Gummi oder Schleim zu verwandeln und daß es auch nicht der Urheber der Reichlschen Reaktion ist, die sich vielmehr durch Entstehung eines Furfurols oder Methylfurfurols aus dem anwesenden Kohlenhydrat erklärt. Ich zeigte, daß Wiesner diese Reaktion mit Proben von Pepsin und Diastase ausgeführt hatte, die kohlenhydrathaltig gewesen waren, ohne diesen Umstand beachtet zu haben, und so zu der Meinung gekommen war, daß es sich um eine Enzymreaktion handle. Weiters, daß er den durch das Enzym

gebildeten Zucker deshalb übersehen hatte, weil er sehr verdünnte Gummilösungen und sehr dünnen Kleister verwendet hatte, weshalb mit Fehlingscher Lösung so wenig Kupferoxydul entstanden war, daß es erst nach mehrstündigem Absetzen sichtbar geworden wäre. Ich zeigte ferner, daß das Gummiferment Cellulose nicht zu lösen und nicht in Gummi zu verwandeln vermag und daß die gegenteilige Meinung Wiesners, die sich auf die Auflösung der sogenannten Stärkcellulose durch das Enzym stützt und die Unangreifbarkeit der gewöhnlichen Cellulosewände aus ihrer physikalischen Beschaffenheit erklärt, unzulässig ist. Diese Untersuchung lieferte also den Beweis, daß das Gummiferment ein diastatisches Enzym ist und nicht der Rest jenes Enzyms, das mutmaßlich bei der Gummibildung in der Pflanze die Umwandlung der Zellwände in Gummi besorgt. Drei Jahre später veröffentlichte Béchamps⁴⁾ eine Untersuchung, welche die von mir gefundenen Tatsachen völlig bestätigt. Béchamps kannte anscheinend keine der vorhergegangenen Arbeiten, wenigstens führt er keine an. Er erklärt ausführlich, daß er schon vor längerer Zeit⁵⁾ die Ansicht ausgesprochen habe, daß in jedem Produkt lebender Zellen Enzyme vorkommen können, da diese stets Produkte lebender Zellen seien.⁶⁾ Dies habe ihn auf den Gedanken gebracht, auch im Gummi nach einem Enzym zu suchen. Er zeigte dann, daß eine 20%ige Gummilösung einen 5%igen Kleister bei 50° C. in wenigen Stunden verflüssigt und nach 6—12 Stunden in ihm große Mengen Zucker erzeugt. Durch Bestimmung des Drehungsvermögens wies er nach, daß sich hierbei zuerst lösliche Stärke und dann Dextrin und Zucker bildet. Auf demselben Wege zeigte er, daß das Enzym Rohrzucker nicht invertiert und auch auf das Gummi selbst nicht verzuckernd einwirkt. Andererseits wies er nach, daß freie Arabinsäure bei 50° auf Kleister unwirksam ist, ihn aber bei 100° zu verflüssigen und in geringem Grade auch zu verzuckern vermag. Aus allen diesen Beobachtungen schließt Béchamps auf die Anwesenheit eines diastatischen Enzyms im Gummi, das er «Gummizymase» nannte. Durch diese zwei Arbeiten waren also die Angaben Wiesners über das Gummiferment in mehreren sehr

wesentlichen Punkten als irrig erkannt und berichtigt worden. Obwohl nun Wiesner diese Berichtigungen nicht widerlegte, blieb er dennoch sowohl in seinem Lehrbuche der Botanik, als auch in der 2. Auflage seiner «Rohstoffe des Pflanzenreichs» auf seinem ursprünglichen Standpunkte stehen. In letzterem Werke⁴⁹⁾ sagt er auf S. 72, Bd. I: «Ich habe in allen von mir untersuchten Gummiarten ein spezifisches diastatisches Ferment aufgefunden, welches nach meinem Dafürhalten als die unmittelbare chemische Ursache der Umwandlung der Cellulose in Gummi anzusehen ist. Auch nach den späteren von Louis Charles Lutz angestellten Beobachtungen ist ein diastatisches Ferment bei Entstehung des Gummis (Akaziengummi) anzunehmen.» Auf S. 85 desselben Werkes sagt er ferner: «Die Lösungen aller Akaziengummiarten, wie der Gummiarten überhaupt, wirken diastatisch, führen nämlich Stärkekleister in Dextrin über. Da die Enzyme, darunter auch die diastatischen Fermente, stark schäumende Lösungen geben, so wird es verständlich, daß auch die Lösungen des Akaziengummis stark schäumen. Kocht man die Lösungen des Akaziengummis so lange, bis sie nicht mehr diastatisch wirken (und dann auch Guajaktinktur nicht mehr bläuen), so bleibt das starke Schäumen der Lösung beim Schütteln aus.» Als Beleg für dieses Festhalten an seinen Angaben führt Wiesner außer dem Hinweis auf Lutz nur seine eigene Arbeit an, übergeht also meine und Béchamps Befunde vollständig. Die Arbeit von Lutz,³⁰⁾ auf welche er sich beruft, ist eine Pariser Dissertation aus dem Jahre 1895, in welcher der Verfasser (S. 74) über die Arbeit Wiesners kurz berichtend (!) von der Anwesenheit eines «den diastatischen Enzymen sich nähernden Fermentes» spricht, dann die Reaktion mit Orcin und Salzsäure als Furfurolreaktion kennzeichnet und hieraus den Schluß zieht, daß «die von Wiesner erhaltenen Ergebnisse noch sehr diskutabel» seien. Auf S. 76 teilt er dann einige eigene Versuche über dieses Enzym mit. Er läßt eine Lösung von Senegalgummi, die mit Blausäure oder Thymol versetzt war, durch 6 Wochen bei 35° C. stehen und findet dann erhebliche Mengen von Zucker darin, die er für neu entstanden hält. Daß dieser Zucker schon vorher darin war, ist

ihm gänzlich unbekannt. Er läßt dann ein zuckerfreies Kirschgummi unter den gleichen Bedingungen auf Stärkekleister einwirken und findet nach einem Monat eine kleine Menge Zucker. Aus diesen 2 Versuchen schließt er, daß das im Gummi enthaltene Enzym unter Umständen Gummi und Stärke in Zucker (!) zu verwandeln vermöge. Mehr hat Lutz über diesen Gegenstand nicht veröffentlicht, aber auch dies Wenige führt ihn dazu, Wiesners Angaben anzuzweifeln und das Enzym für ein zuckerbildendes zu erklären. Wiesner beruft sich daher ganz mit Unrecht auf Lutz, der übrigens ganz einseitig unterrichtet war, da er weder meine noch Béchamps Arbeit kennt. Auch Zeisel,⁵¹⁾ der den chemischen Teil des Abschnittes über die Gummiarten in Wiesners «Rohstoffen» bearbeitet hat, stellt sich in dieser Frage, ohne Angabe von Gründen, mehr auf die Seite Wiesners. Er führt zwar die Literatur vollständig an, behauptet aber, es sei noch strittig, ob das Enzym des Gummis aus Stärkekleister außer Dextrin auch Zucker bilde oder nicht, und gibt außerdem ganz im Sinne Wiesners an, daß es bei der Verflüssigung des Stärkekleisters «auch die Cellulose-(Hemicellulose-)Häute der Stärkekörner» löse. Da er überdies «bezüglich der Rolle, welche dieses Enzym bei der Umbildung von Cellulose (!) beziehungsweise Stärke (!) zu Gummi (!) in der Pflanze spielt», auf die späteren Angaben Wiesners verweist, so werden dadurch die gegenteiligen Befunde vollständig unterdrückt.

Alle diese Arbeiten enthalten die stillschweigende Voraussetzung, daß die oxydierenden und diastatischen Eigenschaften des Gummis von dem gleichen Enzym herrühren, eine Annahme, die sich hauptsächlich auf die Angaben Schönbeins und Lintners stützte. Durch die Untersuchungen Yoshidas⁵⁰⁾ und Bertrands⁷⁾ über die Oxydase des japanischen Lackbaumes, der letzterer den Namen Laccase gab und die er bald darauf in vielen anderen Pflanzen auffand, wurde Bertrand dazu geführt, auch die oxydierenden Wirkungen des Akaziengummis der Laccase zuzuschreiben. Er äußert sich hierüber nur ganz kurz in einer Anmerkung,⁸⁾ in welcher er angibt, die Laccase sowohl im arabischen wie im Senegalgummi, nicht aber im

Kirschgummi gefunden zu haben. Etwas eingehender hat sich Em. Bourquelot¹¹⁾ mit den oxydierenden Wirkungen verschiedener Gummiarten, namentlich des arabischen Gummi beschäftigt. Er zeigte beispielsweise, daß letzteres die Fähigkeit hat, Guajakol, Kreosol, Acetylguajakol, Methylanilin, α -Naphthol, α -Naphthylamin, Veratrylamin, Orthokresol und Phenol, sowie die wässerigen Auszüge vieler Drogen zu oxydieren. Einige Jahre vorher hatte Jacobson²⁸⁾ gezeigt, daß durch passendes Erwärmen einer Diastaselösung oder durch Erschöpfen ihres katalytischen Vermögens oder durch Aussalzen mit Glaubersalz ihre Fähigkeit, Guajak mit Wasserstoffperoxyd zu bläuen, zerstört werden kann, ehe ihre amylolytische Wirkung verloren geht. Er zog hieraus jedoch noch nicht den Schluß, daß diese zwei Eigenschaften zwei verschiedenen Enzymen angehören könnten. Auch Grüß²³⁾ hielt zunächst an der Einheitlichkeit des Enzyms fest. Erst Raciborski³⁷⁾ kam bei seinen Untersuchungen über das Leptomin zu der Ansicht, daß die Reaktion mit Guajak und Wasserstoffperoxyd nicht durch die Diastase hervorgerufen wird, sondern durch einen andern Körper. Seine Schlußfolgerung entbehrte jedoch einer sicheren Grundlage und wurde von Grüß²⁴⁾ bekämpft. Letzterer fand anderseits in *Penicillium glaucum* eine Diastase, welche die Reaktion mit Guajak und Wasserstoffperoxyd nicht gibt,²⁵⁾ wie solche seinerzeit schon Baranetzky gefunden hatte.

Mittlerweile hatte die Lehre von der spezifischen Wirkung der einzelnen Enzyme durch die Untersuchungen Em. Fischers¹⁵⁾ eine wichtige Stütze erhalten, so daß sich immer mehr die Ansicht festsetzte, daß jede besondere Wirkung durch ein besonderes Enzym hervorgerufen wird. Dementsprechend müßte auch beim Gummi die diastatische und die oxydierende Wirkung zwei verschiedenen Enzymen zugeschrieben werden, was indessen in den einschlägigen Arbeiten bisher nirgends ausgesprochen worden ist. Auch die scharfe Unterscheidung der Guajakbläuung mit und ohne Wasserstoffperoxyd, welche Chodat und Bach²⁾ zur Unterscheidung der Peroxydasen und Oxydasen führte, hat bei den noch folgenden Untersuchungen über die Enzyme des Gummi nicht immer Beachtung gefunden.

Einige Beobachtungen über die Gummienzyme machte Frischmuth¹⁷⁾ bei seinen Untersuchungen über das Gummi der Myrrhe. Viel eingehender hat sich Tschirch in Verbindung mit Stevens⁴⁵⁾ mit den Gummienzymen befaßt. Sie kamen zu dem Ergebnis, daß das Gummi eine Oxydase enthalte, daß es aber unmöglich sei, diese von dem Gummi zu trennen.⁴⁶⁾ Tschirch beschäftigte sich hauptsächlich mit der Laccase im sogenannten Lackgummi, dem Gummi des japanischen Lackbaumes, fand aber auch in allen Gummiharzen Oxydasen vor. In einigen dieser letzteren hatten übrigens schon vor ihm Wiesner und Bourquelot die Guajakreaktion erhalten. Er zeigte, daß in der Laccase des Japanlackes ein Gemisch mehrerer Enzyme vorliegt, daß ihre Wirkung durch Kochen zerstört, daß sie jedoch hierbei nicht gefällt wird. Er wies im Verein mit Stevens nach, daß der Stickstoffgehalt des Gummis weder mittels der Lassaigneschen Probe noch mittels ihrer Abänderung von Kehler nachgewiesen werden kann, sondern dies nur entweder durch Erhitzen mit trockenem Ätzkali gelingt, wobei sich Pyrrol entwickelt, oder durch Verbrennen im Sauerstoffstrom mit Kupferoxyd und Nachweis der entstandenen Salpetersäure.⁴⁶⁾ Er zeigte, daß es nach den bis jetzt zur Verfügung stehenden Methoden nicht gelingt, den stickstoffhaltigen Körper von dem Gummi zu trennen, obwohl es leicht möglich ist, die enzymatischen Wirkungen des Gummis zu zerstören. Er nimmt daher, unter der stillschweigenden Voraussetzung, daß die Enzyme stickstoffhaltig sind, eine nähere Beziehung zwischen Gummi und Enzym an, läßt es aber offen, ob es sich dabei um eine Verbindung beider handelt, und nennt die «mit gummiartigen Substanzen vergesellschafteten Oxydasen» «Gummasen», ein Vorgang, der nicht nachahmenswert ist, da er gegen die allgemein gebräuchliche Duclauxsche Bezeichnungsweise verstößt und daher leicht zu Irrtümern Veranlassung geben kann. Tschirch äußert sich auch über die Beziehungen zwischen den Gummienzymen und der Entstehung des Gummis.⁴⁷⁾ Er erklärt, daß es «bis jetzt noch nicht erwiesen sei, daß das Enzym, das man im Gummi arabicum und den heimischen Gummis findet, zur Gummibildung in Beziehung steht. Das einzige, was sicher ist, ist, daß es in den Gummis vorkommt»

(a. a. O. 884). Die Rolle, welche die Oxydasen bei den Sekreten spielen, sei noch gänzlich unklar und bedürfe weiterer Aufklärung (a. a. O. 885). Tschirch scheint die Annahme zu machen, daß amylytische Enzyme in den Gummiarten überhaupt nicht vorkommen oder zum mindesten nicht sicher nachgewiesen seien, wenigstens macht er zu meinen diesbezüglichen Angaben ein Fragezeichen und erwähnt auch die amylytische Eigenschaft des Wiesnerschen «Gummifermentes» nicht. Auch die Béchampssche Arbeit läßt er unerwähnt und spricht davon, daß die «Oxydase» des Gummi zur Gummibildung in Beziehung gebracht worden sei. Der Angabe Tschirchs über den Nachweis des Stickstoffs in der Oxydase hat später Bach¹⁾ widersprochen. Er gibt an, daß der Nachweis des Stickstoffs sowohl bei den Oxydasen wie bei der Peroxydase nach dem Lassaigneschen Verfahren leicht gelinge, wenn man Kalium statt Natrium verwendet und nicht zu wenig davon nimmt. Ferner stellte er fest, daß eine gereinigte Peroxydase aus Meerrettich mit festem Ätzkali erhitzt nicht nur Pyrrol, sondern auch Ammoniak gibt. Vor zwei Jahren hat ein Schüler Wiesners, V. Grafe,²⁾ den Versuch gemacht, die Richtigkeit der Wiesnerschen Angaben über das Gummiferment nachzuweisen und meine gegenteiligen Befunde als Versuchsfehler hinzustellen. Auch Grafe kennt die Arbeit von Béchamps nicht und beruft sich wie Wiesner auf die früher genannte Arbeit von Lutz und auf eine Arbeit von Garros.¹⁹⁾ In beiden Arbeiten soll die Annahme eines Enzyms gemacht werden, das Kleister in Dextrin verwandelt, ohne Zucker zu bilden. Daß Lutz das gerade Gegenteil behauptet, wurde früher erwähnt. Die Arbeit von Garros hat mit dem Gummiferment gar nichts zu tun, denn Garros beschreibt darin ein hefeartiges organisiertes Ferment, also einen Pilz, der die Fähigkeit hat, den unlöslichen Teil des Kirschgummi in Lösung zu überführen und von dem er vermutet, daß er bei der Gummibildung eine Rolle spielen dürfte. Von einem löslichen Enzym wird darin gar nichts erwähnt. Grafe bemüht sich vor allem, nachzuweisen, daß das Gummi aus Kleister nur Dextrin und keinen Zucker bildet. Da das Akaziengummi fast immer kleine Mengen

von Zucker enthält, so kann die Zuckerbildung nur durch eine Zuckerbestimmung vor und nach der Einwirkung auf Kleister nachgewiesen werden. Grafe glaubt nun, daß die von mir angewandte maßanalytische Methode wegen des Schäumens der Gummilösungen nicht genügend genau sei und daß in meinen Lösungen die Zuckerbildung durch Bakterienwirkung hervorgerufen worden sei. Um diese vermeintlichen Fehlerquellen sicher zu umgehen, bestimmte er den Zucker gewichtsanalytisch und filtrierte die Gummilösung vor ihrer Einwirkung auf Kleister durch keimfreie Pukalfilter. Er erhielt zwar auch unter diesen Umständen stets einen kleinen Zuwachs an Zucker, der jedoch nur geringfügig war und von ihm auf die «unvermeidlichen Fehlerquellen» und auf den Umstand zurückgeführt wurde, «daß ja auch die Dextrine, wenn auch in viel schwächerem Maße, und bei richtiger Kochdauer ohne wesentlichen Einfluß auf das Resultat, Fehlingsche Lösung reduzieren». Außerdem gelang es ihm, durch wiederholte Fällung mit 52%igem Alkohol ein zuckerfreies Gummi herzustellen, das in einem Falle keinen Zucker, in einem zweiten nur «Spuren» von Zucker erzeugte. Schließlich behauptet er, die sehr merkwürdige Entdeckung gemacht zu haben, daß sich dem Gummi durch Äther(!) ein Ferment entziehen lasse, das Kleister in Erythroextrin verwandelt. Aus diesen Beobachtungen zieht er den Schluß, daß das Gummiferment aus Kleister nur Dextrin bildet, daß es vielleicht aus zwei Enzymen besteht, von denen das eine Erythroextrin, das andere aus diesem Achroodextrin bildet und daß die Angaben Wiesners über die Wirkung des Enzyms völlig richtig seien. Letztere Behauptung ist natürlich falsch, denn die irrigen Angaben Wiesners über die Umwandlung der Cellulose in die verschiedensten Gummi- und Schleimarten durch ein und dasselbe Enzym hat auch Grafe nicht nachgewiesen.

Schließlich wäre noch kurz zu berichten, wie sich diejenigen Forscher zu dem im Gummi enthaltenen Enzyme stellen, die sich hauptsächlich mit der Entstehung des Gummis beschäftigt haben. Als Ursache der Gummibildung wurde der Wundreiz, die Reizung durch Fadenpilze oder Bakterien, Zutritt des Sauerstoffs, oder Bildung nekrobiotischer Zellen be-

zeichnet, oder es wurde das Gummi geradezu als ein Erzeugnis von Bakterien hingestellt. Es wurde Gummibildung sowohl aus Zellwänden wie im Zellinhalt (Mikosch) beobachtet. Die meisten Beobachter, die eine Umwandlung von Zellwänden in Gummi gesehen haben, dachten dabei an die Mitwirkung eines Enzyms, als dessen Entstehungsort sie entweder die lebenden oder die abgestorbenen Zellen des Gewebes oder die beobachteten Pilze oder Bakterien ansahen. Ein Beweis für die Anwesenheit eines solchen Enzyms in den, in Gummibildung befindlichen Geweben oder für seine Übereinstimmung mit dem im Gummi vorhandenen ist bis jetzt von niemandem erbracht worden, denn Wiesners Versuch, diesen Beweis mittels der Orcinreaktion zu erbringen, beruht auf einer irrigen Annahme und ist daher mißglückt. Fast alle Beobachter, welche bei der Entstehung des Gummis an die Mitwirkung eines Enzyms dachten, stellten sich dieses als hydrolytisch wirkend vor. Nur Größ²⁶⁾ nimmt an, daß es sich dabei um das Zusammenwirken einer Diastase mit «Sauerstoffüberträgern» handelt, durch welche die Aldehyde in Säuren verwandelt werden, wodurch die Säuren des Gummis entstehen. Eine Oxydation nimmt auch Mikosch³²⁾ und Ruhland⁴⁰⁾ an und da Tschirch und Stevens⁴⁵⁾ von einer Beziehung der Oxydasen des Gummis zur Gummibildung sprechen, scheinen auch sie eine ähnliche Ansicht zu haben. In allen diesen Fällen handelt es sich aber immer nur um unbewiesene Annahmen. Es ist ohne weiteres klar, daß die Mitwirkung eines Enzyms bei der Entstehung des Gummis möglich und wahrscheinlich ist, woraus aber noch nicht folgt, daß dieses Enzym im fertigen Gummi vorhanden sein müsse.

I. Eigene Versuche.

Verteilung der Enzyme, Verhalten gegen Gifte und höhere Temperaturen.

Aus dem Vorstehenden ist ersichtlich, daß die Kenntnisse und Ansichten über die im Gummi vorhandenen Enzyme noch mit mancherlei Widersprüchen und Unsicherheiten behaftet sind und viele Lücken aufweisen. Insbesondere handelt es sich

um die Frage, ob das Enzym aus Stärkekleister nur Dextrin oder auch Zucker bildet, ob es bei der Entstehung des Gummis unmittelbar beteiligt ist und ob es Cellulose oder Hemicellulosen in Gummi zu verwandeln vermag. Da die Angaben, welche ich über diese Fragen seinerzeit gemacht habe, von Wiesner unbeachtet geblieben und von Grafe als Irrtum hingestellt worden sind, stellte ich mir die Aufgabe, den wirklichen Sachverhalt einwandfrei festzustellen.

Zu diesem Behufe suchte ich mir zunächst solche Gummisorten zu verschaffen, welche möglichst reich an kräftig wirkenden Enzymen sind. Bei einem Vergleich einer größeren Zahl älterer, der Sammlung entnommener und frisch bezogener, von der letzten Ernte stammender Muster zeigte sich, daß die Verteilung der Oxydase, Peroxydase und Amylase in den verschiedenen Sorten starke Verschiedenheiten aufweist und daß im allgemeinen die frischen Sorten bedeutend reicher an Enzym sind als die älteren. Unter den frischen Sorten waren besonders zwei von E. Moll in Triest bezogene sehr enzymreich, die als hartes und weiches Kordofangummi bezeichnet waren. Etwas weniger wirksam war eine sehr reine, fast farblose, von Kahlbaum in Berlin bezogene Sorte, die ich nach ihren Eigenschaften für ein weiches Kordofangummi halten muß, und ein ziemlich unreines, stark gefärbtes Gheziragummi von E. Moll. Mit diesen 4 Sorten wurden die meisten Versuche ausgeführt. Es lag mir nun vor allem daran, die Möglichkeit der Mitwirkung von Bakterien und Fadenpilzen auszuschalten, ohne die Enzymwirkung zu beeinträchtigen. Am besten hat sich mir zu diesem Zwecke Thymol bewährt. Bokorny⁹⁾ gibt an, daß eine 0,1%ige Lösung von Thymol die Fäulnis von Peptonlösungen, Gärung und Vermehrung von Hefe und die Verschimmelung von leicht schimmelnden Nährböden ganz verhindert. Lübbert²⁹⁾ beobachtete bei einer Verdünnung von 1 : 10 000 vollständige Entwicklungshemmung gegenüber *Staphylococcus pyog. aur.* Das Thymol ist also ein sehr kräftiges Bakterien- und Pilzgift. Ich hielt mir eine größere Menge einer kalt gesättigten wässerigen Thymollösung vorrätig, mit welcher Kleister- und Gummilösungen stets hergestellt

wurden. Da Diastase zwischen 55 und 60° C. am kräftigsten verzuckert, so war auch für das verzuckernde Enzym des Gummi für diese Temperatur die günstigste Wirkung zu erwarten. In der Tat hat schon Béchamps seine Versuche bei 50° ausgeführt und hierbei reichlich Zucker erhalten. Durch das Zusammenwirken einer so hohen Temperatur mit einem so kräftigen Pilzgift, wie es das Thymol ist, erreicht man mit Sicherheit die Ausschaltung der Mitwirkung aller Spalt-, Sproß- und Fadenpilze. Um eine Überschreitung der Temperatur von 60° durch zufällige Schwankungen sicher zu vermeiden, blieb ich bei meinen Versuchen meist zwischen 52—55° C. Durch eine große Zahl von Versuchen überzeugte ich mich, daß die Verflüssigung und Verzuckerung des Kleisters bei dieser höheren Temperatur bedeutend rascher abläuft als bei gewöhnlicher Temperatur. Zur Erläuterung diene folgendes Beispiel:

Ein 5% iger Kartoffelstärkekleister wurde mit einer 20% igen Lösung des weichen Kordofangummi von Kahlbaum, das ich in der Folge einfach als Kahlbaumgummi bezeichnen will, so gemischt, daß auf 3 G. T. des lufttrockenen Gummi 1 G. T. lufttrockene Stärke kam*). Die Hälfte dieser Mischung wurde bei 55° C. die andere Hälfte bei 19° C. unter Watteverschluß aufgestellt. Die warmstehende Flüssigkeit war nach 4 Stunden bis auf wenige Flocken völlig klar, dünnflüssig, enthielt reichlich Erythrodextrin und etwas Zucker. Nach 54 Stunden war das Erythrodextrin verschwunden und sehr viel Zucker entstanden. Aus dem doppelten Volumen Fehlingscher Lösung reduzierte die Flüssigkeit das gesamte Kupfer. Die kaltstehende Flüssigkeit war noch nach 7 Tagen ganz trüb und dick und die vom Kleister abfiltrierte klare Lösung enthielt viel Erythrodextrin und etwas Zucker. Der Unterschied in der Wirkung bei 19° und bei 55° ist also sehr bedeutend. Aus diesem Versuche geht aber auch deutlich hervor, daß das Enzym große Mengen von Zucker bildet, denn das ursprüngliche Kahlbaumgummi enthält nur sehr wenig Zucker. Der Unterschied im Reduktions-

*) Da ich dieses Mischungsverhältnis, das zuerst von Béchamps angewendet worden ist, häufig benützt habe, will ich es in der Folge kurz als das Béchampssche bezeichnen.

vermögen gleicher Raumteile des Gummis und der durch die Verzuckerung entstandenen Flüssigkeit ist sehr bedeutend. Übrigens werde ich ihn noch durch Zahlen belegen. Es ist also zweifellos eine Diastase im Gummi vorhanden. Aus dem Verhalten des Gummis zu Guajakharz allein und in Gegenwart von H_2O_2 geht ferner hervor, daß es sowohl eine Oxydase als auch eine Peroxydase enthält, so daß also mindestens 3 Enzyme darin vorkommen. Daß es sich hier wirklich um 3 verschiedene Enzyme handelt und nicht etwa um verschiedene Eigenschaften eines Enzyms, geht aus der verschiedenen Verteilung dieser 3 Eigenschaften bei den verschiedenen Gummisorten, aus ihrem Verhalten zu Enzymgiften und zu höheren Temperaturen hervor.

Über ihre **Verteilung** konnte ich folgende Erfahrungen sammeln. Eine helle Sennaarsorte gab mit Guajaklösung auch nach langem Zuwarten nicht die geringste Bläuung, wohl aber sehr rasch auf Zusatz von H_2O_2 . Der Farbenton war sehr dunkel. Sie enthielt also eine Peroxydase, aber keine Oxydase. Das Kahlbaumgummi gab mit Guajak nicht die geringste Bläuung, nach Zusatz von H_2O_2 entstand erst nach 36 Stunden eine äußerst geringfügige, nur eben wahrnehmbare Blaufärbung. Es enthält aber, wie der früher mitgeteilte Versuch zeigt, eine beträchtliche Menge diastatisches Enzym. Die drei von E. Moll bezogenen Sorten wurden genau miteinander verglichen. Gleiche Mengen Gummilösung (20%) wurden mit gleichviel Guajaklösung versetzt. Das harte Kordofangummi wurde rasch schwarzblau, das weiche erst nach 1—2 Minuten hellblau, das Gheziri ganz langsam dunkelblau. Alle dunkelten nach 10—15 Minuten stark nach, das weiche Kordofangummi blieb aber bedeutend heller als die beiden andern. Ganz anders ist die diastatische Wirkung verteilt. Die Gummilösungen wurden mit Kartoffelkleister nach Béchamps gemischt und bei 18° und 55° C. aufgestellt. In der Wärme war bei allen dreien nach 3 Stunden Verflüssigung und Lösung eingetreten, doch war die Menge des ungelösten Anteils beim Gheziri am kleinsten, beim harten Kordofan am größten. Nach 4 Tagen hatten beide Kordofansorten reichlich Zucker und Achroodextrin gebildet.

Gheziri dagegen erheblich weniger neben viel Erythroextrin und gelöster Stärke. Bei gewöhnlicher Temperatur erzeugte Gheziri auch nach 8 Tagen nur sehr wenig Zucker, löste nur wenig Stärke und erzeugte aus ihr Erythroextrin. Die Kordofansorten dagegen erzeugten in 8 Tagen ungefähr ebensoviel Zucker wie bei 55° in 4 Tagen und Achroodextrin. Die Angaben über die Zuckermengen sind in diesem Falle Schätzungen unter Anwendung stets gleicher Mengen Fehling'scher Lösung (4 ccm) und Gummilösung (2 ccm) und gleicher Kochdauer (1 Minute), was für diese Art von Vergleichung völlig genügt.

Man sieht, daß die oxydierende und die diastatische Wirkung bei diesen 3 Gummisorten ganz verschieden verteilt ist. Die beiden Kordofansorten wirken ungefähr gleich stark diastatisch, aber ungleich stark oxydierend, wogegen das Gheziri ungefähr so stark oxydierend wirkt, wie das harte Kordofan, aber viel schwächer diastatisch als dieses.

Von den untersuchten **Pilzgiften** zeigte Sublimat die auffallendste Wirkung. Die Versuche wurden mit einem frischen Dschiddagummi und Kartoffelstärke gemacht. Mischungsverhältnis nach Béchamps. Kleister und Gummilösung wurden mit einer 0,1%igen und einer 0,05%igen Sublimatlösung hergestellt und die Mischungen sowohl kalt wie warm aufgestellt. Während sich nun diese Mischung ohne Sublimat bei 55° schon in wenigen Stunden völlig verflüssigt und nach 30 Stunden große Mengen Zucker und kein Erythroextrin enthält, enthalten die mit Sublimat versetzten Mischungen auch nach 5tägigem Stehen in der Wärme den größten Teil der Stärke noch ungelöst, enthalten viel Erythroextrin und nur Spuren von Zucker, entsprechend der im Gummi von vorneherein vorhanden gewesenen Zuckermenge. Die kaltgestandenen Mischungen verhalten sich gerade so. Sublimat verhindert somit die Zuckerbildung sowohl in der Kälte wie in der Wärme vollständig, setzt aber die Stärkelösung und die Bildung von Erythroextrin nur herab. Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, daß hier 2 verschiedene Enzyme vorliegen, die gegen Sublimat verschieden

empfindlich sind, von denen das eine die Stärke löst und in Erythrodextrin verwandelt, das andere Zucker bildet. Für diese Vermutung spricht auch die früher mitgeteilte Tatsache, daß das Ghezirigummi die Stärke besser löst als die beiden Kordafansorten, sie aber dann weit unvollkommener verzuckert als diese, so daß also auch die beiden Eigenschaften der Stärkelösung und der Zuckerbildung auf verschiedene Sorten ungleich verteilt sind.

Auch das Verhalten gegen **höhere Temperaturen** spricht für die Anwesenheit mehrerer Enzyme. So wird z. B. durch einstündiges Dämpfen einer 20%igen Lösung von hartem Kordofangummi die Oxydase und Diastase völlig zerstört, während die Peroxydase erhalten bleibt. Erhitzt man die gleiche Lösung auf 70°, so ist die Oxydase nach 18 Stunden zerstört, die Diastase jedoch meistens noch gänzlich erhalten. Die Peroxydase wird bei dieser Temperatur nach 18 Stunden noch nicht zerstört, wohl aber nach 48 Stunden.

Diese Erscheinungen machen es also sehr wahrscheinlich, daß im Gummi mindestens drei verschiedene Enzyme vorhanden sind, eine Oxydase, eine Peroxydase und eine Diastase. Davon scheint letztere auch ein Gemenge von mindestens 2 Enzymen zu sein. Dieses Ergebnis steht in vollem Einklange mit zahlreichen neueren Beobachtungen an der Malzdiastase und anderen Amylasen, denen zufolge die oxydierenden Wirkungen dieser auf Verunreinigung mit Oxydasen und Peroxydasen zurückgeführt werden müssen (Jakobson,²⁸) Nasse und Fram³³) und die Malzdiastase aus mindestens 2 Enzymen besteht. (Kjeldahl, Seyffert, Potevin, Wysmann, Beijerinck, Fränkel und Hamburg.) Es ist klar, daß man ein derartiges wechselndes Gemisch verschiedener Enzyme, in dem mitunter sogar eines dieser Enzyme fehlen kann, nicht mit dem einheitlichen Namen «Gummiferment» belegen kann, wie es noch Grafe tut. Ich will nun im folgenden über jedes dieser Enzyme noch einige Beobachtungen mitteilen.

II. Oxydase.

Das Vorhandensein von Oxydasen ist bekanntlich von verschiedenen Seiten angezweifelt worden. Einerseits wurde

auf die geringe Verlässlichkeit der Guajakreaktion hingewiesen, anderseits gezeigt, daß bei Anwesenheit von Mangan- oder Eisensalzen bei sehr schwach alkalischer Reaktion die gleichen Oxydationserscheinungen zustande kommen wie durch die Oxydasen und daß sich durch Fällung indifferenten Kolloide bei Gegenwart dieser Salze künstliche Oxydasen herstellen lassen. (Trillat, Lépinos, Spitzer, Saccharoff, Dony-Hénault¹⁴). Es müßte also untersucht werden, ob die Guajakreaktion mit anderen Oxydationswirkungen gleichen Schritt hält und ob nennenswerte Mengen von Mangan oder Eisen nachweisbar sind.

Nasse und Framm³³) haben aus dem Umstande, daß die Guajakbläuung auch beim Mischen von mit CO_2 oder H_2 gesättigten Lösungen eintritt, den Schluß gezogen, daß es sich hierbei um keine Oxydation, sondern um eine Hydroxylierung handelt. Dieser Schluß ist irrig, denn es ist festgestellt, daß die α -Guajakonsäure durch die verschiedensten Oxydationsmittel in Guajakblau und dieses durch Reduktionsmittel wieder in α -Guajakonsäure verwandelt werden kann. Guajakbläuung zeigt also sicher eine oxydierende Wirkung an. Akaziengummi vermag denn auch zahlreiche andere Verbindungen zu oxydieren, die schon in der Einleitung erwähnt worden sind. Ich habe die Wirkung verschiedener Gummisorten auf Pyrogallol, Hydrochinon, Phenol, α -Naphthol, Anilin, Dimethyl-p-phenylendiamin, auf die Indophenolprobe (nach Röhmann und Spitzer) und auf Tyrosin geprüft. Da Gummilösungen deutlich sauer reagieren, findet die Oxydation überall dort, wo nicht absichtlich alkalisch gemacht wird, in saurer Lösung statt, so daß die Begünstigung der Reaktion durch freies Alkali hier wegfällt. Das ist der Fall bei allen Phenolen. Das Kahlbaum-Gummi gab, wie schon früher erwähnt, mit Guajak keine Bläuung. In Übereinstimmung hiermit blieben bei dieser Sorte auch alle anderen Oxydationswirkungen aus, wogegen sie bei den anderen Sorten eintraten. Die kräftigsten Wirkungen erhielt ich mit dem harten Kordofangummi, das auch die kräftigste Guajakbläuung gab. Es erzeugte reichlich Purpurogallin, bräunte eine Hydrochinonlösung schon nach wenigen Stunden und verwandelte sie nach $5\frac{1}{2}$ Wochen in eine tiefdunkelbraune, nur in dünnen Schichten

durchsichtige, stark nach Chinon riechende Flüssigkeit. Phenol färbte es rötlich gelb, später bräunlich, α -Naphthol rasch violett. Letztere Lösung erstarrte nach wenigen Tagen zu einer fast undurchsichtigen, sehr dunkelvioletten, zittrigen Gallerte. Bei der Indophenolprobe (α -Naphthol, p-Phenylendiamin, Na_2CO_3), die in alkalischer Lösung ausgeführt wird, trat sehr rasch eine tiefe Blaufärbung ein und es schied sich bald ein blauer Niederschlag ab. Dagegen wurde das von Wurster empfohlene Dimethyl-p-phenylendiamin in schwach alkalischer Lösung nur sehr langsam und unbedeutend oxydiert. Auch Anilin wurde nur langsam oxydiert und zwar als Salz beträchtlich langsamer, als im freien Zustande.

Wichtig war es zu erfahren, ob die Oxydase die Fähigkeit hat, Tyrosin zu oxydieren, ob also eine Tyrosinase vorhanden ist. Der Versuch wurde mit einigen Gummisorten bei gewöhnlicher Temperatur und bei 50° , in saurer und neutraler Lösung gemacht und bis auf 5 Tage ausgedehnt. Es trat niemals die geringste Veränderung ein. Es ist somit keine Tyrosinase vorhanden. Nach allen Eigenschaften, welche die Oxydase zeigt, hat sie jedenfalls die größte Ähnlichkeit mit der Laccase Bertrands und kann vorläufig mit diesem Namen belegt werden, wie es von Bertrand geschehen ist.

Hunger²⁷⁾ hat angegeben, daß Glykose und Gerbstoffe die Guajakreaktion der Oxydase verhindert. Ich konnte bei Zusatz von Traubenzucker auch in beträchtlicher Menge keine Verhinderung beobachten, wohl aber bei Zusatz von Tannin. Es trat dann mit Guajak nur eine schwache, schmutzig grünlich-graue Färbung ein, die bald verschwand. Ein größerer Zuckergehalt einer Gummisorte kann also niemals die Ursache für ein etwaiges Ausbleiben der Guajakreaktion sein.

Ich machte noch einige Versuche, um festzustellen, ob die oxydierenden Wirkungen nicht von anderen Körpern herrühren könnten. Da das Gummi aus lebenden Geweben stammt, wäre die Anwesenheit von Spuren von Nitriten möglich, wenn auch nicht wahrscheinlich. Ich prüfte größere Mengen dreier Sorten mit KJ und Stärkekleister, mit m-Phenylendiaminsulfat und mit Natriumnaphthionat und β -Naphthol (Riegler). Ich konnte jedoch

nur mit letzterem Reagens, das für das empfindlichste gilt, eine unsichere Reaktion erhalten. Es dürften also wohl kaum Nitrite vorhanden sein, da Riegler als Grenze seiner Reaktion ein Hundert-Milliontel angibt.

Um festzustellen, ob die Oxydationen nicht durch die Anwesenheit erheblicher Mengen von Mangan oder Eisen hervorgerufen werden, wurden etwa 10 g der stärkst oxydierenden Gummisorte verascht und mit einem Teile der Asche eine Manganschmelze gemacht. Es war nicht die geringste Grünfärbung wahrnehmbar. Der Rest der Asche wurde in ClH gelöst, mit NaOH gefällt und das hierbei ausfallende MgO , bei dem etwa vorhandenes Mangan angereichert sein mußte, noch einmal verschmolzen. Jetzt zeigte die Schmelze an zwei Stellen einen sehr blassen grünlichen Stich. Da Bertrand seine Laccase manganhaltig fand, so könnte diese Spur der Laccase zugehören. Eisen konnte in der Asche sehr deutlich nachgewiesen werden. Entsprechend diesem äußerst geringen Mangangehalte konnte ich auch beobachten, daß Zusatz von Mangansulfat die Oxydation von Hydrochinon durch die Oxydase merklich beschleunigt. Von zwei gleichen Proben setzte die mit Mangansulfat gemischte bedeutend früher Krystalle ab und roch viel früher stark nach Chinon als die andere. Erst nach 10 Tagen war der Unterschied zwischen den beiden Proben nur noch gering.

Da somit das Gummi entweder ganz manganfrei ist oder nur sehr geringe Spuren von Mangan enthält und da es überdies auch in saurer Lösung oxydiert, so fallen bei ihm die zwei Haupteinwände, welche namentlich von Dony-Hénault¹⁴⁾ gegen das Bestehen von Oxydasen geltend gemacht werden, weg, wenn man nicht etwa den Eisengehalt für die oxydierenden Wirkungen verantwortlich machen will. Es scheint also im Gummi eine wirkliche Oxydase vorhanden zu sein.

Bezüglich des Vorkommens der Oxydase in verschiedenen Gummisorten wurden schon früher einige Angaben gemacht. Ich möchte noch hinzufügen, daß ein frisch gesammeltes Zwetschgengummi erst nach 40 Stunden eine ganz schwache Blaufärbung gab und ein ebenfalls frisches, in Wasser ganz lösliches Marillengummi eine hellblaue, rasch verblässende Färbung.

Ein laccasehaltiger Tragant ist mir nicht untergekommen, was auch schon mehrere andere Beobachter angegeben haben.

Bezüglich des Verhaltens zu höheren Temperaturen wurde schon erwähnt, daß die Gummilaccase durch einstündiges Dämpfen und durch 18stündiges Erhitzen auf 70° C. zerstört wird. Hinzufügen will ich noch, daß sie durch 6stündiges Erhitzen auf 70° noch nicht merklich verändert wird, wohl aber durch 4tägiges Erwärmen auf bloß 50°. Es setzt dann die Guajakbläuung erst nach etwa 15 Minuten ein und erreicht erst nach einer halben Stunde ihre volle Stärke. Bemerkenswert ist, daß hierbei die Laccase in den verschiedenen Gummisorten in ganz anderem Verhältnis angegriffen wird, als sie ursprünglich vorhanden war, was wohl mit Nebenbestandteilen des Gummis zusammenhängen dürfte. Kochen der Gummilösung zerstört die Laccase binnen zwei Minuten.

III. Peroxydase.

Diese läßt sich am leichtesten in solchen Gummisorten auffinden, welche keine Oxydase oder nur so geringe Spuren davon enthalten, daß die Guajakbläuung erst nach vielen Stunden eintritt. Da die Peroxydase durch Erhitzen auf 70° C. erst nach 48 Stunden zerstört, nach 18 Stunden aber noch nicht merklich geschwächt wird und da sie auch einstündiges Dämpfen ohne wesentliche Veränderung verträgt, was für die Oxydase nicht gilt, so läßt sich durch dieses Hilfsmittel letztere zerstören und dann erstere nachweisen. Auf diese Weise konnte ich sie z. B. im harten und weichen Kordofangummi nachweisen. Ferner fand ich sie in einem Sennargummi und in dem früher erwähnten frischen Zwetschgen- und Marillengummi. Im Tragant fehlt sie. Im Kahlbaumgummi war sie nur in Spuren vorhanden, denn die Bläuung trat bei diesem erst nach 36 Stunden ein. Andere Sorten wurden nicht geprüft, doch dürfte sie wohl in den meisten vorkommen.

IV. Amylase.

Im Hinblick auf die von Wiesner und Grafe geleugnete Fähigkeit der Gummiamylase, aus Stärkekleister Zucker zu bilden,

war es vorerst nötig, diese Eigenschaft ganz zweifellos festzustellen. Es wurden daher zunächst einige quantitative Bestimmungen ausgeführt. Zur Zuckerbestimmung wurde das Pflügersche Oxydullverfahren³⁴⁾ gewählt, das sich durch besondere Genauigkeit auszeichnet. Es wurden 100 g lufttrockenes hartes Kordofangummi in Thymolwasser zu 500 ccm gelöst und die Lösung durch etwas Watte filtriert, um die kleinen Mengen von Holz- und Rindenteilchen zu entfernen. In je 50 ccm dieser Lösung wurde der Zucker bestimmt. Ferner wurden 4,000 g lufttrockene Kartoffelstärke von 13,72% Wassergehalt mit 80 ccm Thymolwasser eine Minute gekocht, nach dem Auskühlen mit 60 ccm der Gummilösung gemischt und durch 87 Stunden bei 52—55° unter Watteverschluß stehen gelassen. Diese Zeit genügt nach meinen Erfahrungen für dieses Gummi völlig zur vollständigen Verzuckerung. Das Mischungsverhältnis ist, wie man sieht, das Béchampssche. Die verzuckerte Lösung wurde auf 180 ccm aufgefüllt und in je 10 ccm der Zucker bestimmt, da sie so zuckerreich war, daß eine größere Flüssigkeitsmenge zu viel Kupferoxydull gegeben hätte. Grafe behauptet, daß das Messen von Gummilösungen wegen des Schäumens ungenau sei und daher maßanalytische Methoden dafür nicht verwendbar seien. Einem Anfänger mag dies wohl Schwierigkeiten bereiten. Bei einiger Geschicklichkeit und Erfahrung ist es jedoch ganz leicht, Gummilösungen ohne das mindeste Schäumen sehr genau zu messen. Die Bestimmungen ergaben für 100 ccm der ursprünglichen Gummilösung:

0,1100 g; 0,1130 g; 0,1020 g Dextrose,

im Mittel also 0,1080 g Dextrose. Nach Verzuckerung der Stärke ergab sich für 100 ccm der ursprünglichen Gummilösung

1,7460 g; 1,9650 g; 1,9320 g Dextrose.

Die erste dieser drei Zahlen ist etwas zu niedrig, da das Asbestfilter bei dieser Analyse etwas undicht war. Das Mittel aus den 2 anderen ist 1,9485. Es haben somit 100 ccm der Gummilösung $1,9485 - 0,1080 = 1,8405$ g Zucker als Dextrose gerechnet neu gebildet. Da in einer mit Thymol gesättigten Lösung bei 50—55° jede Bakterienwirkung ausgeschlossen ist, so kann dieser Zucker nur durch das Enzym

entstanden sein. Es wurde übrigens, um den geringen, durch Verflüchtigung des Thymols entstehenden Verlust auszugleichen, stets etwas festes Thymol im Überschuß zugesetzt.

Um die Tatsache der Zuckerbildung noch auf andere Art festzustellen, schlug ich noch mehrere andere Wege ein. Zunächst benützte ich die Eigenschaft der Enzyme, durch gewisse Stoffe, wie Seide oder Fibrin adsorbiert zu werden, dazu, die Amylase von den übrigen Bestandteilen des Gummis zu trennen. Eine größere Menge käufliches Fibrin (Merck) wurde 48 Stunden in Thymolwasser gequell, filtriert und gewaschen. Ein kleiner Anteil dieses Fibrins wurde in Thymolwasser, ein anderer mit 1%igem Kleister bei 50° durch 8 Tage stehen gelassen, um sicherzustellen, ob das Fibrin nicht selbst schon Kleister verzuckert, oder an Wasser Spuren von Zucker abgibt. Beides war nicht der Fall. Die Hauptmasse des Fibrins wurde mit einer 20%igen Lösung von weichem Kondofangummi durch 3 Tage in der Kälte stehen gelassen und öfters durchgerührt. Dann wurde es abgeseiht und zehmal je eine Stunde mit stets erneutem Thymolwasser stehen gelassen und schließlich am Filter noch einige Zeit gewaschen. Dann wurde es mit 1%igem Thymolkleister bei 50° aufgestellt. Nach 16 Stunden war der Kleister fast völlig gelöst und gab mit J eine reine Blaufärbung. Nach 26 Stunden konnte bereits eine Spur Zucker nachgewiesen werden. Nach 2½ Tagen färbte J rot, nach 3½ Tagen gab Fehlingsche Lösung eine kräftige Reduktion. Nach 10½ Tagen war die Verzuckerung bis auf Spuren von Erythroextrin beendet und es war eine ansehnliche Menge von Zucker entstanden. Es hat hier also die adsorbierte Amylase deutlich stärkelösend und zuckerbildend gewirkt. Da das ursprüngliche Fibrin unter den gleichen Bedingungen den Kleister selbst nach 8 Tagen nicht verändert hatte, so ist eine andere Deutung dieser Beobachtung nicht möglich.

Eine weitere Möglichkeit, die Zuckerbildung durch die Gummiamylase nachzuweisen, bietet die Auffindung zuckerfreier Gummisorten. In einem frisch gesammelten Marillengummi fand ich ein ganz klares, hellgelbes, noch zähflüssiges Stück, das sich in Wasser völlig klar löste und vollständig frei von

Zucker war. Es enthielt nur wenig Oxydase, dagegen viel Peroxydase und Amylase. Kleister wurde durch dieses Gummi bei 50° schon nach 8 Minuten vollkommen verflüssigt. Nach 30 Minuten färbte J bereits violett, nach einer Stunde rot, nach 3 Stunden rötlichgelb und nach 5 Stunden rein gelb. Selbst mit den kräftigst wirkenden Sorten des Akaziengummi konnte ich diese vollständige Umwandlung der Stärke erst nach 24 Stunden erreichen. Das Marillengummi war also ungewöhnlich reich an Amylase. Die damit aus dem Kleister erhaltene Flüssigkeit reduzierte Fehlingsche Lösung sehr stark. Hier ist also in einer ganz kurzen Zeit, bei 50°, in Gegenwart von Thymol, in einer ganz zuckerfreien Flüssigkeit viel Zucker entstanden. Es kann also kein Zweifel darüber bestehen, daß die Amylase Zucker bildet. Es ist übrigens durchaus nicht jedes Gummistück so enzymreich. Ein von dem gleichen Baume stammendes, trübes, dunkel gelbrotes Stück, das sich in Wasser trüb löste, enthielt so wenig Amylase, daß die Hydrolyse nach 6 Wochen erst bei der Bildung von Erythrodextrin angelangt war! Auch manche Traganthsorten enthalten Amylase. Da sie stets zuckerfrei sind, so sind sie zum bequemen Nachweis der Zuckerbildung ebenfalls verwendbar. Am besten eignen sich die gelblichen, in Wasser schlecht quellenden Sorten. Von einer solchen wurden 2 g in 50 ccm Thymolwasser 3 Tage gequellt, dann die zwischen den aufgequollenen Stücken vorhandene dünne Flüssigkeit abfiltriert und mit 1%igem Kleister bei 53—55° C. aufgestellt. Die Flüssigkeit war nach 4 Stunden klar, färbte sich mit J violett, nach 20 Stunden rot, nach 3 Tagen gelbrot, nach 7 Tagen gelb und gab dann mit Fehlingscher Lösung eine starke Reduktion. Nicht alle Traganthsorten enthalten Amylase. Die rein weißen, ausgelesenen enthalten meist nur Spuren davon.

Alle diese Beobachtungen beweisen einwandfrei, daß die Amylase der Gummiarten aus Stärkekleister Zucker erzeugt. Die Vermutung lag nahe, daß dieser Zucker Maltose ist. Da neutrales Kupferacetat von Maltose nicht reduziert wird, wohl aber von Dextrose (Maerker³¹), Sieben⁴³), so läßt sich auf diese Weise leicht feststellen, ob Maltose vorhanden ist. Der

Versuch wurde mit einem frischen Dschiddagummi gemacht. Je 1 ccm der Lösung mit Fehlingscher Lösung und mit Kupferacetat gekocht gibt keinen sicher erkennbaren Unterschied in der Menge des Niederschlages. Der ursprünglich im Gummi vorhandene Zucker ist also jedenfalls Dextrose. Kleine Mengen von Maltose könnten daneben allerdings noch vorhanden sein, da solche auf diesem Wege unbemerkt bleiben. Nun wurde im Béchampsschen Verhältnis mit Kleister gemischt, bei 50° aufgestellt und nach 37 Stunden wieder in derselben Weise geprüft. Es entstand mit Fehlingscher Lösung mehr als doppelt so viel Niederschlag als mit Kupferacetat. Somit ist der entstandene Zucker Maltose. Um diese wichtige Tatsache sicher festzustellen, wurde die Maltose noch durch die Eigenschaften ihres Osazons gekennzeichnet. Das Maltosazon ist nach Grimbert²²⁾ in kaltem 50%igem Aceton leicht löslich, wogegen das Dextrosazon darin unlöslich ist. Außerdem ist ersteres in alkoholischer Lösung rechtsdrehend, letzteres linksdrehend. Zur Darstellung des Osazons wurde Kleister mit hartem Kordofangummi verzuckert und nach der Fischerschen Vorschrift behandelt. Im Filtrat vom heiß filtrierten Dextrosazon fiel unreines Maltosazon heraus. Es wurde zur Reinigung nach Grimbert weiter behandelt und schließlich aus 50%igem Aceton in schönen nadelförmigen Krystallen erhalten. Die Ausbeute ist infolge des vorhandenen Gummis schlecht, so daß zur Polarisation nur eine sehr verdünnte Lösung verwendet werden konnte. Sie gab im 100 mm-Rohr

$$\alpha_D = + 0,06^\circ.$$

Um konzentriertere Lösungen polarisieren zu können, wurde noch eine weitere Menge hergestellt. Diese gab im 100 mm-Rohr

$$\alpha_D = + 0,15^\circ$$

und im 200 mm-Rohr

$$\alpha_D = + 0,31^\circ.$$

Das Osazon ist also zweifellos rechtsdrehend. Hiernach und nach der Löslichkeit in 50%igem Aceton ist es Maltosazon, der Zucker also Maltose. Da das Reduktionsvermögen der Maltose viel geringer ist als das der Dextrose, so ist die frühere

Angabe über die Menge des entstandenen Zuckers zu niedrig, da er als Dextrose gerechnet worden ist. Die Angaben über das Reduktionsvermögen der Maltose lauten ziemlich verschieden; für das Pflügersche Verfahren, das höhere Kupferwerte gibt als die meisten anderen, ist es überhaupt noch nicht bestimmt. Ich mußte es daher erst selbst bestimmen. Da es sich hier nicht um absolut genaue Werte handelt, so begnügte ich mich mit 2 Bestimmungen, und zwar für jene Kupferoxydullmengen, die bei meinen Bestimmungen am häufigsten vorkamen. Zur Bestimmung wurde eine chemisch reine, krystallisierte, über Schwefelsäure getrocknete Maltose verwendet. Die beiden Bestimmungen ergaben:

100 mg Dextrose entsprechen	174,2	mg wasserfreier Maltose und
100	174,75	

für die Berechnungen wurde das Mittel aus diesen 2 Zahlen, nämlich:

174,475

genommen. Berechnet man mit dieser Verhältniszahl aus der früher gefundenen Dextrose die Maltose, so ergibt sich aus 1,8405 g Dextrose 3,2112 g Maltose für 100 ccm der Gummilösung. Da diese 100 ccm ursprünglich nur 0,108 g Dextrose enthalten haben, so hat sich fast genau 30mal so viel Maltose neu gebildet, als ursprünglich Dextrose vorhanden war.

Alle diese Tatsachen zusammengenommen beweisen also, daß die im Gummi vorhandene Amylase nicht, wie Wiesner und Grafe behaupten, aus Kleister bloß Dextrin bildet, sondern außerdem noch Maltose.

Um darzutun, daß meine Angaben zuverlässiger sind, als jene Wiesners und Grafes, muß ich näher erklären, warum von diesen die Zuckerbildung nicht gefunden worden ist. Wiesner versetzte bei den meisten seiner Versuche 5 ccm einer 2%igen Gummilösung mit 1 ccm eines halbprozentigen Kleisters. In 5 ccm dieser Gummilösung sind etwa 0,5—1,0 mg Dextrose vorhanden, welche bei halbstündigem Kochen mit Fehlingscher Lösung etwa 1,5—3 mg Kupferoxydull geben, bei kurzem Kochen jedoch nur 1—2 mg. 1 ccm eines 0,5%igen Kleisters enthält 5 mg Stärke, welche bei mindestens eintägiger Einwirkung von Gummi bei 50° so viel Zucker gibt, daß dadurch bei langem

Kochen 3,5 mg Kupferoxydull, bei kurzem Kochen aber nur etwa 2,4 mg abgeschieden werden. Es handelt sich also hier um sehr kleine Mengen von Kupferoxydull. Diese bleiben bekanntlich in der Fehlingschen Lösung lange Zeit schweben und lösen sich bei längerem Stehen durch Oxydation teilweise oder ganz auf (Kjeldahl, Pflüger). Dies hat namentlich Pflüger bei Ausarbeitung seiner Bestimmungsmethode eingehend untersucht und festgestellt. Unter solchen Umständen ist es daher ganz leicht möglich, die Ausscheidung des Kupferoxydulls gänzlich zu übersehen, und es ist daher auch nicht auffallend, daß Wiesner in seiner Arbeit von dem ursprünglich im Gummi vorhandenen Zucker nichts erwähnt. Grafe gibt in seiner Arbeit (S. 256) für diese letztere Tatsache allerdings eine andere Erklärung. Er behauptet nämlich, von Wiesner erfahren zu haben, daß er das verwendete Gummi vorher von Zucker befreit habe, diesen Umstand aber, als ganz selbstverständlich, in seiner Arbeit nicht erwähnt habe. Bei einem solchen Sachverhalt müßte natürlich die Menge des ausgeschiedenen Kupferoxydulls in Wiesners Versuchen noch kleiner gewesen sein, da ja die ursprünglich vorhanden gewesene Dextrose entfernt war, sodaß dadurch das Übersehen des neu entstandenen Zuckers noch erklärlicher wird. Es ist übrigens sehr bedauerlich, daß Grafe von Wiesner nicht erfahren hat, auf welche Weise er den Zucker aus dem Gummi entfernt hat. Es ist nämlich bis jetzt trotz aller Mühe noch niemandem gelungen, ein sicheres Verfahren zu finden, durch das man den Zucker aus dem Gummi entfernen könnte, ohne dabei die Enzyme zu zerstören oder doch bedeutend abzuschwächen. Grafe hätte sich dann die Mühe, selbst nach einem solchen Verfahren zu suchen, ersparen können. Er glaubt zwar, durch wiederholte Fällung einer 15%igen Gummilösung mit 52%igem Alkohol zum Ziele gekommen zu sein, gibt aber selbst an, daß «in einigen Fällen» das erhaltene Gummi keine Fermentwirkung mehr zeige, dagegen mit «einem gelungenen derartigen Präparate» keine Zuckerbildung eintrat, bei einem anderen jedoch Spuren von Zucker nachweisbar waren. Wie man sieht, führt dieses Verfahren nur gelegentlich zum

Ziel und gegen das damit erhaltene Ergebnis muß ein schweres Bedenken erhoben werden. Da nämlich die wiederholte Fällung mit Alkohol die Enzyme häufig auch gänzlich zerstört, so kann auch gelegentlich der Fall eintreten, daß von den beiden Enzymen, aus denen die Amylase besteht, das zuckerbildende zerstört wird, das stärkelösende jedoch erhalten bleibt. Nach den Untersuchungen von Fränkel und Hamburg¹⁶⁾ kann an dem Bestande dieser zwei Enzyme nicht mehr gezweifelt werden, und ich werde später zeigen, daß sie sich auch in der Gummiamylase sicher nachweisen lassen. Ich habe übrigens das Grafesche Verfahren wiederholt und zunächst festgestellt, daß eine 15%ige Gummilösung weder durch einen Alkohol von 52 Volumenprozent noch durch einen solchen von 52 Gewichtsprozent gefällt wird. Die Fällung tritt nur dann ein, wenn man das Gummi in kalkhaltigem Brunnenwasser löst und den Alkohol mit ebensolchem Wasser verdünnt! Ich habe daher einen anderen Weg eingeschlagen. Die 15%ige Gummilösung wurde mit CaCl_2 versetzt und so lange mit 96%igem Alkohol versetzt, als noch ein Niederschlag entsteht. Es entsteht dadurch ein dicker, käsiger, sich rasch ballender Niederschlag, der leicht mit verdünntem Alkohol und Wasser abgespült werden kann. Durch Wiederholung dieses Verfahrens habe ich ein Gummi erhalten, das nur noch Spuren von Zucker enthielt und Kleister noch sehr kräftig verzuckerte. Der im Gummi entstehende Niederschlag mit Fehlingscher Lösung wurde erst nach mehrstündigem Stehen oder durch Abschleudern sichtbar, wogegen durch Verzuckerung von Kleister schon nach 23 Stunden bei 50° so viel Zucker entstanden war, daß eine kräftige Reduktion eintrat. Dies beweist also, daß tatsächlich bei dem von Grafe eingeschlagenen Wege das zuckerbildende Enzym bereits zerstört war. Ich habe auch schon im Jahre 1890 bei meiner ersten Untersuchung des Gegenstandes eine ganze Reihe verschiedener Wege zur Entfernung des Zuckers ohne Schädigung des Enzyms versucht, ohne zum Ziele gekommen zu sein, und Wiesner würde sich daher ein Verdienst erwerben, wenn er das von ihm angewandte Verfahren veröffentlichen würde, umsomehr als es höchstwahrscheinlich sehr einfach sein

dürfte, da er sonst seine Schilderung jedenfalls, bei der breiten Darstellung seiner Arbeit, nicht übergangen hätte.

Grafe hat noch einen Versuch ausgeführt, welcher nach seiner Ansicht sicher beweisen soll, daß die durch den Gummi hervorgerufene Verzuckerung nicht von den Enzymen des Gummis, sondern von Bakterien herrühre. Er filtrierte das Gummi durch ein Pukalfilter und erzielte durch das Filtrat keine Zuckerbildung. Mit diesem Versuche werde ich mich noch später beschäftigen und werde zeigen, daß er nicht als Einwand gegen meine Angaben verwendbar ist und sich dabei ganz andere Vorgänge abspielen, als Grafe vermutet hat.

Damit ist also festgestellt, daß alle Einwände, welche gegen meine Angaben erhoben worden sind, nicht stichhaltig sind und auf ungenügend genauer Arbeitsweise und Beobachtung beruhen.

Es handelte sich mir nun noch weiter um Feststellung jener Kohlenhydrate, welche von der Amylase des Gummis hydrolysiert werden können. Wiesner hält noch immer ganz ohne zureichenden Grund daran fest, daß sein «Gummiferment» Cellulose in Gummi verwandeln könne, und Grafe schränkt dies, ohne die geringste neue Tatsache beizubringen, dahin ein, daß es «Cellulose gegenüber noch nicht wirksam, hemicelluloseartige Körper und Stärke bis zu Dextrin abzubauen» vermöge. Auf eine Kritik der allgemeinen Betrachtungen (S. 255), welche ihn zu diesem Schlusse führen, kann ich wohl verzichten, da diese so sehr gegen die allerelementarsten Kenntnisse verstoßen, daß ihre Haltlosigkeit wohl für jedermann offen zutage liegt. Über die Wirkung der Gummiamylase auf verschiedene Kohlenhydrate ist bis jetzt außer der Wirkung auf Stärkekleister nur noch die Beobachtung Béchamps bekannt, daß sie Rohrzucker nicht invertiert und arabisches Gummi nicht verzuckert. Es ist bekannt, daß unverkleisterte Stärke von Malzdiastase nur sehr schwierig und langsam angegriffen wird. Wenn daher die Gummianalyse, über die Wirkung der Malzdiastase hinausgehend, auch Hemicellulosen angreifen soll, so müßte man von ihr erwarten, daß sie zum mindesten auch imstande sein müßte, die unverkleisterte Stärke zu lösen oder doch schneller anzugreifen als die Malz-

diastase. Dies ist aber nicht der Fall. Eine Kartoffelstärke wurde von einer 20%igen Gummilösung bei 50° C. binnen 8 Tagen nicht im mindesten angegriffen. Jod färbte die Gummilösung nicht und unter dem Mikroskop konnte keine Veränderung der Stärkekörner wahrgenommen werden. Auch die verkleisterte Stärke wird durch diese Amylase nicht immer vollständig gelöst; es bleiben unter Umständen kleine Mengen ungelöster Flocken zurück, die nach dem Auswaschen mit Jod gelb, rötlichgelb, violett oder selbst blau gefärbt werden. Bringt man sie in eine neue Gummilösung, so bleiben sie ungelöst. Es handelt sich bei den durch Jod gelb werdenden offenbar um einen besonders widerstandsfähigen Anteil des Maquenesschen Amylopectins. Es ist nämlich der Grad, bis zu welchem die Hydrolyse bei der Verkleisterung der Stärke vorgeschritten ist, von wesentlichem Einfluß auf den Erfolg der amylytischen Wirkung des Gummis. Wird lufttrockene Kartoffelstärke mit der 20fachen Menge Wasser verkleistert, so wird sie durch eine 20%ige Gummilösung bis auf die früher genannten Flocken völlig gelöst und verzuckert. Verkleistert man aber nur mit der 15fachen Wassermenge, so bleibt auch nach 3tägiger Wirkung ein viel größerer Anteil ungelöst. Nach dem Abfiltrieren und Auswaschen wird er durch Jod gelb oder rötlichgelb (je nach der Sorte des verwendeten Gummis) gefärbt und löst sich in frischem Gummi auch nach 10tägiger Einwirkung bei 50° nicht auf. Verkleistert man umgekehrt mit immer größeren Wassermengen, so bleibt vom Kleister immer weniger ungelöst und schließlich scheint vollständige Lösung erreichbar zu sein. Daß es sich hier wirklich um einen verschiedenen, bei der Verkleisterung entstandenen Grad der Hydrolyse handelt, geht daraus hervor, daß die nachträgliche Verdünnung des kalten Kleisters mit Wasser an seinem Verhalten gegen die Amylase nichts mehr ändert. Dies gilt allerdings nur dann, wenn der Kleister mindestens 5%ig ist. Bei größerer Verdünnung ist die Hydrolyse schon so weit vorgeschritten, daß entweder gar keine oder nur geringe Unterschiede im Verhalten gegen die Amylase bemerkbar sind. Von der Richtigkeit dieser Deutung überzeugte ich mich noch durch

folgenden Versuch: Aus Kartoffelstärke (lufttrocken) wurde Kleister von folgender Konzentration hergestellt:

1. 2 g Stärke mit 20 ccm Thymolwasser (10,00%),
2. 2 „ „ „ 30 „ „ (6,66%),
3. 2 „ „ „ 40 „ „ (5,00%),
4. 2 „ „ „ 50 „ „ (4,00%).

Diese vier Kleister wurden mit Thymolwasser so lange gewaschen, bis Jod das Filtrat nicht mehr bläute. Bei 1 und 2 trat dies nach etwa 2¹/₂ Wochen, bei 3 und 4 nach 3 Wochen ein. Der Rückstand von 1 war beträchtlich; er nahm gegen 4 stark ab und war bei 4 gering und schleimig. Die Rückstände wurden mit einer 20%igen Lösung von weichem Kordofangummi (je 30 ccm) gemischt und bei 50° stehen gelassen. Jod färbte die Rückstände von 1 und 2 violettrot, von 3 violettblau, von 4 blau. In der Mischung 4 wurde der ungelöste Kleisterrest schon nach 22 Stunden fast vollständig gelöst. In den 3 anderen trat nur teilweise Lösung ein und zwar gegen 1 zu abnehmend. Auch nach 9 tägigem Erwärmen war dies nicht wesentlich anders geworden. In der Flüssigkeit waren beträchtliche Mengen von Zucker nachweisbar. Zusatz neuer Gummilösung und Erwärmen durch 12 Tage brachte die ungelösten Rückstände nicht in Lösung. Jod färbte sie bräunlich. Aus diesen Versuchen ist deutlich erkennbar, daß ein Kleister von fünf und mehr Prozent eine bestimmte Menge wenig hydrolysierter Anteile enthält, welche von der Gummiamylase nicht mehr angegriffen werden. Sie scheinen aus Amylopectin zu bestehen.

Auch die verschiedenen Stärkesorten werden von der Amylase des Gummis nicht in gleichem Grade angegriffen. Folgende 6 Sorten wurden in dieser Hinsicht geprüft: Kartoffel, Reis, Mais, Weizen, Maranta und Manihot (westindisches und brasilianisches Arrowroot). Eine 10%ige Gummilösung wurde mit je einem halbprozentigen Kleister dieser Stärkesorten gemischt und bei 18° und 50° stehen gelassen. Kartoffel- und Marantastärke lösten sich bis auf wenige Flöckchen, etwas mehr Ungelöstes hinterließ Manihotstärke, dann in aufsteigender Reihe Reis, Mais und am meisten Weizen. In der Wärme waren die Proben 3 Tage, in der Kälte 13 Tage lang gestanden,

trotzdem war bei letzteren die Menge des ungelösten Rückstandes viel größer. Zucker war bei allen reichlich entstanden und Jod färbte die klare Lösung rein gelb. Die Rückstände verhielten sich aber sehr verschieden gegen Jod. Bei Kartoffel, Manihot und Maranta wurden sie gelb gefärbt, bei Mais bräunlich, bei Weizen braunviolett und bei Reis rein blau(!). Daraus sieht man, daß in der chemischen Zusammensetzung der verschiedenen Stärkesorten kleine Unterschiede bestehen, und daß manche Sorten Anteile enthalten, welche von der GummiAmylase nicht angegriffen werden. Es eignen sich daher auch nicht alle Sorten gleich gut zur Untersuchung der diastatischen Wirkung, vielmehr ist Kartoffel- und Marantastärke am besten geeignet. Ich verwandte für alle Versuche Kartoffelstärke.

Wenn die Amylase des Gummi die Eigenschaft haben soll, aus Cellulose oder Hemicellulosen Gummi zu erzeugen, so müßte sie mindestens befähigt sein, die in Wasser unlöslichen und darin stark aufquellenden Anteile des Kirsch- und Pflaumengummi und des Traganths in lösliches Gummi zu verwandeln. Es wurden daher nach dieser Richtung gehende Versuche angestellt. Von einem käuflichen Kirschgummi (Kahlbaum) wurde ein Stückchen in Thymolwasser gequellt und tagelang mit diesem solange gewaschen, bis das anfangs stark gelbe Waschwasser farblos war, Fehlingsche Lösung nicht reduzierte und auch der ungelöste Rückstand dies nicht tat. Dann wurden 20% ige Lösungen von weichem Kordafan-, Ghezira- und Kahlbaumgummi in Thymolwasser hergestellt, je 15 ccm in einen Meßzylinder gebracht und so viel von den aufgequollenen Kirschgummistückchen eingetragen, bis die Gesamtmenge 25 ccm betrug. Diese 3 Mischungen blieben bei 8 tägigem Erwärmen auf 50° völlig unverändert. Es konnte weder Lösung noch merkliche Zuckerbildung wahrgenommen werden. Um letztere Tatsache ganz einwandfrei festzustellen, wurde der Versuch mit dem früher erwähnten zuckerfreien und amylasereichen Marillengummi wiederholt. Auch dieses hatte nach 4½ tägiger Einwirkung bei 50° weder Lösung noch die geringste Zuckerbildung erzielt. In ganz ähnlicher Weise wurde auch der in Wasser unlösliche Teil einer schlecht quellenden Traganthsorte auf sein

Verhalten gegen die Amylase geprüft. Der Erfolg war der gleiche. Damit ist also erwiesen, daß auch unlösliche Gummiarten und Pflanzenschleime von der Gummiamylase weder gelöst noch verzuckert werden. Bei den zahlreichen Erfahrungen über den ganz eng begrenzten Wirkungskreis aller genauer untersuchten Enzyme ist es angesichts dieser Tatsachen ganz aussichtslos und überflüssig, auch noch das Verhalten der Amylase zu Hemicellulosen und Cellulose zu prüfen umsomehr, als die Behauptung, daß sie aus solchen Verbindungen Gummi bilde, auf ganz unzulässigen und haltlosen Analogieschlüssen beruht. Da bei den eben beschriebenen Versuchen die Oxydase und Peroxydase des Gummis auch vorhanden war, so folgt daraus, daß auch diese Enzyme nicht imstande sind, unter den angegebenen Versuchsbedingungen lösliches Gummi zu erzeugen. Es müssen eben zur Entstehung eines Gummis ganz bestimmte Kohlenhydrate, von bestimmter chemischer und stereochemischer Konstitution gegeben sein. Ob aus diesen das betreffende Gummi unter dem Einfluß eines oder mehrerer Enzyme entsteht und welche Eigenschaften diese haben, das kann nur durch genaue Untersuchungen, nicht aber durch Analogieschlüsse festgestellt werden. Alle Annahmen über die Beteiligung von Oxydasen bei der Gummibildung sind daher gegenwärtig nur Vermutungen ohne zureichende experimentelle Grundlage.

Nachdem nunmehr feststeht, daß die Gummiamylase nur auf verkleisterte Stärke einwirkt und aus ihr Dextrin und Maltose erzeugt, möchte ich noch einige genauere Angaben über ihre Wirkungsweise machen. Zunächst möge an einem Beispiele gezeigt werden, mit welcher Geschwindigkeit die Reaktion in der Regel abläuft. Die Mischung für den folgenden Versuch wurde nach dem Béchampschen Verhältnis gemacht; Temperatur 53—55° C. (Siehe Tab. auf der nächsten Seite.)

Das Kordofangummi hinterließ mehr ungelösten Rückstand als das Kahlbaumgummi. Ersterer färbte sich nach dem Auswaschen durch Jod rotviolett, letzterer blauviolett.

Bei gewöhnlicher Temperatur sind zur Erzielung der gleichen Wirkung je nach der Gummisorte meist 8—12 Tage

Stunden	I. Weiches Kordofangummi		II. Kahlbaum-Gummi	
	Zustand	Verhalten gegen J	Zustand	Verhalten gegen J
1	verflüssigt	blau	verflüssigt	blau
1 1/2	gelöst bis auf einige Flocken	blauviolett	gelöst bis auf einige Flocken	blauviolett
5	„	gelbrot	„	rotviolett
24	„	gelb	„	rötlich gelb
33	„	„	„	gelb

erforderlich. Die Geschwindigkeit der Wirkung hängt ferner von der Konzentration des Kleisters ab; sie nimmt mit ihr stark ab und wächst umgekehrt bei abnehmender Konzentration beträchtlich. Die Menge der Maltose, welche aus der Stärke gebildet wird, betrug bei 4 Versuchen 49,69%, 54,43%, 55,33% und 56,33% der wasserfreien Stärke. Die Schwankungen in diesen Zahlen erklären sich leicht aus der verschiedenen Dauer der Versuche und der nicht ganz gleichen Versuchstemperatur. Diese Einflüsse machen sich namentlich bei sehr verdünnten Amylaselösungen, wie sie ja im Gummi vorliegen, stark geltend.

Auch über den Einfluß höherer Temperaturen habe ich einige Beobachtungen gemacht. Einstündiges Dämpfen macht die Amylase unwirksam. Erhitzt man Gummi durch 48 Stunden auf 70° und läßt es dann bei 50° auf Kleister wirken, so wird dieser nach 16 Stunden gelöst, aber dann auch nach 9tägiger Einwirkung nur bis zu Erythrodextrin, unter Bildung von etwas Maltose hydrolysiert. Genau das gleiche Verhalten zeigt auch die Malzdiastase. Es wurden ferner Verzuckerungen bei 50°, 60°, 67°, 70° und 74° vorgenommen. Es zeigte sich deutlich, daß die Schnelligkeit der Hydrolyse und die Menge des gebildeten Zuckers zwischen 67 und 70° am größten ist und von da an wieder sinkt. Bei längerer Dauer des Versuches, 24—48 Stunden, wirkt 70° schon ungünstig, in einem Falle wurde hierbei sogar die Amylase vollständig zerstört, ohne daß eine besondere Ursache dafür ge-

funden werden konnte. Daß die Amylase in den verschiedenen Gummisorten in sehr verschiedener Menge vorkommen kann, wurde bereits durch Beispiele belegt (S. 364/5), ebenso, daß die beiden Enzyme, aus denen sie besteht, in verschiedenen Sorten verschieden verteilt sein können (S. 365) und gegen Sublimat verschiedene Widerstandsfähigkeit zeigen (S. 365/6). Erwähnen möchte ich noch, daß ein frisch gesammeltes Pflaumengummi aus Kleister zwar reichlich Zucker erzeugte, daneben jedoch nur Erythrodextrin, trotz 7 tägiger Einwirkung bei 50°. Außer Sublimat prüfte ich noch einige andere Pilzgifte bezüglich ihres Verhaltens gegen die Amylase und zwar 30% Alkohol, 0,5% Phenol und 0,1% Formaldehyd. Diese verzögern zwar etwas die Wirkung des Enzyms, aber es entsteht ebenso reichlich Zucker und Achroodextrin, wie ohne diese Zusätze, was ein weiterer Beweis dafür ist, daß es sich hier nicht um Bakterienwirkung handelt.

Um eine ungefähre Vorstellung davon zu bekommen, wie groß der Gehalt einer bestimmten Gummisorte an Amylase ist, wurde, von dem Béchampsschen Mischungsverhältnis ausgehend, die Menge des zugesetzten Kleisters allmählich gesteigert. Verwendet wurde weiches Kordofangummi bei 53—55°.

Kleister 5%ig ccm	Gummi- lösung 20%ig ccm	Verhältnis von lufttrockenem Gummi zu lufttrockener Stärke	Zeit zur voll- ständigen Hydrolyse zu Achroodextrin und Maltose in Tagen	Bemerkung
20	15	1 : $\frac{1}{3}$	1	Bei den beiden letzten Mischungen gehen die einzelnen Umwandlungen un- gemein langsam vor sich, so daß man sie sehr gut unter- scheiden kann.
40	15	1 : $\frac{2}{3}$	2	
60	15	1 : 1	3	
40	5	1 : 2	5	
80	5	1 : 4	16	
40	1	1 : 10	30	

Es kann also 1 Teil Gummi noch die zehnfache Menge Stärke verzuckern und wahrscheinlich liegt die Grenze noch bedeutend weiter. Je mehr Kleister genommen wird, desto

größer ist die Menge des früher erwähnten, ungelöst bleibenden, flockigen Rückstandes.

Aus allen bisher besprochenen Eigenschaften geht hervor, daß die Gummi-Amylase eine sehr große Ähnlichkeit mit der Malzdiastase hat. Ein wesentlicher Unterschied konnte zwischen beiden nicht gefunden werden. Bemerkenswert ist nur, daß die beiden Enzyme, aus denen die Amylase besteht, in verschiedenen Gummisorten und Gummiarten nicht immer im gleichen Verhältnis gemischt sind.

Warum vermag nun ein durch ein Pukalfilter filtriertes Gummi aus Stärke keinen Zucker zu erzeugen? Grafe erklärt dies in der Art, daß durch das Filter die Bakterien zurückgehalten worden seien, welche nach seiner Meinung den Zucker erzeugt haben sollen. Da nun aber letztere Ansicht falsch ist, so muß der Grund ein anderer sein. Fränkel und Hamburg¹⁶⁾ haben beobachtet, daß Malzdiastase fast quantitativ durch ein Pukalfilter geht, wenn die Enzymlösung nicht reich an solchen Kolloiden ist, welche das Tonfilter nicht zu durchwandern vermögen und die Enzyme nicht durch Adsorption von diesen Kolloiden zurückgehalten werden. Nun ist aber eine Gummilösung sehr reich an Kolloiden und es kommt somit darauf an, ob diese durch das Filter durchgehen. Eine 20- und selbst eine 10prozentige Lösung setzt der Filtration einen beträchtlichen Widerstand entgegen. Ich wählte daher 8prozentige Lösungen. Schon beim Filtrieren sieht man an den Schlierenbildungen und an der zähen schleimigen Schichte, die sich an der Oberfläche des Filters anlegt, daß ein großer Teil der Kolloide zurückgehalten wird. Das Filtrat hat ein ganz anderes Aussehen, als die ursprüngliche Lösung und der Filtrerrückstand. Es ist dünnflüssig, leicht beweglich und vollkommen klar, während jene dickflüssig und trüb sind. Es ist bedeutend ärmer an Oxydase geworden, beginnt sich mit Guajak erst nach einer Stunde zu bläuen und erreicht die Bläuung der ursprünglichen Lösung erst nach 7 Stunden. Da also die Oxydase durch das Gummi stark zurückgehalten wird, ist für die Amylase ein ähnliches Verhalten zu erwarten. Ich überzeugte mich zunächst, daß durch das Filtrieren der Ge-

halt an gelösten Stoffen wesentlich herabgesetzt wird. Um den Trockenrückstand mit dem lufttrocken gewogenen Gummi besser vergleichen zu können, wurde er ebenfalls lufttrocken gewogen. Ich trocknete ihn bei 50° und ließ ihn dann bis zu konstantem Gewicht in der Wage stehen, was leicht und sicher erreichbar ist. Zwei derartige Bestimmungen ergaben folgende Mengen Trockenrückstand:

	II.	IV.
In 100 ccm des Filtrates	3,4840	2,8160
» 100 » » Filtrerrückstandes	11,4800	12,8740
» 200 » » der Mischung somit	14,9640	15,6900
» 100 » » » »	7,4820	7,8450

Die ursprüngliche Lösung war 8prozentig, die Übereinstimmung ist also für den vorliegenden Zweck vollkommen ausreichend. Es war zu erwarten, daß auch der im Gummi vorhandene Zucker durch die Filtration eine ungleiche Verteilung erleiden würde. Folgende Bestimmung bestätigt diese Erwartung.

	IV.
Zucker in 100 ccm des Filtrats	0,1722
» » 100 » » Filtrerrückstandes	0,1253

Daraus ist ersichtlich, daß der Zucker in verhältnismäßig größerer Menge ins Filtrat übergeht und der Filtrerrückstand daran verarmt. Der Zucker wird eben als Krystalloid von den Kolloiden nicht zurückgehalten und geht daher leichter durchs Filter. Der Unterschied im Zuckergehalt wird noch bedeutend auffallender, wenn man bedenkt, daß das Filtrat bedeutend substanzärmer ist, als der Filtrerrückstand. Berechnet man den Zuckergehalt auf den Trockenrückstand nach den unter IV angegebenen Zahlen, so erhält man auf

100 Teile Trockensubstanz d. Filtrates	6,11 Zucker
und auf 100 „ „ „ „ „ Filtrerrückstandes	0,97 „

Aus diesen Bestimmungen geht hervor, daß tatsächlich ein sehr großer Teil der Kolloide nicht durchs Filter geht, also wahrscheinlich die Enzyme zurückhält.

Das zum Filtrieren verwendete Gummi war stets in gesättigtem Thymolwasser gelöst. Das Filter hatte die von Fuhrmann¹⁸⁾ beschriebene Anordnung und war durch Dämpfen

keimfrei gemacht. Meist wurden 250 ccm durch 24–45 Stunden der Filtration unterworfen, wobei ungefähr 100 ccm Filtrat erhalten wurden. Nach Bestimmung des Gehaltes an Zucker und Trockensubstanz wurde Filtrat und Filtrerrückstand mit Kleister im Béchampsschen Verhältnis gemischt und bei 53 bis 55° aufgestellt. Das Verhalten des Filtrates gegen Stärke hängt nun ganz davon ab, ob man ein gutes, oder minder gutes Pukalfilter getroffen hat. In einem Falle (IV) erhielt ich ein Filtrat, welches erst nach 7 tägiger Einwirkung den Kleister vollständig verflüssigte und auch nach 12 ½ Tagen bloß gelöste Stärke, die durch J violettblau gefärbt wurde, aber keine Spur Zucker erzeugt hatte. Der Filtrerrückstand dagegen verflüssigte Kleister in wenigen Stunden und erzeugte reichliche Mengen von Zucker. Es war also in diesem Falle eine vollständige Abtrennung des stärkelösenden Enzyms von den übrigen Gruppen der Amylase gelungen und zwar mittels eines bis jetzt noch nicht verwendeten Verfahrens, das vielleicht bei der Trennung der Enzyme noch wertvolle Dienste leisten kann. Dieses Verfahren beruht darauf, daß ein Teil der Enzyme durch ein geeignetes Kolloid an der Filtration durch ein Tonfilter gehindert wird, während der andere Teil frei beweglich bleibt. Allerdings enthielt das Filtrat nur wenig verflüssigendes Enzym und der Filtrerrückstand war noch reich daran, aber es ist nicht unmöglich, daß das Verfahren vervollkommt wird, sei es durch wiederholte Anwendung der Filtration, sei es durch passende Auswahl des adsorbierenden Kolloids.

In einem zweiten Falle (II) enthielt das Filtrat noch Spuren von zuckerbildendem Enzym. Es verflüssigte Kleister schon nach 45 Stunden zu einer Lösung, welche durch J blauviolett gefärbt wurde und nach 5 Tagen rotviolett. Da sich hieran innerhalb 13 Tagen nichts mehr änderte, wurde die Lösung (verschlossen und mit Thymolüberschuß versetzt) bei gewöhnlicher Temperatur beiseite gestellt. Als sie dann, nach 18-tägigem Stehen in der Kälte, wieder untersucht wurde, färbte J gelb und sie enthielt reichlich Zucker. Es war also eine Spur zuckerbildendes Enzym durchs Filter gegangen, das in

der langen Zeit von 31 Tagen schließlich eine vollständige Verzuckerung zu bewirken vermochte.

In der folgenden Übersicht sind die Zahlenbelege für diese zwei Fälle zusammengestellt.

Analyse IV	100 ccm Filtrat	100 ccm Filtrat mit Kleister aus 0,9608 g Stärke	100 ccm Filter- rückstand	100 ccm Filter- rückstand mit Kleister aus 4,2912 g Stärke
Zucker	0,1722 g	0,1664 g	0,1253 g	0,1253 g Dextrose 1,6627 g Maltose
Analyse II	100 ccm Filtrat	100 ccm Filtrat mit Kleister aus 2,6667 g Stärke	100 ccm Filter- rückstand	100 ccm Filter- rückstand mit Kleister aus 2,6667 g Stärke
Zucker	0,0260 g	0,0260 g Dextrose 1,3852 g Maltose	0,0629 g	0,0629 g Dextrose 1,4088 g Maltose

Das Mischungsverhältnis von Gummi zu Stärke war bei Analyse IV bezogen auf den Trockenrückstand von Filtrat und Filtrerrückstand annähernd 3 : 1. Bei Analyse II dagegen wurde zu Filtrat und Filtrerrückstand gleichviel Stärke zugesetzt, ohne Rücksicht auf ihren verschiedenen Gehalt an Trockensubstanz.

Aus diesen Beobachtungen geht also hervor, daß eine Gummilösung durch ein Tonfilter nicht, wie Grafe meint, unverändert und nur unter Zurücklassung der Bakterien hindurchgeht, sondern eine wesentliche Änderung ihrer ganzen Zusammensetzung erfährt. Es kann hierbei der zuckerbildende Anteil der Amylase entweder ganz zurückgehalten werden oder es gehen Spuren von ihm ins Filtrat über, das dann zwar langsam, aber doch deutlich Zucker bildet.

Mit Hilfe dieser Erkenntnis läßt sich leicht zeigen, daß auch die von Grafe erhaltenen Gummifiltrate erhebliche Mengen von Zucker gebildet haben. Daß seine Zahlen scheinbar das Gegenteil beweisen, kommt daher, weil er die ursprünglich vorhandene Zuckermenge, statt sie im Filtrate zu bestimmen,

in der unfiltrierten Gummilösung bestimmt hat. Nun ist aber das Filtrat, da es sehr substanzarm ist, bedeutend zuckerärmer als die ursprüngliche Gummilösung, trotzdem es relativ zuckerreicher ist. Dazu kommt noch, daß Grafe den neugebildeten Zucker für Dextrose hielt statt für Maltose, und daher aus der erhaltenen Kupfermenge eine zu kleine Zuckermenge berechnet hat. Zieht man diese Verhältnisse in Rechnung, so ergeben seine Zahlen eine erhebliche Menge neugebildeten Zuckers. Bei richtiger Arbeit hätte er also zum gerade entgegengesetzten Schlusse kommen müssen.

Hier muß ich noch einer Beobachtung Grafes gedenken, die wohl einzig in ihrer Art sein dürfte. Er behauptet nämlich, daß man durch länger dauernde Extraktion von Gummi mit Äther einen Körper erhalte, der Kleister in Erythroextrin verwandle und daß das rückständige Gummi dies ebenfalls tue. Er deutet dies in der Art, daß das «Gummiferment» aus zwei Enzymen bestehe, von denen dasjenige, welches Erythroextrin in Achroodextrin umwandelt, vom Äther zerstört werde, das andere dagegen erhalten bleibe. Darnach müßte das Enzym in Äther löslich sein, also eine Eigenschaft haben, die noch bei keinem Enzym beobachtet worden ist. Es war daher von vornherein wahrscheinlich, daß die behauptete Enzymwirkung von dem sauren Rückstand eines ungereinigten Äthers herrührt. Einige Versuche bestätigten diese Vermutungen vollständig. Wird Gummi mit frisch gereinigtem Äther durch 9 Stunden extrahiert, so enthält der Äther keine auf Kleister wirkende Substanz. Auch mehrtägige Einwirkung des Ätherrückstandes verändert den Kleister nicht im mindesten. Das rückständige Gummi verzuckert dagegen ganz normal. Nimmt man jedoch den Destillationsrückstand von gewöhnlichem, käuflichem Äther mit Wasser auf und läßt ihn auf Kleister einwirken, so erhält man je nach Umständen Stärkelösung, oder Bildung von Erythroextrin, oder sogar vollständige Verzuckerung! Es ist bedauerlich, daß Behauptungen mit dem Anspruch auf wissenschaftlichen Wert in so dilettantenhafter Art gewonnen werden.

Durch die eingehende Untersuchung der Gummiamylase ist also sichergestellt worden, daß sie ein Gemisch von Enzymen

darstellt, das die größte Ähnlichkeit mit dem als Malzdiastase bezeichneten Enzymgemenge hat. Es besteht aus mindestens zwei, wahrscheinlich aber aus mehr Enzymen, deren Mischungsverhältnis in den verschiedenen Gummiarten und Sorten ziemlich verschieden sein und von denen gelegentlich auch eines ganz fehlen kann. Mit der Entstehung des Gummis aus anderen Kohlenhydraten hat diese Amylase nichts zu tun. Auch jener Anteil dieses Enzymgemisches, der Kleister nur in Dextrin allein verwandelt, hat mit der Gummibildung nichts zu tun, da ja Dextrin seiner chemischen Natur nach etwas ganz anderes ist, als die verschiedenen Gummiarten. Ein Enzym, welches irgend einen wesentlichen Bestandteil eines Gummis zu erzeugen vermöchte, hat bis jetzt noch niemand in der Hand gehabt. Damit soll natürlich nicht gesagt sein, daß ein solches nicht besteht oder bestehen könnte. Es kann nun noch gefragt werden, wie diese Amylase in das Gummi kommt. Da Gummi das Erzeugnis von Zellen ist, so ist es bei der großen Verbreitung von Amylasen im Pflanzenreich nicht verwunderlich, eine solche darin zu finden, worauf schon Béchamps⁴⁾ hingewiesen hat. Nun hat kürzlich Butkewitsch¹²⁾ gezeigt, daß in der Rinde vieler Bäume Amylase in großer Menge vorkommt. Gerade in der Rinde verschiedener Papilionaceen, nämlich *Robinia Pseudacacia*, *Caragana arborescens* und *Sophora japonica* fand sie sich so reichlich, daß diese Rinden in ihrer Wirksamkeit dem Malz nur wenig nachstehen. Auch im Holze von *Sophora* konnte Amylase nachgewiesen werden. Da nun das Gummi in Holz und Rinde entsteht und aus Wunden der Rinde hervorquillt und da es andererseits Enzyme kräftig adsorbiert, so ist es leicht begreiflich, daß es Amylase enthält. In Rindenstücken, welche sich in einem Fabriksgummi fanden, konnte ich ebenfalls zuckerbildende Amylase nachweisen. Etwa 6—7 vollkommen gummifreie Rindenstücke wurden mit Thymolwasser 17 Stunden ausgelaugt und die Lösung mit dünnem Kleister zusammengebracht. Nach 16 Stunden war die Flüssigkeit klar, nach 10 Tagen war reichlich Zucker neben Erythrodextrin entstanden. Damit erklärt sich also das Vorhandensein der Amylase im Gummi in vollkommen natürlicher und ungezwungener Weise. Dies erklärt

auch das Vorkommen der Oxydase und Peroxydase im Gummi und es würde von diesem Standpunkte aus gar nicht merkwürdig sein, wenn es noch einige andere Enzyme enthielte. Diese Erwägung veranlaßte mich auch, einige Gummiarten mittels Fibrin auf proteolytische Enzyme zu prüfen; ich konnte jedoch solche nicht auffinden. Dieses Verfahren ist allerdings zum Nachweis von Spuren solcher Enzyme nicht geeignet, doch habe ich mich um solche nicht weiter bemüht.

Ich versuchte noch die strittige Frage zu entscheiden, ob der Stickstoff des Gummis als Berlinerblau nachweisbar ist. Bach¹⁾ behauptet zwar, daß dies leicht gelinge, wenn man nicht Natrium, sondern Kalium nimmt und eine größere Menge verwendet, er hat aber seine Versuche nicht mit Gummi, sondern mit einer gereinigten Peroxydase gemacht. Indessen gelingt der Nachweis auch im Gummi, wenn auch nicht leicht. Ich gelangte in der Art zum Ziel, daß ich das gepulverte Gummi mit mehreren Scheiben von Kalium bis zur Selbstentzündung zerrieb, die halbverkohlte, neuerlich zerriebene Masse in ein Glasrohr eintrug, mit einem Stückchen Kalium bedeckte und glühte. Um aus diesem Reaktionsgemisch das Berlinerblau in bekannter Weise zu erhalten, muß man die Flüssigkeit in ganz angefüllten Proberöhrchen $1\frac{1}{2}$ Tage stehen lassen. Dann setzen sich am Boden ein paar blaue Flöckchen ab. Rascher führt jedenfalls das von Tschirch⁴⁶⁾ angewandte Glühen mit Ätzkali zum Ziel.

Schließlich möchte ich noch ein paar Worte der Vorstellung Wiesners widmen, der zufolge das Schäumen einer Gummilösung von dem darin enthaltenen «Gummiferment» herrühren und daher verschwinden soll, wenn durch Kochen die Enzymwirkung zerstört wird. Ich konnte weder durch Kochen noch durch zweistündiges Dämpfen einer Gummilösung ihre Eigenschaft, beim Schütteln zu schäumen, zerstören oder vermindern. Auch nach dem völligen Zerstören jeder enzymatischen Wirkung schäumt die Gummilösung genau so stark wie vorher und der Schaum hat auch an seiner Beständigkeit nichts verloren. Es ist dies auch theoretisch gar nicht anders zu erwarten, da ja das Schäumen von der Zähflüssigkeit der Lösung, also von

ihrer inneren Reibung und von ihre Kohäsion abhängt und diese Eigenschaften bei genügender Konzentration hinreichend groß sind, um das Schäumen hervorrufen zu können, wie ja schon das Klebevermögen einer Gummilösung beweist.

Literatur.

1. A. Bach, Über den Stickstoffgehalt der Oxydationsfermente, Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XLI (1908), S. 226.
2. Bach und Chodat, Zerlegung der sog. Oxydasen in Oxygenasen und Peroxydasen, Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXVI, S. 606.
3. Baranetzky, Die stärkeumbildenden Fermente, Leipzig 1878.
4. Béchamps, Faits pour servir à l'histoire de la gomme arabique (II), Bull. de la Société chim. de Paris [3], Bd. IX (1893), S. 45.
5. Béchamps, Compt. rend., Bd. LXVI (1868), S. 421.
6. Béchamps, Compt. rend., Bd. LXXXIII (1876) S. 5 und 358.
7. Bertrand, Compt. rend., Bd. CXVIII (1894), S. 1215.
8. Bertrand, Compt. rend., Bd. CXX (1895), S. 268.
9. Th. Bokorny, Über die pilzfeindliche Wirkung des Hopfenöls, verglichen mit der Wirkung einiger anderer äther. Öle, Allg. Brauer- und Hopfenztg., 1898, S. 2999.
10. Boulay, Bull. de pharm., Bd. I (1809), S. 225.
11. Em. Bourquelot, Sur la présence de Ferments oxydants dans quelques substances médicamenteuses, Compt. rend. de la Société de Biologie (Série 10), Bd. IV (1897), S. 25.
12. Wl. Butkewitsch, Zur Frage über die Umwandlung der Stärke in den Pflanzen und über den Nachweis der amylytisch. Enzyme, Biochem. Zeitschr., Bd. X (1908), S. 314.
13. Clermont und Chautart, Compt. rend., Bd. XCIV (1882), S. 1254.
14. O. Dony-Henault, Contribution à l'étude méthodique des oxydases (2^e mémoire), Acad. roy. de Belgique, Bulletin de la Classe des Sciences, 1908, S. 105.
15. Em. Fischer, Einfluß der Konfiguration auf die Wirkung der Enzyme, I. Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXVII (1894), S. 2985; II., S. 3479; III., Bd. XXVIII (1895), S. 1429. — Bedeutung der Stereochemie für die Physiologie, Diese Zeitschrift, Bd. XXVI (1898), S. 60.
16. S. Fränkel und M. Hamburg, Über Diastase. Erste Mittel. Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol., Bd. VIII (1906), S. 389.
17. Frischmuth, Unters. üb. d. Gummi d. Myrrhenharzes. Dissertation, Dorpat 1892.
18. Fuhrmann, Vorlesungen üb. Bakterienenzyme, Jena 1907, S. 17.
19. Garros, Sur les matières gommeuses et les matières pectiques.

- Nouveau ferment organisé de la gomme du cérisier. Bull. soc. chim. Paris [3], Bd. VII (1892), S. 625.
20. Göttling, Bull. de pharm., Bd. I (1809), S. 220.
 21. V. Grafe, Studien über das Gummiferment. Wiesner-Festschrift, Wien 1908, S. 253.
 22. Grimbert, Journ. de pharm., VI., Bd. XVII, S. 225.
 23. J. Größ, Die Diastase im Pflanzenkörper, Ber. d. Deutsch. bot. Ges., Bd. XIII (1895), S. 9 und 10.
 24. Derselbe, Über Oxydasen und die Guajakreaktion. Ebendas., Bd. XVI (1898), S. 134 u. f.
 25. Derselbe, Festschrift für Schwendener (1899), S. 187.
 26. Derselbe, Über die Lösung und Bildung der aus Hemicellulose bestehenden Zellwände und ihre Beziehung zu Gummösis. Biblioth. Botanica, Heft 39 (1896), S. 12.
 27. F. W. T. Hunger, Über d. reduzierend. Körper d. Oxydase- und Peroxydasereaktion, Ber. d. Deutsch. bot. Ges., Bd. XIX (1901), S. 374.
 28. J. Jakobson, Diese Zeitschrift, Bd. XVI (1892), S. 340.
 29. Lübbert, Biolog. Spaltpilz-Untersuchungen, 1886.
 30. Lutz (Louis Charles), Contribut. à l'Étude chim. et bot. des Gommés. Thèse de l'école supér. de Pharm. de Paris, 1895, Lons-le-Saunier.
 31. Maerker, Die landw. Versuchsstat., 1877, S. 301.
 32. Mikosch, Untersuchungen über die Entstehung des Kirschgummis, Wien. Akad. math.-naturwiss. Kl., Abt. I, Bd. CXV (1906), S. 911.
 33. O. Nasse und F. Framm, Bemerkungen z. Glykolyse, Pflügers Archiv, Bd. LXIII (1896), S. 203.
 34. Pflüger, Untersuchungen üb. d. quantit. Analyse d. Traubenzuckers, Pflügers Archiv, Bd. LXIX (1897), S. 437.
 35. Planche, Bull. de pharm., Bd. II (1810), S. 579.
 36. Planche, Journ. de Pharm., Bd. VI (1820), S. 16.
 37. M. Raciborski, Ein Inhaltkörper des Leptoms, Ber. der Deutsch. bot. Ges., Bd. XVI (1898), S. 56.
 38. Fr. Reinitzer, Über die wahre Natur des Gummiferments, Diese Zeitschrift, Bd. XIV (1890), S. 453.
 39. C. Reichl, Ber. der österreich. Gesellsch. zur Förderung der chem. Ind., Prag, Bd. I (1879), S. 74.
 40. W. Ruhland, Zur Physiol. d. Gummibildung bei den Amygdaleen, Ber. d. Deutsch. bot. Gesellsch., Bd. XXV (1907), S. 302.
 41. Schönbein, Journ. f. prakt. Chem., Bd. CV (1868), S. 198.
 42. Derselbe, Ebendas., Bd. CVI (1869).
 43. Sieben, Zeitschrift d. Ver. der Deutschen Zuckerindustr., Bd. XXXIV, S. 837.
 44. Struve, Annal. d. Chem. u. Pharm., Bd. CLXIII (1872), S. 162.
 45. Tschirch und Stevens, Über den Japanlack, Arch. d. Pharm., Bd. CCXLIII (1905), S. 532 u. f.

46. Dieselben, Über die Gummi-Enzyme (Gummasen), speziell den Nachweis des Stickstoffs in ihnen, Pharm. Zentralhalle, Bd. XLVI (1905), S. 501.

47. Tschirch, Die Harze und die Harzbehälter, II. Aufl. (1906), Bd. I, S. 404, 877—885.

48. Wiesner, Über das Gummiferment, Wien. Akad. math.-naturw. Kl., Bd. XCII (1885), I. Abteil., S. 40.

49. Derselbe, Die Rohstoffe des Pflanzenreiches. Leipzig 1900, Bd. I.

50. Yoshida, Journ. chem. soc., Bd. XLIII (1883), S. 472.

51. S. Zeisel, Chemische Charakteristik und Konstitution d. Gummiarten in Bd. I, S. 60 der Rohstoffe d. Pflanzenr. von J. Wiesner, II. Aufl., Leipzig 1900.

Graz, botanisches Institut der techn. Hochschule.
