

612.015

Г. 76

рскихъ диссертаций, допущенныхъ къ защитѣ въ Императорской
Военно-Медицинской Академіи въ 1909—1910 учебномъ году.

№ 31.

**ВЛІЯНІЕ РАЗЛИЧНЫХЪ ТЕМПЕРАТУРЪ НА
ФЕРМЕНТЫ
и регенерація ферментныхъ свойствъ.**

ДИССЕРТАЦІЯ

НА СТЕПЕНЬ ДОКТОРА МЕДИЦИНЫ

М. И. Граменицкаго.

Изъ фармакологической лабораторіи проф. Н. П. Кравкова.

Цензорами диссертации по порученію Конференціи были:
профессора **Н. П. Кравковъ**, **М. Д. Ильинъ** и приватъ-доцентъ
Б. П. Бабкинъ.

С.-ПЕТЕРБУРГЪ.

Тип. Т-ва п. ф. «Электро-Типографія Н. Я. Стойковой», Знаменская, 27.
1910.

75249

612.015

Г. 76

(x) 2

Серія докторських дисертацій, допущенихъ къ защитѣ въ Императорской Военно-Медицинской Академіи въ 1909—1910 учебномъ году.

№ 31.

~~31~~
2

7-НОЯ 2012

ВЛІЯНІЕ РАЗЛИЧНЫХЪ ТЕМПЕРАТУРЪ НА
ФЕРМЕНТЫ
и регенерація ферментныхъ свойствъ.

ДИССЕРТАЦІЯ

НА СТЕПЕНЬ ДОКТОРА МЕДИЦИНЫ

М. И. Граменицкаго.

Изъ фармакологической лабораторіи проф. Н. П. Кравкова.

Цензорами диссертации по порученію Конференціи были:
профессора Н. П. Кравковъ, М. Д. Ильинъ и приватъ-доцентъ
Б. П. Бабкинъ.

Перечисл
1906 г.

С. ПЕТЕРБУРГЪ.

Тип. Т-ва п. ф. «Электро-Типографія Н. Я. Стойковой». Знаменская, 27.
1910.

1950

Переучет-60

ОГЛАВЛЕНИЕ

	Стран.
Введение.	
Ньюктория теория, предложенная для объяснения явлений катализа	3
Теория, предложенная для объяснения явлений ферментации	23
Литературные данные о влиянии температуры на ферменты	48
Собственные исследования	57
Доказательство ферментации постъ действны высокой температуры различной силы и продолжительности	70
Первоначальные попытки объяснить факт ферментации постъ кипячении. Влияние на растворы Така-диастазы температур, не высоких	84
Косвенное доказательство обратимости гесп. регенерации ферментных свойств	92
Температурные границы деятельности гесп. бездеятельности оксидазы Maltin'a и Така-диастазы. Ньюктория замечания по поводу optimum'a действия ферментов	102
Непосредственное, прямое доказательство регенерации диастазических свойств	114
Влияние различных температур на регенерацию диастазы	122
Степень регенерации диастазы постъ кипячении	130
Влияние концентрации нагреваемого фермента на его "стойкость" гесп. на регенеративный процесс	134
Влияние прокипяченного фермента на ходъ гидратации, производимой небольшими количествами обыкновенного	137
Наблюдения, произведенныя съ диализованными препаратами Така-диастазы	141
Электрическая проводимость ферментных растворов. Вопросъ объ электролитической диссоциации фермента	143
Кодовальность ферментных растворов	150
Отношение къ высокой температуре инвертина, мальць-диастазы и амилолитического фермента Rankreatin'a	151
Общая заключение	159
Литературный указатель	170

Докторскую диссертацию врача **М. И. Граменицкого** подъ заглавиемъ: *"Влияние различныхъ температуръ на ферменты и регенерация ферментныхъ свойствъ"* печатать разрешается, съ тѣмъ, чтобы по отпечатаніи было представлено въ ИМПЕРАТОРСКУЮ военно-медицинскую академію 500 экземпляровъ самой диссертации и 300 экземпляровъ краткаго резюме ея (вызововъ), при чемъ 125 экземпляровъ диссертации и выводовъ должны быть доставлены въ канцелярію академіи, а остальные 375 диссертаций — въ бібліотеку академіи.

С.-Петербургъ, 13 марта 1910 года.

Ученый секретарь, академикъ *А. Данинъ.*

Харк.
НАУКО.

ВВЕДЕНІЕ.

I. Нѣкоторыя теоріи, предложенныя для объясненія явленія катализа.

Подъ именемъ „катализа“, въ противоположность „анализу“, *Berzelius* ¹⁾ въ 1836-мъ году объединилъ рядъ явленій, которыя нельзя было подвести подъ общіе законы „электрохимическаго средства“, управляющіе реакціями. Эта новая—каталитическая—сила, общая органической и неорганической природѣ, не является, однако, совершенно независимой отъ силы электрохимическаго средства, наоборотъ, по мнѣнію *Berzelius*'а, она служитъ лишнимъ ея проявленіемъ, но въ такихъ формахъ, гдѣ связь и взаимная зависимость реагирующихъ веществъ остается скрытой. Въ другой работѣ того же 1836-го года *Berzelius* ²⁾ нѣсколько ближе подошелъ къ опредѣленію катализа, говоря, что „каталитическая сила состоитъ, кажется, въ томъ, что тѣла черезъ одно лишь присутствіе свое, а не черезъ средство, могутъ пробудить дремлющія при данной температурѣ средства, вслѣдствіе чего ихъ элементы располагаются въ сложномъ тѣлѣ въ такихъ иныхъ соотношеніяхъ, при которыхъ выступаетъ наибольшая электрохимическая нейтрализація“. Сильная мысль великаго химика подвела подъ понятіе катализа и явленія ферментации (напр., спиртовое броженіе сахара), а также тѣ „тысячи каталитическихъ процессовъ“, которыя совершаются въ животныхъ и растительныхъ организмахъ.

Харьковскій Музей
КАТЕДРА ФИЗИОЛОГІИ

402

192

4

Главные факты, которые были необъяснимы с точки зрения общих химических законов и дали повод связать их с явлениями катализа, были следующие.

Въ 1811-мъ году *Kirchhoff* ³⁾ доказалъ превращение крахмала въ декстринъ и сахаръ при кипяченіи его съ разведенными кислотами: въ 1815-мъ, году онъ обнаружилъ подобное дѣйствіе на крахмалъ солодовой вытяжки.

Въ 1811-мъ году *Davy* ⁴⁾ доказалъ, что платиновая проволока обладаетъ способностью оставаться раскаленной въ извѣстныхъ газовыхъ смѣсяхъ. Такъ, между прочимъ, онъ замѣтилъ медленное горѣніе спирта, эфира, терпентина, нефти, получение окисловъ азота на счетъ избытка кислорода и сіана и т. д. Аналогичныя свойства онъ обнаружилъ у палладія. Причину этихъ явленій *Davy* видѣлъ въ дурной проводимости тепла платиной и палладіемъ, по сравненію съ другими металлами, вслѣдствіе чего они „поддерживаютъ, возбуждаютъ и дѣлаютъ чувствительными эти медленныя горѣнія“.

Въ 1818-мъ году *Thenard* ⁵⁾ произвелъ разложеніе перекиси водорода металлами, ихъ окислами и фибриномъ.

Въ 1823-мъ году *Dobereiner* ⁶⁾ открылъ способность губчатой платины вызывать соединеніе водорода съ кислородомъ при обыкновенной температурѣ.

Въ работѣ по тому же вопросу *Dulong'a* и *Thenard'a* ⁷⁾, мы встрѣчаемъ дальнѣйшій анализъ этого явленія; авторы показали, что повышеніе температуры усиливаетъ этотъ процессъ, и что всѣ металлы обладаютъ въ большей или меньшей степени подобными свойствами, напр. палладій, иридій, серебро, золото и друг.; наиболѣе энергично дѣйствуютъ благородные металлы въ видѣ порошка, такъ что порошкообразное золото вызываетъ соединеніе водорода съ кислородомъ при 55° С, серебро при 120°; дальѣе, свойство это присуще и другимъ тѣламъ, какъ-то: углю, немѣзъ,

фарфору, стеклу, кристалламъ каменныхъ породъ—если только температура достаточно высока.

Въ 1833-мъ году и слѣдующемъ *Payen* и *Persoz* ⁸⁾ сдѣлали рядъ попытокъ изолировать диастазу—дѣйствующее вещество солодовой вытяжки и изучитъ ея свойства; попутно они изслѣдовали различныя реакціи крахмала, отношеніе его къ іоду, водѣ, спирту и т. д. Въ другой своей работѣ они ⁹⁾ занимались вопросомъ о силѣ дѣйствія изолированныхъ ими препаратовъ диастазы и о содержаніи ея въ растеніяхъ въ зависимости отъ возраста. Между прочимъ, они указываютъ на то, что, если диастазу, находящуюся во влажномъ состояніи, довести до температуръ 90° и 100° С, то она разрушается.

Въ 1834-мъ году *Biot* и *Persoz* ¹⁰⁾ доказали, что превращеніе крахмала въ декстринъ и сахаръ подъ вліяніемъ кислотъ имѣетъ мѣсто и при обыкновенной температурѣ; разница заключается въ томъ, что при высокой температурѣ реакція совершается въ первыя минуты, тогда какъ при обыкновенной она отлагается большой длительностью (недѣли и мѣсяцы).

Faraday ¹¹⁾ изслѣдовалъ вопросъ объ образованіи воды изъ гремучей смѣси подъ вліяніемъ тонкихъ платиновыхъ пластинокъ и проволокъ и пришелъ къ заключенію, что изготовленная такимъ образомъ платина обнаруживаетъ дѣйствіе подобное губчатой. Для того, чтобы реакція совершалась быстро, требуется безусловная чистота, какъ платины, такъ и гремучей смѣси. Вообще годную для реакціи платину можно получить обработкой ея въ теченіе 4-хъ—5-ти минутъ сѣрной кислотой удѣльнаго вѣса 1.336; если такія пластинки хранить въ стеклянномъ герметически закрытомъ сосудѣ съ дистиллированной водой, то способность къ реакціи сохраняется въ теченіе долгого времени, напр. недѣли; пластинки, хранимыя на воздухѣ или въ де-

ревянномъ сосудѣ съ дистиллированной водою, очень быстро—черезъ пол-сутки и менѣе—теряютъ свои свойства. Подобнымъ образомъ ослабляютъ реакцію примѣси къ гремучему газу другихъ веществъ—напр. этилена, окиси углерода (особенно въ присутствіи двуокиси), фосфористаго и сѣрнистаго водорода. Подобно платиновымъ пластинкамъ вліяютъ на гремучую смѣсь пластинки изъ золота и иридія, и установленный фактъ пріобрѣтаетъ болѣе общее значеніе. Объясняя наблюдаемое явленіе, *Faraday* прежде всего приводитъ теорію *Fusinieri*¹²⁾, который предполагаетъ непрерывное возобновленіе, своего рода токъ, гремучей смѣси около поверхности платины, наступающій въ силу того, что все новыя и новыя порціи, превращаясь въ воду, уходятъ изъ круга реакціи. Признавая неудовлетворительность такого объясненія—ибо остается неизвѣстной причина наступленія реакціи—*Faraday* придаетъ выдающуюся роль силъ притяженія на поверхности платины, благодаря чему происходитъ сильное сгущеніе газовъ и паровъ. Въ подтвержденіе своего мнѣнія *Faraday* приводитъ опять *Hall*'а, доказавшаго, что угольный ангидридъ и известъ подѣ вліяніемъ повышеннаго давленія остаются связанными при такихъ температурахъ, при которыхъ подѣ атмосфернымъ давленіемъ такого связыванія не наблюдается. Нѣчто подобное наблюдать самъ *Faraday*: пропуская при обыкновенной температурѣ подѣ повышеннымъ давленіемъ хлоръ въ воду, онъ получалъ опредѣленный кристаллическій гидратъ, который подѣ атмосфернымъ давленіемъ получить не удается.

Въ томъ-же 1834-мъ году *Döbereiner*¹³⁾ на основаніи своихъ опытовъ пришелъ къ заключенію, что платина и иридій въ размельченномъ состояніи способны при лежаніи на воздухѣ поглотить отъ 200—250 объемовъ кислорода безъ того, чтобы образовать съ нимъ химическое соединеніе;

сила, съ которой металлы удерживаютъ кислородъ, достигаетъ 800 и даже 1000 атмосферъ.

Въ 1834-мъ году *Mitscherlich*¹⁴⁾ опубликовалъ свой классическій трудъ объ образованіи эфира изъ этиловаго алкоголя и сѣрной кислоты. Дѣйствіе сѣрной кислоты въ этомъ процессѣ онъ назвалъ контактнымъ и, подобно *Berzelius*'у, объединилъ подѣ этимъ именемъ нѣкоторые факты, накопившіеся въ химической наукѣ, какъ-то: образованіе изъ сахара спирта и угольной кислоты, окисленіе спирта въ уксусную кислоту, распаденіе мочевины на аммиакъ и угольную кислоту. Всѣ вещества, дѣйствующія контактно, не испытываютъ сами по себѣ ни малѣйшаго измѣненія и являются, по выраженію *Mitscherlich*'а, лишь ферментомъ реакціи.

Тѣ явленія, которые *Mitscherlich* связалъ съ дѣйствіемъ контакта, на два года позднѣе *Berzelius* приписалъ особой каталитической силѣ. Съ тѣхъ поръ доступная знанію область каталитически протекающихъ процессовъ чрезвычайно расширилась, но и въ настоящее время съ нихъ не снята еще печать таинственности, наложенная *Berzelius*'омъ.

Въ 1836-мъ году *Schweam*¹⁵⁾ описываетъ вещество, которое играетъ выдающуюся роль при пищевареніи и называетъ его пепсиномъ.

*Döbereiner*¹⁶⁾ изучаетъ способъ полученія платиновой черни и указываетъ на ея рѣзко выраженную способность производить окисленія; такъ, она не только окисляетъ щавелевую и муравьиную кислоты въ угольную, а алкоголь въ альдегидъ и уксусную кислоту,—но даже доводитъ осмію до осміевой кислоты. *Döbereiner* предлагаетъ называть процессы подобнаго рода „металитическими“.

*Poggendorff*¹⁷⁾ считаетъ процессъ образованія эфира изъ сѣрной кислоты и спирта аналогичнымъ процессу алкоголь-

наго броженія, а контактное дѣйствіе сѣрной кислоты подобнымъ дѣйствію фермента. Въ чемъ заключается сущность контактнаго вліянія.—*Poggendorff* сказать не берется, предполагая однако, что явленія гальванизма играютъ здѣсь выдающуюся роль.

Pagen и *Pearce*¹⁸⁾, сравнивая дѣйствіе сѣрной кислоты на крахмалъ съ дѣйствіемъ діастазы, приходятъ къ заключенію, что эти процессы во многомъ отличны другъ отъ друга. Прежде всего, за одинъ и тотъ же промежутокъ времени діастаза способна превратить разъ въ 6 больше крахмала, по сравненію съ сѣрной кислотой; далѣе, кругъ дѣйствія діастазы ограниченъ, ибо она не превращаетъ въ сахаръ такихъ веществъ, какъ инулинъ и клѣтчатка, между тѣмъ какъ сѣрная кислота производитъ подобное превращеніе; наконецъ, разница заключается еще въ томъ, что дѣйствіе діастазы не прекращается отъ подщелачиванія, даже значительнаго, среды извѣстью, углекислымъ калиемъ или натріемъ, а тѣмъ менѣе отъ легкаго подкисленія; наоборотъ, прибавка дубильныхъ веществъ ведетъ къ полной остановкѣ процесса.

*Mitscherlich*¹⁹⁾ ²⁰⁾ въ двухъ работахъ 1842-го и 1843-го годовъ вновь возвращается къ вопросу о контактныхъ дѣйствіяхъ. По его вычисленію, пространство одного кубическаго дюйма, занятое правильно расположенными въ вертикальныхъ и горизонтальныхъ плоскостяхъ шариками съ поперечникомъ въ $\frac{1}{10,000,000}$ -ную дюйма, — представляетъ поверхность въ 218.166 квадратныхъ футовъ; всякое другое расположеніе шариковъ даетъ еще большія цифры. Платиновая чернь, представляя, при незначительномъ объемѣ, громадную поверхность, даетъ условия для ступенія на этой поверхности различныхъ газовъ и паровъ, а это, въ свою очередь, служить толчкомъ для наступленія различныхъ реакцій. Далѣе, *Mitscherlich* указываетъ, что контактная вліянія пред-

ставляются яснѣе при реакціяхъ разложенія, чѣмъ синтеза, при чемъ различныя вещества дѣйствуютъ съ неодинаковой силой. Такъ, проводя амміакъ черезъ раскаленную мѣдь или желѣзные опилки, мы получаемъ полное его разложеніе на водородъ и азотъ; а употребляя, при той же температурѣ, въ качествѣ катализатора битое стекло, получаемъ лишь незначительное разложеніе амміака на элементы. Явленія контакта наблюдаются, по мнѣнію *Mitscherlich*'а, не только при дѣйствіи твердыхъ тѣлъ на газы, но и жидкостей другъ на друга, а также при дѣйствіи твердыхъ тѣлъ на жидкія. Изъ контактныхъ реакцій втораго рода, помимо образованія эфира изъ сѣрной кислоты и спирта, *Mitscherlich* указываетъ на превращеніе тростниковаго сахара въ глюкозу подъ вліяніемъ разведенной сѣрной кислоты. Контактное дѣйствіе твердыхъ тѣлъ на жидкія констатируется при разложеніи перекиси водорода металлами, или хлористаго калия—окисью мѣди. Разложеніе перекиси водорода контактнымъ способомъ является, по мнѣнію *Mitscherlich*'а, фактомъ особой важности; онъ полагаетъ, между прочимъ, что процессъ этотъ имѣетъ мѣсто только на поверхности твердыхъ тѣлъ. Анализируя контактные явленія, *Mitscherlich* думаетъ, что они въ результатѣ даютъ тѣ же продукты, которые получаются и при помощи другихъ агентовъ; такъ, напр., крахмалъ можетъ быть превращенъ въ декстринъ тройнымъ способомъ: съ помощію діастазы, если ее заставить дѣйствовать при 75° С; затѣмъ, нагреваніемъ съ разведенными кислотами; наконецъ, нагреваніемъ отвара крахмала самого по себѣ до 150° С;—во всѣхъ трехъ случаяхъ получается одинаковый продуктъ—декстринъ. Другими словами, роль контактно дѣйствующихъ веществъ, по мнѣнію *Mitscherlich*'а, сводится на пониженіе условий реакцій (напр. температурныхъ); качественно же реакціи, производимыя контактомъ и протекающія безъ его участія—однѣ

и тѣ же. Кромѣ того, для веществъ, дѣйствующихъ контактнымъ образомъ, характерно, что они по окончаніи реакціи остаются неизмѣнными: это свойство, какъ думаетъ *Mitscherlich*, въ полной мѣрѣ относится и къ диастазѣ, такъ что ферментъ является катализаторомъ подобно другимъ веществамъ.

Reiset и *Millon* ²¹⁾ на основаніи своихъ опытовъ приходятъ къ заключенію, что различныя вещества, дѣйствующія контактно, даютъ продукты различныя не только по количеству, но и по качеству, т. е. контактъ, въ нѣкоторыхъ случаяхъ, не только ускоряетъ реакціи, протекающія и безъ него, но и мѣняетъ ихъ характеръ. Такъ, напр., губчатая платина понижаетъ температуру разложенія азотноаммоніевой соли на 70°C; т. е., вмѣсто 230°C, разлагаетъ ее при 160°C, при чемъ въ числѣ продуктовъ разложенія закиси азота не получается—что имѣетъ мѣсто при разложеніи азотноаммоніевой соли самой по себѣ. Винная кислота въ присутствіи пемзы разлагается при 175°C, въ присутствіи губчатой платины—при 185°—190°C, а сама по себѣ разлагается, начиная съ 195°—200°C. Лимонная кислота даетъ газообразные продукты, сама по себѣ, начиная съ 175°C, съ губчатой платиной—при 165°C, съ пемзой при 155°C. Разложеніе азотнокислой мочевины начинается при 130°C, и при продолжительномъ нагреваніи полнымъ; разложеніе съ помощью губчатой платины оканчивается при этой температурѣ очень быстро, и по характеру то же самое; но при температурахъ болѣе высокихъ—отъ 170°—230°C—въ присутствіи платины получаютъ продукты отличныя отъ тѣхъ, которые даетъ азотнокислая мочевина сама по себѣ. *Reiset* и *Millon* полагаютъ, что съ помощью контактныхъ вліяній можно получать новыя химическія соединенія, а также направлять разложеніе различныхъ органическихъ веществъ въ желаемую сторону.

На основаніи приведенныхъ данныхъ мы можемъ сдѣлать слѣдующіе выводы. Каталитическія—или контактная—реакціи отличаются тѣмъ, что вещество дѣйствуетъ лишь своимъ присутствіемъ, въ конечные продукты реакціи не входитъ и во время ея теченія остается неизмѣннымъ; катализъ лишь ускоряетъ ходъ химическихъ процессовъ, протекающихъ и безъ него, но при болѣе высокихъ температурахъ; однако, въ нѣкоторыхъ случаяхъ, катализъ оказываетъ свое особое дѣйствіе, измѣняя направленіе химическихъ реакцій; небольшое количество вещества, дѣйствующаго каталитически, можетъ произвести очень значительныя химическія дѣйствія; способъ дѣйствія ферментовъ въ основныхъ чертахъ сходенъ съ каталитическимъ дѣйствіемъ другихъ веществъ, поэтому на ферменты надо смотрѣть какъ на катализаторы организованной матеріи. Эти положенія составляютъ основу всего ученія о катализѣ и сохраняютъ полную свою силу и до настоящаго времени. Съ тѣхъ поръ накопились почти необъятный фактической матеріаль изъ области катализа, и было сдѣлано много попытокъ подойти къ пониманію механизма дѣйствія катализаторовъ и установить законы каталитическихъ реакцій; но эта область явленій продолжаетъ быть чрезвычайно таинственной и теоріи катализа, приложимой ко всѣмъ его случаямъ, не существуетъ. Еще болѣе тайной окружены процессы, протекающіе съ участіемъ ферментовъ, строеніе и химическій характеръ которыхъ, въ противоположность катализаторамъ неорганизованной матеріи, совершенно не выяснены. Ученіе о ферментахъ на долгое время порвало связь съ ученіемъ о каталитическихъ процессахъ, пытались найти себѣ объясненіе въ особыхъ свойствахъ живой матеріи и въ специфической жизнѣдѣтельности кѣлѣтокъ; однако, такое обособленіе ферментативныхъ процессовъ не было плодотворнымъ, ибо мы до сихъ поръ не знаемъ, что ле-

жить в основѣ жизни вообще и что представляет собою жизненная сила, а потому объяснять съ помощью ея явления ферментации—значитъ объяснять неизвѣстное неизвѣстнымъ. Великимъ событіемъ въ физиологической химіи было открытіе *Buchner'a*, доказавшаго, что ферменты можно изолировать отъ клѣтокъ, ихъ вырабатывающихъ, и разматривать съ обще-химической точки зрѣнія, внѣ связи съ неизвѣстной жизненной силой. Послѣдствіемъ такого, строго экспериментальнаго, направленія въ изученіи ферментовъ явилось убѣжденіе въ томъ, что ферментативные процессы по существу своему—процессы каталитическіе, и если не всегда подчиняются общимъ законамъ катализа, то причина этого кроется въ особомъ характерѣ веществъ, дѣйствующихъ ферментативно, въ ихъ нестойкости, легкой разрушаемости подъ вліяніемъ различныхъ агентовъ и трудности полученія въ чистомъ видѣ. Однимъ словомъ, вопросу о ферментахъ дана была вновь та же постановка, какую мы видѣли у *Berzelius'a*, т. е. онъ свелся къ вопросу о катализѣ.

Остановимся теперь на нѣкоторыхъ попыткахъ, направленныхъ къ объясненію явленій катализа.

У *Berzelius'a* мы видѣли скорѣе опредѣленіе понятія катализа, чѣмъ его объясненіе, когда онъ говоритъ, что тѣла „однимъ присутствіемъ своимъ пробуждаютъ дремлющія при данной температурѣ средства“.

Mitscherlich связывать явленія катализа съ происходящимъ на поверхности катализаторовъ сгущеніемъ различныхъ газовъ и паровъ.

Faraday вполнѣ раздѣлялъ этотъ взглядъ, полагая, что сгущеніе газовъ на поверхности является необходимымъ условіемъ для наступленія каталитическихъ реакцій.

Въ дальнѣйшемъ мы встрѣчаемся съ теоріей *Liebig'a*²²⁾. Онъ выводилъ катализъ изъ общаго закона инерціи и первоначально выражался слѣдующимъ образомъ: „эта причина

заключается въ способности, которую обладаетъ тѣло, находящееся въ состояніи разложенія или соединенія, т. е. въ состояніи химическаго дѣйствія,—въ способности вызывать въ другомъ соприкасающемся съ нимъ тѣлѣ такую же химическую дѣятельность, или дѣлать его способнымъ претерпѣвать то же измѣненіе, которое оно испытываетъ само. Эта способность лучше всего представляется горящимъ тѣломъ (находящимся въ состояніи химическаго дѣйствія), при помощи котораго мы вызываемъ въ другихъ тѣлахъ ту же дѣятельность, когда мы приближаемъ ихъ къ горящему“. Ему возражали такимъ образомъ, что для зажиганія не является необходимымъ горящее тѣло, а достаточно лишь нагрѣтаго до извѣстной температуры, все равно, было ли оно нагрѣто химическимъ процессомъ или электрической энергіей. Сознвая неудовлетворительность первоначальной формулировки, *Liebig* впоследствии остановился на слѣдующей: „подобно тому, какъ теплота способна нарушать статическій моментъ въ элементахъ очень многихъ химическихъ соединеній, это производится и тѣломъ, элементъ котораго сами по себѣ находятся въ состояніи нарушеннаго равновѣсія; движеніе, въ которомъ находятся его атомы, сообщаетъ атомамъ элементовъ, напр. сахара (*Liebig* объясняетъ явленія броженія); они перестаютъ удерживаться въ томъ состояніи, въ которомъ они образуютъ сахаръ, и располагаются по своимъ особымъ притяженіямъ“.

Подобной теоріи атомныхъ колебаній придерживался *Mendeleev*²³⁾. Исходя изъ теоретической предпосылки, что въ прикасающихся тѣлахъ въ плоскостяхъ касанія наступаютъ измѣненія движенія, авторъ дѣлаетъ все совершенно иное процессы на три группы. Къ первой онъ относитъ такіа вещества, которыя, хотя и измѣняютъ свой родъ движенія, но изъ положенія равновѣсія не выходятъ и химически остаются неизмѣнными. Вторая группа объединяетъ

тѣ случаи, когда пришедшіе въ движеніе атомы однихъ частицъ влекутъ за собою образованіе съ атомами другихъ частицъ новыхъ комбинацій, т. е. здѣсь имѣютъ мѣсто явленія соединенія, замѣненія или разложенія. Третьей возможной случай состоитъ въ томъ, что „неизмѣняющееся тѣло В находится въ столь прочномъ подвижномъ равновѣсіи, что сравнительно малая пертурбація движенія его атомовъ въ частицѣ, происходящая на плоскости касанія, не нарушаетъ атомнаго равновѣсія его частицъ, тогда какъ въ измѣняющемся тѣлѣ А подвижное равновѣсіе атомовъ въ частицѣ уже само собой, до прикосновенія къ В, было близко къ нарушенію или неустойчивости, а то, сравнительно незначительное, измѣненіе движенія, которое совершается на плоскостяхъ касанія, можетъ уже вводить атомы въ положеніе, потребное для новаго равновѣсія, подобно тому, какъ нагрѣваніе можетъ производить такое же измѣненіе движенія.

Много общаго съ только что приведенными имѣютъ теоріи *Skraup'a*²⁴⁾ и *Bunsen'a*²⁵⁾. *Skraup* допускаетъ, что при нѣкоторыхъ условіяхъ колебанія одного вещества могутъ произвести въ другомъ полное измѣненіе строенія, и сравниваетъ это явленіе съ явленіемъ резонанса.

Bunsen полагаетъ, что атомы одного вещества, оставаясь сами неизмѣнными, могутъ въ сферѣ прикосновенія съ другимъ химически измѣнять это послѣднее.

*Häfner*²⁶⁾ считаетъ характернымъ для каталитически дѣйствующаго вещества особаго рода натяженіе его молекулъ, однако не доводящее ихъ до распада, тогда какъ во всѣхъ другихъ химическихъ реакціяхъ распадъ молекулъ является неизбѣжнымъ.

*Mayer*²⁷⁾ признаетъ каталитической всякую силу, которая не стоитъ ни въ какомъ количественномъ отношеніи съ производимымъ ею дѣйствіемъ. Удара крыла птицы

или небольшого напора вѣтра бываетъ иногда достаточно для того, чтобы низринулась громадная лавина. Съ точки зрѣнія *Mayer'a*, катализъ представляетъ частный случай болѣе общаго явленія—явленія „разрѣшенія“.

*Loew*²⁸⁾ высказываетъ чрезвычайно оригинальный взглядъ на механизмъ каталитическаго процесса. Разбирая катализъ гремучаго газа раздробленнымъ стекломъ, авторъ видитъ причину реакціи въ томъ, что газовыя молекулы распадаются на атомы при ударахъ объ острые грани стекла, при чемъ сродство водородныхъ атомовъ къ кислороднымъ оказывается сильнѣе, чѣмъ обратное соединеніе въ молекулы: въ результатъ получается образованіе воды. Этотъ процессъ онъ считаетъ аналогичнымъ взрыву гремучаго серебра и нитроглицерина подъ вліяніемъ удара. Катализъ гремучаго газа съ помощью платины *Loew* считаетъ возможнымъ объяснить подобнымъ же образомъ, предполагая у молекулъ платины наличность острыхъ граней или шиповъ.

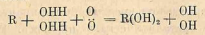
Brodie и *Clausius*²⁹⁾ полагаютъ, что процессы окисленія связаны съ расщепленіемъ молекулы кислорода на атомы съ противоположными электрическими зарядами.

*Schönbein*³⁰⁾ въ рядѣ работъ развиваетъ свой взглядъ на процессы окисленія, объясняя ихъ превращеніемъ мало дѣятельнаго обыкновеннаго кислорода въ озонъ.

*Hoppe-Seyler*³¹⁾ предполагаетъ, что благодаря присутствію въ организмѣ возстаивающихъ веществъ молекула обыкновеннаго кислорода распадается на 2 атома, изъ которыхъ одинъ соединяется съ водородомъ, а другой остается свободнымъ и дѣйствуетъ активно.

Нѣсколько отличенъ отъ указанныхъ взглядъ *Traube*³²⁾. Явленія окисленія онъ связываетъ съ разложеніемъ воды, а не кислорода. По его мнѣнію, молекулы воды расщепляются на гидроксильныя группы и водородные атомы; гид-

роксилы присоединяются к легко окисляющемуся тѣлу, а водородные атомы съ кислородомъ образуютъ перекись водорода, которая и дѣйствуетъ активно. Процессъ идетъ по слѣдующей схемѣ:



Главный недостатокъ теории *Vraube* заключается въ томъ, что она безсильна объяснить окислительные процессы въ отсутствіи воды.

*Berthelot*³³⁾, изучая образование сложныхъ эфировъ, убѣдился, что малѣйшія количества минеральныхъ кислотъ сильно ускоряютъ этотъ процессъ (фактъ, извѣстный со времени *Thenard'a*); онъ пришелъ къ заключенію, что ускореніе растетъ до извѣстнаго предѣла, пропорціонально количеству прибавляемой кислоты и объясняется параллельно идущей промежуточной реакціей. Въ болѣе подробное объясненіе процесса *Berthelot* не входитъ.

Согласно теории *Van't Hoff'a*³⁴⁾, при процессѣ окисленія имѣетъ мѣсто расщепленіе молекулярнаго кислорода на атомы съ противоположными электрическими зарядами, при чемъ, сообразно съ характеромъ подлежащихъ окисленію веществъ, одно изъ нихъ окисляется положительно,—другое отрицательно—заряженными атомами.

*Jorissen*³⁵⁾ точно также признаетъ расщепленіе кислородной молекулы при процессахъ медленнаго окисленія. Количественная опредѣленія показываютъ, что при процессахъ медленнаго окисленія активируется столько кислорода, сколько требуетъ его окисляющееся тѣло для образованія своего перваго продукта окисленія. Кроме того, на основаніи опытовъ *Evan'a*³⁶⁾, не лишено вѣроятности, что и обыкновенный кислородъ является диссоціирующимъ на атомы, хотя и въ очень незначительной степени.

Взглядъ *Engler'a* и *Wild'a*³⁷⁾ сводится къ тому, что мо-

лекула кислорода цѣликомъ присоединяется къ легкоокисляющемуся тѣлу, при чемъ образуется перекись тина R_2O_2

или $\ddot{R} < \overset{O}{\underset{O}{\parallel}}$. Это соединеніе отдаетъ одинъ изъ кислородныхъ атомовъ другому способному къ окисленію тѣлу, а само переходитъ въ простую окись. Такимъ образомъ, активнымъ кислородомъ является не кислородъ въ состояніи свободныхъ атомовъ, но таковъ, который находится въ нестойкомъ химическомъ соединеніи и легко можетъ отщепиться.

Въ другой работѣ *Engler'a*, произведенной вмѣстѣ съ *Weissberg'омъ*³⁸⁾, мы находимъ дальнѣйшее развитіе этого взгляда. Рѣчь идетъ объ активированіи кислорода скипидаромъ. Авторы приходятъ къ заключенію, что активное состояніе кислорода не связано съ образованіемъ озона, перекиси водорода или съ атомнымъ расщепленіемъ кислорода, но имѣетъ въ своей основѣ образованіе перекиси легко окисляющагося тѣла, при чемъ одинъ изъ кислородныхъ атомовъ обладаетъ большою подвижностью и легкой отщепляемостью. Представляется интереснымъ влияние температуры на процессъ активированія кислорода скипидаромъ. По мѣрѣ повышенія температуры, энергія процесса растетъ, при 100°С она достигаетъ maximum'a; съ дальнѣйшимъ повышеніемъ температуры активированіе кислорода замедляется, а начиная съ 160°С его не происходитъ. Причину этого явленія авторы видятъ въ томъ, что, по мѣрѣ повышенія температуры, рядомъ съ образованіемъ активнаго кислорода идетъ процессъ внутренняго окисленія вещества, и чѣмъ энергичнѣе активируется кислородъ, тѣмъ въ болѣешихъ размѣрахъ онъ потребляется для внутренняго окисленія, до 100°С количество вновь образованнаго активнаго кислорода беретъ перевѣсъ надъ тѣмъ, которое потребо-

15889

Химический институтъ
КАТЕДРА ФИЗИКОХИМИИ

У.С.И.Р.—Н.К.О.
Химический институтъ
КАТЕДРА ФИЗИКОХИМИИ
401

валось для внутреннего окисления; а начиная со 100° С отношения устанавливаются как раз обратные, так что при 160° С весь вновь образованный активный кислород моментально расходуется для внутреннего окисления. Далее, если скипидар в продолжении нескольких часов нагревать при 80° или 100° С, то он теряет свою окисляющую способность: это объясняется опять таки внутренним окислением вещества. Схематически оба процесса можно представить в следующем виде, если обозначить скипидар через А, а подверженное окислению тело через В:



$AO_2 + B = AO + OB$; начиная с температуры 160° С, получаем:

$$A + O_2 = A < \frac{0}{0} = A = \frac{0}{0}, \text{ гдѣ } 0 \text{ равняется } = 0, \text{ т. е.}$$

фактически окислительная способность достигает нуля.

Brode ²⁹⁾, наблюдая каталитическое влияние перекиси водорода на иодистый водород, пришел к заключению, что этот случай катализа, подобно многим другим, легко может быть объяснен с точки зрения промежуточных реакций. Между прочим он указывает, что при комбинации различных катализаторов может получиться в суммѣ или положительный, или отрицательный результат и что, если прибавить к катализатору другого вещества, которое само по себѣ едва катализирует, то иногда это прибавление повышает энергию процесса в очень значительной степени.

Ernst ³⁰⁾ изучал катализ гремучаго газа с помощью коллоидальной платины. Для этого катализа, как и для других, существует тѣсная зависимость от температуры; по мѣрѣ повышения ея, энергия процесса возрастает, а, начиная с известнаго предѣла, падает; другими словами, для этого катализа существует известный optimum темпе-

ратуры (между 65° и 85° С). Далее, авторъ убѣдился в томъ, что высокая температура влияет на растворъ коллоидальной платины ослабляющимъ образомъ, и тѣмъ выше температура, тѣмъ сильнее это влияние; причина заключается в переходѣ платины въ не-коллоидальное состояніе. Количество превращеннаго гремучаго газа въ единицу времени прямо пропорционально абсолютному количеству платины. Переходя къ объясненію наблюдаемаго катализа, *Ernst* придаетъ выдающееся значеніе явленію поглощенія газа платиной; по мѣрѣ повышения температуры, скорость поглощенія возрастаетъ, но вмѣстѣ съ тѣмъ количество поглождаемаго газа падаетъ; до известной температурной границы (65°—85° С) влияние первого рода беретъ перевѣсъ и катализ усиливается; за этой границей устанавливаются отношенія какъ разъ обратныя; въ каждый данный моментъ абсолютное количество превращенныхъ продуктовъ зависитъ отъ взаимнаго соотношенія этихъ противоположающихся влияній.

Euler ^{41) 42)} разсматриваетъ химическія реакціи вообще, какъ реакціи между ионами, и каталитически дѣйствующимъ считаетъ такое вещество, которое увеличиваетъ концентрацію дѣятельныхъ ионовъ.

Подобнаго воззрѣнія придерживается и *Cohen* ⁴³⁾. Между прочимъ, онъ считаетъ тростниковый сахаръ кислотой; въ кивертированномъ сахарѣ кислотныя свойства выражены рѣзче, тѣмъ въ тростниковомъ.

Ostwald ^{44) 45)}, отбывая существующія теоріи катализа, приходитъ къ заключенію, что ни одна изъ нихъ не можетъ дать удовлетворительнаго объясненія каталитическихъ явленій. Кроме того, ко всякой теоріи, по его мнѣнію, необходимо предъявлять требованіе, чтобы она вела къ правильной экспериментальной постановкѣ вопросовъ и къ

открытию тех законов, по которым известный процесс совершается. В этом отношении теория молекулярных колебаний, напр., обречена на бесплодность; она имѣет то особое преимущество—говорит *Оствальд*,— что вообще не может быть опровергнута, так как недоступна провѣркѣ⁴. Главныя стремленія въ области катализа, по мнѣнію *Оствальда*, должны быть направлены къ изученію процессовъ съ количественной стороны и къ открытію ихъ закономерности,—и тогда уже легче будетъ создать теорію катализа. Въ настоящее время, когда ученіе о каталитическихъ процессахъ основывается лишь на фактическомъ матеріалѣ, почти несистематизированномъ, нельзя предложить общей теоріи катализа. Въ частности, такъ называемый гетерогенный катализъ, т. е. имѣющій мѣсто при физически неоднородныхъ средахъ, повидному, поддается объясненію съ точки зрѣнія теоріи промежуточныхъ реакцій, протекающихъ съ участіемъ катализатора. *Оствальд* останавливается преимущественно на опредѣленіи понятія катализа. Согласно его воззрѣніямъ, всякій катализаторъ лишь ускоряетъ реакцію, идущія и безъ него, но иногда настолько медленно, что ходъ ихъ нельзя доказать нашими измѣреніями. Далѣе, имѣть такого химическаго процесса, который не могъ бы подвергаться каталитическому влиянію, и имѣть такого химическаго соединенія, которое не могло бы играть роли катализатора въ известныхъ случаяхъ. Помимо катализаторовъ, ускоряющихъ процессъ, *Оствальд* признаетъ существованіе замедляющихъ катализаторовъ. Всѣ явленія катализа онъ дѣлитъ на четыре группы; къ первой относятся „разрѣшенія“ (Auslösungen) въ пересыщенныхъ системахъ; вторая заключаетъ катализъ въ гомогенныхъ смѣсяхъ; третья—гетерогенные катализы; наконецъ, къ четвертой группѣ относятся явленія ферментации. „Катализаторъ—говорит *Оствальд*—является всякое вещество, ко-

торое, не входя въ конечный продуктъ химической реакціи, измѣняетъ ея скорость“.

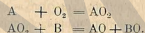
Точку зрѣнія *Оствальда* на роль катализатора раздѣляютъ *Мeyer* и *Ramm*⁴⁶. Гремучій газъ даетъ воду, начиная съ температуры 500° С. При обыкновенной температурѣ по предположенію этихъ авторовъ, процессъ идетъ настолько медленно, что доказать его не удастся. Въ продолженіи 2-хъ лѣтъ гремучій газъ не далъ образованія воды; *Berthelot* наблюдалъ 4 года, и съ тѣмъ же результатомъ. Авторы заключаютъ, что, быть можетъ, необходимы сотни и тысячи лѣтъ для наступленія этой реакціи при обыкновенной температурѣ. Къ рѣшенію поставленнаго вопроса они подошли инымъ путемъ. Именно, они наблюдали процессъ при 300° С и черезъ 63 дней могли доказать, что образовалось известное количество воды. Впрочемъ, авторы подчеркиваютъ, что безупречная постановка подобныхъ изслѣдованій очень трудна, и что результаты различныхъ опытовъ весьма неодинаковы; причину этого авторы видятъ въ каталитическомъ влияніи стѣнокъ сосудовъ, въ которыхъ находился гремучій газъ.

Профессоръ *Ипатьевъ*⁴⁷ на основаніи своихъ изслѣдованій не считаетъ возможнымъ согласиться со взглядами *Оствальда* на каталитическія явленія. Опредѣленіе катализатора, какъ ускорителя реакцій, медленно протекающей и безъ него, не объясняетъ нѣкоторыхъ фактовъ, полученныхъ авторомъ. Такъ, напр., „въ присутствіи глинозема, при температурахъ около 600° С, не получается совершенно альдегиднаго разложенія спирта; если бы эта реакція происходила при обыкновенной температурѣ съ чрезвычайною малою скоростью, то при высокой температурѣ должна была бы имѣть какую-нибудь измѣримую величину, а между тѣмъ мы не можемъ обнаружить и малѣйшихъ слѣдовъ альдегида. При такой температурѣ частица уже близка къ

разложению по различным направлениям, и если введенный катализатор сильно ускорит разложение по одному направлению, то почему же при таких благоприятных обстоятельствах не совершается разложение и по другому направлению, хотя бы в малых количествах? Кромѣ того, одно изучение скоростей каталитических процессов не может объяснить их причину и является лишь одним из способов наблюдения катализа. Проф. *Итаи* смотрит на катализатор, как на трансформаторъ энергій, и подходит къ этому опредѣленію путемъ слѣдующихъ разсужденій. „Опыты прямо указываютъ, что введеніе катализатора сильно понижаетъ температуру, при которой происходитъ каталитическая реакція, и на это обстоятельство должно быть обращено большое вниманіе. Разложение органическаго соединенія въ присутствіи катализатора требуетъ затраты тепловой энергій, несмотря на то, что нѣкоторыя реакціи, при этомъ происходящія, будутъ имѣть экзотермическій характеръ. Эта затрата энергій нужна и для того чтобы катализаторъ могъ проявить свое химическое вѣдѣніе на данное вещество, а, кромѣ того, она нужна и для того, чтобы сообщать импульсъ такимъ реакціямъ разложения. Одна затрата опредѣленного количества тепловой энергій, какъ показываютъ опыты, не вызываетъ разложения органическаго соединенія; гораздо меньшее количество затраченной тепловой энергій при участіи катализатора (неизмѣняемаго по окончаніи процесса) можетъ вызвать распадъ органическаго соединенія, а потому и является предположеніе, что катализаторъ трансформируетъ тепловую энергію въ химическую, что и обуславливаетъ ходъ процесса при гораздо низшей температурѣ“.

Engler и Herzog ⁴⁸⁾ для механизма окислительныхъ процессовъ считаютъ возможнымъ допустить слѣдующую схему. Положимъ, въ известной химической системѣ существуютъ

два тѣла А и В, изъ которыхъ В подлежитъ процессу окисленія, но само по себѣ окисляться не можетъ; тѣло А, наоборотъ, обладаетъ свойствомъ легко окисляться, присоединяя молекулярный кислородъ, и въ то же время подвергаться противоположному процессу—раскисненія. Такимъ образомъ, А является лишь передатчикомъ кислорода, а тѣло В его акценторомъ:



Всѣ, отмѣченныя нами, попытки объяснить каталитическія явленія можно свести въ слѣдующія основныя группы: теорія промежуточныхъ реакцій или переносителей; теорія, связывающая катализъ съ измѣненіемъ поверхностнаго натяженія реагирующихъ веществъ; теорія механическихъ колебаній; электрическая теорія; теорія, сводящая катализъ къ ускоренію медленнѣе идущихъ реакцій; теорія превращенія энергій. Приведемъ теперь теоріи, которыя были предложены для объясненія явленій ферментациі.

II. Теорія, предложенная для объясненія явленій ферментациі.

Возникновеніе понятія о „Fermentatiō“ теряется въ глубокой древности. Въ разныя времена съ этимъ понятіемъ связывали различныя процессы: или отождествляли его съ явленіями гнѣнія, или со всѣми процессами, протекающими съ отдѣленіемъ газовъ, или же видѣли въ ферментациі проявленіе жизненной силы, полной глубочайшей тайны. Наблюденія долгое время носили описательный характеръ, и объясненія процесса не создавались.

Первая попытка найти ключъ къ пониманію ферментативныхъ явленій связана съ именемъ *Stahl*'а ⁴⁹⁾. По его мнѣнію, ферментациія имѣетъ въ своей основѣ оживленное движеніе безчисленнаго количества частицъ, соединенныхъ

между собою определенным образом и состоящих изъ соли, масла и земли; другими словами, *Stahl* предложилъ теорію механическихъ колебаній.

Berzelius и *Mitscherlich*, создавшие ученіе о каталитическихъ и контактныхъ явленіяхъ, пытались объяснить ими и процессы ферментативные.

*Liebig*⁵⁰⁾, предложившій указанную нами теорію катализа, пытался съ ея точки зрѣнія объяснить также и ферментативные процессы. Ферментирующее вещество, обладающее особымъ колебаніемъ своихъ частицъ, распадается и увлекаетъ въ кругъ этого распада вещества ферментируемое. Распадающаяся бѣлковья вещества вызываютъ гнивіе, распадающаяся дрожжи — спиртовое броженіе; пенсия въ стадіи распада вызываетъ измѣненіе бѣлковъ. *Liebig* приводитъ изъ области химіи конкретный примѣръ, дѣйствующій ясною его точку зрѣнія. Азотная кислота не дѣйствуетъ на платину; сплавъ изъ серебра и платины въ азотной кислотѣ растворяется: объясненіе лежитъ въ томъ, что серебро, растворяясь (или распаваясь), переноситъ подобное дѣйствіе и на платину.

Аналогичный взглядъ мы встрѣчаемъ у *Cl. Bernard*⁵¹⁾. По его мнѣнію, всякое бѣлковое тѣло, распаваясь, можетъ дѣйствовать, какъ ферментъ.

*Schönbein*⁵²⁾ придаетъ большое значеніе тому обстоятельству, что всѣ каталитически дѣйствующія вещества, какъ-то: мизозинъ, эмульсинъ, дрожжи, диастаза обладаютъ способностью разлагать перекись водорода, а при нагреваніи теряютъ эту способность, вмѣстѣ съ этимъ исчезаютъ и ихъ специфическія свойства. На основаніи своихъ наблюденій *Schönbein* сводитъ всѣ ферментативные процессы на дѣятельность кислорода, на особое „аллотропное“ измѣненіе его состоянія.

Работы *Pasteur*'а, доказавшаго, что явленія броженія служатъ выраженіемъ жизненнаго акта дрожжей, а не слѣдствіемъ ихъ распада и перехода въ смерть, — перенесли вопросъ о ферментации изъ чисто химической области въ область интимныхъ химическихъ процессовъ кѣлѣки, и слѣдствіемъ его частью болѣе общаго вопроса о жизненныхъ явленіяхъ вообще.

Въ дальнѣйшемъ мы встрѣчаемся съ теоріей ферментации *Hüfner*'а⁵³⁾. Этотъ авторъ придаетъ большее значеніе внутримолекулярнымъ силамъ притяженія, которыя могутъ при извѣстныхъ условіяхъ распредѣлиться такимъ образомъ, что изъ двухъ рядомъ лежащихъ молекулъ одна остается неизмѣнной, а другая распадается; точно также изъ трехъ молекулъ двѣ могутъ распастись, а третья не измѣнится. Съ повышеніемъ температуры молекулярныя колебанія становятся болѣе оживленными, и ходъ каталитическаго (и ферментативнаго) процесса ускоряется. Отличіе каталитическихъ процессовъ отъ обыкновенныхъ химическихъ реакцій разложенія и двойного обмена заключается только въ томъ, что молекула катализатора не разрушается, а лишь испытываетъ особаго рода растяженіе. Въ этомъ и лежитъ причина неистощимой дѣятельности веществъ, являющихся катализаторами. Реакціи, протекающія каталитически, необратимы, и нѣкоторыя изъ нихъ вообще не могутъ происходить безъ участія катализаторовъ.

*Nasse*⁵⁴⁾, предложившій вполнѣ дѣйстви электрическую теорію ферментации, въ своей первой попыткѣ разсматриваетъ ферментативные процессы съ механической точки зрѣнія, напоминая точку зрѣнія *Liebig*'а и *Hüfner*'а. По его мнѣнію, ферментативный процессъ является сущностью жизненнаго процесса какъ всего организма, такъ и каждой отдѣльной кѣлѣчки. Поэтому, авторъ не вполне согласенъ со взглядомъ *Pflüger*'а, который считаетъ возможнымъ объяснить всѣ

жизненные явления с помощью внутримолекулярных движений, независимо от участия ферментов; наоборот, по мнѣнію *Nasse*, внутримолекулярныя колебанія ферментативно дѣйствующихъ веществъ и ихъ тѣсная зависимость отъ температурныхъ вліяній наиболѣе должны обращать на себя вниманіе при оцѣнкѣ и анализѣ жизненныхъ проявленій. Энергія ферментативныхъ процессовъ, незначительная во время покоя органа, способна въ высокой степени видоизмѣняться и возрастать въ зависимости отъ различнаго рода вліяній: температуры, присутствія другихъ молекулъ и т. д. или, наоборотъ, совершенно прекращаться и замрзать отъ дѣйствія различныхъ ядовъ. Въ частности, дѣятельность ферментовъ тѣсно связана съ наличностью различныхъ солей, и связь эта, по мнѣнію *Nasse*, специфична для каждаго фермента.

*Loew*²⁸⁾, какъ мы видѣли при обзорѣ теорій катализа, первоначально считалъ возможнымъ объяснить каталитическіе—а также ферментативные—процессы съ грубо механической точки зрѣнія, допуская разбиваніе однихъ молекулъ объ острия грани другихъ. Въ той же работѣ, однако, авторъ считаетъ возможнымъ допустить и другую причину для объясненія каталитическихъ процессовъ—а именно притяженіе. Мы знаемъ, говорить отъ химическихъ реакцій, производимыя свѣтомъ, электричествомъ и теплотой; почему же онѣ не могутъ быть произведены силой притяженія? Предположивъ, для случая катализа перекиси водорода платиной, что молекула перекиси водорода находится на равномъ разстояніи отъ молекулъ воды и платины, *Loew* путемъ простыхъ вычисленій приходитъ къ выводу, что молекула платины притягиваетъ молекулу перекиси водорода, съ силой приблизительно въ 8 разъ большей, чѣмъ вода, что и обуславливаетъ катализъ. Основываясь на этихъ предположеніяхъ, *Loew* объясняетъ и тотъ, на первый взглядъ зага-

дочный, случай, когда два изомерныхъ тѣла играютъ далеко не одинаковую роль въ каталитическихъ процессахъ; явлениями же притяженія можно объяснить и специфичность ферментовъ.

Въ слѣдующей своей работѣ *Loew*²⁹⁾, повидимому, покинуть грубо механическую точку зрѣнія и пытается выяснить основу ферментативныхъ дѣйствій съ помощью химіи. Ферменты,—альбуминоидная натура которыхъ, по его мнѣнію, несомнѣнна—въ отношеніи ихъ внутренняго движенія и способности къ различнаго рода реакціямъ представляютъ остатокъ силы, дѣйствующей въ живой протоплазмѣ. Въ самомъ дѣлѣ, между живой протоплазмой и ферментами существуетъ большая аналогія: одинаково разрушаются они высокой температурой, щелочами и кислотами, и если существуетъ въ этомъ отношеніи разница, то она лишь количественная и зависитъ отъ большей лабильности протоплазмы. Потеря ферментами ихъ активности основывается на переходѣ активнаго бѣлка или пептона въ инактивную форму. Ферменты образуются изъ протоплазмы путемъ деполимеризаціи протоплазматическаго бѣлка. Активный альбуминъ, получающійся отъ живой протоплазмы, согласно опредѣленіямъ *Loew*'а, содержитъ 12 альдегидныхъ группъ, если исходить изъ наипростейшей формулы; ферменты содержатъ меньше—всего 2 или 3—такихъ группы, ибо при ихъ образованіи имѣютъ мѣсто процессы самоокисленія и саморазложенія. При извѣстномъ расположеніи альдегидныхъ группъ достигается ихъ значительная подвижность, которой и можно приписать ферментативное дѣйствіе. При переходѣ ферментовъ въ неактивное состояніе эти альдегидныя группы уничтожаются. Пользуясь обычной методикой, мы не въ состояніи доказать присутствія указанныхъ альдегидныхъ группъ, ибо очень разведенный щелочной растворъ серебра оказывается не дѣйствующимъ, а концентри-

рованный разрушает ферментныя свойства. Къ рѣшенію вопроса о наличности альдегидныхъ группъ *Loew* подошелъ другимъ путемъ. Если прибавить одинаковое количество свѣже-осажденной окиси серебра къ прокипяченному и непрокипяченному раствору панкреатина и выдержать эти растворы въ теченіе нѣсколькихъ часовъ при 40°-вой температурѣ, то, по прибавленіи къ нимъ амміака, окажется, что дѣятельный ферментъ даетъ интенсивно темную окраску, а недѣятельный лишь незначительное побурѣніе. Впрочемъ, неизвѣстно, какіе результаты дадутъ при этомъ методѣ другіе ферменты. Изъ всѣхъ нейтральныхъ соединений органической химіи альдегиды отличаются именно тѣмъ, что обнаруживаютъ гидратирующее дѣйствіе, не испытывая сами по себѣ измѣненія. Такъ, напр., этиловый альдегидъ переводитъ цѣанъ въ оксамидъ—процессъ, очень напоминающій ферментативный.

Въ 1879-мъ году *Nageli* ⁴⁷⁾ предложилъ свою теорію для объясненія ферментативныхъ процессовъ. Теорія эта—механическая. Дѣйствіе ферментовъ состоитъ какъ въ притяженіи извѣстныхъ атомовъ субстрата, такъ и въ сообщеніи имъ опредѣленныхъ движеній. Допустимъ, что при температурѣ, еще не приводящей къ распаду, мы имѣемъ въ водномъ растворѣ смѣсь бѣлковъ и ферментовъ. Молекулы тѣхъ и другихъ находятся въ непосредственной близости. *Nageli* допускаетъ еще, что молекулы фермента колеблются съ особенной быстротой, и характеръ этихъ колебаній отличенъ отъ колебаній молекулъ субстрата; въ силу этого происходитъ, что ферменты переносятъ свой родъ движенія на субстратъ, усиливаютъ его молекулярныя колебанія и выводятъ ферментируемая вещества изъ того состоянія равновѣсія—обыкновенно неустойчиваго,—въ которомъ они находятся, т. е. производятъ распадъ подлежащихъ ферментаціи частицъ. Молекулы фермента, состоянія

которыхъ очень устойчиво, распаду не подвергаются, а лишь замедляютъ свои движенія отъ встрѣчи съ молекулами субстрата.

Tammann ^{58) 59)} смотритъ на ферменты, какъ на катализаторы. Однако, ферменты сильно отличаются отъ обычныхъ ускорителей гидrolитическихъ реакцій—щелочей и кислотъ,—не только по своимъ свойствамъ, но и по характеру и результатамъ своего дѣйствія. Въ то время, какъ всякая кислота—въ силу присутствія водороднаго іона—ускоряетъ гидrolитическую реакцію,—не всякій ферментъ дѣлаетъ то же самое. По характеру производимаго эффекта, ферменты стоятъ къ кислотамъ въ такомъ же отношеніи, какъ специальная группа реактивовъ къ общей группѣ. Другое отличіе дѣйствія кислотъ отъ ферментовъ заключается въ томъ, что въ позднѣйшія стадіи гидратации ферментныя реакціи протекаютъ медленнѣе, чѣмъ кислотныя; лишь при условіи весьма большихъ количествъ фермента, и особенно высокой температуры и въ теченіе недолгого времени ферментныя реакціи идутъ одинаково съ кислотными, т. е. протекаютъ съ опредѣленной скоростью. Причина этого явленія, по мнѣнію *Tammann*'а, заключается въ нестойкости ферментовъ, въ ихъ распадѣ на недѣятельные компоненты; процессъ распадѣнія при низкой температурѣ идетъ медленно, при высокой очень быстро; поэтому ферментныя реакціи имѣютъ неодинаковый ходъ въ зависимости отъ температуры, и температурный optimum своего дѣйствія; кромѣ того, ввиду перехода ферментовъ въ недѣятельную форму, ни одна реакція, ими производимая, не достигаетъ конца, а всегда остается большая или меньшая часть непревращенныхъ продуктовъ. Замедленіе и даже остановка ферментныхъ реакцій въ дальнѣйшія стадіи дѣйствія обуславливаются, кромѣ распадѣнія фермента, замедляющимъ влияніемъ образующихся продуктовъ (а также

развитіемъ бактерій, которыя могутъ разрушить ферментъ). Наконецъ, послѣднее, наиболѣе важное, отличие ферментныхъ гидролизомъ отъ кислотныхъ заключается въ томъ, что ферменты, по мѣрѣ теченія реакціи, все болѣе и болѣе переходятъ въ нецѣльное состояніе. Несмотря, однако, на всѣ эти отличія, ферменты являются, подобно кислотамъ, катализаторами гидролитическихъ реакцій.

Nasse ⁶⁰⁾ въ 1894-мъ году предложилъ электрическую теорію для объясненія ферментныхъ дѣйствій. Наслѣдую электрическую проводимость растворовъ фермента, соединеннаго со своимъ специфическимъ субстратомъ и, параллельно съ этимъ, растворомъ фермента, соединеннаго съ субстратомъ неспецифическимъ, *Nasse* пришелъ къ заключенію, что въ первомъ случаѣ электрическая проводимость больше, чѣмъ во второмъ; слѣдовательно, ферментъ во время своей специфической дѣятельности или самъ даетъ свободные іоны, или, вѣрнѣе, увеличиваетъ диссоціацію воды. Кроме того, если изслѣдовать электрическую проводимость растворовъ фермента некипяченнаго, т. е. дѣятельнаго, и фермента, разрушеннаго кипяченіемъ, то опытъ показываетъ, что и здѣсь существуетъ разница въ электрической проводимости этихъ растворовъ. На основаніи своихъ данныхъ, *Nasse* считаетъ возможнымъ объяснить гидролитическія ферментныя реакціи съ точки зрѣнія электролитической диссоціаціи.

Arthur ⁶¹⁾, подходя къ вопросу о способѣ дѣйствія ферментовъ, обращаетъ вниманіе на то обстоятельство, что и количественный и качественный химическій анализъ ферментовъ даютъ очень противорѣчивые результаты у различныхъ авторовъ; дагѣ, что ферменты могутъ дѣйствовать въ неограниченно малыхъ количествахъ такъ, по вычисленіямъ *Duchaux*, 1 часть химозина можетъ свернуть 250.000 частей казеина. *Arthur* приводит опыты *Wittich*'а и *Fick*'а ⁶²⁾.

Wittich показалъ, что, если подвергнуть діализу пепсинъ, то нельзя доказать его присутствія во внѣшнемъ сосудѣ; но если въ этотъ послѣдній помѣстить фибринъ, то пепсинъ діализуется и фиксируется фибриномъ; доказываются это тѣмъ, что стоитъ немного подкислить фибринъ, какъ онъ растворится. *Fick*, наблюдая ферментативные процессы свертыванія, пришелъ къ заключенію, что скорость ихъ чрезвычайно велика и что нельзя допустить повсемѣстнаго соприкосновенія и химическаго взаимодействія молекулы фермента съ молекулами субстрата. Поэтому *Fick* считаетъ возможнымъ объяснить явление свертыванія поступательнымъ молекулярнымъ движеніемъ, когда за распаденіемъ одной молекулы быстро слѣдуетъ распаденіе другой, третьей и т. д. Кроме этихъ опытовъ, *Arthur* приводитъ взглядъ *Jager*'а ⁶³⁾, который рассматривалъ ферменты какъ силы, аналогичныя съ электричествомъ, свѣтомъ и магнетизмомъ, а производимыя ферментами химическія реакціи объясняетъ физическими и механическими вліяніями фермента. Основываясь на этихъ данныхъ, *Arthur* приходитъ къ выводу, что ферменты—не вещества, а лишь извѣстное состояніе веществъ, подобно тому, какъ свѣтъ, теплота и электричество лишь свойства тѣла, а не сами тѣла. Указанное выше поглощеніе фибриномъ пепсина, совершенно аналогично, по мнѣнію *Arthur*'а, поглощенію свѣта сѣрнистымъ цинкомъ; при извѣстныхъ условіяхъ, а именно въ темнотѣ, поглощенная свѣтовая энергія можетъ освободиться точно такъ же, какъ при подкисленіи фибрина обнаруживается энергія ферментативная. Извѣстно, что всѣ ферменты безповоротно теряютъ свои свойства уже при температурахъ ниже 100°С: подобнымъ образомъ и магнитный брусокъ при температурѣ краснаго каленія размагничивается навсегда. Наконецъ, тѣ противорѣчія, въ которыя впадаютъ авторы, занимаясь химическимъ анализомъ ферментовъ, указываютъ

на то, что анализу подвергаются не ферменты собственно, а исключительно примеси к нимъ. На основаніи всѣхъ этихъ соображеній, *Arthur* считаетъ необходимымъ разсматривать ферменты, не какъ матеріальныя субстраціи, но какъ свойства этихъ матеріальныхъ субстраціи.

Moraweski ⁶⁴⁾ высказываетъ предположеніе, что ферменты представляютъ известные продукты расщепленія тѣхъ веществъ, на которые они дѣйствуютъ специфическимъ образомъ; процессы ферментации напоминаютъ фактъ большей растворимости соли при прибавленіи другой соли той же кислоты. *Moraweski* указываетъ на то обстоятельство, что во всѣхъ препаратахъ ферментовъ, даже самыхъ чистыхъ, непремѣнно присутствуютъ соли кальція.—и что эти послѣднія обладаютъ нѣкоторыми общими съ ферментами свойствами; такъ, при температурѣ кипѣнія воды, подобно бѣлкамъ, онѣ осаждаются, и вновь могутъ перейти въ растворъ при прибавленіи нейтральныхъ солей; температура 40°—60°С является наиболѣе благоприятной для ихъ растворенія; въ тѣхъ же температурныхъ границахъ лежитъ optimum дѣйствія ферментовъ.

Dubois ⁶⁵⁾ пришелъ къ заключенію, что при дѣйствіи ферментовъ имѣютъ мѣсто электрическія измѣненія среды, и что изслѣдованіе ферментативныхъ процессовъ съ этой точки зрѣнія приблизитъ насъ къ пониманію того, какимъ образомъ происходитъ разрушеніе сложныхъ органическихъ молекулъ съ помощью ферментовъ.

Chanot и Doyen ⁶⁶⁾ полагаютъ, что при процессахъ свертыванія крови со стороны ферментовъ не обнаруживается никакихъ электрическихъ явленій.

Согласно воззрѣніямъ *Donnat*'а ⁶⁷⁾, настоящіе коллоидальныя растворы обладаютъ обратимыми свойствами; такъ, напр., если произвести осажденіе коллоидовъ измѣненіемъ температуры или прибавленіемъ постороннихъ веществъ, то съ

приведеніемъ въ первоначальныя условія они вновь дадутъ коллоидальный растворъ. Однако, органическіе коллоиды не способны къ подобнымъ обратимымъ процессамъ; это объясняется, по мнѣнію *Donnat*'а, химическими измѣненіями, которыя испытываютъ чрезвычайно нестойкія, лабильныя органическія молекулы—и между прочимъ молекулы ферментовъ.

Ernst ⁶⁸⁾, считая ферментативные процессы процессами каталитическими и во многихъ отношеніяхъ аналогичными тѣмъ, которые производятся коллоидальными растворами металловъ, — въ то же время указываетъ на нѣкоторыя черты, отличающія эти процессы другъ отъ друга. Ослабленіе каталитической способности коллоидальныхъ металловъ имѣетъ въ своей основѣ осажденіе металла и уменьшеніе его поверхности, тогда какъ при переходѣ ферментовъ въ недѣйтельное состояніе играютъ роль, по мнѣнію *Ernst*'а, промежуточные продукты.

Noyes и Sammet ⁶⁹⁾ смотрятъ на каталитическія дѣйствія вообще—въ частности на ферментативныя—съ точки зрѣнія *Ostwald*'а, т. е. считаютъ катализаторы веществами, измѣняющими ходъ (ускоряющими или замедляющими) различныхъ химическихъ реакцій. Они различаютъ слѣдующіе типы катализаторовъ: 1) переносители (примѣръ: сѣрная кислота при образованіи этилового эфира); 2) вещества, дѣйствующія прикосновеніемъ и поглощеніемъ (примѣръ: платиновая чернь или животный уголь при разложеніи перекиси водорода); 3) вещества, дѣйствующія прикосновеніемъ и въ то же время электролитически (примѣръ: мѣдь при разложеніи бромистаго этилена цинкомъ); 4) вода (примѣръ: синтезъ йодистаго цинка съ помощью воды); 5) растворимые электролиты (примѣръ: сѣрная кислота при расщепленіи крахмала); 6) ферменты (примѣръ: химозинъ при реакціи переведенія коллоидальнаго казеина въ осадокъ);

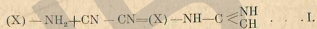
7) неорганические коллоиды (примѣръ: катализъ перекиси водорода коллоидальной платиной).

*Brown*⁶⁹⁾ изучалъ инверсію сахарозы съ помощью ферментовъ и пришелъ къ выводу, что эта реакція протекаетъ не одинаково по сравненію съ кислотной инверсіей. Известное равенство $K = \frac{1}{t} \log \frac{a}{a-x}$ годное для кислотныхъ гидролизовъ, гдѣ t —время, a —первоначальное количество сахарозы, x —количество превращенной сахарозы—это равенство для большинства случаевъ инверсій ферментами является непригоднымъ; скорѣе соответствуетъ фактамъ другая формула: $2R_t = \frac{1}{t} \log \frac{a+x}{a-x}$. Далѣе, *Brown* опредѣлялъ, сколько получается превращенныхъ продуктовъ, если при одномъ и томъ же количествѣ фермента измѣнять концентрацію сахарозы; онъ установилъ, что при концентраціяхъ отъ 5—40% количество превращенныхъ продуктовъ за одинъ и тотъ же промежутокъ времени остается одинаковымъ; но при слабыхъ концентраціяхъ—отъ 0,25—2% сахарозы количество превращенныхъ продуктовъ пропорціонально концентрации. На основаніи этихъ данныхъ *Brown* принимаетъ, что между ферментомъ и субстратомъ происходитъ нестойкое химическое соединеніе.

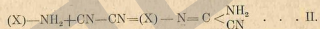
*Loose*⁷⁰⁾ въ 1904-мъ году дополняетъ и расширяетъ сказанную имъ раньше теорію ферментныхъ дѣйствій. Способность къ дѣятельности ферментовъ основывается на существованіи въ нихъ очень подвижныхъ и нестойкихъ химическихъ группъ, которыя превращаютъ тепловую энергію въ химическую. Эти дѣятельныя группы лабильны въ высокой степени и подъ вліяніемъ различныхъ факторовъ—кислотъ, щелочей, высокой температуры—переходятъ путемъ внутри-частичной перестановки атомовъ въ недѣятельную модификацію. Что касается вопроса о характерѣ

лабильныхъ группъ въ ферментахъ, то первоначальный взглядъ автора сводился къ тому, что лабильныя группы имѣютъ альдегидный характеръ. Однако, отъ этого взгляда онъ отказался, главнымъ образомъ потому, что разведенный щелочной растворъ серебра, прибавленный къ ферментамъ при обыкновенной температурѣ, не даетъ выдѣленія металла. Скорѣе можно допустить наличность въ высокой степени подвижныхъ и способныхъ къ различнымъ реакціямъ кетонныхъ группъ. На это предположеніе наводятъ слѣдующіе факты. Синильная кислота является сильнымъ ядомъ для ферментовъ; она же, какъ известно, способна вступать въ кетонами въ химическую связь, очень нестойкую, которая легко можетъ быть нарушена. Кромѣ того, такія соединенія какъ гидразинъ, метиль—гидразинъ, фениль—гидразинъ и гидросиламинъ уже въ очень разведенныхъ растворахъ образуютъ съ кетонными группами гидразины и оксимы, т. е. связываютъ ихъ; если допускать въ ферментахъ наличность кетонныхъ группъ и считать ихъ основой ферментнаго дѣйствія, то естественно ожидать, что къ упомянутымъ соединеніямъ ферменты должны быть особенно чувствительны и въ присутствіи ихъ терять свои специфическія свойства. Дѣйствительно, опыты подтвердили это предположеніе. Такъ, разведенный нейтральной реакціи растворъ гидросиламина при дѣйствіи на диастазу въ теченіе сутокъ лишаетъ ее специфическихъ свойствъ. Подобнымъ же образомъ удалось привести каталазу въ теченіе 18 часовъ въ недѣятельное состояніе. 1%-ый гидразинъ убиваетъ при 40°C въ теченіе 2-хъ часовъ пениль, трисинъ и диастазу, въ теченіе 8 часовъ эмульсинъ. Метиль-гидразинъ въ 0,032%-омъ растворѣ убиваетъ при 40°C трипинъ, въ 0,32%-омъ растворѣ диастазу въ теченіе 1 часа; въ 0,64%-омъ растворѣ—пениль въ теченіи 2-хъ час. Такимъ образомъ характерное дѣйствіе приведенныхъ соединеній на кетоны совпадаетъ съ характернымъ дѣйствіемъ

на ферменты: отсюда ясно, по мнѣнію *Loew's*, наличность въ ферментахъ кетонныхъ группъ. Свободныя адегидныя группы въ ферментахъ отсутствуютъ; однако нельзя отрицать возможности существованія полимеризованныхъ альдегидныхъ группъ, которыя съ указанными основаніями въ реакцію не вступаютъ. Обыкновенные кетоны, какъ известно, вещества не особенно легко измѣняющіяся, поэтому ихъ наличностью нельзя всецѣло объяснить лабильность ферментныхъ свойствъ, столь рѣзко выраженную. *Loew* полагаетъ, что одновременно съ кетонными группами въ ферментахъ присутствуютъ группы амидныя, которыя тоже отличаются большой подвижностью. Путь для доказательства амидныхъ группъ въ ферментахъ подобенъ предыдущему, т. е. вещества, связывающія амидныя группы, должны лишать ферменты специфическихъ свойствъ. Въ самомъ дѣлѣ, если дѣйствовать при обыкновенной температурѣ 0,04°/о-мъ воднымъ растворомъ свѣже-полученнаго дициана на дрожжи, то по истеченіи 24-хъ часовъ они совершенно утрачиваютъ способность къ броженію. Однако, пепсинъ, трипсинъ, эмульсинъ и диастаза къ дициану сравнительно очень мало чувствительны; какъ объяснить этотъ фактъ? Быть можетъ, амидныя группы въ этихъ ферментахъ отсутствуютъ? *Loew* полагаетъ, что при дѣйствіи дициана могутъ образоваться новыя амидныя группы, которыя компенсируютъ потерю, обусловленную связываніемъ ихъ, такъ что наряду съ равенствомъ:

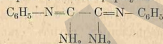


можетъ существовать равенство другое:



За вѣроятность такого предположенія говорятъ опыты *Thomann's* ¹⁾, который доказалъ, что при дѣйствіи дициана на

анилинъ образующійся цианъ-анилинъ соответствуетъ какъ разъ второй изъ приведенныхъ формулъ:



Кромѣ дициана, характерное дѣйствіе на амидныя группы оказываетъ разведенная азотистая кислота, при чемъ, если дѣло идетъ о соединеніи жирнаго ряда, то образовавшаяся диазо-группа переходитъ, выделяя азотъ, въ гидроксильную. При опытахъ съ вліяніемъ азотистой кислоты на ферменты необходимо считаться съ вреднымъ дѣйствіемъ кислотности самой по себѣ, безотносительно къ характеру кислоты, и для рѣшенія вопроса приходится производить контроль въ въ указаномъ направленіи. Точно поставленные опыты *Aso*,— въ которыхъ исключено дѣйствіе кислотности самой по себѣ параллельными опытами съ другими кислотами: азотной и сѣрной,—привели къ очень интереснымъ результатамъ: азотистая кислота въ 0,02°/о-мъ растворѣ убиваетъ пепсинъ въ теченіи 1 часа, при 40° С. въ 0,05°/о-мъ растворѣ убиваетъ трипсинъ тоже черезъ 1 часъ, въ томъ же 0,05°/о-мъ растворѣ убиваетъ при 18° эмульсинъ въ теченіи 15 часовъ. Что касается диастазы, то она для такихъ опытовъ не пригодна, ибо ко всякой кислотѣ является чувствительной въ чрезвычайной степени. Приведенныя данныя говорятъ по мнѣнію *Loew's* за специфическое окисляющее дѣйствіе азотистой кислоты на амидныя группы. Кромѣ дициана и азотистой кислоты, въ большей или меньшей степени связываютъ амидныя группы альдегиды; опыты съ вліяніемъ формальдегида на различные ферменты вполнѣ подтверждаютъ теоретическія предположенія, и всѣ изслѣдованные въ этомъ направленіи ферменты оказываются чувствительными къ формальдегиду въ большей или меньшей мѣрѣ. На основаніи всѣхъ приведенныхъ соображеній приходится заклю-

чить, что в ферментной частице существует особое подвижное состояние атомов, которое можно назвать кинетической химической энергией; по мере повышения температуры колебания подвижных групп становятся все оживленнее, однако до известной температурной границы, при которой и за которой наступает внутричастичное перемещение специфически-ферментивно действующих групп, и фермент навсегда теряет свои свойства. Та температура, при которой наблюдается потеря ферментных свойств, бывает различна в зависимости от реакции среды, присутствия и количества солей и т. д. Механизм ферментативного действия *Loew* представляет собой таким образом, что колеблющиеся атомы ферментной частицы переносят свою энергию на подлежащая распаденію тела, сравнительно непрочная, в которых и происходит то или другое изменение.

*Le Play*⁷²⁾ полагает, что для ферментов является наиболее характерным их коллоидальное состояние—а оно лежит в основе биологии всех клеток—и что ферменты приближаются по своим свойствам к живой материи, особенно в том отношении, что подвержены безпрерывному и при том необратимому превращению.

*Szoyek*⁷³⁾ смотрит на ферменты как на катализаторы живой клетки, обладающие коллоидальной натурой, и считает их лишь ускорителями медленно протекающих и без всякого влияния реакций.

Тех же взглядов придерживается *Леонович*⁷⁴⁾.

*Oppenheimer*⁷⁵⁾ считает ферменты носителями своеобразной формы энергии, которая порождается живой протоплазмой, но может проявиться и вне ее. Эта энергия—ближе неизвестная—в состоянии освободить скрытую потенциальную энергию химического вещества и превратить ее в другую форму—напр., тепловую; при этом действии химическое вещество изменяется таким образом, что сумма

образовавшихся веществ обладает меньшей потенциальной энергией, чем первоначально взятое. Фермент во время процесса ферментации остается незамышимым и действует специфично, на вещества строго определенного структурного и стереохимического характера.

*Euler*⁷⁶⁾ считает ферменты, равно как и неорганические катализаторы, ускорителями медленно протекающих реакций; ускорение достигается благодаря тому, что ферменты повышают электрическую проводимость среды, умножая число активных молекул. Ферментативные процессы имеют некоторые отличия от процессов, идущих под влиянием неорганических катализаторов; одно из этих отличий касается соотношения между количеством субстрата и фермента: так, если взять субстрат в избытке, то скорость реакции приблизительно пропорциональна концентрации фермента; если же взять в избытке фермент, то скорость оказывается пропорциональной концентрации субстрата.

Согласно взгляду *Bokorny*⁷⁷⁾, ферменты и протоплазма фактически являются катализаторами и по действию во многом приближаются к тонкораздробленным металлам. Однако, представляется спорным, можем ли мы называть коллоидальные растворы металлов неорганическими ферментами: особенно резко различия ферментов и неорганических катализаторов в отношении их к ядам; так, напр., „отравленная“ платина может быть приведена в первоначальное состояние обработкой горячей серной кислотой; ферменты же, лишенные тем или другим путем своих специфических свойств, ни при каких условиях вернуть их не могут;—в этом отношении ферменты сходны с плазмой.

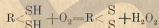
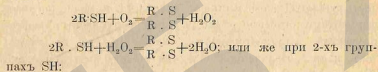
*Senter*⁷⁸⁾ для большинства ферментативного протекающих процессов принимает, что роль фермента сводится к ускорению медленно идущих химических пре-

вращений. Однако, реакция разложения перекиси водорода с помощью каталазы должна быть отнесена в разряд гетерогенных реакций и объяснена с точки зрения явления диффузии.

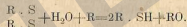
*Chodat*⁷⁹⁾ высказал электрическую теорию ферментных действий. Ферменты увеличивают количество ионов воды, соединяются с ними и переносят на субстрат, в силу чего и происходит гидратация.

По мнению *Schade*⁸⁰⁾, катализ представляет собою явление настолько широко распространенное, что едва ли найдется химическая реакция, которая не могла бы подвергнуться каталитическому влиянию. Ферменты *Schade* считают специальными катализаторами процессов органической жизни.

*Heffter*⁸¹⁾ высказал взгляд, что в процессах окисления и восстановления, протекающих в организме, весьма важную роль играют легко подвижные водородные атомы. Автор полагает, что таким именно свойством обладают водородные атомы группы или групп SH в некоторых биологических телах и формулирует процесс в вид следующей схемы:



Конечные продукты окисления в присутствии воды могут быть восстановлены и вновь проявить свое действие.



*Agazzotti*⁸²⁾, наблюдая процессы ферментации в ультрамикроскоп, заметил, что в начале действия фермента

происходит особого рода агглютинация подлежащих распаду веществ, следовательно увеличение их концентрации: к этому именно и сводится роль ферментов во всех процессах, вызываемых ими.

*Bredig*⁸³⁾ ⁸⁴⁾ ⁸⁵⁾, выработавший метод приготовления водных растворов коллоидальных металлов с помощью сильного электрического тока, в ряд работ изучил их каталитическое действие на различных химических реакции, главным образом на катализ перекиси водорода. В его опытах мы находим точное количественное выражение энергии наблюдаемых процессов и их зависимость от ряда условий, влияющих на катализ. На основании своих исследований *Bredig* пришел к заключению, что между действием металлов в коллоидальном состоянии и действием ферментов существует чрезвычайно далекая идущая аналогия, которая позволяет назвать водные растворы коллоидальных металлов „неорганическими ферментами“ или „моделями ферментов“. Аналогия видна из следующих сопоставлений:

1) Неорганизованные ферменты, подобно неорганическим, в физическом отношении являются коллоидами, благодаря чему обладают огромной поверхностью действия и резко выраженной способностью к поглощению или связыванию других веществ.

2) Коллоидальные металлы, взятые даже в очень малых количествах, при известных условиях могут вызвать, подобно ферментам, значительные химические превращения. Так, напр., раствор коллоидальной платины по расчету 1 грамм-атом на 70 миллионов литров воды обладает значительным катализирующим действием на перекись водорода, если даже эта последняя берется в количестве, превосходящем в миллион раз количество катализатора.

3) Подобно ферментам, коллоидальные растворы спо-

способны производить следующие химические превращения: окислять алкоголь в уксусную кислоту кислородом воздуха; разлагать муравьинокислый кальций на углекислый кальций, углекислоту и водород; разлагать щавелевую кислоту; разлагать перекись водорода; окрашивать гваяковую настойку в синий цвет; превращать гидрохинон в хинон.

4) Къ реакции среды коллоидальные металлы, подобно ферментам, чувствительны въ высокой степени; такъ, напр., прибавленіе небольшого количества щелочи весьма повышаетъ катализъ перекиси водорода коллоидальной платиной; подобныя отношенія существуютъ для фермента эмульсина: благоприятное дѣйствіе щелочи повышается до известнаго предѣла, а съ дальнѣйшимъ прибавленіемъ падаетъ; при большомъ количествѣ щелочи каталитическій процессъ прекращается. Прибавленіемъ кислотъ въ значительной степени уменьшается активностъ коллоидальныхъ растворовъ металловъ, а равнымъ образомъ и нѣкоторыхъ ферментовъ: такъ, напр., *Jacobsen*⁸⁶⁾ доказалъ, что прибавленіе $\frac{1}{100}$ -ой части нормальнаго раствора HCl къ эмульсину замедляетъ нормальный катализъ перекиси водорода въ 6 разъ (съ 10 до 60 минутъ).

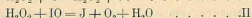
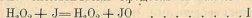
5) Подобно дѣйствію неорганизованныхъ ферментовъ, дѣйствіе коллоидальныхъ металловъ стоитъ въ тѣсной зависимости отъ температуры. Чѣмъ выше температура, тѣмъ энергичнѣе протекаетъ катализъ,—однако, до известнаго предѣла, переходы котораго, энергія процесса падаетъ. Слѣдовательно, здѣсь существуетъ аналогичный съ ферментами optimum температурнаго вліянія. Кроме того, температура кипѣнія воды (а также болѣе высокая) вліяетъ на каталитическую способностъ коллоидальныхъ металловъ сильно ослабляющимъ образомъ, при чемъ разъ утраченныя свойства теряются навсегда: и здѣсь полная аналогія съ ферментами.

6) Съ особенной ясностью выступаютъ аналогія между коллоидальными растворами металловъ и ферментами въ отношеніи ихъ къ различнымъ „ядамъ“. Нѣкоторыя химическія соединенія, взятые даже въ ничтожномъ количествѣ, способны ослаблять каталитическія реакціи въ чрезвычайно рѣзкой степени или же совершенно прекращать ихъ. Растворъ синильной кислоты по расчету 1 граммъ—молекула на 1 миллионъ литровъ уже ясно замедляетъ катализъ перекиси водорода коллоидальной платиной; болѣе того, каталитическое дѣйствіе 0,0000103 грамма платины понижается на половину растворомъ HCN концентраціи 1 граммъ—молекула на 20 миллионъ литровъ (такой растворъ содержитъ въ 1-мъ литрѣ 0,0014 миллиграмма HCN). Съ другой стороны, известно, что и ферменты къ дѣйствію сильной кислоты чрезвычайно чувствительны. Достаточно уже небольшихъ количествъ этого яда, чтобы уничтожить въ ферментахъ способностъ катализировать перекись водорода; потеря этой способносты наблюдается у многихъ органическихъ веществъ, вытяжекъ различныхъ тканей, и между прочимъ у кровяныхъ шариковъ. Эти аналогіи идутъ дальше. Растворы коллоидальныхъ металловъ, потерявшие свои каталитическія свойства подъ вліяніемъ синильной кислоты, спустя болѣе или менѣе продолжительное время вновь ихъ приобретаютъ, т. е. какъ-бы „выздоровливаютъ“ отъ „паралича“, вызваннаго „отравленіемъ“: подобнымъ образомъ „выздоровливаютъ“ и ферменты. Уже *Schönbein*⁸⁷⁾ замѣтилъ, что свѣжіе листья (*Leontodon* и другихъ), продержанные въ теченіе нѣсколькихъ секундъ въ парахъ синильной кислоты, теряютъ свою способностъ катализировать перекись водорода и производятъ поспѣннѣе гваяковой настойки: но стоитъ полежать имъ на воздухѣ, какъ утраченныя способностъ приобретается вновь. *Bredig* изслѣдовалъ съ точки зрѣнія ядовитаго дѣйствія на катализъ цѣлый рядъ ве-

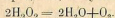
щество и по степени ядовитости разбить их на несколько групп. Сильными ядами оказались: HCN, KCN, J₂, HgCl₂, H₂S, CO, Ph, PhH₃, AsH₃, CS₂. Яды средней силы — анилин, гидроксиланин, бром, хлористо-водородная, щавелевая, мышьяковистая кислоты, амилнитрит. Еще слабее — фосфорная кислота, пирогаллол, пнтробензол, фтористоводородная кислота, фтористый аммоний, азотистокислый натрий. Почти индифферентными оказались — разведенный раствор бертолетовой соли, амидовый и этиловый алкоголи, эфир, глицерин, скипидар, хлороформ. Наконец, муравьиная кислота, гидрацин и разведенная азотная кислота оказались ускоряющим образом действующими на катализ. „Выздоровление“ коллоидальных растворов наступает не при всех „ядах“: оно имеет место при „отравлении“ синильной кислотой, окисью углерода, фосфором, фосфористым водородом, гидросилианином. Причины ядовитого действия на коллоидальную платину всех указанных соединений различны. Действие восстанавливающих веществ естественнее всего свести на связывание кислорода, который — как можно предполагать — находится или в непрочном химическом соединении с платиной или адсорбирован ею. С другой стороны, поверхность платины может быть химически или механически загрязнена, т. е. покрыта слоем неактивного вещества, напр., серой из H₂S, каломелем или ртутью из сулема. Далее, при действии таких веществ, как HCN и HCl, платина химически связывается и растворяется. Наконец, в некоторых случаях имеет место образование сложных соединений, как-то H₂ PtCu, и т. п. Таким образом, необходимо признать, что аналогия между коллоидальными растворами металлов и ферментами очень велика. Чем больше и подробнее изучаются каталитические реакции вообще, тем яснее представляются детали таких реакций и их особен-

ности, еще более сближающая их с неорганизованными ферментами. Даже такие стороны ферментного действия, как их специфичность, находят в области катализа свои аналоги. Так, напр., известно, что окисляющее действие полифромовой кислоты на иодистый водород катализируется перекисью водорода в гораздо большей степени, чем другими веществами. Присутствие даже следов воды сильно ускоряет окисление окиси углерода, между тем как некоторая другая реакция сильно замедляется; напр., если действовать концентрированной серной кислотой на щавелевую, то эта последняя распадается на воду, углекислоту и окись углерода по равенству: $(CO_2H)_2 = CO_2 + CO + H_2O$; достаточно присутствия 0,01% воды, чтобы замедлить ход этого разложения; при 0,1% воды разложение совершается лишь в течение многих часов. Далее, каталитическое действие некоторых соединений может до известного времени не проявляться и находится в своего рода зимнем состоянии и лишь под влиянием другого вещества обнаруживается каталитическая сила: таким именно образом влияет коллоидальное золото или щелочь на хлористую ртуть или марганец — здесь, по мнению *Bredig'a* наблюдается полная аналогия с действием открытой *Павловым* киназы на пнкреатической фермент. Наконец, открытый *Bredig'ом* периодически пульсирующий катализ перекиси водорода поверхностью ртути чрезвычайно напоминает явление пульсации вообще. Подобно тому, как пульсация вырванных органов или пульсация вакуолей может весьма сильно изменять свой характер и свою силу под влиянием различных физических и химических агентов, точно также каталитические реакции можно регулировать и видоизменять весьма различным способом, и получать путем графического изображения различные кривые, вплоть до „pulsus intermittens“.

Что касается теории каталитического и ферментного действия, то *Bredig* склоняется к предположению о промежуточных реакциях, при помощи которых, по его мнению, совершается всякий каталитический процесс. Так, напр. разложение перекиси водорода в присутствии иодистого калия можно схематически представить таким образом:



суммируя эти процессы, получим:



Loew ⁸⁸⁾ в 1908-м году возвращается к высказанной им раньше теории ферментного действия. Подобно тому, как нет жизни без организации—пишет он—так же нет ее и без диализных белковых тел плазмы. Химическая энергия отличается от тепловой значительно большей амплитудой атомных колебаний; поэтому химическая энергия скорее тепловой вызовет химическое изменение различных веществ. Сюда относится приведенный уже выше, случай перехода циапа в оксамид в присутствии этилового альдегида: без этого последнего реакция не происходит. Инулин дает фруктозу лишь при действии высокой температуры; инулаза уже при обыкновенной температуре производит ту же реакцию. Подвижное состояние атомов в частицах и ее определенная стереохимическая конфигурация—вот что лежит в основе ферментных свойств. „Объемное колебание“ атомов кислорода в альдегидных или кетонных группах относится к объемному колебанию в группах гидроксильных, как 12,2:7,8 Объемное колебание азота в группах циапа приблизительно в 7 раз превосходит колебание азота в группах амидной.

Fischer ⁸⁹⁾ на основании своих многолетних исследований (1884—1908) пришел к заключению, что при объяснении ферментного действия необходимо считаться с сфе-

рической конфигурацией как ферментов, так и веществ, подлежащих ферментации. По мнению *Fischer'a*, ферменты должны подходить к субстрату, как ключ к замку, т. е. ферментировать могут только такие вещества, которые имеют конфигурацию, родственную с субстратом. Так, инвертин расщепляет α -метил-гликозид, а на β -метил-гликозид не действует, хотя этот последний кислотами расщепляется легче своего изомера; ясно, что инвертин и α -метил-гликозид имеют ассиметрический атом углерода и родственные группы, его связывающие.

Спрашивается, — какой же общий вывод мы можем сделать из всего вышесказанного? Нашла ли проблема катализа свое решение? Объяснены ли ферментативные процессы?—Нет. Мы до сих пор не можем понять того внутреннего химизма, который лежит в основе всех каталитических явлений, и все наши знания в этой области носят преимущественно описательный характер. Между тем, значение процессов, протекающих каталитически и вызываемых одним „присутствием“ тела, по мере их изучения, возрастает все больше и больше; катализ дает совершенный способ для решения подчас сложнейших химических задач и для осуществления таких превращений, для которых потребовалась бы или весьма высокая температура или чрезвычайно сильное давление. Если катализ играет громадную роль в химических процессах мертвой природы, то значение его в жизненных явлениях приобретает характер безусловности и необходимости; катализ—это способ и орудие жизни. С этой точки зрения вопрос о ферментах, т. е. катализаторах организованных тканей, является насущным вопросом биологии, как науки о жизни; нет сомнения в том, что ферментативные процессы представляются сложней обыкновенных каталитических, так как мы не знаем, что

такое ферментъ по химическому характеру, тогда какъ громадное большинство другихъ катализаторовъ являются веществами известными вплоть. Кромѣ того, при ведемъ своемъ сходствѣ съ обыкновенными катализаторами ферменты, повидимому, имѣють и рѣзкія отличія: такова ихъ ясно выраженная специфичность и чрезвычайно легкая и безповоротная разрушаемость высокой температурой; въ этомъ отношеніи аналогіи съ обыкновенными катализаторами очень мало, и онѣ не идутъ настолько далеко, чтобы уничтожить грань, существующую между катализаторами матеріи живой и неживой.

3. Литературныя данныя о вліяніи температуры на ферменты.

Ферменты—термолабильныя вещества, т. е. ихъ дѣятельность чрезвычайно тѣсно связана съ той или иной температурой, а равнымъ образомъ и ихъ свойства могутъ подья вліяніемъ претерпѣть сильныя измѣненія. При температурахъ низкихъ скорость ферментативныхъ процессовъ ничтожна, затѣмъ по мѣрѣ повышенія температуры увеличивается и, проходя черезъ maximum, вновь уменьшается съ тѣмъ, чтобы при 70°—80°С уничтожиться совершенно. Согласно общепринятымъ взглядамъ, всякій ферментъ въ водномъ растворѣ навсегда лишается своихъ специфическихъ свойствъ уже при температурахъ, лежащихъ ниже 100°С—и лишь нѣкоторые оксидазы могутъ, не разрушаясь, переносить кратковременное кипяченіе. Подобное отношеніе къ температурѣ считается въ высшей степени характернымъ для представленія о ферментахъ, и литературныя данныя по этому вопросу настолько же многочисленны, насколько и однообразны. Для ферментовъ растительнаго происхожденія температура разрушенія или „смерти“ указывается близкой къ 80°С, для ферментовъ животныхъ—близкой къ 70°С.

Уже *Payen* и *Persoz* ⁸⁾ ⁹⁾, открывшіе диастазу, а также *Schwann* ¹⁵⁾, открывшіи пепсинъ, указали на то, что при кипяченіи ферментъ лишается своихъ свойствъ навсегда.

Schönbein ³⁷⁾ доказалъ, что всѣ вещества, заглагающія перекись водорода, какъ-то мизозинъ, эмульсинъ, дрожжи, диастаза, а также вытяжки различныхъ растительныхъ и животныхъ тканей теряютъ эту способность при нагреваніи до 100°С.

Paschutin ³⁶⁾ на основаніи своихъ опытовъ приходитъ къ заключенію, что достаточно трехъ-минутнаго нагреванія слюны при 73° С, чтобы лишить ее ферментативныхъ свойствъ, такъ же дѣйствуетъ получасовое нагреваніе при 69°—70° С; растительная диастаза уничтожается при доведеніи до 100° С; концентрированныя растворы фермента, по сравнению съ разведенными, менѣе чувствительны къ дѣйствію высокой температуры; ферментативный процессъ идетъ и при 0° С, но въ 6½ разъ медленнѣе, по сравнению съ температурой optimum'a. Въ работѣ этого автора мы находимъ указанія на болѣе раннюю литературу по разбираемому вопросу. Такъ, по мнѣнію *Kühne*, ферментъ слюны замѣтно ослабляется уже при t° 40° С. *Gautier* считалъ разрушающей температуру значительно ниже 100° С. Согласно взгляду *Liebig'a* всѣ ферменты при доведеніи до 100° С безповоротно разрушаются. *Schiff* думалъ, что слюна теряетъ свои свойства лишь при полу-минутномъ кипяченіи, и переноситъ безъ вреда менѣе продолжительное.

Markwort и *Hufner* ³¹⁾ убѣдились, что эмульсинъ въ растворѣ чистаго глицерина переноситъ 60-ти градусную температуру въ продолженіи 15 минутъ; при высшей температурѣ начинается разрушеніе фермента, а при 90° С оно происходитъ чрезвычайно быстро.

Grätzner ³²⁾ высказываетъ взглядъ, что неорганизованные ферменты во время своей специфической дѣятельности под-

вергаются разрушению, хотя и неполному; температура, при которой происходит ферментативный процесс, иногда менять направление этого процесса: так, птлинин, действуя на крахмал при низкой температурѣ, дает больше декстриновъ, чѣмъ сахара, при высокой—наоборотъ.

Hippe ⁹⁵⁾ полагаетъ, что концентрированные растворы ферментовъ, по сравненію съ разведенными, болѣе стойки къ высокой температурѣ; однако и они ни въ какомъ случаѣ не выносятъ t° 100° С. Разведенные растворы лишаются своихъ свойствъ между 70—90° С. Въ сухомъ состояніи ферменты относятся къ температурѣ иначе. Если подвергнуть нагреванію въ продолженіи $\frac{1}{4}$ часа пепсинъ—при 169°—170° С. мальдиастазу—при 158° С, трипсинъ—при 159°—162° С, то ферментативныя свойства останутся сохраненными почти въ полной мѣрѣ.

Красковъ ⁹⁴⁾ доказалъ дѣйствіе слюны на крахмалъ при 0° С.

По *Lintner*'у ⁹³⁾ диастаза при доведеніи до 70° С теряетъ значительную часть своей ферментативной силы. Помимо гидролитическаго, авторъ считаетъ характернымъ для диастазы ея окислительное свойство, ея способность производить пенины въ гваяковой настойки; другіе ферменты, какъ химозинъ, слюна, пепсинъ и инвертинъ подобнымъ свойствомъ не обладаютъ. Окислительная способность остается даже послѣ кратковременнаго кипяченія, когда диастатическая совершенно пропадаетъ.

Въ другой своей работѣ *Lintner* ⁹⁶⁾, между прочимъ, обсуждаетъ вопросъ,—дѣйствительно ли нагреваніе фермента вмѣстѣ съ субстратомъ до пѣкоторой степени ослабляетъ разрушающее вліяніе температуры на ферментативныя свойства. На основаніи своихъ опытовъ авторъ приходитъ къ заключенію, что защитительная роль субстрата не доказана и легко объясняется болѣе сильнымъ дѣйствіемъ фермента при той температурѣ, при которой обыкновенно изучается

это свойство. (55°—60° С). Обыкновенная температура, по мнѣнію *Lintner*'а, не ослабляетъ фермента, быть можетъ потому—какъ предполагаетъ авторъ,—что его опыты были непродолжительны (ферментъ подвергался дѣйствію обыкновенной температуры не болѣе сутокъ).

Въ работахъ *Ferni* ⁹⁷⁾ ⁹⁸⁾ ⁹⁹⁾ ¹⁰⁰⁾ мы встречаемся съ вопросомъ о вліяніи различныхъ температуръ на ферменты. По его мнѣнію, растворы трипсина ослабляются не только болѣе высокой, но термостатной (около 40° С) и даже обыкновенной температурой. Въ сухомъ состояніи трипсинъ очень стойко переноситъ высокія температуры. Такъ, при полу-часовомъ нагреваніи при 130° С онъ теряетъ $\frac{1}{3}$ своей первоначальной силы, при 140° С—приблизительно половину, при 155° С— $\frac{2}{3}$ ея, и лишь при 160° С разрушается весь. Если взять въ качествѣ растворителя не воду, а другія жидкости, то ферменты становятся менѣе чувствительны къ высокой температурѣ. Такъ, напр., пепсинъ и трипсинъ въ продолженіи 1 часа выносятъ t° 80° С, если они растворены въ хлороформѣ, амилловомъ алкохолѣ или бензолѣ; въ эфирномъ растворѣ они при этихъ условіяхъ разрушаются. Антиферменты еще болѣе чувствительны къ температурѣ, чѣмъ ферменты; такъ, плазма изъ крови собаки, нагрѣтая до 50° С, теряетъ всѣ свои антиферментативныя свойства.

Gorini ¹⁰¹⁾ показалъ, что культура *bacil. Prodigiosus* выделяетъ свертывающій молоко ферментъ, который отличается сравнительно очень большой стойкостью. Напр., онъ не разрушается при 1 часовомъ нагреваніи при 60—65° С и даже при 70—80° С. Однако, стоитъ довести растворъ этого фермента до 100° С, какъ свойства его утрачиваются навсегда.

По *Tammann*'у ⁹⁸⁾ ферменты выше температуры optimum'a своего дѣйствія подвергаются разрушенію, которое тѣмъ значительнѣе, чѣмъ выше температура.

Nasse ⁹⁰⁾, *Arthur* ⁹¹⁾ въ своихъ работахъ указываютъ

на разрушающее действие температуры кипения на растворы ферментов.

По *Moraczewsk*'ому ⁶⁴⁾ трипсин ослабляется даже 35°-ной температурой; большинство же ферментов начинают терять в своей силе при температурѣ выше 40° С. Во всякомъ случаѣ, приходится сказать, что температура optimum'a действия ферментовъ близка къ температурѣ начинающагося разрушения.

Pugliese ¹⁰²⁾ изслѣдовалъ вліяніе различныхъ температуръ на пepsинъ, мальць-и такадиастазу. Онъ указываетъ, между прочимъ, что нефилътрованная слюна лишается своихъ свойствъ при 75° С, филътрованная—при 70° С, а разведенная въ 10 разъ—при 60° С. Прибавленіе различныхъ солей и пептона повышаетъ разрушающую температуру. При продолжительномъ нагрѣваніи (при t° 36°, 43° и 55° С) значительной разницы въ указанныхъ ферментахъ не обнаружилось.

Beijerinck ¹⁰³⁾, изслѣдуя пятнистую болѣзнь листьевъ табака, убѣдился, что она вызывается какимъ-то веществомъ съ характеромъ фермента (*contagium vivum fluidum*). Этотъ контактій, раздѣляя общія ферментамъ свойства, уже при 90° С подвергается разрушенію.

Camus и *Gley* ¹⁰⁴⁾ изучили ферментативныя свойства вытяжки изъ предстательной железы ежа и убѣдились, что доведеніе до 90° С не уничтожаетъ присущихъ ей свойствъ, и лишь при 100° С они пропадаютъ.

На потерю ферментативныхъ свойствъ при высокой температурѣ указываетъ также *Loewe* ⁷⁹⁾.

Issajew ¹⁰⁵⁾ своими опытами доказалъ, что мальць-оксидаза въ растворѣ чистаго глицерина переноситъ очень сильныя температурныя вліянія. Такъ, послѣ 10-ти и 15-ти минутнаго нагрѣванія при 100° С мальць-оксидаза сохраняетъ не только свои окислительныя свойства, но и способность

производить нѣкоторыя „красочныя“ реакціи. Болѣе того, окислительная способность у мальць-оксидазы остается въ большей или меньшей степени даже послѣ 1/2 часовъ нагрѣванія на водяной банѣ при 100° С и 1/2 часового въ автоклавѣ при 1 1/2 атмосферахъ.

Cramer и *Bearn* ¹⁰⁶⁾ пришли къ заключенію, что пепсинъ лишается своихъ свойствъ не только при 100°-ной, но даже при 60°-ной температурѣ; однако характеръ происходящихъ измѣненій въ томъ и другомъ случаѣ представляется не одинаковымъ.

По *Roger*'у ¹⁰⁷⁾, слюна теряетъ свои свойства при 10—15-ти минутномъ нагрѣваніи при 85° С.

Изслѣдуя амилазу животнаго происхожденія, *Allaria* ¹⁰⁸⁾ убѣдился, что minimum ея действия—при 0° С, maximum—при 38° С, температура разрушенія—70° С.

Согласно даннымъ *Pailhade*'а ¹⁰⁹⁾ растительный ферментъ *Philothion* даже послѣ нагрѣванія до 100° С не теряетъ способности переводить сѣру въ сѣроводородъ.

По *Klemper*'у ¹¹⁰⁾, optimum действия амилитического фермента, добываемаго изъ овса, лежитъ между 40—70° С. Этотъ ферментъ сравнительно очень стоекъ, такъ какъ разрушается лишь между 90—95° С.

По *Slosse* и *Limbosch*'у ¹¹¹⁾ optimum действия слюнной амилмальтазы 50—58° С; температура разрушенія—70°—74° С.

Shaklee ¹¹²⁾ доказалъ, что пепсинъ постепенно утрачиваетъ свои свойства даже при такой сравнительно невысокой температурѣ, какъ 37° С. Черезъ двое сутокъ, действия этой температуры, пепсинъ сохраняетъ лишь около 1/2 своей первоначальной силы.

Очень выносливымъ по отношенію къ температурѣ оказался по изслѣдованіямъ *Gerber*'а ¹¹³⁾ сычужный ферментъ нѣкоторыхъ крестоцвѣтныхъ растений. Optimum его створаживающаго действия на молоко лежитъ около 85° С.

По Euler'y ¹¹⁴) температуры optimum'a дѣйствія ферментовъ лежатъ, въ среднемъ, между 37° — 53°C, температуры разрушенія или „смерти“ между 60° — 75°C. Нѣкоторыя оксидазы разрушаются только при 80° — 90° ¹¹⁵).

Многочисленныя данныя по вопросу о влиянii температуры на ферменты мы находимъ у Samyely ¹¹⁶). Птицинъ въ свободномъ отъ субстрата состоянii разрушается между 58 — 70°C. Инвертинъ дрожжей имѣетъ температуру разрушенія въ границахъ между 51° — 55°C, или даже 45° — 50°C, если эта послѣдняя температура дѣйствуетъ продолжительное время. Температура разрушенія пенина въ нейтральномъ растврѣ — при 55°C, въ кислотъ (0,2% HCl) — при 65°C. Энтерокиназа разрушается послѣ 3-хъ часового нагрѣванія при 67°C. Эреpsинъ теряетъ свои свойства, начиная съ 7° 59°C. Уреаза — ферментъ, расщепляющій мочевицу на углекислоту и амiакъ — въ водномъ растврѣ при 50°C приходитъ въ бездѣятельное состоянiе. Салицилаза разрушается лишь при 100°C, тирозиназа — между 50° — 70°C; каталаза — ферментъ, расщепляющій перекись водорода на водородъ и кислородъ — между 72° — 75°C.

Behrens ¹¹⁷) доказалъ, что выжатый сокъ, а также экстрактъ изъ листьевъ табака обладаетъ какъ пероксидазными, такъ и оксидазными свойствами. Пероксидаза табака отличается большою стойкостью: доведеное до 100°C ее не уничтожаетъ, и лишь при болѣе долгомъ кипяченii она теряетъ свои свойства. Оксидаза болѣе чувствительна къ температурнымъ влiянiямъ.

Aso ¹¹⁸) въ органахъ нѣкоторыхъ растений обнаружилъ много различныхъ ферментовъ съ характеромъ оксидазы, при чемъ отмѣчаетъ существованiе ихъ зимогеннаго состоянiя. Ферментъ, производящii красное окрашиванiе гваякола, по отношенiю къ температурѣ оказывается болѣе стойкимъ, чѣмъ обыкновенная оксидаза и пероксидаза.

Gerber ¹¹⁹) обнаружилъ въ нѣкоторыхъ растенияхъ присутствiе смѣшаннаго фермента, который при однократномъ доведенii до 100°C не теряетъ своихъ специфическихъ свойствъ.

Кульсонъ ¹²⁰) доказалъ, что пероксидаза и оксидаза изъ рѣдки, утративши свои свойства послѣ кипяченiя, при стоянii на воздухѣ вновь ихъ прiобрѣтаютъ; это наблюдается не только при дѣйстви 100°-ныхъ, но даже 115°-ныхъ температуръ.

Приведенныя литературныя данныя убѣждаютъ въ томъ, что разрушающее дѣйствiе высокихъ температуръ на водные растворы ферментовъ — фактъ, подтвержденный множествомъ разъ и чрезвычайно характерный для представленнаго о ферментахъ вообще. Согласно современнымъ воззрѣнiямъ ¹¹⁴) ¹¹⁶) потеря специфическихъ свойствъ ферментомъ, его „обмирание“ или „смерть“ приводится въ аналогию съ процессомъ коагуляции бѣлка, при чемъ тѣ различiя, которыя иногда наблюдаются въ отношенii къ температурѣ у различныхъ препаратовъ одного и того же фермента, объясняются или „индивидуальностью“, или соудствiемъ постороннихъ примѣсей. Лишь нѣкоторыя оксидазы — ферменты, занимающiе до сихъ поръ нѣсколько особое положенiе въ ряду другихъ — оказываются болѣе стойкими по отношенiю къ температурѣ.

Систематическiя изслѣдованiя Кульсона, произведенныя въ лабораторii проф. Н. П. Кракова, обнаружили у оксидазы рѣдки очень интересныя и своеобразныя свойства — свойства регенераци послѣ кипяченiя. Регенерация эта наступаетъ въ большей или меньшей степени, черезъ болѣе или менѣе долгое время, въ зависимости отъ продолжительности и силы нагрѣванiя, отъ чистоты препаратовъ и другихъ влiянii. Это новое свойство ферментовъ заставило

измѣнить общепринятый взглядъ на разрушающее дѣйствіе высокихъ температуръ, по крайней мѣрѣ для оксидазъ.

Зародился новый вопросъ—насколько общимъ является это свойство и распространяется ли оно на ферменты наиболѣе распространенные — гидролитическіе. По предложенію глубокоуважаемаго профессора *Николая Павловича Кравкова*, я занялся вопросомъ о вліяніи различныхъ—главнымъ образомъ высокихъ — температуръ на диастатическій ферментъ.

Собственныя изслѣдованія.

Прежде, чѣмъ перейти къ фактической сторонѣ дѣла, сдѣлаемъ необходимыя замѣчанія по поводу методики, которой мы пользовались. Продажные препараты ферментовъ растворялись въ водѣ и осаждались 75° алкоголемъ; затѣмъ подвергались промыванію на фильтрѣ алкоголемъ той же крѣпости, послѣ него 96°-нымъ, наконецъ эфиромъ и высушивались или въ термостатѣ при 37°—40°С или въ эксикаторѣ надъ сѣрной кислотой. Главною цѣлью подобной обработки было освобожденіе препаратовъ отъ сахара (молочнаго), который обычно прибавляется при фабрикаціи ферментовъ для большей ихъ сохранности. Мы получали бѣловатый порошокъ, почти или совершенно растворяющійся въ водѣ, нейтральной реакціи, обыкновенно не возстановляющій *Fehling*'овой жидкости.

Главные результаты получены нами съ препаратомъ Така-диастазы фирмы *Parke-Davis*; препаратъ этотъ отличается большой силой своего дѣйствія, и, послѣ указанной обработки, при дѣйствіи высокихъ температуръ не даетъ осадковъ. Фирма *Parke-Davis* была настолько любезна, что доставила значительное количество фермента, уже освобожденнаго отъ сахара фабричнымъ путемъ.

Кромѣ Така-диастазы, мы работали съ диастазой *Pankreatin*'а фирмы *Parke-Davis* и съ *Maltin*'омъ фирмы *Merk*'а.

Какъ растворитель для ферментовъ, мы примѣняли исключительно дистиллированную воду; концентрація растворовъ и ихъ количества были очень различны, смотря по цѣлямъ,

которая мы преслѣдовали. Объектомъ дѣйствія ферментовъ служилъ водный отваръ рисоваго крахмала различныхъ разведеній; онъ приготовлялся постепеннымъ нагрѣваніемъ на мѣдной сѣткѣ до кипѣнія.

Ходъ гидратации изучался отчасти поляризацией и по реакціи съ йодомъ, а главнымъ образомъ посредствомъ титрованія образовавшагося сахара (и декстриновъ?) *Fehling*'овой жидкостью; индикаторомъ служилъ 10% водный растворъ желѣзисто-синеродистаго калия или, согласно предложенію *Mengherl'a*¹²³⁾, фильтровальная бумага *Schleicher'a* № 589, пропитанная этимъ растворомъ. Такъ какъ намъ интересны были, главнымъ образомъ, сравнительныя цифры, то выборъ титровальнаго—а не вѣсового—метода, какъ быстро производимаго и въ общемъ точнаго, является совершенно понятнымъ.

При наблюденіи ферментативныхъ процессовъ намъ пришлось считатьъ съ возможностью участія въ нихъ микроорганизмовъ. Какъ извѣстно⁷⁵⁾, микроорганизмы вырабатываютъ различные ферменты, примышительно къ средѣ, на которой произрастаютъ, и въ частности диастатическіе. Для насъ вопросъ этотъ былъ важенъ потому, что во многихъ случаяхъ мы имѣли дѣло съ ферментами слабо дѣйствующими, и нѣкоторыя наблюденія надъ ферментативными процессами были продолжительны—въ теченіе дней и недѣль; если видъ раствора вънутрь подозрѣніе на развитіе микробовъ, мы совершенно не считались съ данными подобныхъ наблюденій. Кратковременныя наблюденія, продолжавшіяся нѣсколько часовъ, мы производили безъ прибавленія постороннихъ веществъ, къ которымъ прибѣгали во всѣхъ другихъ случаяхъ. Изъ антисептическихъ средствъ мы пользовались главнымъ образомъ салициловой кислотой и толуоломъ. Первая сильно замедляетъ ходъ ферментативныхъ процессовъ, но зато обладаетъ антисептическими

свойствами въ значительной степени; толуоль, особенно рекомендованный *E. Fischer*'омъ, оказался наиболее пригоднымъ веществомъ, повидимому, совершенно не измѣняя качества и силы ферментации и сохраняя растворы долгое время безупречными въ бактериальномъ отношеніи.

Чтобы сдѣлать условія нашихъ наблюденій аналогичными во всѣхъ случаяхъ, а выводы изъ полученныхъ цифръ правильными, мы обратили вниманіе на возможность образования при высокихъ температурахъ растворимаго стекла, которое, измѣняя реакцію среды, могло вліять такъ или иначе на диастатическій процессъ. Обыкновенно мы пользовались пробирками одинаковаго диаметра, при чемъ изъ нихъ, которая, послѣ получасоваго нагрѣванія съ водой при 100°С въ Коховскомъ паровомъ аппаратѣ давали хотя бы несильную окраску съ феноль-фталеномъ, т. е. растворимую щелочь,—для опытовъ не примѣнялись.

Профильтрованные растворы ферментовъ разливались поровну въ одинаковыя пробирки и подвергались дѣйствію той или иной температуры. Для полученія высокихъ температуръ мы пользовались кипящей водяной баней, Коховскимъ аппаратомъ и автоклавомъ. Черезъ извѣстное время кипяченія пробирки охлаждались до определенной температуры, и въ нихъ вливался въ одинаковомъ количествѣ свѣже-приготовленный и охлажденный отваръ рисоваго крахмала. Гидратация происходила или при обыкновенной температурѣ 17°—20°С, или въ термостатѣ 38°—39°С, или въ ледяной водѣ.

Производя качественныя пробы на сахаръ съ помощью жидкости *Fehling*'а, мы на первыхъ же порахъ убѣдились въ томъ, что водные растворы Така-диастазы послѣ 5-ти минутнаго и даже 15-ти минутнаго нагрѣванія при 100°С оказываются въ той или другой степени дѣйствующими на крахмалъ, при чемъ гидратация наступаетъ не сразу, а че-

режь больше или меньше долгое время, смотря по продолжительности нагревания, количеству фермента и т. д. В этих первоначальных попытках подойти к решению вопроса мы не применяли никаких антисептических средств, чтобы наблюдать процесс в чистом виде; в параллель с прокипяченным ферментом мы ставили пробирки с крахмалом и водой:—эти контрольные пробирки не давали нам ни следа сахара даже после долгого стояния в термостате (напр. 1—2 сутки). Однако, подобный контроль, где вместо прокипяченного фермента бралась вода, казался нам не вполне удовлетворительным потому, что растворы ферментов являются удобной средой для развития микроорганизмов, тогда как сам по себе крахмал остается долгое время неизменным в своих свойствах. Это возражение, правда, можно было делать лишь в тех случаях, где гидратация обнаруживалась через долгое время напр. сутки, и совершенно отпадало в опытах, дававших гидратацию через 3—4—5 часов. Для того, чтобы изучать ферментативный процесс неограниченное время, мы прибегали к указанным выше антисептическим средствам, вполне ясно сознавая, что такой прием является неизбежным злом, внося в ферментацию постороннее и вредное в смысле замедления влияния; и в этом случае гидратация крахмала после 5-ти и даже 15-ти минутного кипячения фермента обнаруживалась с полной очевидностью.

Итак, на первых же порах мы имели дело с фактом, стоявшим в полном противоречии с установившимися взглядами: для объяснения его возможно было сделать два совершенно различных предположения. Во-первых, по аналогии с оксидазой ридьки, можно было думать, что Така-диастаза, утратившая свои специфические свойства при 100°-ной температур, после охлаждения через тот или другой промежуток времени, в большей

или меньшей степени вновь их приобретает, т. е. обладает способностью к регенерации. Второе предположение, хотя и менее вероятное, но все же возможно, заключалось в том, что при действии высокой температуры оставалась неразрушенной какая-нибудь очень небольшая или даже минимальная часть фермента, быть может более стойкая, чем главная его масса, и что она-то и обнаруживала то действие, которое мы наблюдали.

Скажем заранее, что выяснение этих вопросов представляло большие затруднения, причина которых стала ясна для нас лишь в конце наших наблюдений. Мы станем излагать факты в той последовательности, как они наблюдались в действительности и, чтобы быть правильно понятыми, отметим те сомнения и ряд вопросов, которые возникали при отыскании получившихся цифр.

Первоначально мы сделали первое из указанных предположений, что Така-диастаза, потерявшая свои свойства при кипячении, обладает способностью регенерации. Путь для доказательства подобного предположения заключался в следующем. Один и тот же раствор фермента в одинаковом количестве разливался в пробирки и подвергался одному и тому же температурному влиянию—положим медленному нагреванию на водяной бане до кипения в ней воды и с этого момента еще 5 минут. Пробирки охлаждались до обыкновенной температуры. К части из них прибавлялся в определенном количестве отвар крахмала и через известное время производилось количественное определение образовавшегося сахара. Другая часть пробирок оставалась стоять без крахмала в том же расчете, что фермент регенерируется, т. е. появляется вновь. Через известное время в эти последние пробирки прибавлялся тот же отвар крахмала, в том же количестве, гидратация шла при тех же температурных условиях и титро-

вапия производились через такое же время, как и в первом случае. Зато оставалось только сравнить цифры этих двух титрований,—и вопрос рѣшался в ту или другую сторону. Всѣ многочисленныя попытки, которыя мы дѣлали въ этомъ направленіи, первоначально оказались неудачными въ томъ смыслѣ, что прокипяченный ферментъ при стояніи, самъ по себѣ, не усиливался, а, наоборотъ, ослаблялся еще болѣе, по сравнению съ ферментомъ не стоявшимъ и соединеннымъ съ крахмаломъ тотчасъ послѣ кипяченія и охлажденія; при этомъ, ослабленіе это было тѣмъ значительнѣе, чѣмъ выше была температура: при 37°—40°С значительнѣе, чѣмъ при обыкновенной, при этой послѣдней значительнѣе, чѣмъ при температурѣ близкой къ 0°С. Такимъ образомъ, первоначально мы не могли дать прямого доказательства того, что ферментъ, потерявшій свои свойства при кипяченіи, по охлажденіи черезъ извѣстное время ихъ приобретаетъ вновь, въ той или другой степени, т. е. регенерируется.

Поэтому, для объясненія установленныхъ фактовъ мы обратились къ другому предположенію, вѣроятность котораго казалась намъ, однако, сомнительной. Мы предположили именно, что имѣемъ дѣло съ очень стойкимъ ферментомъ, который утрачиваетъ всѣ свои специфическія свойства лишь при длительномъ дѣйствіи высокихъ температуръ, и что при указанныхъ температурныхъ условіяхъ нашихъ опытовъ оставалась неразрушенной и способной къ дѣятельности какая-нибудь незначительная часть этого фермента. Чтобы рѣшить этотъ вопросъ, мы поступали слѣдующимъ образомъ. Прокипяченный и охлажденный растворъ фермента соединялся съ определеннымъ количествомъ отвара крахмала, и черезъ извѣстные промежутки времени титрованиемъ опредѣлялось количество образовавшагося сахара. Параллельно съ этимъ, брались количества некипяче-

наго фермента въ 100, 1000 и 10.000 разъ меньшія взятаго для кипяченія, и изучалось ихъ дѣйствіе на крахмалъ при совершенно одинаковыхъ съ первымъ случаемъ условіяхъ. Хотя намъ было неизвѣстно, какая часть фермента не разрушилась высокой температурой, все таки, путемъ соответственнаго разведенія растворовъ, мы могли хотя бы приблизительно приравнять эту неизвѣстную величину заранѣе определенной. Систематически произведенныя наблюденія убѣдили насъ въ томъ, что не можетъ быть рѣчи объ остаткахъ фермента. Именно, если первая стадія гидратаціи крахмала, которую производитъ кипяченый ферментъ, по цифрамъ очень сходна, напр., съ $\frac{1}{1000}$ -ой некипяченого, то въ дальнѣйшемъ эти два процесса идутъ особыми путями, и кипяченый даетъ значительно высшія цифры. Напротивъ напр. $\frac{1}{100}$ -ая часть некипяченого фермента гидратируетъ крахмалъ первоначально значительно сильнѣе, чѣмъ ферментъ, подвергнутый нагреванію, но потомъ этотъ послѣдній, все болѣе и болѣе усиливая свою дѣятельность, даетъ цифры одинаковыя съ $\frac{1}{100}$ -ой некипяченого и, во многихъ случаяхъ, даже болѣе высокія. Эти процессы чрезвычайно удобно наблюдать, даже продолжительное время, при низкой температурѣ 1°—3° С, безъ прибавленія антисептическихъ средствъ.

Другой способъ наблюденія состоялъ въ слѣдующемъ. Положимъ, мы имѣемъ 10 пробирокъ съ прокипяченнымъ въ теченіи 5-ти минутъ ферментомъ. Къ 5-ти изъ нихъ мы прибавляемъ только крахмалъ, къ остальнымъ и крахмалъ и салциловую кислоту (0,2%-мъ растворѣ, объемъ на объемъ). Одновременно съ этимъ мы имѣемъ 10 пробирокъ съ некипяченнымъ ферментомъ, количество котораго въ 100 разъ меньше взятаго для кипяченія; къ 5-ти изъ нихъ прибавимъ только крахмалъ, къ остальнымъ и крахмалъ и салциловую кислоту. Всѣ растворы заключаются въ термо-

стаг $t^{\circ} 38^{\circ}$ — 39° С. Затѣмъ производится титрованіа: положимъ черезъ каждый часъ берется по одной пробиркѣ безъ салициловой кислоты съ кипяченнымъ ферментомъ и $1/100$ -ой частью некипяченнаго, и опредѣляется сахаръ; пробирки съ салициловой кислотой титруются черезъ сутки, двое, трое, и т. д.—въ томъ расчетѣ, что за это время ферментъ произведетъ все дѣйствіе, на которое онъ способенъ въ присутствіи салициловой кислоты. Результаты подобныхъ опытовъ слѣдующіе: $1/100$ -ая часть некипяченнаго фермента начинаетъ свое дѣйствіе значительно ранѣе подвергнутаго кипяченію и вообще даетъ несравненно болѣе высокія цифры: это безъ салициловой кислоты; съ другой стороны, эта же $1/100$ -ая часть фермента, въ присутствіи салициловой кислоты или совершенно не даетъ гидратациі крахмала, или даетъ лишь трудно измѣримыя при титрованіи слѣды сахара. Кипяченый ферментъ, наоборотъ, сперва долго остается безъ дѣйствія, затѣмъ дѣйствіе его медленно начинается; конечный же эффектъ его дѣйствія въ присутствіи салициловой кислоты—во много разъ превосходитъ $1/100$ -ую некипяченнаго, взятую для сравненія. Однимъ словомъ, данная, полученная съ помощью этихъ двухъ методовъ, съ большей или меньшей очевидностію говорили противъ предположенія объ остаткахъ фермента.

Исключивъ предположеніе объ остаткахъ фермента и не получивъ, въ то же время, очевидныхъ данныхъ въ пользу прямой регенерациі диастаза, мы склонны были думать, что полной аналогіи между регенерацией оксидазы рѣдки и регенерацией диастатическаго фермента не существуетъ, и что послѣдній требуетъ какихъ-то особыхъ условій для своей регенерациі—быть можетъ присутствія крахмала—или какъ специфическаго субстрата, или какъ коллоидальнаго вещества вообще.

Намѣчая вкратцѣ дальнѣйшій ходъ нашихъ наблюденій

скажемъ нѣсколько словъ о такъ называемой „стойкости“ оксидазы. Какъ извѣстно, оксидирующие ферменты менѣе чувствительны къ температурнымъ вліяніямъ и иногда сохраняютъ свои свойства послѣ доведенія до 100° С или даже послѣ нѣкотораго нагреванія при этой температурѣ. Для изслѣдованія стойкости поступають, естественно, такимъ образомъ, что измѣнившійся растворъ фермента нагревають, охлаждаютъ и изслѣдуютъ на оксидирующую способность съ помощью одного изъ предложенныхъ реактивовъ—напр. гваяковой настойки; и если происходитъ реакція окисленія, то заключаютъ, что ферментъ „стоетъ“ и что по крайней мѣрѣ часть его осталась неразрушенной. Какъ велика эта часть и почему она, находясь въ растворѣ и подвергаясь одинаковымъ для всего раствора температурнымъ вліяніямъ, осталась дѣятельной—этимъ вопросомъ не задаются, подтверждая лишь фактъ наличности фермента самъ по себѣ. Если болѣе внимательно изслѣдовать такъ называемую „стойкость“ у оксидазы resp. пероксидазы Maltin'a, то дѣло представится въ слѣдующемъ видѣ. Водный растворъ этого фермента, подвергнутый дѣйствію кипящей водяной бани въ теченіе 7, 8 и даже 10-ти минутъ и охлажденный, оказывается способнымъ окислять гваяковую настойку въ присутствіи перекипя водорода, т. е. даетъ, хотя и слабую, пероксидазную реакцію; если такой же растворъ нагревать дольше—напр. 12 минутъ, то, по охлажденіи, онъ на гваяковую настойку не дѣйствуетъ, и оксидаза и пероксидаза кипяченіемъ уничтожились. Но черезъ нѣсколько: 5—10 минутъ или $1/3$ часа (смотря по препарату фермента и силѣ нагреванія) стоянія при обыкновенной температурѣ наступаетъ регенерация пероксидазы (а также оксидазы, но въ болѣе слабой степени), и по мѣрѣ дальнѣйшаго стоянія сила регенерациі возрастаетъ. Если нагреваніе производятъ не на водяной банѣ (температура въ заключенныхъ въ нее

Именно, čímь меньшими количествами диастазы дѣйствовать на опредѣленное количество крахмала, čímь медленнѣе и постепеннѣе начинается гидратация, хотя бы конечный результатъ ея былъ полнымъ и одинаковымъ съ большими количествами диастазы, дѣйствующей почти моментально; въ зависимости отъ соотношенія фермента и субстрата, можетъ потребоваться отъ нѣсколькихъ минутъ до нѣсколькихъ часовъ времени, когда невозможно бываетъ съ положительностью сказать, идетъ гидратация или нѣтъ, присутствуютъ или отсутствуютъ ферментъ въ данномъ растворѣ. Если взять сравнительно большую дозу фермента, при обыкновенной температурѣ очень быстро дѣйствующую на опредѣленное количество крахмала, и слѣдить за эффектомъ дѣйствія равныхъ ей дозъ при болѣе высокихъ температурахъ за короткій промежутокъ времени, то можно замѣтить, что до извѣстныхъ предѣловъ процессъ усиливается, а затѣмъ начинаетъ ослабѣвать; начиная съ температуры растворовъ, близкой къ 80°C, гидратация крахмала не обнаруживается не только въ первые моменты, но и по истеченіи получаса, часа и болѣе; однако, на основаніи только что сказаннаго, нельзя дѣлать выводъ объ отсутствіи фермента въ этомъ послѣднемъ случаѣ, ибо не исключена возможность присутствія очень малыхъ дозъ диастазы, способныхъ дѣйствовать лишь чрезвычайно медленно.

Не удовлетворяясь такимъ неопредѣленнымъ отвѣтомъ на поставленный нами вопросъ о границѣ дѣятельности гесп. бездѣятельности диастазы, мы прибѣгли къ другому методу. Мы существеннымъ образомъ измѣнили соотношеніе между ферментомъ и субстратомъ; именно, при прежнемъ, значительномъ количествѣ фермента мы стали брать очень небольшие, почти минимальныя, количества крахмала (напр., 1 каплю отвара 1 : 200), и слѣдили за ходомъ процесса по реакціи съ іодомъ при разнообразныхъ температурахъ фер-

мента. Пользуясь такимъ простымъ методомъ, мы могли очень быстро и легко обнаружить самыя незначительныя количества фермента, и реакція эта по своей чувствительности въ извѣстныхъ случаяхъ оказалась мало уступающей реакціи на оксидазу. Если, напр., прибавить при обыкновенной температурѣ 1 или 2 капли отвара крахмала 1 : 200 къ 5 куб. сант. раствора фермента 1 : 1000, то черезъ нѣсколько секундъ, почти моментально получимъ безцвѣтную реакцію съ іодомъ; то же самое происходитъ съ ферментомъ, быстро нагрѣтымъ до 40°, 50°, 60°, 65°, 70°, 75°C—и, конечно, охлажденнымъ для пробы съ іодомъ—; но когда мы имѣемъ ферментъ, доведенный до 80°C и выше, то этого не происходитъ; напротивъ, не только черезъ нѣсколько секундъ, но и черезъ много минутъ дѣйствія 80°-наго фермента на 1—2 капли отвара крахмала—и охлажденіи—мы получаемъ ясную крахмальную реакцію съ іодомъ. Очевидно, что начиная съ т° 80°C или остается какая-нибудь трудно измѣримая часть фермента или онъ весь уничтожается, какъ таковой. Насколько чувствителенъ этотъ способъ обнаруженія диастазы, можно судить изъ того, что 5 куб. сант. раствора 1 : 100.000 даетъ эритродекстриновую реакцію черезъ 10—20 секундъ, черезъ 1—2 минуты реакція становится безцвѣтной; 5 куб. сант. раствора 1 : 1.000.000 даетъ эритродекстриновую реакцію черезъ 1—3 минуты, безцвѣтную—черезъ 4—6 минутъ.

Составляя всѣ эти данныя, мы вправѣ были заключить, что при доведеніи раствора диастазы до 80°C (и выше) она становится бездѣятельной, подобно оксидазѣ при этихъ условіяхъ, и что первоначально установленный фактъ ферментации послѣ кипяченія не могъ объясняться какими-либо остатками фермента, а обратнымъ процессомъ, регенерацией ферментныхъ свойствъ; всякое другое заключеніе изъ приведенныхъ данныхъ было бы нелогичнымъ.

Несмотря, однако, на целый ряд косвенных доказательств регенерации диастатических свойств, вопрос о возможности прямой регенерации этого фермента, самого по себе, в данном растворе, — оставался открытым до тех пор, пока мы не получили таких препаратов Така-диастазы, которые оказались способными к подобного рода прямой регенерации и подтвердили все выводы, сделанные до сих пор.

Сделав предварительные замечания об общей методике, примененной нами, и намечив вкратце ход нашей мысли и наших исследований, перейдем к подробному описанию опытного материала. Для удобства разобьем его на несколько групп в зависимости от того, к решению какого вопроса направлен тот или другой ряд опытов; где будет необходимо, сделаем замечания о специальной методике, к которой мы прибегали.

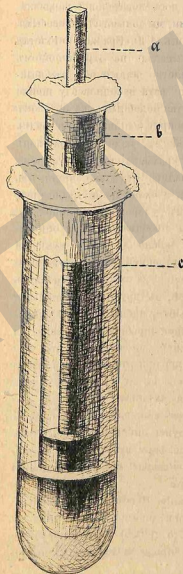
Доказательство ферментации после действия высокой температуры различной силы и продолжительности.

В этой части своей работы мы намерены представить ряд цифровых данных, доказывающих с большей или меньшей очевидностью, что водные растворы Така-диастазы, подвергнутые кипячению на водяной бане, в Коховском паровом аппарате и в автоклаве при 115°C, и соединенные после охлаждения с отваром рисового крахмала, через тот или другой промежуток времени производить его гидратацию.

Этот факт настолько шель в разрез с установившимися взглядами на разрушаемость ферментов высокой температурой, что мы не сразу в него поверили и старались объяснить его наличие какими-либо побочными

влияниями и неудовлетворительностью методики. В тех из опытов, где для нагревания применялась водяная баня, мы обращали особое внимание на то, чтобы раствор фермента при разливании в пробирки не разбрызгивался по их стенкам; в противном случае могло бы закристализоваться часть фермента, подвергаясь менее сильному температурному влиянию, сохранили свои свойства и что она то и давала ту гидратацию, которую мы наблюдали.

Другое возражение, которое мы себе делали, касалось вопроса об участии в гидратации крахмала бактериальных ферментов; однако, при незначительной продолжительности большинства приводимых ниже наблюдений, это возражение отпадает; с особенной убедительностью против такого предположения говорить опыты, где для нагревания применялась 115°-ая температура в течение 15 минут, т. е. полная бактериологическая стерилизация жидкостей, а также бактериологический контроль (пересевы на питатель-



ный (бульон). Чтобы устранить последовательное загрязнение растворов микроорганизмами, мы пользовались особым приспособлением. (См. рисунок 1-й). Бралась неоглазая стеклянная палочка (а), обертыалась на ограниченном пространстве слоем ваты и плотно вставлялась в обыкновенную пробирку (b) до дна; вата находилась у шейки пробирки. Эта пробирка, обернутая подобным же образом, слоем ваты, вставлялась в пробирку большего диаметра (с). Во внутренней пробирке, положим, находился раствор фермента, во внешней—отварь крахмала: таким образом фермент и субстрат нагревались отдельно друг от друга; когда, послѣ кипячения и охлаждения, требовалось соединить эти жидкости, легким ударом стеклянной палочки дно внутренней пробирки пробивалось. При описанном расположении пробирок можно думать о меньшей прогреваемости жидкости во внутренней, как окруженной слоем воздуха и изолированной от соприкосновения съ дномъ автоклава, кипящей водой, съ другими пробирками; действительно, путемъ специальныхъ наблюдений мы убедились, что содержаемое внутренней пробирки прогревается медленнѣе содержаемаго внешней, но отстоять отъ нея лишь на 3—4 минуты, не больше; при этомъ не надо забывать, что и охлаждение жидкости во внутренней пробирке происходит медленнѣе, чѣмъ во внешней, и этимъ до некоторой степени вознаграждается меньшая первоначальная прогреваемость. Ясно, что пользуясь описаннымъ способомъ наблюдения, мы не вносили въ ферментативный процесс ничего посторонняго и могли наблюдать его неопредѣленно долгое время—недѣли и мѣсяцы.

Сдѣлаемъ еще одно замѣчаніе. Просматривая приводимыя цифры, легко видѣть, насколько онѣ различны; это зависитъ, во-первыхъ, оттого, что примѣнялись температурныя вліянія различной силы и продолжительности; во-вто-

рыхъ, очень большую роль играли свойства тѣхъ препаратовъ (неодинаковыхъ въ различныхъ наблюденияхъ), которыми мы пользовались.

Ввиду принципиальнаго значенія затронутого нами вопроса, врядъ-ли кто сдѣлаетъ намъ упрекъ въ томъ, что мы брали сравнительно большое количество фермента и незначительное—крахмала; наша цѣль была—получить по возможности рѣзкія и убѣдительныя цифры.

Водный профильтрованный растворъ Така-диастазы поровну разливался въ пробирки; послѣднія заключались въ водяную баню обыкновенной температуры и сравнительно медленно нагревались вмѣстѣ съ ней; съ момента кипѣнья воды находились 5 минутъ и быстро охлаждались. Свѣже приготовленный и охлажденный отварь рисоваго крахмала прибавлялся поровну къ охлажденному раствору фермента. Пробирки закрывались ватными пробками и закладывались въ термостатъ (t° 38—39 $^{\circ}$ C). Антисептическихъ средствъ не прибавлялась. Въ некоторыхъ наблюденияхъ для большей точности титровалось заразъ по двѣ пробирки.

ТАБЛИЦА 1-я.

5-ти минутное кипяченіе на водяной банѣ.

№№ наблюдений.	Продолжительность кипѣнья и время, которое прошло, титрования.	Кол-во, куб. сант. жидк. Fehling'a и крахм. при титров. 1).	Кол-чество фермента.	Кол-чество субстрата.	№№ наблюдений.	Продолжительность кипѣнья и время, которое прошло, титрования.	Кол-во, куб. сант. жидк. Fehling'a и крахм. при титров. 1).	Кол-чество фермента.	Кол-чество субстрата.
1	6 час.	3,5 3,5	10 куб. сант. 1 : 250.	20 куб. сант. 1 : 100.	3	6 час.	2,4 2,2	10 куб. сант. 1 : 250.	20 куб. сант. 1 : 100.
2	5 1/2 ч.	3,2	id.	id.	4	6 час.	1,5 1,5	id.	id.

1) Fehling'ova жидкость, согласно предложенію Schmidt'a,¹²⁹⁾ разводилась 4-мя частями воды; поэтому каждый куб. сант. въ ея, приведенный въ таблицахъ, соответствуетъ приблизительно 1 миллиграмму глюкозы (точно: 0,988 миллиграмма).

MM пастеризованн.		Количество фермента.		Количество субстрата.		MM пастеризованн.		Количество фермента.		Количество субстрата.		
Промежуток времени, через который Колич. куб. сант. Колич. Fehling'a в расх. при титров.						Промежуток времени, через который проше. титрования. Колич. куб. сант. Колич. Fehling'a в расх. при титров.						
5	5 час.	3,8 3,5	10 куб. сант. 1 : 250.	20	куб. сант. 1 : 100.	19	3 часа	1,6 1,4 2,8 2,3	10	куб. сант. 1 : 250.	10	куб. сант. 1 : 100.
6	4 1/2 ч.	2,9 3,0	id.	id.			6 час.					
7	4 1/2 ч.	3,0 2,6	id.	id.			20 30 мин. 5 час. 7 час. 9 1/2 ч.	0,8 15,0 22,5 27,0	id.		id.	
8	5 час.	5,4 5,0	id.	id.			21 30 мин. 1 1/2 ч. 3 часа.	0,1 1,5 9,0	id.		id.	
9	5 час.	2,1 2,0	id.	id.			22 1 1/2 ч. 3 часа. 4 1/2 ч.	1,0 3,0 5,0	id.		id.	
10	5 час.	2,0 1,7	id.	id.			5 1/2 ч. 3 часа. 4 1/2 ч.	9,0 3,0 5,0				
11	5 час.	1,5 1,5	id.	id.			23 45 мин. 3 часа. 6 час. 9 час.	0 1,0 2,8 4,1	5	куб. сант. 1 : 250.	id.	
12	5 час.	2,9 2,7	id.	id.			24 3 1/2 ч. 15,5 28,9 32,0	14,8 15,5 28,9 32,0	10	куб. сант. 1 : 500.	id.	
13	3 часа. 6 час.	2,8 4,8	id.	id.			25 2 часа. 4 часа.	2,2 5,7	id.		id.	
14	3 часа. 6 час.	2,0 4,5	id.	id.			26 3 часа. 5 час.	3,6 6,9 7,5	id.		8	куб. сант. 1 : 100.
15	20 мин. 2 часа. 4 1/2 ч.	0 1,1 2,4	id.	id.			27 30 мин. 1 час. 1 1/2 ч. 2 часа. 5 час.	0 0 0,8 1,2 6,6	10	куб. сант. 1 : 200.	10	куб. сант. 1 : 100.
16	3 часа. 6 час.	3,0 8,0	id.	id.								
17	2 часа. 4 часа.	2,2 5,7	id.	id.								
18	1 1/2 ч. 3 часа.	3,0 3,2 3,0 3,5	id.	10	куб. сант. 1 : 100.							

Всё только что приведенные цифры убеждают в томъ, что послѣ 5-ти минутнаго кипяченія на водяной банѣ ферментъ оказывается въ той или другой степени дѣйствующимъ. Дѣйствіе это наступаетъ не сразу, а черезъ тотъ или другой промежутокъ времени, и идетъ сравнительно медленно. Если мы станемъ оцѣнивать силу температурнаго вліянія въ приведенныхъ наблюденіяхъ, то окажется, что ферментъ подвергался температурѣ выше 80° С. Около получаса (ввиду сравнительно медленнаго нагрѣванія водяной бани); температура въ пробиркахъ не достигала 100° С, а держалась на 97°—98° С, несмотря на бурное кипѣніе окружающей ихъ воды. Въ тѣхъ изъ приведенныхъ (и приводимыхъ ниже) наблюденій, въ которыхъ мы пользовались ферментомъ не совершенно освобожденнымъ отъ сахара, производились соответственные поправки на силу его редукиці; послѣдняя была очень незначительна и—въ тѣхъ количествахъ фермента, которыми мы обыкновенно пользовались—едва достигала 1 миллиграмма глюкозы, (т. е. 1 куб. сант. жидкости Fehling'a).

Переходимъ къ слѣдующему ряду наблюденій, гдѣ для нагрѣванія былъ примѣненъ Коховскій паровой аппаратъ. Въ этомъ случаѣ пробирки или заключались въ ненагрѣтый аппаратъ, нагрѣвались вмѣстѣ съ нимъ и съ момента кипѣнія воды находились 15 минутъ, а затѣмъ охлаждались подъ краномъ, или же погружались въ кипящую воду, и время отсчитывалось съ того момента, когда прекратилась реакция начиналось снова; мы задавали вопросы насколько быстро температура въ пробиркахъ успѣваетъ подняться до 100° С: оказалось, что это происходитъ черезъ 2—3 минуты отъ возобновленія кипѣнія воды.

Т А Б Л И Ц А 2-я.
15-ти минутное кипячение в Ковшовом аппарате.

№№ наблюдений.	Проводкутн проре- ши, через которые прошла, титрования.		Количество фермента.	Количество субстрата.	№№ наблюдений.	Проводкутн проре- ши, через которые прошла, титрования.		Количество фермента.	Количество субстрата.
	Кол-во куб. сант. жидк. Fehling'a в расх. при титров.	Кол-во куб. сант. жидк. Fehling'a в расх. при титров.				Кол-во куб. сант. жидк. Fehling'a в расх. при титров.	Кол-во куб. сант. жидк. Fehling'a в расх. при титров.		
1	3 1/4 ч.	2,5	5 куб. сант. 1: 250.	10 куб. сант. 1: 100.					
2	1 1/2 5	2,8 4,5	id.	id.	14 20 ч.	1 1/2 2 1/2	5,5 12,0	id.	id.
3	1 1/2 4ч.10м.	3,3 9,9	id.	id.	15	3	4,0 8,0	ib.	id.
4	4 1/2 ч.	0,2	5 куб. сант. 1: 250.	id.		8	34,0		
5	3 5	4,5 7,0	10 куб. сант. 1: 400.	id.	16 20 ч.	3 1/2 4	3,5 28,5	20 куб. сант. 1: 500.	id.
6	2 1/4 5	1,0 1,5	10 куб. сант. 1: 100.	id.	17 20 ч.	7 1 1/2 2 1/2	7,0 12,0 20,0	40 куб. сант. 1: 1000.	id.
7	3	1,0	id.	id.	18	2	10,5	10 куб. сант. 1: 400.	id.
8	3	4,2	30 куб. сант. 1: 300.	id.	19	1	2,0	5 куб. сант. 1: 250.	id.
9	3	1,0	10 куб. сант. 1: 300.	id.	20	1	4,0	50 куб. сант. 1: 2500.	id.
10	3	2,0	30 куб. сант. 1: 200.	id.	21	2	9,0	10 куб. сант. 1: 102.	id.
11	2 4	4,0 7,5	5 куб. сант. 1: 300.	id.	22	12	6,0	30 куб. сант. 1: 300.	id.
12	30 м. 3 ч.	0 2,0	id.	id.	23	12	4,0	10 куб. сант. 1: 300.	id.
13	16 ч.	6,0	10 куб. сант. 1: 150.	id.	24	12	8,0	30 куб. сант. 1: 900.	id.

Начиная с этого, во
всех наблюд. описыв.
группы гидрат. происхо-
дила из кв. термометра,
а в водной ванне (15° в
пробирк. 1° - 2° C).

№№ наблюдений.	Проводкутн проре- ши, через которые прошла, титрования.		Количество фермента.	Количество субстрата.	№№ наблюдений.	Проводкутн проре- ши, через которые прошла, титрования.		Количество фермента.	Количество субстрата.
	Кол-во куб. сант. жидк. Fehling'a в расх. при титров.	Кол-во куб. сант. жидк. Fehling'a в расх. при титров.				Кол-во куб. сант. жидк. Fehling'a в расх. при титров.	Кол-во куб. сант. жидк. Fehling'a в расх. при титров.		
25	1 сут.	11,0	30 куб. сант. 1: 900.	id.	28	20 час.	7,0	10 куб. сант. 1: 200.	id.
26	12	24,0			2	3 сут.	18,0		
27	3	30,0			3	-	24,0		
28	4	34,0			4	-	2,0		
29	5	37,5			29	15 час.	29,0	10 куб. сант. 1: 900.	25 куб. сант. 1: 100.
30	6	41,0			11 1/2 с.	-	18,0		
31	7	41,0			2 1/2	-	40,0		
32	8	43,0			3 1/2	-	40,0		
33	26	18 час.	9,0	id.	4 1/2	-	40,0		
34	2	сут.	21,0		5 1/2	-	65,0		
35	3	-	32,0		6 1/2	-	68,0		
36	4	-	42,0		7 1/2	-	78,0		
37	5	-	47,0		9 1/2	-	80,0		
38	6	-	51,0						
39	27	20 час.	10,0	30 куб. сант. 1: 600.	id.				
40	2	сут.	24,0						
41	3	-	32,0						
42	4	-	38,0						
43	7	-	41,0						

Приведем теперь некоторые цифровые данные, полу-
ченные при нагревании растворов, Така-дистазы в про-
должении 1/4 часа на водной бане. О постановке таких
опытов ничего нового говорить не приходится.

Т А Б Л И Ц А 3-я.

15-ти минутное кипячение на водяной бане. Гидратация
в термостате при 38°—39° C.

№№ наблюдений.	Проводкутн проре- ши, через которые прошла, титрования.		Количество фермента.	Количество субстрата.	№№ наблюдений.	Проводкутн проре- ши, через которые прошла, титрования.		Количество фермента.	Количество субстрата.
	Кол-во куб. сант. жидк. Fehling'a в расх. при титров.	Кол-во куб. сант. жидк. Fehling'a в расх. при титров.				Кол-во куб. сант. жидк. Fehling'a в расх. при титров.	Кол-во куб. сант. жидк. Fehling'a в расх. при титров.		
1	4 1/2 ч.	1,4	10 куб. сант. 1: 250.	20 куб. сант. 1: 100.	3	4 1/2 ч.	0,4	10 куб. сант. 1: 250.	20 куб. сант. 1: 100.
2	7	1,7	id.	id.	4	4	2,5	10 куб. сант. 1: 500.	10 куб. сант. 1: 100.
3	7	1,8							
4	8	2,2							

Приведем теперь наблюдения, гдѣ растворы ферментовъ подвергались получасовому нагреванію въ Коховскомъ аппаратѣ.

ТАБЛИЦА 4-я.

№№ наблюдений.	Промежути времени, черезъ которые прован. титрованы.			Количество фермента.	Количество субстрата.	№№ наблюдений.	Промежути времени, черезъ которые прован. титрованы.			Количество фермента.	Количество субстрата.
	Кол-во, куб. сант.	Кол-во, куб. сант.	Кол-во, куб. сант.				Кол-во, куб. сант.	Кол-во, куб. сант.	Кол-во, куб. сант.		
1	3 час.	0,5	10 куб. сант.	10 куб. сант.	1: 250.	5	20 час.	6,5	30 куб. сант.	1: 900.	id.
		1,0	1: 250.				2 сут.	11,0			
			Гидратация въ термостатѣ 33—39° С.				4 "	25,0			
							6	1 сут.			
2	5 "	0,9	10 куб. сант.	id.	1: 500.	2	1 сут.	13,5	id.	id.	
							3 "	22,5			
							7 "	36,0			
3	1½ "	5,6	10 куб. сант.	id.	1: 250.	7	18 час.	2,0	id.	id.	
		8,7	1: 250.				2 сут.	6,5			
			Начиная съ этого, во всѣхъ описываемыхъ наблюденияхъ этой группы гидратация происходила въ ледяной водѣ.				3 "	18,5			
							4 "	32,0			
4	3 сут.	8,0	id.	id.		5	5 "	25,0	id.	id.	
		11,0					6 "	28,0			

Для полноты приведемъ нѣсколько наблюдений, гдѣ примѣнено было двукратное нагреваніе въ Коховскомъ аппаратѣ по 15 минутъ и однократное 1 часовае. Между первымъ и вторымъ кипяченіемъ пробирки съ ферментомъ стояли въ ледяной водѣ.

ТАБЛИЦА 5-ая.

№№ наблюдений.	Промежути времени, черезъ которые прован. титрованы.			Количество фермента.	Количество субстрата.	№№ наблюдений.	Промежути времени, черезъ которые прован. титрованы.			Количество фермента.	Количество субстрата.
	Кол-во, куб. сант.	Кол-во, куб. сант.	Кол-во, куб. сант.				Кол-во, куб. сант.	Кол-во, куб. сант.	Кол-во, куб. сант.		
1	1 сут.	1,6	10 куб. сант.	10 куб. сант.	1: 250.	4	1 сут.	0	id.	id.	
		3,2	1: 250.				3 "	0,5			
		3 "	4,9				гидратация въ ледяной водѣ	8 "			1,0
								8 "			1,0
2	1 "	3,0	30 куб. сант.	id.	1: 600.	5	1 сут.	0	id.	id.	
		7,0	1: 600.				3 "	0			
		11,0	гидратация въ ледяной водѣ				3 "	0			
							3 "	0			
3	20 час.	0,5	30 куб. сант.	id.	1: 900.	3	1 час.	0	1½ часовае кипяченіе въ Коховскомъ аппаратѣ;	гидратация въ ледяной водѣ.	
		2 сут.	0,5				2 сут.	2,5			

Переходимъ къ новому ряду наблюдений, гдѣ гидратация происходила въ присутствіи дезинфицирующихъ веществъ, а именно салициловой кислоты и толуола. Данныя этихъ наблюдений, съ своей стороны, съ несомнѣнностью устанавливають основной фактъ нашей работы, — что Така-диастаза, подвергнутая даже продолжительному кипяченію, оказывается дѣйствующей на крахмалъ, въ той или другой степени. Салициловая кислота примѣнялась нами въ растворѣ 1: 500; такой растворъ прибавлялся объемъ на объемъ къ смѣси фермента и крахмала, такъ что окончательное содержаніе салициловой кислоты оказывалось равнымъ 0,1%. Толуолъ прибавлялся въ количествѣ 1—2 куб. сант. на 20—30 куб. раствора. Ввиду сильнаго задерживающаго вліянія салициловой кислоты на диастатическій процессъ, мы обыкновенно не получали ни слѣда сахара, если подвергали ферментъ 15-ти минутному (а также болѣе сильному) кипяченію въ

Коховском аппарате или на водяной бане. Приводимы наблюдения над ферментативным процессом в присутствии салициловой кислоты касаются 5-ти минутного нагревания фермента на водяной бане. Салициловая кислота прибавлялась к ферменту постое его кипячения и охлаждения; вместе с этим прибавлялся и крахмал. Перед производством титрования смесь нейтрализовалась 1/2%-ным раствором натром. Гидратация происходила в термостате при 38°—39° С.

ТАБЛИЦА 6-ая.

Наблюдения с салициловой кислотой. 5-ти минутное кипячение фермента на водяной бане.

№№ наблюдений.	Промежутки времени, через которые пром. титрования.	Колич. куб. сант. являе. <i>Fehling's</i> в являе. при титров.	Количество		№№ наблюдений.	Промежутки времени, через которые пром. титрования.	Колич. куб. сант. являе. <i>Fehling's</i> в являе. при титров.	Количество	
			фермента.	субстрата.				фермента.	субстрата.
1	1 сут.	1.8 2.0	10 куб. сант. 1:250.	5 куб. сант. 1:100.	9	2 1/2 ч.	0	10 куб. сант.	5 куб. сант.
						10 час.	5.1	1:250.	1:100.
2	1 »	1.1	id.	id.	10 »	4.1	id.	id.	id.
						7 сут.	4.3	id.	id.
						9 »	4.2	id.	id.
3	50 час.	4.6	id.	id.		13 »	3.9	id.	id.
						25 »	2.4	id.	id.
4	2 сут.	5.3	id.	id.	10	18 час.	3.0	id.	id.
						2 сут.	2.8	id.	id.
5	2 »	4.0 4.5	id.	id.					
		0	id.	id.	11	3 сут.	3.6	id.	id.
6	4 1/2 ч.	2.8	id.	id.		5 »	3.2	id.	id.
		3.3	id.	id.		9 »	1.5	id.	id.
7	5 час.	0.3	id.	id.		25 »	1.5	id.	id.
		4.6	id.	id.	12	1 сут.	5.3	id.	id.
		4.5	id.	id.		2 »	5.9	id.	id.
		4.3	id.	id.					
8	1 сут.	3.2	id.	id.	13	1 сут.	4.4	id.	id.
		3.1	id.	id.		2 »	4.5	id.	id.
		1.5	id.	id.					

№№ наблюдений.	Промежутки времени, через которые пром. титрования.	Колич. куб. сант. являе. <i>Fehling's</i> в являе. при титров.	Количество		№№ наблюдений.	Промежутки времени, через которые пром. титрования.	Колич. куб. сант. являе. <i>Fehling's</i> в являе. при титров.	Количество	
			фермента.	субстрата.				фермента.	субстрата.
14	4 час.	1.1	10 куб. сант.	5 куб. сант.	21	26 час.	1.1	id.	id.
	22 »	5.5	1:250	1:100.					
	5 сут.	2.9	id.	id.	22	3 сут.	4.6	id.	id.
	16 »	3.0	id.	id.					
15	16 час.	2.3	id.	id.	23	27 час.	2.9	id.	id.
	2 сут.	2.3	id.	id.					
16	20 час.	1.5	id.	id.	24	1 сут.	2.8	id.	id.
17	30 »	салицид.	id.	id.	25	30 час.	4.8	id.	id.
18	30 »	3.0	id.	id.	26	26 сут.	2.5	id.	id.
19	18 »	1.5	id.	id.	27	1 сут.	1.5	5 куб. сант.	id.
	2 сут.	1.5	id.	id.		4 »	1.3	1:250.	id.
20	2 »	1.8	id.	id.	28	1 »	2.1	id.	10 куб. сант. 1:100.

ТАБЛИЦА 7-ая.

15-ти минутное кипячение в Коховском аппарате. Гидратация в термостате 38—39° С. с толуюлом.

№№ наблюдений.	Промежутки времени, через которые пром. титрования.	Колич. куб. сант. являе. <i>Fehling's</i> в являе. при титров.	Количество		№№ наблюдений.	Промежутки времени, через которые пром. титрования.	Колич. куб. сант. являе. <i>Fehling's</i> в являе. при титров.	Количество	
			фермента.	субстрата.				фермента.	субстрата.
1	3 час.	0	10 куб. сант.	10 куб. сант.	1	2 час.	3.5	10 куб. сант.	10 куб. сант.
	30 »	2.5	1:300.	1:100.		4 »	7.0	1:300.	1:100
	2 сут.	9.0	id.	id.	20	»	39.0	id.	id.
					2	сут.	54.0	id.	id.
2	30 мин.	0	id.	id.					
	3 час.	3.0	id.	id.	4	1 »	35.0	30 куб. сант.	id.
	20 »	34.0	id.	id.		2 »	48.0	1:900.	id.

№№ наблюдений.	Продукция ферментации, через которые проан. титрования.			Количество фермента.	Количество субстрата.	№№ наблюдений.	Продукция ферментации, через которые проан. титрования.			Количество фермента.	Количество субстрата.
	Колич. куб. сант.	Колич. куб. сант.	Колич. <i>Fehling</i> в ив-расс. при титров.				Колич. куб. сант.	Колич. куб. сант.	Колич. <i>Fehling</i> в ив-расс. при титров.		
5	30	сут.	25,0	10 куб. сант.	id.	6	20	час.	28,0	id.	id.
3	"	"	36,0	1:200.		2	сут.	40,0			
4	"	"	35,0								
			38,0								

Изъ таблицъ 6-ой и 7-ой видно, между прочимъ, насколько различно влияют на ферментативный процесс салициловая к-та и тодуоль; при послѣднемъ (какъ мы убѣдились нѣсколькими контрольными наблюдениями) гидратация идетъ, повидимому, своимъ нормальнымъ путемъ, безъ всякой задержки. Чѣмъ объясняется уменьшеніе редуцціи при долгомъ стояніи пробирокъ съ салициловой кислотой,—мы сказать не беремъ; быть можетъ, тутъ играетъ роль дальнѣйшее окисленіе образовавшагося сахара или имѣетъ мѣсто обратный процессъ, т. е. образованіе углеводовъ съ высшимъ молекулярнымъ вѣсомъ.

Переходимъ къ послѣднему ряду наблюдений, устанавливающихъ фактъ ферментации послѣ кипяченія. Мы докажемъ, что водные растворы Така-диастазы, подвергнутые стерилизаціи въ автоклавъ при 115° С въ продолженіи 15-ти минутъ, черезъ тотъ или другой промежутокъ времени оказываются способными ферментировать крахмалъ. Правда, многія наблюденія этой группы дали намъ отрицательный результатъ; т. е. мы не получили никакой гидратации крахмала; тѣмъ болѣе обращаютъ на себя вниманіе наблюденія съ положительнымъ результатомъ. Очевидно, при подобныхъ температурныхъ влияніяхъ мы находимся на границѣ полной и

безоворотной разрушаемости фермента. Отрицательный же результатъ (т. е. отсутствіе ферментации) намъ дали растворы Така-диастазы, подвергнутые получасовому нагреванію въ автоклавъ при 115° С, а также 1½-часовому въ Коховскомъ аппаратѣ. Изъ таблицы 8-ой видно, что ферментативный процессъ носитъ характеръ, чрезвычайной медленности и постепенности и, вообще, не даетъ полной гидратации тѣхъ количествъ крахмала, которая мы примѣняли. Какъ и въ другихъ случаяхъ, мы производили строгій контроль, подвергая титрованію ферментъ и крахмалъ, прокипяченные въ автоклавъ и стоявшіе отдѣльно другъ отъ друга. Необходимыя замѣчанія по поводу особой постановки этихъ наблюдений были сдѣланы рѣчею и, кромѣ того, помѣщены въ нашей статьѣ Русскаго Врача за 1908-ой годъ ¹²³⁾.

Т А Б Л И Ц А 8-ая.

15-ти минутное нагреваніе въ автоклавъ при 115°С.
Гидратация въ термостатѣ при 38°—39°С.

№№ наблюдений.	Продукция ферментации, через которые проан. титрования.			Количество фермента.	Количество субстрата.	№№ наблюдений.	Продукция ферментации, через которые проан. титрования.			Количество фермента.	Количество субстрата.
	Колич. куб. сант.	Колич. <i>Fehling</i> в ив-расс. при титров.	Колич. куб. сант.				Колич. <i>Fehling</i> в ив-расс. при титров.	Количество фермента.	Количество субстрата.		
1	1½ с.	0	8 куб. сант.	5 куб. сант.	4	1½ с.	0,9	10 куб. сант.	10 куб. сант.		
	3½ "	0	1:250°	1:100.		2½ "	1,0	1:250.	1:100.		
	4½ "	сѣдн.				72 "	6,4	начинаетъ 4-го дня этого	наблюдения гидратация про-		
	5½ "	0,5				4 мѣс.	6,0	исходила при обыкновен-	ной температурѣ.		
	8½ "	1,4				10 "	8,0				
	29 "	2,3									
2	20 сут.	1,6	10 куб. сант.	10 куб. сант.	5	2 сут.	5,5	10 куб. сант.	id.		
	70 "	5,7	1:500.	1:270.		13 "	6,5	1:1000.			
			id.			20 "	14,0				
3	18 час.	0		15 куб. сант.		75 сут.	6,4	10 куб. сант.	id.		
	1½ с.	0,5		1:100.		6	7,5	1:200.	гидратация послѣдние		
	3½ с.	0,7							3 мѣсяца при обыкновен-		
	8 "	1,1							ной температурѣ.		
	9 "	1,5									
	85 "	5,4									
	125 "	11,2									

Замѣтимъ, что редукція фермента самого по себѣ послѣ дѣйствія 115°-ой температуры не мѣняется; т. е. если ферментъ былъ не редуцирующимъ, опъ такимъ и оставался, а если опъ давалъ нѣкоторую (всегда очень незначительную) редукцію, то сила ея оставалась прежней. Редукція крахмала, какъ до кипяченія, такъ и послѣ кипяченія въ автоклавѣ, даже послѣ долгаго стоянія (годъ и болѣе) равнялась нулю.

Кромѣ всѣхъ, приведенныхъ до сихъ поръ, наблюдений, гдѣ ферментация доказана цифрами, мы могли бы привести описаніе произведенныхъ нами качественныхъ наблюдений; но, имѣя ввиду дѣлать свои заключенія лишь на основаніи цифровыхъ данныхъ, ограничимся о качественномъ изслѣдованіи вопроса однимъ упоминаніемъ.

2. Первоначальныя попытки объяснить фактъ ферментации послѣ кипяченія. Вліяніе на растворы Така-діастазы температуры невысокихъ.

Когда былъ установленъ фактъ ферментации послѣ кипяченія, естественно было задаваться вопросомъ—чѣмъ его объяснить: обратнымъ ли процессомъ, т. е. регенерацией діастатическихъ свойствъ или чрезвычайной стойкостью Така-діастазы, т. е. приписать этотъ процессъ остаткамъ фермента, ветропнутымъ высокой температурой. Какъ указано выше, для объясненія явленія мы первоначально обратились къ предположенію о регенерации фермента.

Методика этого ряда наблюдений очень проста. Положимъ, мы имѣемъ растворъ фермента, разлитый поровну въ пробирки; подвергнемъ ихъ одному и тому же температурному вліянію, напр., 5-ти минутному кипяченію на водя-

ной банѣ; послѣ охлажденія раздѣлимъ эти пробирки на двѣ порціи, къ одной изъ которыхъ прибавимъ точчасъ же крахмалъ, а къ другой послѣ того, какъ пробирки простоятъ нѣкоторое время сами по себѣ, безъ крахмала—въ томъ расчетѣ, что ферментъ успѣетъ хотя бы отчасти регенерироваться; время и условія гидратации той и другой порціи фермента совершенно одинаковы. Если бы оказалось, что порція, къ которой прибавленъ крахмалъ не непосредственно послѣ кипяченія, а черезъ нѣкоторый промежутокъ времени, дала значительно высшія цифры сравнительно съ другой, контрольной,—то подобнаго рода явленіе совершенно ясно и опредѣленно говорило бы за регенерацию діастазы и было бы прямымъ доказательствомъ регенеративнаго процесса. Далѣе, если бы при такой постановкѣ наблюдений мы получили въ томъ и другомъ случаѣ одинаковыя цифры, то должны были бы заключить, что само по себѣ стояніе водныхъ растворовъ прокипяченной діастазы не измѣняетъ ни въ ту, ни въ другую сторону ея способности дѣйствовать на крахмалъ. Наконецъ, при отвѣтѣ на поставленный вопросъ можно было представить себѣ еще одинъ случай: при стоянїи, сами по себѣ, водные растворы прокипяченной діастазы могли утратить въ той или другой степени свою ферментативную силу. Данная приведенныхъ въ этомъ отдѣлѣ наблюдений подтвердили послѣднее предположеніе.

Часть цифръ, приведенныхъ ниже, получена безъ примѣненія антисептическихъ средствъ, почему наблюденія были кратковременны, чтобы вполне исключить вліяніе бактеріальныхъ ферментовъ; другая же часть наблюдений, разсчитанная на болѣе продолжительное время, произведена въ присутствіи салициловой кислоты. Последняя постановка заслуживаетъ упрека въ томъ отношеніи, что сама по себѣ

салициловая кислота могла влиять неблагоприятно на обратный процесс, на регенерацию, которую мы хотѣли изучать; поэтому данные этихъ наблюдений служили лишь дополненіемъ къ другимъ, гдѣ процесс изучался въ чистомъ видѣ, безъ всякихъ постороннихъ вліяній.

При разработкѣ поставленнаго вопроса мы примѣняли различныя температуры, а именно температуру термостата 38°—39С, обыкновенную 17—20°С и низкую 1—2°С, стараясь найти наиболѣе благоприятныя для наступленія обратнаго процесса температурныя условия.

Какъ мы упомянули, результатъ этихъ наблюдений оказался отрицательнымъ въ смыслѣ регенерации; само по себѣ состояніе протіяченнаго раствора фермента не только не способно было придать имъ большей силы, но лишало ихъ и той, которую они имѣли непосредственно послѣ кипяченія и охлаждения; при этомъ, чѣмъ выше температура, тѣмъ значительнѣе ее ослабляющее вліяніе, такъ что термостатная болѣе ослабляетъ, чѣмъ обыкновенная, обыкновенная—болѣе, чѣмъ близкая къ 0С.

Когда мы будемъ заканчивать описаніе протоколовъ наблюдений, еще вернемся къ затронутому здѣсь вопросу и, насколько возможно, выяснимъ кажущееся противорѣчіе между цифрами, приводимыми здѣсь и полученными впоследствии; а теперь продолжимъ изложеніе опытнаго матеріала въ томъ порядкѣ и послѣдовательности, какъ мы его получали и сообразно ходу нашей мысли.

ТАБЛИЦА 9-ая.

5-ти минутное кипяченіе на водяной банѣ. Регенерируется ли протіяченнаго фермента самъ по себѣ?

№ наблюдений.	Время стоянія протіяченнаго фермента — самого по себѣ, безъ кипяченія.	Промежутки времени, черезъ которые производилась титровка.	Колич. куб. сант. лакт. Фермента, перекисоказаннаго при титрованіи.	Количество фермента.	Количество субстрата.
1	нестоявшій. 3 часа (об. т-ра).	2 ч. 50 м.	1,6	7 к. с. 1:250	4 к. с. 1:100
		2 ч. 50 "	1,7		
2	нестоявшій. 3 часа (об. т-ра).	3 час.	1,6	id.	10 куб. сант. 1:100.
		3 "	1,0		
3	нестоявшій. 17 часовъ (2° С).	2 "	0,7	id.	id.
		2 "	0,7		
4	нестоявшій. 3½ часа (об. т-ра).	3½ час.	1,0	id.	id.
		3½ "	0,9		
5	нестоявшій. 5 часовъ (об. т-ра).	5 час.	1,0	id.	id.
		5 "	1,0		
6	нестоявшій. 3 часа (об. т-ра).	3 "	0,8	id.	id.
		3 "	0,4		
7	нестоявшій. 2½ часа (об. т-ра).	1½ час.	0,6	8 куб. сант. 1:250.	5 куб. сант. 1:100.
		1½ "	0,5		
8	нестоявшій. 3½ часа (об. т-ра).	3½ "	0,6	6 куб. сант. 1:250.	8 куб. сант. 1:100.
		3½ "	0,4		
9	нестоявшій. 20 часовъ (об. т-ра).	4½ "	0,9	7 куб. сант. 1:250.	5 куб. сант. 1:100.
		4½ "	0,5		
10	нестоявшій. 5 часовъ (об. т-ра). 22 часа (об. т-ра).	6 час.	3,5	10 к. с. 1:250	20 к. с. 1:100.
		6 "	2,5		
		6 "	1,9		
11	нестоявшій. 4 часа (об. т-ра). 22 часа (об. т-ра).	5½ час.	3,2	id.	id.
		5½ "	2,3		
		5½ "	2,0		

№№ наблюдений.	Время стояния приготовленного фермента (об. т-ра), куб. сахар. соев., без крахмала.	Промежуток времени, через который проваривались тигриваны.	Количество куб. саит. <i>Fehling's</i> гидратированной при тигривании.	Количество фермента.	Количество субстрата.
12	нестоявший, 5 часовъ (об. т-ра).	6 час.	2,3	id.	id.
	5 часовъ (термогст.).	6 "	1,6		
13	нестоявший, 23 часа (об. т-ра).	6 "	1,2	id.	id.
	23 часа (об. т-ра).	6 "	1,5		
14	нестоявший, 5 часовъ (об. т-ра).	5 "	3,6	id.	id.
	5 часовъ (об. т-ра).	5 "	2,6		
15	нестоявший, 24 часа (об. т-ра).	5 "	4,8	id.	id.
	24 часа (об. т-ра).	4½ "	2,9		
16	нестоявший, 4½ часа (об. т-ра).	4½ "	2,8	id.	id.
	4½ часа (об. т-ра).	4½ "	2,1		
17	нестоявший, 5 часовъ (об. т-ра).	5 "	1,9	id.	id.
	5 часовъ (об. т-ра).	5 "	5,2		
18	нестоявший, 5 часовъ (об. т-ра).	5 "	2,0	id.	id.
	5 часовъ (термогст.).	5 "	1,5		
19	нестоявший, 5 часовъ (об. т-ра).	5 "	1,3	id.	id.
	5 часовъ (об. т-ра).	5 "	1,4		
20	нестоявший, 5 часовъ (об. т-ра).	5 "	1,5	id.	id.
	5 часовъ (об. т-ра).	5 "	1,3		
21	нестоявший, 5 часовъ (об. т-ра).	5 "	1,7	id.	id.
	5 часовъ (об. т-ра).	5 "	2,8		
			1,9		

Слѣдующая таблица, которую мы приведемъ, касается того же вопроса о прямой регенерации прокипяченнаго фермента. Ввиду продолжительности наблюдений, примѣнена была салициловая кислота въ 0,2%'-мъ растворѣ объемъ на объемъ. Отваръ крахмала былъ одинъ и тотъ же какъ при первоначальномъ соединеніи съ ферментомъ, только что прокипяченнымъ, такъ и при послѣдующемъ, когда ферментъ простоялъ то или другое время; подобно ферменту, крахмальтъ сохранялся съ прибавленіемъ салициловой кислоты Гидратация происходила въ термостатѣ при 38—39° С. Время нагреванія фермента—5 минутъ на водяной банѣ.

ТАБЛИЦА 10-ая.

№№ наблюдений.	Время стояния приготовленного фермента (об. т-ра), куб. сахар. соев., без крахмала.	Промежуток времени, через который проваривались тигриваны.	Количество куб. саит. <i>Fehling's</i> гидратированной при тигривании.	Количество фермента.	Количество субстрата.
1	нестоявший, 1 сутки (об. т-ра).	1 сутки	4,6	10 куб. саит. 1 : 250.	10 куб. саит. 1 : 100.
	1 сутки (об. т-ра).	1 "	2,5		
2	нестоявший, 1 сутки (об. т-ра).	1 сутки	2,5	id.	5 куб. саит. 1 : 100.
	1 сутки (термогст.).	1 "	2,2		
3	нестоявший, 1 сутки (об. т-ра).	1 сутки	1,4	id.	10 куб. саит. 1 : 100.
	1 сутки (об. т-ра).	1 "	3,1		
4	нестоявший, 1 сутки (об. т-ра).	1 сутки	2,2	id.	id.
	1 сутки (термогст.).	1 "	1,1		
			1,6	id.	id.
			1,5		
			1,3		

№№ наблюдений	Время стояния фермента самого себя, без крахмала.	Продолжительность, через которые произвелись гидратации.	Колич. куб. сант. сахара. Растворенной при гидратации.	Количество фермента.	Количество субстрата.
5	нестоявший.	2 суток	6,3	id.	id.
	2 суток (об. т-ра).	" "	5,3		
6	2 суток (термоуст.)	2 "	1,8		
	нестоявший.	2 "	6,7	id.	id.
	2 суток (об. т-ра).	" "	5,7		
	2 суток (термоуст.).	2 "	1,4		
7	4 суток (об. т-ра).	2 "	5,9		
	4 суток (термоуст.).	2 "	1,3		
	нестоявший.	2 "	4,3	id.	id.
	2 суток (об. т-ра).	2 "	1,9		
	2 суток (термоуст.).	2 "	1,2		
	4 суток (об. т-ра).	2 "	2,0		
4 суток (термоуст.).	2 "	1,2			

Разсматривая приведенные цифры, легко видеть, что усиление ферментативных свойств прокипяченной диастазы не наступает даже при долгом ее стоянии; напротив, ее способность действовать на крахмал еще более уменьшается, и темъ значительнее, чѣмъ выше температура. Нѣсколько цифръ, которая стоятъ въ противорѣчии съ этимъ выводомъ (напр. наблюдение 14-ое табл. 9-ой гдѣ ферментъ стоялъ 1 сутки при обыкновенной температурѣ и при соединении съ крахмаломъ далъ болѣе сильную гидратацию, чѣмъ ферментъ исходный, нестоявший) мы объясняли влияниемъ бактерий, развившихся за 1 сутки стояния и выработавшихъ диастатическій ферментъ— хотя видъ раствора въ смысле бактериальнаго загрязнения оставался безупречнымъ.

Въ дальнѣйшемъ мы обратились къ вопросу— какъ относится къ невысокой температурѣ некипяченный ферментъ и не замѣчается ли, при этихъ условіяхъ, наклонности къ его ослабленію. Примѣнена была салициловая к-та въ обычномъ разведеніи. Гидратация въ термостатѣ.

ТАБЛИЦА 11-ая.
Вліяніе на некипяченый ферментъ температуръ невысокихъ.

№№ наблюдений	Время стояния не кипяченого фермента самого по себе, безъ крахмала.	Продолжительность произведенія гидратации.	Колич. куб. сант. сахара. Растворенной при гидратации.	Количество фермента.	Количество субстрата.
1	нестоявший.	30 час.	5,2	10 куб. сант.	10 куб. сант.
	2 суток (термоуст.).	30 "	0	1: 2500.	1: 100.
2	нестоявший.	3 сут.	4,8	id.	id.
	3 суток (термоуст.).	3 "	1,3		
3	нестоявший.	25 час.	3,5	id.	id.
	2 суток (об. т-ра).	25 "	3,2		
4	2 суток (термоуст.).	2 "	0		
	нестоявший.	3 сут.	5,8	10 куб. сант.	id.
5	4 суток (термоуст.).	3 "	1,4	1: 500.	
	нестоявший.	27 час.	13,5	10 куб. сант.	id.
6	27 часовъ (об. т-ра).	27 "	8,0	1: 250.	
	27 часовъ (термоуст.).	27 "	2,9		
7	нестоявший.	27 "	12,9	10 куб. сант.	id.
	27 часовъ (об. т-ра).	27 "	5,9	1: 500.	
8	27 часовъ (термоуст.).	27 "	0		
	2 суток (1—2 ^о С.).	27 "	6,0		
9	2 суток (термоуст.).	27 "	0		
	нестоявший.	30 "	30,5	10 куб. сант.	id.
	1 сутки (об. т-ра).	30 "	26,2	1: 250.	
1 сутки (термоуст.).	30 "	2,0			

Таким образом мы видим, что и некипяченный фермент относится к температурам невысоким подобно кипяченному, все больше и больше утрачивая свою силу.

3. Косвенное доказательство обратимости *gesp.* регенерации ферментных свойств.

Итак, первоначальные попытки дать прямое доказательство регенерации ферментных свойств оказались неудачными, и для объяснения наблюдаемых явлений пришлось обратиться в область других предположений. Именно, придерживаясь общепринятой точки зрения на стойкость ферментов вообще, мы представили себѣ, что Така-диастаза относится к числу чрезвычайно стойких, не вполне разрушающихся при кипячении ферментов, способных послѣ влияния 100°-ой и даже 115°-ой температуры к специфической деятельности, в той или другой степени. Такое представление, правда, мало уясняло этот процесс; казалось непонятным, почему раствор фермента, потерявший почти все свои свойства при доведении до 100° С, — не теряет их совершенно при продолжающемся влиянии такой температуры; основываясь на таком предположении, необходимо было думать, что ферментативная способность в данном растворе чрезвычайно различна, что часть фермента уничтожается уже при 80° С, другая при 90° С и т. д., и что существуют такіе части того же самого фермента, на которых 100°-ая и даже 115°-ая температуры не влияют в смысле разрушения. Как бы то ни было, анализируя установленный факт ферментации послѣ кипячения, мы сдѣлали предположение об остатках фермента и старались выяснить вопрос экспериментальным путем.

О постановкѣ опытовъ этой группы мы сдѣлаемъ несколько осерыхъ замѣчаній. Какъ известно, о силѣ фермента, т. е. о его количествѣ въ данномъ объемѣ жидкости, мы судимъ по силѣ его дѣйствія, т. е. по количеству превращенныхъ продуктовъ; для нѣкоторыхъ ферментовъ пытались даже установить строгую зависимость между количествомъ фермента и эффектомъ его дѣйствія, и выразить формулой эту зависимость (такое, напр. правило *Schütz-Boriscowa*); во всякомъ случаѣ, несомнѣнно, что одинъ и тотъ же гидролитическій эффектъ при одинаковыхъ условіяхъ температуры жидкостей и объема ихъ производится только одинаковыми количествами фермента. Мы исходили изъ предположенія, что послѣ кипяченія въ растворѣ фермента оставалась какая-нибудь незначительная часть, сохранившаяся невредимо, присутствіемъ которой и объяснялся установленный нами фактъ ферментации; а что она была незначительна, ясно было изъ того, что въ первое время послѣ соединенія фермента съ субстратомъ не происходило никакихъ измѣненій послѣдняго, и лишь постепенно, черезъ часъ, два и больше, начиналось разжиженіе и просвѣтленіе крахмала, и въ дальнѣйшемъ усиливалось. Мы старались эмпирически установить то количество некипяченнаго фермента, которое дадо бы приблизительно такой же ходъ гидратации, какой давалъ ферментъ прокипяченный, напр. 5 минутъ; путемъ соответственнаго разведенія первоначальнаго раствора фермента мы получали такимъ образомъ $\frac{1}{10}$ -ую, $\frac{1}{100}$ -ую, $\frac{1}{1000}$ -ую его и т. д.—и съ ними могли сравнивать ту неизвѣстную величину, которая вопреки ожиданіямъ не измѣнила своихъ свойствъ кипяченіемъ. Первоначальныя наблюденія, разсчитанныя на короткое время—4—5—6 часовъ мы производили безъ прибавленія антисептическихъ средствъ; условія гидратации, т. е. продолжительность ея, объемъ жидкостей, температура были, конечно, одинаковы для каж-

дой группы наблюдений. Мы установили, что фермент, прокипяченный на водяной бане 5 минут действует приблизительно так же, как $\frac{1}{1000}$ -ая часть того же фермента не подвергнутого кипячению; но это касается лишь первого времени наблюдения—1-го, 2-го и 3-го часа; в дальнейшем же эти процессы становятся различными в том отношении, что кипяченный фермент берет перевес над $\frac{1}{1000}$ -ой частью некипяченного. Наблюдения показывают, далее, что $\frac{1}{100}$ -ая часть некипяченного фермента производит гидратацию значительно более сильную, чем фермент подвергнутый 5-ти минутному кипячению; при этом гидратация, производимая $\frac{1}{100}$ -ой частью некипяченного, начинается уже в то время, когда прокипяченный фермент еще не действует. Эти факты нам указали на то, во 1-х, что после 5-ти минутного кипячения могла остаться невредимой часть фермента, значительно меньшая $\frac{1}{100}$ -ой первоначально взятого количества; и, во 2-х, хотя эта первая часть в первой стадии гидратации чрезвычайно сходна по эффекту действия с $\frac{1}{100}$ -ой частью, но в дальнейшем эти процессы идут каждый своим путем. Уже и на основании этих данных можно было усомниться в правильности сделанного предположения об остатках фермента.

Чтобы следить произвольно долгое время за гидратацией, производимой кипяченым ферментом с одной стороны, и $\frac{1}{100}$ -ой и $\frac{1}{1000}$ -ой частью некипяченного с другой, мы применяли салициловую кислоту; этим мы обеспечивали себя от упрека в возможности участия в гидратации бактериальных ферментов. Совершенно естественно было ожидать, что мы встретимся здесь с теми же отношениями, о которых только что сказали, т. е. $\frac{1}{100}$ -ая часть кипяченного фермента дает цифра, значительно высшая, чем кипяченный 5 минут, а $\frac{1}{1000}$ -ая—приблизительно одинаковая с ним. Однако результат оказался иным. Именно,

$\frac{1}{1000}$ -ая часть некипяченного фермента в присутствии салициловой кислоты вообще не действует, не дает даже намека на гидратацию,—во то время как кипяченный 5 минут фермент дает вполне извѣрные цифры; $\frac{1}{100}$ -ая часть фермента в присутствии салициловой кислоты хотя и производит гидратацию крахмала, но значительно меньшую производимой ферментом кипяченным, т. е. как раз обратное тому, что можно было бы ожидать исходя из предположения об оставшейся неразрушенной части фермента, близкой к $\frac{1}{1000}$ -ой его. Итак, $\frac{1}{1000}$ -ая часть фермента, действуя без салициловой кислоты, дает цифры близкия к кипяченному ферменту, а в присутствии ея не дает ли какой гидратации; а $\frac{1}{100}$ -ая без салициловой кислоты действует значительно энергичнее, чем фермент кипяченный, а в присутствии ея остается. Во избежание недоразумений скажем еще раз, что в присутствии салициловой кислоты мы имѣли в виду получить конечный эффект гидратации и титрования производили через большие промежутки времени—сутки и более, и что условия постановки этих сравнительных наблюдений были одинаковы, растворы брались одни и те же как в присутствии салициловой кислоты, так и без нея.

Спрашивается, какой же вывод можно было сделать из этих данных? Вывод один: предположение об остатках фермента, уцѣлѣвших при кипячении, отпадало, и только что описанныя явления объяснялись восстановлением ферментных свойств, регенерацией фермента, которая все больше и больше прогрессировала, проходя, конечно, различные стадии, и между прочим ту, когда количество регенерировавшейся части было близко к $\frac{1}{1000}$ -ой части первоначально взятого, а в дальнейшем или лучше сказать в окончательном итоге превосходя даже и $\frac{1}{100}$ -ую. Иное объяснение изложенным фактам дать чрезвычайно трудно.

Если намъ сдѣлать упрекъ въ томъ, что въ присутствіи саллициловой кислоты, ввиду ея чрезвычайно сильно задерживающаго вліянія на диастатическій процессъ, картина этого послѣдняго могла носить искаженный характеръ,—то мы скажемъ, что въ этой части своей работы не ставили себѣ цѣлью изучить обратный процессъ во всемъ его объемѣ и во всей его закономерности, а имѣли въ виду лишь доказать невозможность предположенія о какихъ-то чрезвычайно загадочныхъ и непонятныхъ остаткахъ или сдѣдахъ фермента, набѣгшихъ общей и законной участи — потери специфическихъ свойствъ подъ вліяніемъ высокой температуры. Кромѣ такого ряда доказательствъ, мы можемъ привести и другія; именно, часть наблюденій, относящихся къ этой категоріи, произведена нами безъ прибавленія антисептическихъ средствъ, при низкой температурѣ (въ ледяной водѣ); наблюденія эти, въ свою очередь, самымъ рѣшительнымъ образомъ говорятъ противъ предположенія о какихъ-то „сдѣдахъ“ или остаткахъ фермента.

Т А Б Л И Ц А 12-я.

Сравнительный ходъ гирацации, производимой прокляченными 5 минутъ ферментомъ и различными долями некличаега, какъ безъ саллициловой кислоты, такъ и въ ея присутствіи. Гирация въ термостатѣ при 38—39° С.

№№ наблюденій.	Количество субстрата.	Количество фермента.	Промежутки времени черезъ которые производилась титрованія.		Количество куб. сант. закислоты	
			безъ саллицил. кислоты.	съ саллицил. кислоты.	безъ саллицил. кислоты.	съ саллицил. кислоты.
1	20 куб. сант. 1:100.	10 к. с. (книп.) 1:250.	3 час. 18 час.	2 сут. 2,5	1,5	4,0
		1/100 (пек.)	6 - 13 час.	8 сут. 1,7	2,5	2,5
		1/1000 (пек.)	3 - 18 час.	3 сут. 1,6	2,0	0
			6 - 3 сут.			

№№ наблюденій.	Количество субстрата.	Количество фермента.	Промежутки времени черезъ которые производилась титрованія.		Количество куб. сант. закислоты	
			безъ саллицил. кислоты.	съ саллицил. кислоты.	безъ саллицил. кислоты.	съ саллицил. кислоты.
2	id.	10 к. с. (книп.) 1:250.	3 час.	1 сут.	2,8	6,3
			6 -	2 -	4,8	6,9
			3 -	1 -	7,2	2,8
			6 -	2 -	8,0	2,9
		1/100 (пек.)	3 -	1 -	3,0	0
		1/1000 (пек.)	6 -	2 -	4,0	0
3	id.	10 к. с. (книп.) 1:250.	3 -	1 -	2,0	5,4
			6 -	3 -	4,5	5,5
			3 -	1 -	12,0	2,5
			6 -	3 -	10,0	2,5
		1/100 (пек.)	3 -	1 -	3,3	0
		1/1000 (пек.)	6 -	3 -	5,0	0
4	id.	10 к. с. (книп.) 1:250.	20 мин.	16 час.	0	3,0
			2 час.	2 сут.	1,1	3,0
			4½ -	2 сут.	2,4	3,0
			20 мин.	2 сут.	10,0	10,0
		1/50 (пек.)	2 час.	16 час.	24,8	3,5
			4½ -	2 сут.	33,1	3,0
5	10 куб. сант. 1:100.	5 к. с. (книп.) 1:250.	45 мин.	1 сут.	0	2,5
			3 час.	4 -	2,7	2,3
			6 -	4 -	4,1	4,1
			8 -	4 -	5,6	5,6
			45 мин.	1 -	12,0	1,3
			3 час.	4 -	14,7	1,3
		1/50 (пек.)	6 -	4 -	17,6	17,6
6	id.	10 к. с. (книп.) 1:500.	30 мин.	30 час.	0,8	15,0
			5 час.	30 -	22,0	4,0
			7 -	30 -	27,0	8,0
			9½ -	30 -	24,0	30,0
		1/50 (пек.)	7 -	30 -	30,0	1,8
		1/50 (пек.)	9½ -	30 -	30,0	30,0
7	id.	(10 к. с. (книп.) 1:500.	30 мин.	18 час.	0,1	2,0
			1½ час.	1½ сут.	1,3	2,0
			3 -	1½ сут.	8,9	7,0
			30 мин.	18 час.	21,0	1,2
		1/50 (пек.)	1½ час.	1½ сут.	30,0	1,2
			3 -	1½ сут.	30,0	1,2

№№ наблюдений.	Количество субстрата.	Количество фермента.	Промежуток времени, через которые производились титрования.		Количество куб. сант. жидкости Fehling'a нараходованный при титровании.					
			без салицил. кислоты.	с салицил. кислотой.	без салицил. кислоты.	с салицил. кислотой.				
8	id.	10 к. с. (книп.) 1 : 500.	1½ час.	2,0	2 сут.	4,0	2,5			
			3 -	4,0		6,0				
			4½ -	9,5		9,5				
9	id.	10 к. с. (книп.) 1 : 500.	1½ -	17,0	2 -	26,0	1,3			
			3 -	26,0		27,0				
			4½ -	30,0		30,0				
10	id.	10 к. с. (книп.) 1 : 250.	2 -	3,5	1 -	5,0	3,3			
			5 -	5,0		17,0				
			2 -	17,0		23,0				
11	id.	10 к. с. (книп.) 1 : 250.	16 час.	6,2	7 сут.	5,2	0			
			10 -	5,2		9,4				
			7 -	9,4		5,3				
			9 -	5,3		5,0				
			13 -	5,0		3,3				
			35 -	3,5		3,5				
			16 час.	3,3		7 сут.		40 -	3,5	0
			40 -	3,5				7 -	2,8	
			7 -	2,8				9 -	2,6	
			9 -	2,6				13 -	2,5	
			13 -	2,5				25 -	2,5	
			25 -	2,5				16 час.	0	
16 час.	0	40 -	0							
40 -	0	7 сут.	0							
7 сут.	0	9 -	0							
9 -	0	13 -	0							
13 -	0	32 -	0							
11	id.	10 к. с. (книп.) 1 : 250.	4½ час.	0	2 сут.		3,9	4,5		
			2 сут.	3,9		4 -	4,5			
			4 -	4,5		4½ час.	7,2			
			4½ час.	7,2		2 сут.с.	7,7			
			2 сут.с.	7,7		4 -	8,3			
			4 -	8,3						

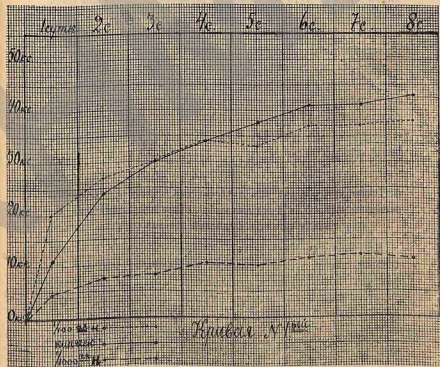
№№ наблюдений.	Количество субстрата.	Количество фермента.	Промежуток времени, через которые производились титрования.		Количество куб. сант. жидкости Fehling'a нараходованный при титровании.			
			без салицил. кислоты.	с салицил. кислотой.	без салицил. кислоты.	с салицил. кислотой.		
12	id.	10 к. с. (книп.) 1 : 250.	2 сут.	6,1	2 сут.	4 -	6,0	
			4 -	6,0		7 -		5,8
			7 -	5,8		1/10 (нек.).		7,4
13	8 куб. сант. 1 : 100.	10 к. с. (книп.) 1 : 250.	2 -	7,3	1 -	4 -	7,0	
			4 -	7,3		7 -		7,0
			7 -	7,0		3 час.		3,5
14	10 куб. сант. 1 : 100.	10 к. с. (книп.) 1 : 100.	3 час.	3,5	10 к. с. (книп.) 1 : 250.	5 -	7,2	
			5 -	7,2		1/10 (нек.).		29,6
			1/10 (нек.).	29,6		3 -		36,0
			3 -	36,0		5 -		20,0
			5 -	20,0		1/100 (нек.).		22,0
			1/100 (нек.).	22,0		5 -		0,3
14	10 куб. сант. 1 : 100.	10 к. с. (книп.) 1 : 100.	½ час.	0,3	10 к. с. (книп.) 1 : 250.	1½ -	1,4	
			1½ час.	1,4		3 -		2,5
			3 -	2,5		1/100 (нек.).		3,9
			1/100 (нек.).	3,9		½ -		6,4
			½ -	6,4		1½ -		11,0
			1½ -	11,0		3 -		0,9
14	10 куб. сант. 1 : 100.	10 к. с. (книп.) 1 : 100.	1½ -	1,5	10 к. с. (книп.) 1 : 250.	1½ -	1,5	
			1½ -	1,5		3 -		2,3
			3 -	2,3		3 -		2,3

ТАБЛИЦА 13-ая.

Сравнительный ход гидратации, производимой ферментами, кипяченными 15 минут в Коховском аппарате и различными долями некипяченого. Гидратация в холодной воде (t в пробирках 10—20° С°).

№№ наблюдений.	Количество субстрата.	Количество фермента.	Продукция артемии, через которые пропущены, при титровании.		№№ наблюдений.	Количество субстрата.	Количество фермента.	Продукция артемии, через которые пропущены, при титровании.							
			Колич. куб. сант.	время, мин.				Колич. куб. сант.	время, мин.						
1	10 куб. сант. 1:100.	10 куб. сант. (кип.) 1:250.	1 сут.	4,0	3	1/100 (нек.)	1 сут.	30,0	2	27,0					
			3	8,0			3	30,0							
			8	34,0			4	34,0							
			1/10.000 (нек.)	1			0	5	33,0						
			3	2,0			6	37,0							
			8	2,0			7	37,0							
							8	38,0							
			2	id.			30 куб. сант. (кип.) 1:600.	20 час.	10,0	4	1/1000 (нек.)	1 сут.	4,5	2	7,5
								2 сут.	24,0			3	8,0		
								3	32,0			4	10,5		
4	38,0	5			10,0										
7	41,0	6			11,5										
1/1.000 (нек.)	20 час.	4,5			7	12,0									
2 сут.	7,0	8			11,0										
3	8,0	id.			10 куб. сант. 11:200.	20 час.		7,0							
4	10,0					2 сут.		18,0							
7	13,0					3		24,0							
1/10.000 (нек.)	20 час.		0	4		29,0									
2 сут.	0		1/100 (нек.)	20 час.		9,0									
3	2,0		2 сут.	16,0											
4	2,0		3	20,0											
7	3,0		4	22,0											
3	id.		30 куб. сант. (кип.) 1:900.	1 сут.		11,0	5	id.	50 куб. сант. 1:1500.	20 час.	11,0	2	24,0		
				2		24,0				4	35,0				
		3		30,9	1/100 (нек.)	20 час.				18,0					
		4		34,0	2 сут.	23,0									
		5		37,5	4	25,0									
		6		41,0											
		7		41,0											
		8		43,0											

Наблюдение 3-ье приведенной таблицы 13-ой изобразим в видт кривой. № 1-ый. Пересекающиеся линии указывают на то, что кипяченный фермент, сравнительно мало дѣятельный в первое время, в дальнейшем все болѣе и болѣе нарастает в своей силѣ, и в концѣ концов превосходить 1/100-ую часть некипяченого, взятого для сравнения; другими словами, видна регенерация фермента.



Итак, различные способы наблюдения убѣдили насъ в томъ, что ферментация, производимая подвергнутой нагреванію Така-диастазой, объясняется возрожденіемъ, регенерацией ферментныхъ свойствъ. Легко видѣть, однако, что до-

казательство это лишь косвенное; именно, мы убедились въ невозможности другихъ предположеній, напр. предположенія объ участіи въ процессѣ бактеріальныхъ ферментовъ, о „стадахъ“ или „остаткахъ“ фермента, перенесшихъ кипяченіе безъ всякаго измѣненія своихъ свойствъ; однимъ словомъ, доказательство это скорѣе посило характеръ логическаго вывода, чѣмъ безусловной очевидности, и желаніе найти прямой путь къ рѣшенію вопроса продолжало быть самымъ насущнымъ.

Разъ обратный процессъ — самъ по себѣ не шель, т. е. прокипяченный ферментъ при стоянн не регенерировался, а въ то же время наблюдалось его очевидное ферментирующее дѣйствіе на крахмалъ, — мы рѣшили, что этотъ послѣдній играетъ большую роль въ наблюдаемомъ явленіи, пробуждая ферментъ къ дѣятельности, — въ силу ли своихъ коллоидальныхъ свойствъ, или своего специфическаго значенія для диастазы.

4. Температурныя границы дѣятельности гесп. бездѣятельности оксидазы Maltin'a и Така-диастазы. Нѣкоторыя замѣчанія по поводу optimum'a дѣйствія ферментовъ.

Нарушая хронологическое описаніе хода нашихъ изслѣдованій, мы въ пѣльяхъ ясности изложимъ обратимся къ фактамъ, которые были установлены лишь впоследствии, и имѣли рѣшающее значеніе для объясненія наблюдаемыхъ явленій.

Испытавъ неудачу при первоначальныхъ попыткахъ дать прямое доказательство регенерациі диастазы, мы занялись изученіемъ другихъ свойствъ приведеннаго въ бездѣятельность фермента и выяснили нѣкоторыя условія, влияющія на ферментативный процессъ. Параллельно съ этимъ мы испытывали отношеніе къ высокой температурѣ

другихъ ферментовъ — Maltin'a и амилолитическаго фермента Pankreatin'a; о результатахъ этихъ опытовъ мы скажемъ впоследствии, а теперь обратимся къ ферменту Maltin'у. Пользуясь гваяковой настойкой, какъ реактивомъ, легко установить, что какъ окисляющее, такъ и пероксидирующее свойство Maltin'a выражены очень рѣдко. Для нашихъ наблюденій мы не прямо применяли продажный препаратъ (Merck'a), а предварительно обрабатывали его спиртомъ и эфиромъ по обычнымъ приемамъ; концентрація употребляемыхъ растворовъ была обыкновенно 1:1000; видъ такихъ растворовъ при кипяченіи не мѣняется, не давая ни осадковъ, ни помутненій; реакція остается прежней — нейтральной. Если мы такой растворъ погрузимъ въ кипящую водяную баню на 5 минутъ и охладимъ, то окислительная способность остается, хотя и въ болѣе слабой степени, сравнительно съ первоначальной. Если мы растворъ фермента подвергнемъ 10-ти минутному нагреванію и охладимъ, то окислительная способность или совершенно пропадетъ или будетъ проявляться чрезвычайно слабо. Подобныя наблюденія говорятъ за большую „стойкость“ оксидазы — фактъ не новый и установленный для многихъ представителей этой группы ферментовъ. „Стойкость“ понимается въ томъ смыслѣ, что не весь растворъ фермента теряетъ свои специфическія свойства, а часть его остается въ этомъ смыслѣ неизмѣненнымъ. Далѣе, если мы прокипяченный около 10 минутъ и охлажденный растворъ раздѣлимъ на 2 порціи, одну изъ которыхъ испробуемъ на оксидуу тотчасъ же, а другой дадимъ простоять, положимъ, ¼ часа, то окажется, что въ первой порціи оксиданной реакціи или нѣтъ или она очень слаба, тогда какъ во второй она уже появилась или усилилась — фактъ, говорящій за регенерацию фермента, за обратный процессъ, протекающій, можно сказать, на глазахъ. Подобнымъ же образомъ, ферментъ, про-

кипяченный 15 минут в Коховском аппарате, теряет свои специфические свойства, а при стоянии через больше или меньше продолжительное время — полсуток, сутки — вновь их приобретает. Фермент, прокипяченный в Коховском аппарате 20 минут, регенерирует при стоянии лишь пероксидазная свойства, а не оксидазная. Подчасовое нагревание в Коховском аппарате (и больше продолжительное) оксидазы Maltin'a, повидимому, совершенно лишает ее способности к регенерации, которая не наступала даже через 1—2 недели.

Анализируя так называемую „стойкость“ оксидазы Maltin'a, мы пришли к совершенно неожиданному выводу. Существующее представление о „стойкости“ ферментов (к температурным влияниям) мало уясняет этот очень важный в теоретическом и практическом отношении вопрос. Трудно понять, почему в одном и том же растворе, подвергнутом одному и тому же температурному влиянию, может остаться небольшое количество вещества, на которое температура не действует, в то время, как главная масса этого вещества утрачивается все свои характерные свойства; трудно понять, почему эта небольшая часть не успела подвергнуться общему процессу, несмотря на сравнительно долгое действие высокой температуры. Если следовать за оксидазной (resp. пероксидазной) реакцией в зависимости от температуры, то устанавливается следующая закономерность: чем выше температура раствора Maltin'a, тем быстрее наступает оксидазная реакция, так что при 50°C она быстрее, чем при 40°-ой и обыкновенной, при 70°C быстрее, чем при всех ниже лежащих; по начиная с 75°—76°C реакция эта быстро ослабевает, а при 81°—82°C не наступает совершенно, окисления гваяковой настойки не происходит. (Это касается и температур больше высоких). Постановка подобных наблюдений

чрезвычайно проста. Положим, мы имеем раствор Maltin'a поровну разлитый в пробирки; берем одну из них, вставляем в нее термометр и погружаем пробирку в кипящую водяную баню; когда температура достигнет желательного предела, прибавляем несколько капель гваяковой настойки и смотрим за реакцией. Итак, уже около 81—82°C—на математически точных цифрах мы не претендуем—оксидазы нет, как таковой, она лишилась своих свойств, и сколько бы времени мы ни наблюдали при этих условиях, гваяковая настойка остается неизменной. Нам возражать на это, что, быть может, сама гваяковая настойка при температуре около 80°C приходит в такое состояние, что не способна дать красочной реакции, а что фермент остается в целости, но только не может проявить себя. Легко опровергнуть такое возражение: именно, если мы доведем до 80°C и даже до 98°—99°C—не раствор Maltin'a, а раствор коллоидальной платины, приготовленной по способу Bredig'a,—и прибавим к нему несколько капель гваяковой настойки, то красочная реакция проявляется чрезвычайно резко; очевидно, сама по себе настойка способна к указанной реакции. Итак, уже при 81°—82°C водный раствор оксидазы лишается своих специфических свойств, приходит в недействительное, скрытое состояние; стоит охладить такой раствор, реакция наступает вновь. Ввиду только что сказанного, общепринятый взгляд на стойкость оксидазы должен быть изменен. Оксидаза не потому стойка, что при действиях высокой температуры ее свойства пропадают лишь мало-по-малу, так что, напр., к концу 10-ти минутного кипячения сохраняется целой и нетронутой известная часть фермента; стойкость оксидазы основывается на способности ее легко переходить в скрытое состояние уже при температурах сравнительно невысоких с тем, чтобы при понижении температуры

возвращать временно утерянные свойства—въ той или другой степени. Если мы будем испытывать стойкость оксидазы, руководствуясь обычными приемами, то заметим лишь конечныя стадии процесса, а весь ход его останется для нас совершенно скрытым.

Итакъ, чѣмъ же объясняется наличие оксидазной реакціи послѣ кипяченія фермента? На основаніи приведенныхъ соображеній, мы придемъ къ неизбежному заключенію, что объясненіе это лежитъ въ чрезвычайно быстро идущемъ обратномъ процессѣ, въ регенерации ферментныхъ свойствъ—что обуславливается болѣе низкой температурой; чѣмъ сильнѣе и длительнѣе вліяніе высокой температуры, тѣмъ болѣе требуется времени для наступленія обратнаго процесса и тѣмъ несовершеннѣе онъ происходитъ, а при достаточно продолжительномъ дѣйствіи высокой температуры ферментъ можетъ безповоротно лишиться своихъ специфическихъ свойствъ, когда, какъ можно предполагать, органическая основа ферментной молекулы подвергнется далеко зашедшимъ и необратимымъ измѣненіямъ.

Болѣе низкая температура, напр. 70°C, при достаточно продолжительномъ дѣйствіи на оксидазу—20—30 минутъ—лишаетъ ее окислительной способности при этой температурѣ; но стоитъ охладить подобный растворъ, какъ ферментативныя свойства появляются вновь. Слѣдовательно, и при болѣе низкой температурѣ имѣетъ мѣсто процессъ, подобный описанному, но отличается лишь болѣе медленнымъ ходомъ.

Продолжая анализъ вопроса о дѣятельномъ и бездѣятельномъ состояніи оксидазы и о ея стойкости, мы встрѣтились еще съ однимъ фактомъ, о которомъ считаемъ нужнымъ упомянуть. Если мы продѣлаемъ съ помощью Maltin'a обыкновенную реакцію на оксидазу (а также пероксидазу) и нагревемъ жидкость до 80°—82°C (или выше), то, при этой

температурѣ, довольно скоро—черезъ $\frac{1}{2}$ —1—1 $\frac{1}{2}$ минуты—произойдетъ обезцвѣчиваніе жидкости, т. е. обезцвѣчиваніе гваяковой настойки; охладивши жидкость и прибавивши новую порцію Maltin'a, заметимъ, что гваяковая настойка вновь посинѣетъ. Въ чемъ кроется причина этого явленія? Предположеніе, которое намъ кажется болѣе вѣроятнымъ, состоитъ въ слѣдующемъ: окисляющей ферментъ, при обычныхъ условіяхъ переносившій кислородъ на другія тѣла, при высокой температурѣ обнаруживаетъ какъ разъ обратныя свойства: онъ самъ окисляется; объ этомъ мы судимъ потому, что окисленная гваяковая настойка при нагреваніи съ ферментомъ вновь раскисляется и приходитъ, такъ сказать, въ первоначальное свое состояніе, годное для новой реакціи окисленія. Приведемъ другія доказательства въ защиту этого взгляда. Если мы окислимъ гваяковую настойку растворомъ коллоидальной платины и нагремъ до 80°C и выше, то измѣненія цвѣта жидкости не произойдетъ даже при продолжительномъ наблюденіи, (и лишь при долгомъ кипяченіи на водяной банѣ—около полудна—произойдетъ измѣненіе жидкости, а именно довольно значительное обезцвѣчиваніе ея съ выпаденіемъ ярко синяго пигмента—явленіе, по всей вѣроятности связанное съ дальнѣйшимъ окисленіемъ гваяковой смолы); стоитъ теперь къ смѣси гваяковой настойки и платины, доведенной до 80°—82°C прибавить Maltin'a, нагрѣтаго до этой температуры, какъ очень быстро пойдетъ восстановительный по отношенію къ гваяковой настойкѣ процессъ, т. е. она вернется въ первоначальное, способное къ окисленію, состояніе, а потерявшій свои специфическія окислительныя свойства ферментъ самъ окислится.

Послѣ того, какъ мы установили границу температурной бездѣятельности оксидазы, нашей ближайшей цѣлью было изслѣдовать въ этомъ отношеніи Така-диастазу. Какъ мы,

уже указывали, рѣшение вопроса въ этомъ случаѣ представляло неизмѣримо большія трудности. Въ самомъ дѣлѣ, присутствие оксидазы констатируется съ помощью многихъ предложенныхъ реактивовъ очень быстро, почти моментально, и, наоборотъ, отсутствие оксидазной реакціи говорить за отсутствіе фермента. Диагностическій же ферментъ, гидратируя крахмалъ, способенъ проявить свое почти моментальное дѣйствіе лишь въ томъ случаѣ, когда онъ отличается значительной силой и находится въ большомъ количествѣ; меньшія же, а тѣмъ болѣе минимальныя дозы, „слѣды“ фермента требуютъ болѣе или менѣе большаго времени для того, чтобы проявить себя ощутительнымъ для нашихъ реактивовъ образомъ: въ первое время видъ крахмала остается неизмѣнимымъ, не показывая ни разжиженія, ни просвѣтленія, реакція съ іодомъ остается крахмальной, редукціи ни слѣда; однимъ словомъ, сразу нельзя сказать, есть лиагностическій ферментъ въ данной жидкости или нѣтъ его. Могутъ быть различныя причины этого явленія. Во-первыхъ, дѣятельность диастазы и другихъ ферментовъ, согласно взглядамъ нѣкоторыхъ авторовъ⁷⁵⁾, проходитъ черезъ короткій скрытый періодъ, въ теченіи котораго идетъ, такъ сказать, лишь подготовка къ ферментации. Далѣе, какъ указываетъ *Bredig*⁸⁸⁾, если катализаторъ прибавленъ лишь въ минимальномъ количествѣ, то онъ уничтожается субстратомъ и поэтому каталитическое дѣйствіе проявиться не можетъ: необходимы большія дозы катализатора, чтобы реакція началась. Наконецъ, послѣдняя, наиболѣе дѣйствительная, причина заключается въ томъ, что, хотя процессъ и начался, по ввиду чрезвычайно незначительнаго количества фермента, идетъ настолько медленно, что до извѣстнаго предѣла остается неуловимымъ, а затѣмъ лишь постепенно, становится доступнымъ нашимъ реактивамъ и можетъ быть доказанъ.

Однимъ словомъ, обыкновенная методика безильна быстро рѣшить вопросъ о наличности малыхъ количествъ диастазы. Поэтому мы примѣнили особый способъ наблюденія, дѣйствія ферментомъ на очень незначительныя количества крахмала, напр., на 1—2 капли $\frac{1}{2}\%$ или $\frac{1}{4}\%$ -го отвара крахмала, предполагая, что при этихъ условіяхъ даже очень незначительныя количества диастазы быстро проявятъ себя, и посредствомъ реакціи съ іодомъ можно будетъ слѣдить за ходомъ гидратации. Дѣйствительно, поставленные въ этомъ направленіи опыты дали вполне удовлетворительные результаты. Такія незначительныя количества диастазы, какъ 0,0001 и 0,00001 грамма съ помощью такого приема констатируются очень быстро—черезъ 1—2—4 минуты; поэтому, испытывая неизвѣстный растворъ на диастазу и не получая въ указанный срокъ измѣненія крахмальной реакціи съ іодомъ, мы вправѣ заключить, что въ жидкости ферментъ находится или въ неизмѣримо маломъ количествѣ, или совершенно отсутствуетъ. Этотъ методъ былъ нами примѣненъ при изученіи вопроса о температурной границѣ бездѣятельности диастазы.

Рядъ фактовъ говоритъ въ пользу того, что Така-диастаза теряетъ всѣ свои специфическія свойства уже въ первые моменты дѣйствія температуры, близкой къ 80°C.

Положимъ, мы имѣемъ обычное количество отвара крахмала (10—20 куб. сант.), нагрѣтаго до 80°C; прибавимъ къ нему растворъ диастазы, быстро доведенный до той же температуры, и станемъ слѣдить за гидратацией при этихъ температурныхъ условіяхъ, производя титрованія черезъ $\frac{1}{4}$ часа, $\frac{1}{2}$ часа, 1 часъ и болѣе; крахмалъ останется неизмѣнимымъ, не дасть ни слѣда редукціи. Если параллельно съ этимъ, подобную реакцію продѣлаемъ при температурѣ обыкновенной, то реакція начнется моментально и бурно пойдетъ впередъ. Ввиду того, что крахмалъ при высокой

температуръ способенъ къ гидратации даже въ большей степени, чѣмъ при обыкновенной, отсутствие ея при указанныхъ условияхъ приходится объяснить утратой ферментомъ специфическихъ свойствъ—по крайней мѣрѣ большей ихъ части. Сказать, что ферментъ отсутствовалъ совершенно, было бы не совсѣмъ справедливо, ибо возможно предположеніе, что первоначально оставалась неизвѣстная часть дѣйствующаго вещества, которая разрушилась лишь при дальнѣйшемъ нагрѣваніи. Если мы тотъ же опытъ повторимъ, применяя минимальныя количества крахмала при прежнемъ, сравнительно большомъ количествѣ фермента, то получимъ опять-таки отрицательный результатъ, т. е. охлажденная жидкость съ разведеннымъ растворомъ йода въ іодистомъ калиѣ дастъ ясную крахмальную реакцію. Этотъ результатъ имѣетъ уже незамѣримо большую доказательность въ смыслѣ потери ферментомъ всѣхъ своихъ специфическихъ свойствъ въ первые моменты дѣйствія 80°-ой (и болѣе высокой, конечно,) температуры.

Если мы продѣлаемъ опытъ нѣсколькимъ образомъ, а именно доведемъ растворъ фермента до 80—82°C, продержимъ его при этой температурѣ около минуты, охладимъ и прибавимъ къ ферменту минимальное количество крахмала то увидимъ, что гидратация этого послѣдняго наступитъ лишь черезъ 5—6 минутъ, тогда какъ $\frac{1}{100}$ -ая и $\frac{1}{1000}$ -ая части того же количества фермента, не подвергнутаго нагрѣванію, уже черезъ $\frac{1}{2}$ минуты (первая) и 1—2 минуты (вторая) начнутъ измѣнять крахмаль, давая декстриновую окраску съ йодомъ. Изъ сопоставленія этихъ данныхъ ясно, что при 80—82°C лежитъ граница дѣятельности resp. бездѣятельности Така-диастази, аналогично оксидазѣ Maltin'a. Спрашивается теперь, какъ же относится этотъ ферментъ къ температурамъ выше optimum'a его дѣйствія (45—50°C) и ниже 80°C? На основаніи приведенныхъ выше цифръ, до-

казывающихъ ослабленіе фермента уже при такихъ температурахъ, какъ 38°C, можно заранѣе предвидѣть, что ослабленіе ферментныхъ свойствъ, по мѣрѣ повышенія температуры, будетъ выступать все въ большей и большей мѣрѣ; къ этому вопросу мы еще вернемся, а теперь зададимся другимъ—какъ смотрѣть на optimum температуры и какъ идти ферментативный процессъ выше этого optimum'a? Когда рѣчь идетъ объ optimum'ѣ дѣйствія ферментовъ, разумѣется обыкновенно та температура, при которой извѣстное количество фермента, дѣйствуя на сравнительно большое количество субстрата, дастъ въ теченіе опредѣленнаго промежутка времени—напр. сутокъ—наибольшій эффектъ. Что такой optimum дѣйствительно существуетъ—это несомнѣнно. Но изъ чего складается этотъ optimum? Во всѣхъ ли стадіяхъ процессъ при оптимальной температурѣ идетъ наиболѣе бурно сравнительно съ другими температурами, лежащими выше и ниже его? Абсолютно ли само понятіе объ optimum'ѣ или, наоборотъ, носитъ характеръ условный? На основаніи своихъ наблюденій мы пришли къ заключенію, что понятіе объ оптимальной температурѣ значительно сложнее, чѣмъ это кажется съ перваго взгляда. Мы указывали на опыти съ оксидазою Maltin'a, которая тѣмъ сильнѣе дѣйствуетъ на гваяковую настойку, чѣмъ выше температура, такъ что при 50°C сильнѣе, чѣмъ при 40°, при 70°C сильнѣе, чѣмъ при 40°, 50° и 60° и т. д. до тѣхъ поръ, пока температура не поднимется до 75—76°C, когда энергія процесса чрезвычайно быстро идетъ на убыль, а при 81°—82°C сводится на нѣтъ. Гдѣ же тутъ optimum дѣйствія? Какъ его понимать? Если бы мы применили большое количество гваяковой настойки, а не то, которое требуется для качественнаго доказательства оксидазы и измѣряется всего нѣсколькими каплями,—и стали наблюдать процессъ окисленія при различныхъ температурныхъ условияхъ, то наибольшій эф-

фактъ дѣйствія указать бы намъ на optimum температуры, и очень возможно, что этотъ послѣдній лежалъ бы какъ разъ въ тѣхъ предѣлахъ, которые приводятся различными авторами для ферментовъ вообще (40—50°С). И въ этомъ случаѣ первая стадія процесса протекала бы всего энергичнѣе при температурахъ выше optimum'a, но въ дальнѣйшемъ энергія процесса стала бы все значительнѣе и значительнѣе ослабѣвать, вслѣдствіе перехода фермента въ недѣйтельное состояніе, и въ результатѣ максимальный эффектъ дали бы температуры сравнительно невысокія, которыя оказываютъ на окислацію менѣе ослабляющее вліяніе. Температуры, лежащія ниже optimum'a, могли бы дать цифры, одинаковыя съ температурами, лежащими выше его; а между тѣмъ одинъ и тотъ же результатъ былъ бы достигнутъ въ обоихъ случаяхъ особыми путями: въ первомъ случаѣ ферментъ можетъ дѣйствовать долгое время, замѣтно не ослабѣвая въ силѣ, но энергія процесса, вслѣдствіе невысокой температуры, мала; во второмъ случаѣ, наоборотъ, высокая температура чрезвычайно ускоряетъ окислительный процессъ, но въ то же время дѣйствуетъ пагубно на окисляющій агентъ, на ферментъ. Optimum же дѣйствія объясняется бы тѣмъ, что при немъ оба эти вліянія, противоположныя по характеру, сочетаются въ наиболѣе благоприятномъ для конечнаго эффекта окисленія смыслѣ. Эти соображенія вполнѣ приложимы и для диастатическаго фермента. Optimum дѣйствія Така-диастазы лежитъ около 45°—50°С. Казалось бы, опять-таки, что эта температура является оптимальной для всѣхъ стадій процесса, съ начала до конца; ближайшій анализъ явленія показываетъ ошибочность такого предположенія. Постановка приводимыхъ въ таблицѣ 14-ой наблюдений заключалась въ слѣдующемъ. Мы имѣли равныя количества одного и того раствора Така-диастазы, быстро довели ихъ до различныхъ, указанныхъ въ таблицѣ, темпе-

ратуры и соединяли съ равными между собою количествами крахмала, доведеннаго до соответственной температуры, гидратация проходила въ теченіе 5 минутъ, а затѣмъ производились титрованія.

ТАБЛИЦА 14-ая.

№ наблюдени.	Количество фермента.	Количество субстрата.	Продолжительность гидратации.	Температура при которой происходила гидратация.	Количество куб. сант. зидкости <i>Fehling's a</i> израсходованной при титрованіи.
1	1 куб. сант. 1:1000.	20 куб. сант. 1:500.	5 минутъ.	20°	3,0
				40°	3,5
				45°	3,6
				50°	4,5
				60°	5,0
				80°	5,2
2	1 куб. сант. 1:400.	10 куб. сант. 1:100.	5	20°	5,0
				50°	8,0
				60°	11,0
				70°	9,5
				75°	2,5

Мы видимъ, какъ повышается энергія процесса въ зависимости отъ температуры, т. е. насколько энергичнѣе одно и то же количество фермента дѣйствуетъ при температурахъ, лежащихъ выше optimum'a, чѣмъ при немъ; но это касается лишь краткаго периода гидратации, ея первыхъ стадій: въ дальнѣйшемъ же, опять-таки, ходъ процесса измѣнится въ силу того, что ферментъ все болѣе и болѣе будетъ переходить въ недѣйтельное состояніе, и въ результатѣ болѣе продолжительнаго наблюденія, напр. суточного, наибольшую гидратацию произведетъ ферментъ, дѣйствовавшій при 40°—50°С. Однимъ словомъ, установленный для

ферментов optimum действия не абсолютны, а стоит в тьшой зависимости от времени, в течение которого наблюдается процесс.

5. Непосредственное, прямое доказательство регенерации диастатических свойств.

Переходим к новому ряду наблюдений, которые самым решительным и несомненным образом доказывают, что причиной чрезвычайной „стойкости“ диастатического фермента по отношению к температурѣ является обратный процесс, регенерация ферментных свойств. Данные этих наблюдений развеяли все сомнѣния, касающіяся участия въ процессѣ посторонних и случайныхъ влияній, напр., бактерий, остатковъ фермента и т. д. и, въ сущности, свѣдѣли излишними все косвенныя доказательства обратности ферментныхъ свойствъ. Мы должны сказать, что препараты фермента, съ которыми получены ниже приводимыя данныя, обладали особенно высокой гидролитической силой и, по всей вѣроятности, имѣли и качественныя отличія отъ прежнихъ препаратовъ, потому что постановка нѣкоторыхъ опытовъ этой группы, одинаковая съ прежними, привела къ инымъ результатамъ. Когда было установлено, что уже въ первые моменты дѣйствія 80°-ой температуры диастаза лишается своихъ специфическихъ свойствъ, мы опять обратились къ вопросу о возможности ея прямой регенерации, т. е. самой по себѣ, безъ крахмала. Вопросъ былъ бы рѣшенъ въ положительномъ смыслѣ, если бы удалось доказать, что, положимъ 2 одинаковыя порціи раствора фермента, нагрѣтыя до 80°С и охлажденныя до обыкновенной температуры имѣютъ неодинаковую ферментативную силу въ зависимости оттого, когда ихъ соединить съ крахмаломъ — непосредственно ли послѣ охлаждения или черезъ нѣкоторый про-

межутокъ времени; положимъ, что вторая пробирка съ ферментомъ, простоявшая напр. 1 часъ сама по себѣ, дала при титрованіи значительно больше сахара, чѣмъ первая: это ясно указало бы на начавшійся обратный процессъ, на регенерацию фермента. Приводя таблицу 15-ую, свѣдѣаемъ относительно ея особыя замѣчанія. Постановка наблюдений, записанныхъ на эту таблицу, заключалась въ томъ, что растворъ фермента — или въ одной общей колбѣ, или поровну разлитый въ одинаковыя пробирки — подвергался тому или другому температурному влиянію и быстро охлаждался до обыкновенной температуры. Затѣмъ бралось определенное количество такого раствора, соединялось съ определеннымъ количествомъ отвара крахмала той же комнатной температуры, и смесь оставлялась стоять въ течение строго определенного времени; затѣмъ производилось титрование. Такимъ образомъ мы получали эффектъ гидратации, на которую способенъ ферментъ нагрѣтый и быстро охлажденный, не стоявший; это было исходное титрование, съ которымъ мы сравнивали все другія; для краткости мы называемъ такія пробирки „исходными“. Черезъ то или другое время стоянія фермента, самого по себѣ, продолжалось то же самое, т. е. бралось определенное количество фермента, соединялось съ определеннымъ количествомъ крахмала, и черезъ определенное время производилось титрование. Сравнивая эту цифру съ полученной прежде, съ „исходной“, легко было видѣть наступила ли регенерация, и въ какой степени. Параллельно измѣрялась титрованіемъ гидратация, на которую способенъ некипяченный ферментъ при тѣхъ же условіяхъ опыта, т. е. въ томъ же объемѣ и концентраціи, что и нагрѣтый, при той же температурѣ, количествѣ крахмала и продолжительности гидратации. Если растворы фермента (и крахмала) оставлялись на долгое время, къ нимъ прибавлялся толуоль.

ТАБЛИЦА 15-ая.

Регенерация диастических свойств после нагревания фермента (Обыкновенная температура).

№№ лабораторий.	Количество субстрата.	Количество фермента.	Сила температурного действия.	Продолжительность гидролиза.	Обозначение пробирок.	Колич. куб. сант. жид. <i>Fehling'a</i> в расх. при титров.
1	10 куб. сант. 1:100.	10 куб. сант. 1:1.000.	доведенъ до 85° С.	15 мин.	ненагрѣтая	10,2
					исходная	1,5
2	10 куб. сант. 1:100.	10 куб. сант. 1:1.000.	15 минутъ въ Ковховскомъ аппаратѣ.	2 часа.	исходная	0,8
					исходная	0,95
3	10 куб. сант. 1:100.	10 куб. сант. 1:1.000.	доведенъ до 95° С.	30 мин.	ненагрѣтая	12,0
					исходная	0,6
4	5 куб. сант. 1:200.	5 куб. сант. 1:1.000.	доведенъ до 85° С.	20 мин.	ненагрѣтая	7,5
					исходная	3,0

№№ лабораторий.	Количество субстрата.	Количество фермента.	Сила температурнаго действия.	Продолжительность гидролиза.	Обозначение пробирок.	Колич. куб. сант. жид. <i>Fehling'a</i> в расх. при титров.
5	5 куб. сант. 1:200.	10 куб. сант. 1:1.000.	доведенъ до 85° С.	20 мин.	ненагрѣтая	6,0
					исходная	1,2
6	id.	5 куб. сант. 1:1.000.	доведенъ до 95° С.	10 мин.	ненагрѣтая	4,0
					исходная	0,6
7	id.	id.	доведенъ до 85° С.	20 мин.	ненагрѣтая	6,0
					исходная	0,3
8	id.	id.	доведенъ до 85° С.	20 мин.	ненагрѣтая	9,0
					исходная	1,4
9	id.	id.	доведенъ до 85° С.	20 мин.	ненагрѣтая	7,5
					исходная	1,5

№№ плавильни.	Количество субстрата.	Количество фермента.	Сила температурного действия	Продолжительность выдержки.	Обозначение пробирок.	Колич. куб. сант. жид. <i>Рейнол</i> в раск. при выдерж.	
10	5 куб. сант. 1 : 200.	5 куб. сант. 1 : 1.000.	доведень до 85° С.	20 мин.	ненагрятая	8,0	
					исходная	0,9	
					прогованин	15 мин.	1,0
						1 час.	2,5
						1 ч. 45 м.	3,6
						3 часа.	4,1
						4 -	4,8
						5 час.	5,9
						5 сут.	6,0
						20 -	5,0
11	id.	id.	5 мин. кипят. на вод. бань.	4 часа.	исходная	1,5	
					пр.	20 час.	2,0
						3 сут.	3,2
12	id.	id.	при 70° С. 10 мин.	20 мин.	ненагрятая	6,3	
					исходная	0,8	
					прогованин	½ часа.	1,0
						1 час.	1,6
						4½ часа.	3,8
						1 сутки.	3,9
						2 сут.	4,0
1 -	4,1						
13	id.	id.	доведень до 85° С.	10 мин.	ненагрятая	6,0	
					исходная	0	
					прогованин	20 мин.	0,5
						1 час.	1,8
						2 часа.	2,6
						3 -	2,9
						4 -	3,3
						22 -	4,2
						2 сут.	4,1
						10 -	4,3
15 -	3,4						
14	id.	id.	при 70° С. 30 мин.	10 мин.	ненагрятая	6,2	
					исходная	4,2	
					прогов.	1 час.	4,6
						2 часа.	4,9
						5 час.	4,8
						2 сут.	5,0
						11 -	4,9

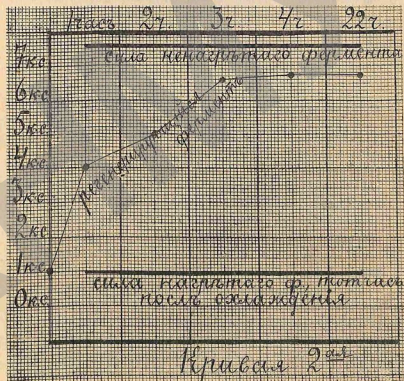
№№ плавильни.	Количество субстрата.	Количество фермента.	Сила температурного действия.	Продолжительность выдержки.	Обозначение пробирок.	Колич. куб. сант. жид. <i>Рейнол</i> в раск. при выдерж.						
15	5 куб. сант. 1 : 200.	5 куб. сант. 1 : 1.000.	при 63° С. 1 час.	10 мин.	ненагрятая	8,0						
					прогов.	исходная	1,0					
						1 час.	1,4					
						3 -	1,3					
						20 -	1,8					
						3 сут.	1,6					
						8 -	1,4					
						16	id.	id.	при 60° С. 1½ часа.	20 мин.	ненагрятая	9,0
											исходная	6,0
											прогов.	1 час.
3 -	5,0											
2 сут.	5,8											
8 -	5,9											
17	id.	id.	½ часа на кип. вод. бань.	19 час.	исходная	3,5						
					прогов. 20 ч.	5,0						
18	id.	id.	1 час на кип. вод. бань.	19 час.	исходная	2,5						
					прогов. 20 ч.	2,6						
19	id.	id.	при 71° 20 мин.	1 ч. 15 м.	исходная	0,8						
					прост.	1 час.	1,5					
						24 -	3,5					
20	id.	id.	доведень до 80° С.	15 мин.	ненагрятая	7,7						
					исходная	1,0						
					прогованин.	1 час.	4,0					
						2 -	5,0					
						3 -	6,5					
						4 -	6,6					
						22 -	6,6					
21	id.	5 куб. сант. 1 : 10.000.	доведень до 80° С.	40 мин.		ненагрятая	6,2					
исходная					1,0							
прогованин.					55 мин.	1,8						
					2 час.	1,9						
					3 -	3,0						
					4 -	4,0						
					5 -	3,0						
	6 -	4,0										
1 сут.	4,3											
4 -	4,0											

№ наблюдений.	Количество субстрата.	Количество фермента.	Сила температурного влияния.	Продолжительность выдержки.	Обозначение пробирок.	Колич. куб. смат. в вид. <i>Filobol</i> в пробирк. при изгн.
22	5 куб. смат. 1 : 200	5 куб. смат. 4 : 1.000.	при 70° С. 10 мин.	2½ час.	ненагрятая	8,5
					исходная	2,5
					прот. { 2½ час.	3,7
					1 сут.	4,1
2 сут.	4,8					
23	id.	5 куб. смат. 1 : 1.000.	доведен до 81° С.	10 мин.	ненагрятая	5,9
					исходная	0,7
					прот. { 1¼ час.	3,8
					3 »	4,2
7 »	5,9					
2 сут.	5,0					

Из таблицы 15-ой видно, что регенерация диастазы — факт, не подлежащий никакому сомнению. Чем меньше было температурное влияние, тем энергичнее идет регенеративный процесс, и в некоторых случаях, повидному, способен доходить до конца, т. е. диастазы возрождается в полной мере, до своей первоначальной силы. Для наглядности представляем данные наблюдения 20-го в видъ кривой, где верхняя горизонтальная линия условно изображает силу ненагрятго фермента, нижняя горизонтальная — силу фермента тотчас постъ нагрывания и охлаждения, а средняя — собственно кривая — ходъ регенерации.

Такимъ образом, мы явились свидетелями процесса, о возможности котораго даже трудно было подозревать: ферментъ, это лабильное вещество, для котораго полная и безповоротная разрушаемость высокой температурой столь характерна, проходя стадию бездѣтельности, совершенной утраты своихъ специфическихъ свойствъ — при пониженіи температуры мало-по-малу приобретать ихъ вновь, иногда даже

въ полной мере. Эти данныя заставляютъ сильно измѣнить существующіе взгляды на разрушаемость — по крайней мере в некоторыхъ — ферментовъ. Быть можетъ, въ организмѣ,



жизнь котораго тѣснѣйшимъ образомъ связана съ наличностью ферментовъ, существуютъ тысячи условий, способныхъ, подобно кратковременному дѣйствию высокой температуры, переводить ферменты изъ дѣятельнаго состоянія въ скрытое и обратно, и направлять, такимъ образомъ, жизненные процессы въ желаемую сторону. Особенно мы должны

№№ выделений.	Производительность пастбищных ферм-та.		Обозначение титруемых пробирок.	Колич. куб. сант. элюата при титров. пробир.	№№ выделений.	Производительность пастбищных ферм-та.		Обозначение титруемых пробирок.	Колич. куб. сант. элюата F. oblonga при титров.
	Производительность гидратации.	Производительность гидратации.				Производительность гидратации.	Производительность гидратации.		
1	доведень до 85° С.	20 минут.	простоваш. 10° С.	4,5	2	до 85° С.	20 минут.	прот. 5 ⁰ -10 ⁰ -20 ⁰ С.	5,0
			21° С.	6,0				6 сут. 20° С.	5,5
			37° С.	6,0				37° С.	6,0
			50° С.	0				простоваш. 20° С.	5,3
								6 сут. 1 37° С.	4,7
								простоваш. 20° С.	5,2
	20 минут.	1 сутка при тем-ах:	10° С.	5,5	3	до 85° С.	20 минут.	неагрятая	6,2
			21° С.	6,0				исходная.	4,8
			37° С.	6,0				простоваш. 20° С.	4,6
								1 час: 40° С.	4,6
								45° С.	4,4
								простоваш. 20° С.	4,9
2	20 минут.	1 час при тем-ах:	10° С.	5,3	3	при 60° С. проваривать 30 мин.	10 минут.	2 час: 20° С.	4,9
			21° С.	6,2				40° С.	4,9
			37° С.	6,0				45° С.	4,6
								простоваш. 20° С.	4,8
								40° С.	4,7
								45° С.	4,1
	20 минут.	3 часа:	50° С.	0	4	до 85° С.	20 минут.	неагрятая	8,0
								исходная.	0,8
								простоваш. 20° С.	1,0
								15 мин. 40° С.	1,6
								45° С.	1,0
								простоваш. 20° С.	2,5
20 минут.	3 часа:	50° С.	0	4	до 85° С.	20 минут.	1 час: 20° С.	3,3	
							40° С.	3,3	
							45° С.	1,3	
							простоваш. 20° С.	3,6	
							40° С.	4,6	
							1 1/2 час. 45° С.	2,3	
20 минут.	прот. 20 час:	50° С.	0	4	до 85° С.	20 минут.	20° С.	4,1	
							40° С.	4,6	
							45° С.	2,0	
							простоваш. 21° С.	5,0	
							37° С.	5,5	
							50° С.	0	

№№ выделений.	Производительность пастбищных ферм-та.		Обозначение титруемых пробирок.	Колич. куб. сант. элюата при титров. пробир.	№№ выделений.	Производительность пастбищных ферм-та.		Обозначение титруемых пробирок.	Колич. куб. сант. элюата F. oblonga при титров.
	Производительность гидратации.	Производительность гидратации.				Производительность гидратации.	Производительность гидратации.		
4	доведень до 85° С.	10 минут.	простоваш. 20° С.	4,8	6	до 85° С.	10 минут.	неагрятая	8,0
			4 час. 40° С.	4,5				исходная.	1,0
			45° С.	1,8				20° С.	1,4
			простоваш. 20° С.	5,0				40°-42° С.	1,4
			5 час. 40° С.	4,5				45° С.	1,2
			45° С.	1,6				простоваш. 20° С.	1,3
	20 минут.	1 час:	45° С.	0	5	до 85° С.	10 минут.	3 час. 40° С.	1,3
								45° С.	1,2
								20 мин. 20° С.	0,5
								40° С.	1,0
								45° С.	0,3
								(св.д.)	0
5	доведень до 85° С.	10 минут.	0	6	до 85° С.	10 минут.	20 мин. 20° С.	1,8	
							40° С.	2,5	
							45° С.	0,3	
							1 час. 20° С.	2,6	
							40° С.	3,4	
							45° С.	0,3	
	20 минут.	2 часа:	45° С.	0	6	до 85° С.	10 минут.	3 час. 20° С.	2,9
								40° С.	3,3
								45° С.	0,3
								4 час. 20° С.	3,3
								40° С.	3,3
								45° С.	0,3
6	доведень до 85° С.	10 минут.	0	7	до 85° С.	10 минут.	22 час. 20° С.	4,9	
							40° С.	5,1	
							45° С.	0	
							2 сут. 20° С.	4,1	
							40° С.	3,2	
							45° С.	0	
	20 минут.	6 сут.	45° С.	0	7	до 85° С.	10 минут.	20° С.	4,5
								40° С.	3,5
								45° С.	0
								простоваш. 21° С.	6,5
								40° С.	5,0
								45° С.	0

Примеч. Начиная с 3-го ч. этого опыта, темпер. у всех пробирок была одинаковой, а именно 20°-ая.

Примеч. Начиная с 11-го часа этого опыта, темпер. у всех пробирок была одинаковой, а именно 20°-ая.

№ п/п	Продолжительность, мин.	Температура, °С.	Обозначение тигрушек пробирок.	Колич. куб. смт. инкубационной среды	№ п/п	Продолжительность, мин.	Температура, °С.	Обозначение тигрушек пробирок.	Колич. куб. смт. инкубационной среды				
										Продолжительность, мин.	Температура, °С.		
Доводень до 30°С. 10 минут.	просохлаив.	4 час.	21° С. 40° С. (сост.) 45° С.	6,6 5,0 6,1	9	до 80°С.	21° С. 40° С. 45° С.	6,6 4,9 5,8	5,9 0,7 3,8				
										22 час.	21° С. 40° С. 45° С.	6,6 4,9 0	3,8 4,0 4,4
		4 час.	20° С. 30° С.	5,9 5,5			5,0 4,5						
								2 сут.	20° С. 30° С.	5,0 4,5	5,0 4,5		
												неагрятая исходная	1½ ч.
	3 час.	20° С. 30° С.	4,2 4,5	4,2 4,5									
						7 час.	20° С. 30° С.	5,9 5,5	5,0 4,5				
										2 сут.	20° С. 30° С.	5,0 4,5	5,0 4,5
	неагрятая исходная	1½ ч.	20° С. 30° С.	3,8 4,0									
						3 час.	20° С. 30° С.	4,2 4,5	4,2 4,5				
										7 час.	20° С. 30° С.	5,9 5,5	5,0 4,5
2 сут.	20° С. 30° С.	5,0 4,5	5,0 4,5										

Отбивая приведенные в табл. 16-ой цифры, мы приходим к заключению, что температура играет громадную роль при регенеративном процессе д-стазы и направлять его совершенно различными путями.

При этом, 50°-ая температура, признаваемая оптимальной для деятельности Така-д-стазы, оказывается бездельной

вернуть ему утерянные свойства; наоборот, она сводит на нуль и тот запас ферментативной силы, которая обнаруживает фермент при соединении с крахмалом непосредственно после нагревания и охлаждения; другими словами, разрушающее влияние этой температуры сильнее, чем склонность фермента к регенерации; это же касается, конечно, и температур больше высоких.

При 45°С обратный, регенеративный процесс берет перевес над разрушающим действием этой температуры, и фермент начинает приобретать утерянные свойства, — однако, лишь в очень незначительной степени; иногда (напр. наблюд. 5-ое табл. 16-ой) вернувшиеся свойства остаются *in statu quo* долгое время; в этом случае иметь место своеобразное равновесие химической системы, объясняющееся двумя противоположными влияниями: с одной стороны склонностью фермента вернуть свои утерянные свойства, а с другой — задерживающим или разрушающим действием 45°-ой температуры на этот обратный процесс.

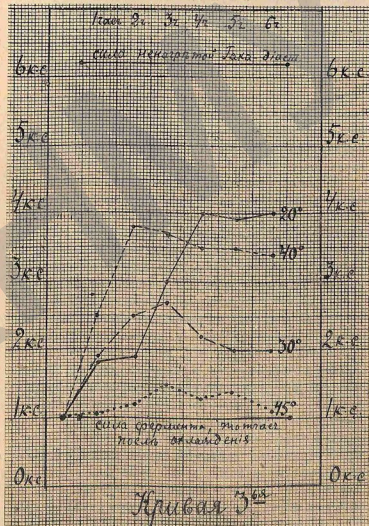
При 40°-ой температуре обратный процесс идет наиболее бурно и быстро достигает сравнительно очень высоких цифр; однако, это касается лишь первых часов наблюдения, ибо в дальнейшем эта же 40°-ая температура оказывает явно неблагоприятное влияние, давая сперва остановку обратного процесса, а затем и уменьшая его силу сравнительно с той, которая уже достигнута.

Ход процесса при 30°-ой температуре по своей силе и характеру занимает среднее место между 40°-ой и обыкновенной (около 20°С), при которой регенерация фермента происходит более медленно, но за то имеет значительно большую продолжительность, так что, в конц концов, фермент регенерируется при ней в более полной мере, сравнительно с температурами выше лежащими.

На кривой № 3-й мы изображаем графически регенеративный процесс диастаза, в зависимости от различных температур (пользуемся цифрами наблюдения 9-го таблицы 16-ой).

Одним словом, видна чрезвычайно тесная зависимость между температурой с одной стороны и нарастанием специфических свойств регенерирующегося фермента—с другой; здесь также существует свой optimum температуры, но понятие о нем не менее условно, чѣм понятие об optimum'ѣ дѣйствія ферментовъ вообще; ибо, если мы ограничим время своего наблюдения нѣсколькими (2—3) часами, то должны будемъ заключить, что температура близкая къ 40°C есть optimum обратного процесса; но стоитъ взять суточный промежутокъ времени, какъ отношенія изменятся, optimum'омъ регенерации фермента придется назвать температуру обыкновенную или еще болѣе низкую.

Итакъ, изслѣдуя регенерацию ферментативныхъ свойствъ, мы убѣждаемся, какую громадную роль играетъ температура въ этомъ процессѣ. Ея двойственное вліяніе на ферменты выступаетъ еще съ болѣею ясностью, чѣмъ при обычномъ наблюдении ферментативныхъ процессовъ: чѣмъ выше температура, тѣмъ энергичнѣе—конечно, въ извѣстныхъ предѣлахъ—идетъ возрожденіе ферментативныхъ свойствъ, но эта же температура въ дальнѣйшемъ ослабляетъ регенерацию; наоборотъ, чѣмъ ниже температура, тѣмъ умѣреннѣе идетъ реакція и тѣмъ болѣе глубокихъ степеней она достигаетъ. Лабильность ферментовъ, всѣмъ признаваемая, представлятъ настолько тѣсную и прямую функцію температуры, что пользуясь этой послѣдней можно по произволу изменять силу и характеръ ферментативнаго дѣйствія; можно сдѣлать ходъ процесса равнымъ нулю или усилить его до большихъ скоростей; можно перевести соверша-



яющую реакцию в скрытое состояние и вновь возродить, быстро или медленно, на очень короткое или на очень долгое время.

7. Степень регенерации диастазы после кипячения.

При наблюдении процесса регенерации ферментных свойств совершенно естественно являлся вопрос: насколько же далеко идет эта регенерация? Мы видели, что, темъ незначительнѣе температурное влияние, темъ быстрее и энергичнѣе идет обратный процесс; наоборот, при дѣйстви 113-ой температуры ходъ ферментативнаго процесса отличается чрезвычайной медленностью, продолжается мѣсяцами (быть может, и годами), при чемъ въ результатъ не получается полной гидратации крахмала, несмотря на то, что количество его употреблялось сравнительно небольшое: 5—10 куб. сант. 1:100. При рѣшеніи вопроса о степени регенерации или, что тоже, о силѣ подвергнутаго нагреванію фермента необходимо было выбрать особую методику наблюдений. (Этимъ вопросомъ мы занимались въ то время, когда еще не обладали препаратами диастазы, способными регенерироваться сами по себѣ, безъ крахмала и отличающимися особенно высокой силой своего дѣйствія). Дѣло въ томъ, что различныя количества (ненасыщен) Така-диастазы, напр. 10 куб. сант. растворовъ 1:1000, 1:10.000 и 1:100.100, дѣйствуя на сравнительно небольшія количества отвара крахмала, напр. на 10 куб. сант. 1:100 даютъ приблизительно одинаковыя количества сахара (около 50 mg или 50 куб. сант. жидк. Fehling'a), если титрование производить черезъ достаточно долгій промежутокъ времени, напр. черезъ 1—2 сутокъ; вся разница заключается въ способѣ дѣйствія—болѣе быстромъ или болѣе медленномъ—указанныхъ количествъ фермента, но не въ конечномъ результатѣ гид-

ратации. Поэтому, если напр. 10 куб. сант. раствора фермента 1:1.000, подвергнутаго $\frac{1}{4}$ часовому нагреванію въ Коховскомъ аппаратѣ, дѣйствуя на 10 куб. сант. крахмала, черезъ 2 сутокъ дадутъ около 50 mg. сахара, то мы не въ состояніи сказать, — какова сила этого фермента и какой степени достигла регенерация, напр. $\frac{1}{1000}$ -ой ли части первоначальной величины, или $\frac{1}{100}$ -ой и т. д. Въ наблюденияхъ, проводимыхъ въ этомъ отдѣлѣ нашей работы, мы брали сравнительно очень большія количества крахмала и дѣйствовали на нихъ различными количествами (некипяченнаго) фермента; наблюдения были продолжительны настолько, чтобы каждое количество фермента успѣвало проявить всю свою гидролитическую силу, т. е. превратить крахмала столько, сколько оно вообще способно превратить; съ другой стороны, мы подвергали нагреванію подобный растворъ фермента, соединили съ тѣмъ же крахмаломъ, и сравнивали конечный результатъ этой гидратации съ той, которая произведена различными долями фермента. Такимъ образомъ мы получали прямой отвѣтъ на вопросъ: въ какой степени регенерируется ферментъ при температурномъ влияніи данной силы.

ТАБЛИЦА 17-ая.

№ наблюдениа	Количество субстрата	Количество фермента	Условія гидратации	Сила температурнаго влияния на ферментъ	Промежутокъ времени, черезъ которае производилась титровка.	Количество сахара, полученнаго при титров.
1	25 куб. сант. 1:100.	10 куб. сант. 1:900.	Термо-статъ 38° (приблиз. тождество)	15 мин. изъ Коховскаго аппарата.	15 час. (и мен. въ томъ же количествѣ).	2,5 75,0

№№ лабораторий.	Количество субстрата.	Количество фермента.	Условия гидратации.	Сила температурного влияния на фермент.	Промежуточные времена, через которые производилось титрование.	Количество куб. сант. жидк. <i>Fehling's</i> , вливаемых при титровании.
					1½ сут. { кип. некип.	18,0 120,0
					2½ сут. { кип. некип.	26,0 119,0
					3½ сут. { кип. некип.	40,0 120,0
					4½ сут. кип.	50,0
					5½ " " "	65,0
					6½ " " "	68,0
					7½ " " "	78,0
					9½ " " "	80,0
2	150 куб. сант. 1:100	10 куб. сант. 1:10.000	id.	id.	3 сут. { кип. нек. (въ томъ же количествѣ)	3,0 50,0
					10 сут. { кип. нек.	8,0 64,0
					45 сут. { кип. нек.	8,0 62,0
3	150 куб. сант. 1:100	5 куб. сант. 1:10.000	id.	id.	2 сут. { кип. нек. (1/10 доз.)	0,8 2,5
					5 сут. { кип. нек. 1/10	2,2 7,5
					40 сут. { кип. нек. 1/10	9,0 10,6
					Примѣч. Для титрования брались по 10 куб. сант. изъ общей смеси.	

№№ лабораторий.	Количество субстрата.	Количество фермента.	Условия гидратации.	Сила температурного влияния на фермент.	Промежуточные времена, через которые производилось титрование.	Количество куб. сант. жидк. <i>Fehling's</i> , вливаемых при титровании.
4	100 куб. сант. 2 : 100.	10 куб. сант. 1 : 10.000.	обыкновен. термом. (толуола).	15 мин. въ Кох. апар.	1 сут. { кип. нек. (въ томъ же колич.). нек. 1/10.	свѣдѣн 8,0 5,0
					8 сут. { кип. нек. 1/10.	3,0 28,0 17,0
					40 сут. { кип. нек. 1/10.	18,0 34,0 23,0
					Примѣч. Для титрования брались по 10 куб. сант. смеси.	
5	150 куб. сант. 1 : 200.	id.	id.	id.	1 сут. { кип. нек. (въ томъ же колич.). нек. 1/1000.	свѣдѣн 9,0 свѣдѣн нѣтъ
					10 сут. { кип. нек. 1/1000.	4,0 10,5 4,0
					20 сут. { кип. нек. 1/1000.	свѣдѣн 7,5 12,5 6,0
6	200 куб. сант. 1 : 200.	di.	id.	доведенъ до 80° C.	20 час. { кип. нек. (въ томъ же колич.). нек. 1/10.	40,0 130,0 15,0
					2 сут. { кип. нек. 1/10.	95,0 145,0 32,0

Приведенныя наблюдёнія говорить за то, что ферментъ, прокипяченный $\frac{1}{4}$ часа въ Коховскомъ аппаратѣ, способенъ вернуть приблизительно $\frac{1}{10}$ -ую часть своей первоначальной силы. Однако, здѣсь должны играть громадную роль свойства препаратовъ и такъ называемая „стойкость“ ихъ.

Другой способъ наблюдёнія степени регенерации заключался въ томъ, что титрования производились не черезъ продолжительное, а, наоборотъ, черезъ очень короткое время— черезъ 10—20 минутъ (см. предыдущій отдѣлъ), и если два раствора фермента, дѣйствуя на одно и то же количество крахмала, давали при титрованіи одинаковыя цифры, то мы заключали, что сила ферментовъ приблизительно одинакова.

8. Вліяніе концентрации нагреваемого фермента на его „стойкость“ гесп. на регенеративный процессъ.

Незначительная часть нашихъ наблюдёній касается вопроса о вліяніи концентрации фермента на его стойкость по отношенію къ высокой температурѣ или, говоря другими словами, на его способность къ регенерации. Установилась взгляды, что болѣе концентрированныя растворы ферментовъ менѣе чувствительны по отношенію къ температурнымъ вліяніямъ, по сравненію съ разведенными. Къ сожалѣнію, остаются неизвѣстными детали методики, примѣняемой въ этомъ случаѣ; неизвѣстно именно, берутся-ли одинаковыя абсолютныя количества фермента или просто берется часть имѣющагося концентрированнаго раствора фермента, разводится водой и подвергается одинаковому съ концентрированной частью температурному вліянію. Наиболѣе точная постановка подобныхъ наблюдёній, по нашему мнѣнію, заключается въ слѣдующемъ. Положимъ, мы имѣемъ растворъ фермента опредѣленной концентрации. Желательно

выяснить, какъ относится по сравненію съ нимъ къ нагреванію одной и той же силы растворъ, разведенный въ 10 разъ. Возьмемъ въ 2 пробирки по равному количеству первоначальнаго раствора, напр. по 10 куб. сант.; къ одной изъ нихъ прибавимъ 90 куб. сант. воды и разольемъ по 10 куб. сант. въ 10 одинаковыхъ пробирокъ; подвергнемъ эти 11 пробирокъ одному и тому же температурному вліянію и охладимъ; послѣ этого прибавимъ къ концентрированному раствору 90 куб. сант. воды; такимъ образомъ мы будемъ имѣть въ концѣ концовъ 2 порціи фермента одинаковыя по абсолютному количеству и по объему; остается соединить ихъ съ равными количествами крахмала и наблюдать гидратацию при одной и той же температурѣ. Если бы мы просто развели водой одну изъ равныхъ порцій фермента, не разливая ее по пробиркамъ, то не избѣжали бы упрека въ томъ, что прогреваніе неодинаковыхъ объемовъ жидкости неодинаково; если бы взяли равныя количества фермента, то опять опять-таки былъ бы неточенъ. Пользуясь такой методикой, мы пришли къ выводу, прямо противоположному по сравненію съ общепринятыми взглядами; именно всѣ наблюдёнія указали намъ, что болѣе разведенные растворы Така—диастазы обладаютъ болѣею способностью къ регенерации, даютъ болѣе быстрый и энергичный обратный процессъ, т. е. болѣе „стойки“. Наблюдёнія этой группы произведены нами въ то время, когда мы не могли еще примѣнить непосредственнымъ образомъ доказать регенерацию диастазы, и вмѣстѣ съ другими данными служили косвеннымъ доказательствомъ регенеративнаго процесса.

ТАБЛИЦА 18-ая.

Вліяніє концентрації ферментовъ при нагрѣваніи на регенеративный процессъ.

№№ наблюдений.	Условия постановки наблюдений.	Продолжительность опыта, часовъ и минутъ.	Объяснение ферментовъ.	Коэфф. куб. сант. иппосет. Релинга и драссе, при 10 градусахъ.
1	Количество крах-ла 10 куб. сант. 1: 100. Коэфф. фер-та 10 куб. сант. 1: 250. 15-ти минутное кипичение въ Кохонский аппаратъ. Гидратация въ ледяной водѣ.	16 час.	неразвед. разведен. (въ 4 раза)	6,0 9,0
2	id.	20 "	неразвед. разведен. (въ 4 раза)	5,5 7,0
		1½ сут.	неразвед. развед. (въ 4 раза)	8,5 12,0
		2½ "	неразвед. развед.	12,0 20,0
3	id.	1 -	неразвед. разведен. (въ 10 р.)	2,0 4,0
		2 -	неразвед. развед.	5,0 9,0
4	10 куб. сант. фер-та 1: 100. Остальныя условия одинаковы.	12 час.	неразвед. развед. (въ 3 раза)	6,0 9,0
5	10 куб. сант. фер-та 1: 300. Остальныя условия одинаковы.	12 -	неразвед. развед. (въ 3 раза)	8,0 11,0
6	Гидратация въ термостатѣ 38—39° С. съ прибавл. толуола.	3½ "	неразвед. разведен. (въ 5 разъ)	5,0 7,0
		20 "	неразвед. развед.	24,0 28,0
		2 сут.	неразвед. развед.	40,0 45,0
		3 -	неразвед. развед.	45,0 52,0

Чѣмъ объяснить неодинаковое отношеніе къ нагрѣванію, точнѣе говоря, къ регенерации свойствъ послѣ нагрѣванія, растворовъ различной концентрации,—сказать трудно; этотъ фактъ способенъ лишь навести на нѣкоторыя предположенія; одного изъ нихъ мы коснемся, когда будемъ говорить объ электрической проводимости ферментныхъ растворовъ.

9. Вліяніє прокипяченнаго фермента на ходъ гидратации, производимой небольшими количествами обыкновеннаго.

Мы задались вопросомъ,—не пойдетъ ли обратный процессъ, т. е. регенерация нагрѣтаго фермента болѣе энергично въ присутствіи хотя бы небольшихъ количествъ дѣятельнаго фермента, и не послужитъ ли этотъ послѣдній толчкомъ для возрожденія утерянныхъ ферментативныхъ свойствъ. Это тѣмъ болѣе необходимо было изслѣдовать, что въ литературѣ за послѣднее время часто поднимается вопросъ о взаимномъ вліяніи катализаторовъ вообще, и въ нѣкоторыхъ случаяхъ вліяніе это ясно сказывается. Наиболее яркій примѣръ такого вліянія представляетъ кишечная кишка, открытая *Павловымъ*, которая способна вызвать къ энергичной дѣятельности панкреатической ферментъ. *Roger*¹²⁷ указалъ, что слюна, приведенная въ бездѣятельное состояніе нагрѣваніемъ до 85°—100° С въ продолженіе 10—15 минутъ и прибавленная къ очень незначительному количеству слюны ненагрѣтой, сильно поощряетъ ея дѣйствіе на крахмалъ. Далѣе, сюда же относится изслѣдованіе *Ascoli* и *Izar'a*¹²⁸ относительно стимулирующаго дѣйствія коллоидальныхъ металловъ на аутолизъ печени.

Данныя первоначально сдѣланныхъ наблюдений какъ будто говорили за справедливость нашего предположенія: гидратация крахмала, производимая очень незначительнымъ количествомъ дѣятельной диастазы, къ которой прибавленъ

быть прокипяченный раствор, начиналась раньше и шла значительно энергичнее, по сравнению с контрольной, где вместо прокипяченной диастазы прибавлялся соответственный объем воды. Произведенные количественные определения сахара окончательно убедили в этом.

Анализируя это явление, необходимо было установить—какой же фермент активируется—возрождаются ли свойства, утерянные при действии высокой температуры или, наоборот, приведенный в бездеятельное состояние фермент стимулирует обыкновенный. Решить этот вопрос было легко. Мы избрали два способа для такого решения.

Исходя из предположения, что приведенный в бездеятельность фермент возрождается, необходимо было ожидать, что čímь меньше было температурное влияние, čímь легче произойдет регенерация, а при очень сильных температурных влияниях—напр. постъ получасового нагревания в автоклавъ при 115° С—подобную регенерацию ожидать было трудно. Цифры, однако, показали, что существенной разницы не наблюдается,—нагреть ли фермент $\frac{1}{4}$ часа или 1 час; все равно гидратация крахмала идет энергичнее, čímь в контрольной пробирке. Подобныя данные говорили в пользу того, что кипяченный фермент усиливает деятельность некипяченного, а не наоборот.

Другой способ решения вопроса заключался в следующем. Мы подвергали диализу приведенный в бездеятельность фермент и изучали, когда идет энергичнее процесс гидратации,—в присутствии диализата или диализуемого вещества; в первом случае играли бы главную роль и лишь слѣды фермента, прошедше пергамент; во втором случае активирующее влияние можно было бы свести на присутствие подлежащего возрождению фермента и лишь отчасти приписать солям; оказалось, что наиболее рѣзкое усиление процесса производить диализат, т. е. по

всей вѣроятности соли. Такимъ образомъ вопросъ былъ бы рѣшенъ в томъ смыслѣ, что прокипяченный ферментъ влияетъ активирующимъ образомъ на деятельность малыхъ количествъ некипяченнаго, а не наоборотъ. Приведемъ нѣсколько наблюдений.

ТАБЛИЦА 19-ая.

№№ наблюдений.	Условия постановки наблюдений.	Степень нагревания фермента, который прибавлялся для стимулирования.	Продолжительность времени, черезъ которое производилась гидратация.	Обозначение гидратировавшихся пробирок.	Количество крахмала, вышедшее в раствор при гидратации.
1	Количество крахмала 10 куб. сант. 1:100. 1 куб. сант. фермента 1:10.000. Гидрат. при обыкновенной температурѣ.	$\frac{1}{2}$ и $\frac{1}{4}$ —ый ферментъ, нагрѣтъ въ автоклаве 30 мин. при 120° С.	2½ час.	Съ прибавленіемъ воды (4 к. с.) . . . Съ прибавленіемъ нагрѣт. въ авток. фермента (4 к. с.) .	9,0 14,0
2	1 куб. сант. фермента 1:100.000. Въ остальныхъ условияхъ одинаковыя.	id.	2½ "	Съ прибавленіемъ воды (5 к. с.) . . . Съ прибав. авток. фермента (5 к. с.) . Съ прибавленіемъ воды (5 к. с.) . . . Съ прибав. авток. фермента (5 к. с.) .	0 2,5 13,0 17,0
3	1 куб. сант. фермента 1:200.000. Въ остальныхъ условияхъ одинаковыя.	id.	20 "	Съ прибавленіемъ воды (1 к. с.) . . . Съ прибав. авток. фермента (1 к. с.) . Съ прибавленіемъ воды (1 к. с.) . . . Съ прибав. авток. фермента (1 к. с.) .	2,0 3,0 6,5 11,0
4	id.	id.	20 час.	Съ прибавленіемъ воды (8 к. с.) . . . Съ прибав. авток. фермента (8 к. с.) .	2,0 4,2
5	id.	id.	16 "	Съ прибавленіемъ воды (1 к. с.) . . . Съ прибав. авток. фермента (1 к. с.) .	1,0 7,0

№№ наблюдений.	Условия постановки наблюдений.	Степень нагрева фермента, который прибавлялся для стимуляции.	Продолжительность, через которую производится нагревание.	Обозначение титруемых пробирок.	Количество выпавшего осадка. Подборка, при титровании.
5	id.	id.	2 сут.	Съ прибавлением воды (1 к. с.) . . .	6,0
			3 "	Съ прибав. автокл. фермента (1 к. с.) . . .	16,0
			4 "	Съ прибав. воды (1 к. с.)	7,0
			4 "	Съ прибавл. автокл. фермента (1 к. с.) . . .	18,0
6	id.	3/4%-ый ферм. нагреть при 240° С. 20 мин.	16 час.	Съ прибавлением воды (1 к. с.) . . .	1,0
			2 сут.	Съ прибав. 240°-го фермента (1 к. с.) . . .	7,0
				Съ прибавлением воды (1 к. с.)	6,0
			3 "	Съ прибав. 240°-го фермента (1 к. с.) . . .	20,0
			4 "	Съ прибавлением воды (1 к. с.)	7,0
4 "	Съ прибавл. 240°-го фермента (1 к. с.)	18,0			
7	id.	1% раствор фермента диализован на продолжении 2 сут. (жидкость смѣнялась 4 раза); диализат инактивен до объема диализируемого фермента. Общ. жидкости нагрѣты въ автоклавѣ при 120° С. въ течение 1 часа.	20 час.	Съ прибавлением воды (10 к. с.) . . .	3,0
			2 сут.	Съ прибавлением диализата (10 к. с.) . . .	6,0
				Съ прибавлением диализируемого фермента (10 к. с.) . . .	5,0
			12 "	Съ прибав. воды . . .	5,0
	Съ прибавлением диализата	9,0			
	Съ прибавлением ди-го фермента . . .	7,5			
	Съ прибав. воды . . .	10,0			
	Съ прибавлением диализата	14,0			
	Съ прибавлением ди-го фермента . . .	14,0			

Не занимаясь вопросом о дѣйствіи различныхъ солей на ходъ ферментативныхъ процессовъ, мы бы хотѣли, все-таки, сдѣлать одно предположеніе. Можно производить безчисленныя комбинаціи солей и изучать ихъ вліяніе на ферментацию, получая положительный или отрицательный, болѣе или менѣе рѣзкій, эффектъ; но если задаться цѣлью получить наиболѣе благоприятное сочетаніе солей въ смѣсѣ ускоренія ферментативнаго процесса, то, быть можетъ, окажется, что въ ферментъ какъ разъ существуетъ такая наиболѣе выгодная комбинація неорганическихъ веществъ; необходимо лишь установить, какія количества этихъ веществъ даютъ максимальный эффектъ. Между прочимъ, Тага-диастаза—ферментъ чрезвычайно сильный—содержитъ сравнительно громадное количество золь; по нашимъ опредѣленіямъ, которыя мы производили съ различными препаратами фермента, количество золь колеблется отъ 30—35%.

10. Наблюденія, произведенныя съ Диализованными препаратами Тага—диастазы.

Мы приведемъ нѣсколько наблюденій произведенныхъ съ диализованными препаратами Тага-диастазы. Результаты этихъ наблюденій не прибавляютъ ничего новаго къ тому, что уже сказано, и лишній разъ убѣждаютъ въ томъ, что диастаза послѣ кипяченія регенерируется. Интересно отмѣтить, однако, что ферментъ, лишенный главной массы солей, въ значительной степени утрачиваетъ свою первоначальную силу. Диализъ мы производили черезъ пергаментную бумагу въ продолженіи нѣсколькихъ сутокъ, смѣняя диализатъ дважды въ сутки. Обыкновенно, диализъ происходилъ при низкой температурѣ (въ ледяной водѣ), безъ прибавленія антисептическихъ средствъ; этотъ способъ болѣе удобенъ по тому, что ферментъ не испытываетъ вреднаго вліянія постороннихъ веществъ и ослабляющаго дѣйствія обыкновенной, а тѣмъ болѣе термостатной температуръ.

ТАБЛИЦА 20-ая.

№№ опытов.	Количество субстрата.	Количество фермента.	Сила температурного влияния на фермент.	Условия гидратации.		
				Промежуток времени, через которое производится титрование.	Конц. куб. сант. ядра. <i>Fahling's</i> .	Вспр. при титров.
1	10 куб. сант. 1:100.	20 куб. сант. 1:1000. Фермент диагностировался при разных температурах 8 дней.	Прокипяченъ 15 минутъ въ Коховскомъ аппаратѣ.	1 сутки. 2 сутки. 4 сутки.	5,0 10,0 10,0	въ ледяной водѣ.
2	id.	id.	30 мин. въ Коховскомъ аппаратѣ.	1 сутки. 2 сутки. 4 сутки.	3,0 5,0 4,5	id.
3	id.	10 куб. сант. 1:300. Ферментъ диагностировался 2 сутки при разныхъ температурахъ.	15 мин. въ Коховскомъ аппаратѣ.	20 часовъ. 2 сутки. 4 сутки.	11,0 24,0 30,0	id.
4	id.	id.	id.	3½ час. 20 час. 2 сут. 4 сут.	5,0 24,0 40,0 40,0	въ термом. 38—39° С. съ прибавленіемъ телят. оза.

Мы видимъ изъ таблицы 20-ой, что и диализованный ферментъ, подобно обыкновенному, способенъ къ специфической дѣятельности даже послѣ значительной силы температурныхъ влияній; другими словами, онъ также регенерируется.

II. Электрическая проводимость ферментныхъ растворовъ. Вопросъ объ электролитической диссоціаціи фермента.

При наблюденіи обратимости ферментныхъ свойствъ, исчезаніи и нарожденіи ихъ подъ влияніемъ той или иной температуры, естественно было задаться вопросомъ о физико-химической основѣ этого процесса.

Весь громадный трудъ, который потраченъ различными исследователями на выясненіе химической природы, или, если можно такъ выразиться, химической индивидуальности ферментовъ, не далъ никакихъ положительныхъ результатовъ. Всѣ добытыя данныя скорѣе говорятъ за непостоянство и непостоянность ферментнаго состава, чѣмъ за его строгую опредѣленность. Одни авторы склоняются въ пользу того взгляда, что ферменты по химическому характеру очень близки къ бѣлковымъ веществамъ, другіе придаютъ выдающуюся роль углеводнымъ группамъ.

Повидимому, данныя эмпирическаго состава ферментовъ не только бессильны рѣшить вопросъ о химической индивидуальности ферментовъ, но и дать этому вопросу плодотворную постановку. Положимъ, мы имѣемъ растворъ фермента; анализъ этого послѣдняго до и послѣ кипяченія дастъ одно и тоже количество входящихъ элементовъ,—а между тѣмъ во второмъ случаѣ дѣло идетъ не о ферментѣ собственно, а о веществѣ, которое только черезъ некоторое время можетъ приобрести ферментативныя свойства; поэтому, данныя анализа будутъ совершенно нехарактерны для фермента, какъ такового. Ясно, что рѣшеніе этого вопроса надо искать въ болѣе тонкихъ химическихъ измѣненіяхъ, а не въ грубой разницѣ состава,—въ измѣненіи строенія вещества при одномъ и томъ же аналитическомъ составѣ. Исходя изъ этихъ соображеній, мы сдѣлали попытку связать явленія ферментации—и ея отсутствіе—съ физико-химическими про-

цессами болѣе интимнаго свойства. Первоначально намъ казалась очень плодотворной идея, развитая *Nasse* ⁽⁶⁾, сводящая явленія ферментации на электролитическую диссоціацію фермента въ моментъ его специфической дѣятельности. *Nasse* измѣрявалъ электрическую проводимость некипяченнаго фермента съ специфическимъ субстратомъ и кипяченнаго фермента съ специфическимъ субстратомъ и установилъ, что въ первомъ случаѣ электрическая проводимость больше, чѣмъ во второмъ; онъ объясняетъ это образованіемъ дѣятельнымъ ферментомъ свободныхъ ионовъ, которые повышаютъ электрическую проводимость. Но другія цифры, приводимыя авторомъ, вносятъ нѣкоторое противорѣчіе и затрудняютъ подобное объясненіе явленія. Именно, излѣду электрическую проводимость кипяченнаго и некипяченнаго ферментовъ самихъ по себѣ, безъ субстрата, авторъ установилъ, что разрушенный кипяченіемъ ферментъ имѣетъ большую проводимость, чѣмъ дѣятельный, — тогда какъ на основаніи перваго положенія необходимо было ожидать какъ разъ обратныхъ отношеній. *Nasse* оставляетъ это противорѣчіе необъясненнымъ и придаетъ особое значеніе первому факту, а именно повышенной электрической проводимости въ смѣси дѣятельнаго фермента съ субстратомъ по сравненію съ недѣятельнымъ.

Имѣя дѣло съ фактомъ обратимости ферментныхъ свойствъ, мы сдѣлали попытку найти ему объясненіе въ этой области явленій. Ввиду того, что обратный процессъ въ нѣкоторыхъ случаяхъ отличался быстрымъ ходомъ, намъ представлялась возможность систематически слѣдить за измѣненіемъ электрической проводимости — *resp.* сопротивленіемъ — растворовъ въ связи съ появленіемъ и нарастаніемъ ферментныхъ свойствъ. Съ другой стороны, соединяя ферментъ, подвергнутый кипяченію (напр. $\frac{1}{4}$ -часовому) съ крахмаломъ и слѣдя за измѣненіемъ электрическаго сопротивленія этой

смѣси, мы рассчитывали съ помощью такого метода точно отмѣтить начальный моментъ регенераціи фермента, а затѣмъ и ея дальнѣйшій ходъ.

Первоначально поставленные опыты какъ будто согласовались съ положеніями, выставленными *Nasse*, а именно, прокипяченный растворъ фермента обнаруживалъ меньшее электрическое сопротивленіе, т. е. большую проводимость, по сравненію съ некипяченымъ. Однако, примѣнивъ болѣе строгую методику наблюденія и устранивъ всѣ возможные источники ошибокъ, мы пришли къ инымъ выводамъ. Когда рѣчь идетъ объ электрическихъ сопротивленіяхъ вообще, а тѣмъ болѣе о такихъ сильныхъ сопротивленіяхъ, которыя представляютъ растворы ферментовъ, всякая малѣйшая неточность метода или побочное вліяніе могутъ сильно отразиться на результатахъ. Прежде всего, мы устранили вліяніе щелочности стекла (какъ и во всѣхъ другихъ опытахъ) и изслѣдовали электрическую проводимость растворовъ при строго одинаковой температурѣ; но и послѣ этого, неизмѣнно получали цифры, согласныя съ приводимыми *Nasse*, т. е. что прокипяченный ферментъ оказывается лучше проводящимъ электрическій токъ, по сравненію съ некипяченымъ; при этомъ, чѣмъ болѣе высокому температурному вліянію ферментъ подвергался, тѣмъ сильнѣе нарастала его электрическая проводимость. Какъ намъ удалось установить, это явленіе объяснялось чрезвычайно просто: испареніемъ жидкости при нагреваніи фермента (хотя бы очень незначительнымъ и измѣряемымъ 1—2 каплями); если мы тщательно уравнивали объемъ подвергнутому кипяченію фермента съ некипяченымъ т. е. первоначальнымъ, то электрическая проводимость оказывалась одинаковой. Къ сожалѣнію, въ работѣ *Nasse* не указана подробно та методика, которой онъ пользовался, а потому мы вправѣ подозревать вліяніе отмѣченнаго обстоятельства на результаты, къ которымъ при-

шесть авторъ. Испарение имѣетъ мѣсто не только при нагреваніи пробирокъ на голомъ огнѣ или водяной банѣ, но и въ Коховскомъ аппаратѣ. Итакъ, водные растворы Такадиастазы проводятъ электрической токъ одинаковымъ образомъ—все равно, обладаютъ ли они специфическими свойствами, или утратили ихъ. Мы окончательно убѣдились въ этомъ, применяя еще болѣе простую и свободную отъ упрековъ методику: какъ мы указывали выше, доведенный 80—82° С и охлажденный растворъ Такадиастазы въ первые минуты не обнаруживаетъ ферментативныхъ свойствъ, но очень скоро, черезъ немного минутъ, начинается регенерация фермента и быстро идетъ впередъ; если бы электрическая проводимость была тѣмъ или инымъ образомъ связана съ наличностью или отсутствіемъ специфическихъ свойствъ фермента, то при указанныхъ условіяхъ измѣнилась бы въ томъ или иномъ направленіи; однако, наблюденія показали намъ, что электрическая проводимость остается неизмѣнной. Такимъ образомъ, мы оспариваемъ правильность одного положенія *Nasse*.

Перейдемъ къ другому, касающемуся измѣненія электрической проводимости въ зависимости оттого, некипяченный т. е. дѣятельный ферментъ соединенъ съ специфическимъ субстратомъ, или приведенный въ бездѣйствіе. *Nasse* утверждаетъ, что въ этомъ случаѣ некипяченный ферментъ даетъ большую электрическую проводимость, т. е. меньшее сопротивление, по сравненію съ ферментомъ лишеннымъ своихъ свойствъ, и объясняетъ это болѣею диссоціаціей воды, или образованіемъ свободныхъ ионовъ дѣятельнымъ ферментомъ. Замѣтимъ, прежде всего, что приводимыя авторомъ цифры не рѣзки; такъ, для кипяченнаго фермента съ субстратомъ *Nasse* устанавливаетъ сопротивленіемъ=2124 омамъ, а для некипяченнаго=2082 омамъ: разница въ 42 ома на столь большія абсолютныя цифры не рѣзка и приблизительно,

въ 10 разъ меньше той, которая приводится авторомъ для иллюстраціи другого положенія, уже разобраннаго нами;—именно, для кипяченнаго фермента самого на себѣ дается сопротивленіе=2106 омамъ, а для некипяченнаго=2556 омамъ, т. е. разница уже рѣзкая—450 омамъ. На основаніи своихъ наблюденій, мы не можемъ согласиться и съ этимъ, вторымъ, положеніемъ *Nasse*. Мы убѣдились, что прибавленіе къ одинаковому количеству отвара крахмала строго одинаковыхъ количествъ дѣятельнаго и недѣятельнаго ферментовъ не измѣняетъ электрической проводимости ни въ ту ни въ другую сторону. Какъ и въ первомъ случаѣ, помимо обыкновенной, мы применяли еще особую, болѣе точную методику. Именно, соединяя съ крахмаломъ только что прокипяченный и охлажденный растворъ фермента и сдѣлая за электрическимъ сопротивленіемъ, мы въ первое время имѣли дѣло, такъ сказать, съ недѣятельною смѣсью двухъ веществъ, но въ дальнѣйшемъ наступала регенерация фермента (а вмѣстѣ съ тѣмъ гидратация крахмала), т. е. увеличеніе свободныхъ ионовъ, съ точки зрѣнія *Nasse*, а вмѣстѣ съ тѣмъ должно было наступить измѣненіе электрическаго сопротивленія. Однако, сопротивление остается безъ переменъ и въ этомъ случаѣ, и имѣющаяся въ растворѣ электрическая диссоціація остается *in statu quo*. Если бы намъ и удалось установить большую проводимость смѣси дѣятельнаго фермента съ крахмаломъ по сравненію съ недѣятельнымъ, то объясненія можно было бы искать не въ одномъ образованіи ферментомъ свободныхъ ионовъ, а въ нѣкоторомъ—правда незначительномъ—повышеніи температуры при явленіяхъ ферментации, или въ болѣею электрической проводимости продуктовъ гидратации крахмала по сравненію съ нимъ. Повторяемъ, на основаніи собственныхъ опредѣленій мы пришли къ выводу, что объяснить явленія

ферментации электрической диссоциацией фермента—чрезвычайно трудно.

При определении электрического сопротивления мы пользовались методом *Коларауна*, основанном на применении мостика *Винсона* и руководствовались указаниями, даваемыми *Ostwald'ом*¹²³⁾ и *Heinz'ом*¹²⁴⁾. Прибор фирмы *Гармама* и *Брауна* снабжен телефоном для констатирования существующего в цепи тока. Сосудь (по *Аррениусу*) для исследуемой жидкости был особенно удобен, потому что позволял сближать электроды на какое угодно расстояние. Абсолютных определений электрической проводимости мы не делали, и проводимыми нами цифры имеют лишь относительное (сравнительное) значение.

Наблюдение 1-ое. Така-диастаза 1:10,000 t⁰ наблюд. = 22,0°C.

Некипяч. фер-ъ W (сопротивл.) = 585 Ω (омов)	
Вскипач. 1/4 час. вь Кохов.	Поправки на при-
аншар. W = 570	ведеиe объемь
Вскипач. 1/2 вь Кохов. аншар. . W = 545	къ первоначаль-
	но му производилась.

Наблюдение 2-ое. Така-диастаза 1:10,000 t⁰ наблюд. = 21,0°C.

Некипач. фер-ъ W = 555.	} вато по
Вскипач. 1/4 часа вь Кох. аншар. W = 590.	
Вскипач. 1/2 часа вь Кох. аншар. W = 590.	
Вскипач. 3/4 часа вь Кох. аншар. W = 535.	
Вскипач. 1 час вь Кох. аншар. W = 500.	
То же, съ поправк. на испарение W = 555.	} порций.

Наблюдение 3-ье. Така-диастаза 1:25,000 t⁰ наблюд. = 21,0°C.

Некипач. фер-ъ W = 1070
Вскипач. 1/4 вь Кох. аншар. W = 990
То же, съ поправкой на испарение W = 1080
Вскипач. 1/2 час. вь Кох. аншар. W = 960

Наблюдение 4-ое Така-диастаза 1:10,000 t⁰ наблюд. = 29,7°C.

Некипач. фер-ъ W = 540
Простоявший 6 часов вь термостатъ при 38°C.
закрытый простой ватной пробкой W = 520
То же, но съ пробкой, залитой парафиномъ W = 545

Наблюдение 5-ое. Така-диастаза 1:200 t⁰ наблюд. = 29,0°C.

Некипач. фер-ъ W = 47
Вскипяченный вь автоклави при 120° 15 мин. W = 44
Подобный же растворъ, но съ поправкой на испарение W = 47,2

Наблюдение 6-ое Така-диастаза 1:100,000 t⁰ наблюд. = 21,5°C.

Некипач. фер-ъ W = 4700
Доведенный на голомъ огнь до кипения W = 4700

Наблюдение 7-ое. Maltin 1:200 t⁰ наблюд. = 24°C.

Некипач. фер. W = 90
Доведен. до кипия. на голомъ огнь W = 90

Наблюдение 8-ое. Така-диастаза 1:400 t⁰ наблюд. = 20,7°C.

Ферментъ доведенъ до 90°C и быстро охлажденъ до 20,7°C. Затѣмъ изслѣдовалось его сопротивление

Черезъ 5 минутъ . . . W = 58,5	} Другая порция того же фермента
10 минутъ . . . W = 58,5	
30 минутъ . . . id.	
2 часа . . . id.	
3 часа . . . id.	} Черезъ 2 мин. W = 58,0
	15 мин. id.
	1 часъ id.
	2 часа id.

Наблюдение 9-ое. Така-диастаза 1:10,000 t⁰ наблюд. = 20,8°C.

Прокипяченъ 10 минутъ вь Кох. аншар. По охлажденіи прибавленъ крахмалъ, приготовленный съ соляной кислотой (на 20 к. с. фер-та 10 к. с. крахмала).

Смѣсь имѣеть W = 255
Черезъ 1 часъ (гидратация уже началась). W = 255

Наблюдение Ю-ое.

3 куб. сант. Така-диаст. 1 : 5.000
 + 1 куб. сант. KCl 0,745%¹⁰ наблюд. = 24,0°C.
 + 20 куб. сант. крахм. 1 : 100
 W = 5,5
 Черезъ 1 часъ . . W = 5,6

Наблюдение II-ое.

10 куб. сант. Така-диаст. 1 : 5.000
 + 2 куб. сант. KCl 0,745%¹⁰ наблюд. = 29,7°C.
 + 10 куб. сант. крахмала 1 : 100
 W = 4,4
 Черезъ 1 часъ . . . 4,4
 2 часа . . . 4,4

12. Коллоидальность ферментных растворовъ.

Отказавшись отъ мысли свести явления ферментации на электролитическую диссоциацию вещества, мы обратились къ въ область „микрофизическихъ“ наблюдений. Если разсматривать водные растворы Така-диастазы въ ультрамикроскопъ, то съ большой ясностью констатируется ихъ коллоидальность: въ полъ зрѣнія видны довольно равномерной величины, блестящія, отчасти лучистыя частицы, обнаруживающія оживленное движение: чѣмъ болѣе концентрированный растворъ взять для наблюдений, тѣмъ болѣе количество этихъ частицъ. Совершенно аналогичную ультрамикроскопическую картину представляютъ растворы коллоидальной платины (приготовленные по способу *Bredig's*), при чѣмъ, по количеству частицъ, проносающихся въ полъ зрѣнія, водный растворъ фермента 1 : 1000 приближается къ водному раствору платины 1 : 2000. Мы задались вопросомъ—насколько тѣсно связана коллоидальность ферментнаго раствора съ его

специфическими свойствами, и въ какомъ микрофизическомъ состояннн представляются растворы фермента недѣятельнаго. Намъ приходилось уже указывать, что растворы, съ которыми мы работали, послѣ кипяченія не дали осадковъ; иногда происходило лишь помутнѣнне ихъ, исчезающее безъ слѣда при охлажденнн (фосфорныя соли); поэтому грубыхъ измѣненнй физическаго состояннн (подобныхъ осажденню металла изъ его коллоидальнаго раствора при прибавленнн электролита), ожидать было трудно; тѣмъ не менѣе равномерность распределеннн частицъ, ихъ величина и подвижность послѣ дѣйствнн высокой температуры могли испытать тѣ или ннныя измѣненнн, которыя могли быть такъ или иначе связаны съ утратой специфическихъ ферментативныхъ свойствъ. Наблюденнн, произведеннныя въ этомъ направленнн, показали намъ, что ультрамикроскопическая картина растворовъ Така-диастазы остается неизмѣнной, независимо отъ того, обладаетъ ли ферментъ своими специфическими свойствами или утратилъ ихъ. Мы подвергали изслѣдованню растворы, нагрѣтые въ теченне 20 минутъ при 100°C, 120°C и 240°C и убѣдились, что величина, равномерность и Броуновское движенне частицъ въ ультрамикроскопѣ, повидимому, остаются безъ перемѣны. Такимъ образомъ, поставленный нами вопросъ рѣшился отрицательно. Очевидно, при утратѣ ферментомъ его специфическихъ свойствъ дѣло идетъ о болѣе тонкихъ процессахъ, касающихся, быть можетъ, измѣненнн внутри молекулярнаго строения вещества.

13. Отношенне къ высокой температурѣ инвертина, мальцъ-диастазы и амилолитическаго фермента Pankreatin'a.

Мы закончили описанне наблюдений, произведенныхъ съ Така-диастазой и оксидазой Maltin'a и убѣдившихъ насъ въ обратимости ферментныхъ свойствъ. Изъ другихъ фермен-

товъ мы изслѣдовали въ этомъ направленіи инвертиръ (или инвертазу, по новѣйшей номенклатурѣ), содержащейся въ Така-диастазѣ, Maltin (фирмы Merck'a) и амилотитическій ферментъ Pankreatin'a (фирмы Parke-Davis). Все эти препараты подвергались лабораторной обработкѣ спиртомъ и эфиромъ. Инверсии мы подвергали продажный свекловичный сахаръ; объ ея эффектѣ судили на основаніи поляриметрическихъ опредѣленій, по главнымъ образомъ на основаніи цифръ, получавшихся при титрованіи. Въ остальномъ методика не отличалась отъ описанной выше.

Изъ всѣхъ этихъ ферментовъ наиболее „стойкимъ“ оказался ферментъ, просвѣтляющій крахмалъ и переводящій его въ растворимое состояніе (амилаза, по терминологіи нѣкоторыхъ авторовъ); онъ находится въ Maltin'ѣ и отличается значительной силой своего дѣйствія. Растворъ этого фермента, прокипяченный 10 минутъ на водяной банѣ и соединенный съ отваромъ рисоваго крахмала, просвѣтлялъ этотъ послѣдній черезъ большій или меньшій промежутокъ времени—черезъ полчаса или сутки. Установивъ этотъ фактъ и анализируя его съ развитой выше точки зрѣнія регенерациі ферментныхъ свойствъ, мы убѣдились, что таковая дѣйствительно имѣетъ мѣсто. Имено, если прокипяченный и охлажденный растворъ Maltin'a разделить на двѣ равныя порціи изъ которыхъ одну соединить съ крахмаломъ непосредственно, другую послѣ болѣе или менѣе долгаго стоянія, то окажется, что вторая просвѣтляетъ крахмалъ значительно скорѣе первой, т. е. что ферментъ послѣ кипяченія способенъ регенерировать свои свойства. Если кипятить растворъ Maltin'a болѣе 10 минутъ, то его дѣйствіе на крахмалъ, повидимому, уничтожается безвозвратно. Что касается собственно диастатическихъ свойствъ Maltin'a (амило-малтазы), то они послѣ доведенія до 100° С пропадаютъ, повидимому, навсегда; по крайней мѣрѣ даже продолжительное

наблюденіе (нѣсколько сутокъ) не обнаруживаетъ ни слѣда сахара. То же самое можно сказать объ инвертирѣ, содержащемся въ Така-диастазѣ и объ амилотитическомъ ферментѣ Pankreatin'a. Все эти препараты обладали слабо выраженными ферментативными свойствами и, быть можетъ, этимъ отчасти объясняется ихъ „нестойкость“ по отношенію къ температурѣ, или, говоря другими словами, отсутствіе ихъ регенерациі при доведеніи до 100° С (и конечно, при болѣе сильныхъ температурныхъ вліяніяхъ). Возникать другой вопросъ: имѣютъ ли эти ферменты хотя бы нѣкоторую склонность къ восстановленію своихъ свойствъ послѣ сравнительно несильныхъ температурныхъ вліяній—70°—80° С? Казалось естественнымъ предположеніе, что не все ферменты должны различать свойства Така-диастазы въ смыслѣ ея поразительной „стойкости“ по отношенію къ температурѣ, и то, что намъ удалось установить для этого фермента въ границахъ столь широкихъ, для другихъ могло бы оказаться справедливымъ, наоборотъ, въ границахъ очень тѣсныхъ; т. е., если Така-диастаза способна регенерироваться послѣ дѣйствія на нее температуръ отъ 80°—115° С, то другіе ферменты, о которыхъ здѣсь идетъ рѣчь, способны на такую регенерацию напр. лишь въ предѣлахъ отъ 80°—82° С; это тѣмъ болѣе можно было предположить, что различныя препараты одного и того же фермента, какъ мы видѣли, проявляютъ весьма неодинаковую способность къ регенерациі. Прежде, чѣмъ перейти къ протоколамъ наблюденій, мы должны сказать, что эти послѣднія служили лишь дополненіемъ къ тому, что уже было установлено относительно Така-диастазы и на многочисленность и полноту ни въ какомъ случаѣ претендовать не могутъ.

Наблюденіе I-е. Растворъ Pankreatin'a 1 : 1000 по 10 куб. сант. разлитъ въ пробирки; часть изъ нихъ нагрѣта 10 минутъ при 65° С, другая часть—15 минутъ. Кромѣ того, взята

$\frac{1}{100}$ -ая и $\frac{1}{10000}$ -ая части некипяченного фермента, т. е. 10 куб. сант. раствора 1:100.000 и 1:1.000.000. Во все пробирки прибавлено по 8 куб. сант. отвара крахмала 1:100. Гидратация в термостат при 38—39° С, с прибавлением толуола.

	Титрования через:		
	1 сут.	2 сут.	
$\frac{1}{1000}$ нек.	3,5	6,5	куб. сант. вязкости Fehling'a.
$\frac{1}{100}$ нек.	30,0	58,0	
нагрѣт. 10 минутъ	16,5	42,0	
нагрѣт. 15 минутъ	14,0	32,0	

Наблюдение 2-е. Pankreatin 1:10.000 по 10 куб. сант. разлить в пробирки и нагреть при 65° С 10 минут и 30 минут. Остальные условия прежние.

	Титрования через:			
	1 сут.	2 сут.	3 сут.	4 сут.
$\frac{1}{1000}$ нек.	0	0	0	сѣды.
$\frac{1}{100}$ нек.	4,0	18,0	28,0	39,0
нагрѣт. 10 мин.	2,0	13,0	14,0	20,0
нагрѣт. 30 мин.	0	1,5	4,5	4,0

Наблюдение 3-е. Pankreatin 1:20.000 по 10 куб. сант. разлить в пробирки. Часть из них лишь доведена до 65° С, другая выдержана при этой температуре 10 минут, третья—30 минут. Остальные условия прежние.

	Титрования через:			
	1 сут.	2 сут.	3 сут.	4 сут.
$\frac{1}{1000}$ нек.	0	0	сѣды.	2,5
$\frac{1}{100}$ нек.	сѣды.	сѣды.	5,5	5,5
нагрѣт. 10 мин.	0	0	сѣды.	3,5
нагрѣт. 30 мин.	0	0	0	0
доведен. до 65° С.	сѣды.	8,0	9,0	9,5

Наблюдение 4-е. Ивертинъ 1:1000 по 10 куб. сант. разлить в пробирки, которые подвергнуты 10 минутному нагреванию при 70° С. Взять еще $\frac{1}{100}$ -ая и $\frac{1}{1000}$ -ая части некипяченного фермента. Количество свежесочиненного сахара—по 5 куб. сант. 1:100. Гидратация в термостат при 38—39° С с прибавлением толуола.

	Титрования через:			
	1 сут.	2 сут.	3 сут.	4 сут.
$\frac{1}{1000}$ нек.	1,5	2,0	2,5	3,0
$\frac{1}{100}$ нек.	7,0	8,5	10,5	16,0
нагрѣт. 10 мин.	1,5	4,5	6,0	10,0

Наблюдение 5-е. Инвертиль 1:10.000 по 10 куб. сант. Нагреть 3 мин. при 70° С. Для сравнения взята 1/100-ая часть некипяченного. Остальные условия прежние.

	Титрованы через:		
	1 сут.	2 сут.	3 сут.
1/100 нек.	5,5	6,0	7,5
доведен. до 70° С.	5,0	8,5	8,5

Наблюдение 6-е. Инвертиль лишь доведен до 70° С и быстро охлажден. Сахара по 5 куб. сант. 20:100. Остальные условия прежние.

	Титрованы через:								
	3 час.	1 сут.	2 сут.	4 сут.	5 сут.	7 сут.	9 сут.	10 е.	
1/100 нек.	0	2,0	3,0	3,0	11,0	18,0	20,0	22,0	
доведен. до 70° С.	0	9,0	16,0	27,0	41,0	50,0	68,0	87,0	

Наблюдение 7-е. Инвертиль нагреть при 80° С 2 минуты. Для сравнения взята 1/50-ая часть некипяченного фермента. Сахара по 5 куб. сант. 20:100.

	Титрованы через:				
	2 час.	5 час.	20 час.	2 сут.	3 сут.
1/50 нек.	0	1,0	4,0	4,5	5,5
нагрет. 2 мин.	0	2,0	6,0	12,5	20,5

Наблюдение 8-е. Инвертиль концентрации 1:500 в общей колбе доведен до 65° С и быстро охлажден до обыкновенной температуры. Затем взято 10 куб. сант. этого раствора и соединено с 20 куб. сант. 10%-го свекловичного сахара. Через тот или другой промежуток времени стояния инвертина брались тоже по 10 куб. сант. и соединялось с тем же количеством сахара. Гидратация при обыкновенной температуре 30 минут.

Исходная	2,0	
Через	1 сутки	2,0
	2 сут.	2,4
	9 сут.	2,8

Наблюдение 9-е. Инвертиль 1:1000 в общей колбе доведен до 60° С и быстро охлажден до обыкновенной температуры. Гидратация в продолжении 1 часа. Остальные условия одинаковы с наблюдением 8-м.

Исходная	3,0	
Через	5 часов	3,0
	1 сутки	3,3
	2 сут.	3,7
	3 сут.	4,0
	4 сут.	4,0

Наблюдение 10-е. Maltin 1:500 в общей колбе нагреть 1 минуту при 63° С и охлажден до обыкновенной температуры. Крахмала по 10 куб. сант. 1:100. Фермента для каждого отдельного титрования по 10 куб. сант. Гидратация при обыкновенной температуре 20 минут.

Исходная	4,0	
Через	30 минут	4,2
	1 час	4,4
	2 часа	4,4
	2 сутки	4,4
	1 сутки	5,0

Наблюдение 11-е. Условия одинаковы съ наблюдениемъ 10-мъ.

Исходная	3,5
Черезъ	{ 3 часа 3,4
	{ 6 часовъ 3,4
	{ 1 сутки 3,8
	{ 30 часовъ 4,2

Наблюдение 12-е. Maltin 1:1000 въ общей колбѣ нагрѣтъ при 70° С 7 минутъ. Гидратация при обыкновенной температурѣ 30 минутъ. Остальныя условия одинаковы съ предыдущими наблюдениями.

Исходная	1,2
Черезъ	{ 1 часъ 1,2
	{ 1 сутки 1,5
	{ 2 сутокъ 1,8

Приведенныя наблюдения по своему характеру распадаются на 2 группы. Первые 7 наблюдений ковеннымъ образомъ доказываютъ регенерацию фермента, ибо исключаютъ предположеніе объ остаткахъ или „слѣдахъ“ фермента, не успѣвшихъ уничтожиться подъ вліяніемъ нагрѣванія. Однако цифры не рѣзки и имѣютъ значеніе, какъ добавленіе къ тому, что нами доказано относительно Така-діастазы. Последние 5 наблюдений болѣе нагляднымъ образомъ говорятъ за регенерацию фермента послѣ нагрѣванія; мы видимъ ясно, что ферментъ, соединенный съ субстратомъ непосредственно послѣ нагрѣванія и охлажденія, дѣйствуетъ слабѣе, чѣмъ тотъ, который простоялъ то или другое время, самъ по себѣ.

Итакъ, все ферменты, которые мы изслѣдовали, а именно Така-діастаза, инвертинъ, содержащійся въ ней, мальцъ-діастаза, оксидаза, содержащаяся въ ней и амиллитическій ферментъ Pancreatins—въ большей или меньшей степени способны регенерироваться послѣ дѣйствія на нихъ высокой температуры.

Общая заключенія.

На основаніи всего вышеизложеннаго мы приходимъ къ слѣдующимъ выводамъ:

Водные растворы Така-діастазы оказываются чрезвычайно стойкими по отношенію къ температурнымъ вліяніямъ. Не только послѣ доведенія до 100° С, но и послѣ часового нагрѣванія при 100° С. и ¼ часового при 115° С ферментъ этотъ обнаруживаетъ въ большей или меньшей степени свои специфическія свойства. Въ основѣ этого явленія лежить процессъ регенерации ферментныхъ свойствъ. Ходъ этого обратнаго процесса бываетъ весьма неодинаковъ въ зависимости отъ силы температурнаго вліянія на ферментъ и отъ той температуры, при которой обратный процессъ наблюдается. Нѣкоторые препараты Така-діастазы обладаютъ свойствомъ прямой регенерации, т. е. регенерируются сами по себѣ, безъ субстрата; другіе препараты способны лишь къ регенерации ковенной, т. е. требуютъ для ея наступленія присутствія крахмала. Въ чемъ лежитъ причина такого различія, мы сказать не можемъ, во всякомъ случаѣ, чѣмъ сильнѣе ферментъ, тѣмъ скорѣе можно ожидать наступленія его прямой регенерации.

Ферментативныя свойства водныхъ растворовъ Така-діастазы совершенно пропадаютъ уже въ первые моменты дѣйствія 80°-ой температуры.

Если изучать регенерацию фермента послѣ кратковременнаго нагрѣванія при 80° — 85°С, то окажется, что при t°

50° С и больше высокой регенерации не происходит; при 40° 45° С регенерация или не наступает или же наступает в очень незначительной степени и быстро (через 2—3 часа) уничтожается вновь; при 40° С регенерация происходит всего энергичнее, однако через 4—5—6 часов останавливается и идет на убыль; при обыкновенной температуре регенерация диастазы, начавшись сравнительно медленно, долгое время (сутки и больше) идет вперед и в конце концов оказывается полнее, чем при 40° С; одним словом, на процесс регенерации диастатических свойств температура оказывает очень узкое влияние.

Больше разведенные растворы Така-диастазы больше стойки по отношению к температуре, т. е. дают регенерацию больше полную.

Понятие о температурном optimum'е действия ферментов чрезвычайно условно и всецело зависит от времени, в течение которого наблюдается процесс. Чем короче время наблюдения, тем выше этот optimum, и наоборот.

Диализованные препараты Така-диастазы, подобно обыкновенным, способны к регенерации после кипячения.

Наличие или отсутствие специфических свойств в растворе ферментов, а также момент их специфической деятельности не связаны с изменением электрической проводимости этих растворов.

Коллоидальный характер растворов Така-диастазы, наблюдаемой в ультрамикроскоп, не изменяется даже после очень сильных температурных влияний (напр. 240° С).

Оксидаза Maltin'a (resp. пероксидаза) после 10 минутного нагревания на водяной бане при 100° С еще сохраняет слабую окислительную способность. После более долгого нагревания (15—20 минут) ферментативные свойства пропадают, однако через тот или другой промежуток времени возвращаются вновь, т. е. оксидаза регенерируется

подобно Така-диастазе. Больше сильное температурное влияние лишает оксидазу способности к регенерации.

Оксидаза Maltin'a уже около 80° С (80°—82°) приходит в совершенно недействительное состояние, т. е. лишается своих ферментативных свойств. Поэтому „стойкость“ этого фермента, т. е. наличие специфических свойств после 10 минутного нагревания, объясняется не остатками фермента, неразрушенными высокой температурой, а обратными процессами, т. е. регенерацией оксидазы, наступающей при охлаждении раствора.

Оксидаза, приведенная в недействительное состояние, т. е. при 80° С и выше, обнаруживает свойство прямо противоположное, т. е. свойство раскисления.

Раствор Maltin'a даже после 10 минутного нагревания на водяной бане и соединения с крахмалом через больше или меньше долгое время просветляется этот субстрат, т. е. переводит в растворимое состояние, при этом сахара совершенно не образует; другими словами, амилаза сохраняет свое действие в то время, как действие амиломилазы уничтожается.

В основе „стойкости“ амилазы Maltin'a лежит обратный процесс регенерации ферментных свойств.

Амило-мальтаза Maltin'a, инвертин Така-диастазы и амилолитический фермент Pankreatin'a уже при доведении до 100° С утрачивают свои ферментативные свойства, по видимому навсегда; однако, при менее сильных температурных влияниях удается доказать, что эти ферменты способны к регенерации, хотя и в слабой степени.

В этом заключаются главные выводы из наших наблюдений. Строго отбывая фактическую сторону дела от области предположений, мы позволим себе отметить некоторые пункты нашей работы.

Нѣтъ сомнѣній въ томъ, что существующіе въ насто-

ящее время и общепринятые взгляды на такое характерное свойство ферментов, как отношение их к высокой температуре, должны быть изменены, по крайней мере для ферментов диастатических и окислительных. Современное представление о „стойкости“ ферментов нуждается в прояснении; во всех, разобранных нами, случаях понятие об этой „стойкости“ мы принуждены были замкнуть понятием о регенерации ферментных свойств, т. е. способности ферментов уже при невысоких сравнительно температурах быстро переходить в неактивное состояние, а при охлаждении возвращаться вновь к деятельности. Не удивительно, что эти два понятия совпадают, и больше „стойкий“ в общепринятом смысле фермент, конечно, легче дать эту обратную реакцию, и наоборот. С этой точки зрения будут понятны те разногласия и та неопределенность, с которыми мы встречаемся всякий раз, как заходит вопрос о „стойкости“ того и другого фермента; одни авторы признают, что достаточно только довести фермент до 80°-ой температуры, чтобы его разрушить, другие считают необходимым 5-ти или 10-ти минутное нагревание при этой температуре, третьи указывают более высокие температуры, необходимые для полного разрушения; очень может быть, что во всех этих случаях дело шло о регенерации фермента, приведенного в полную бездеятельность уже в первые моменты действия 80°-ой температуры; регенерация же эта, как мы видели, может иметь весьма неодинаковую силу и продолжительность, и в некоторых случаях вполне симулировать „стойкость“, протекая чрезвычайно быстро и внушая мысль об остатках фермента, на которых температурное влияние не сказывается. Можно представить себе, что два исследователя, работая с одним и тем же препаратом фермента и подвергая его одному и тому же температурному влиянию, могли прийти к неодина-

наковым выводам в зависимости от того, когда определялась „стойкость“ такого фермента— непосредственно ли после охлаждения или через 5—10 минут, в течение которых мог начаться регенеративный процесс или значительно усилиться уже наступивший. Итак, под именем большей или меньшей „стойкости“ ферментов мы склонны понимать большую или меньшую регенерацию ферментных свойств, более или менее быстрое *restitutio ad integrum*. Для каждого фермента и даже для каждого отдельного препарата одного и того же фермента необходимо определять те температурные границы, в которых он теряет свои специфические свойства с тем, чтобы в той или другой степени приобрести их по охлаждению, и за которыми испытывает уже безповоротное разрушение; легко себя представить, что границы эти, во-первых, могут быть очень различны, а, во-вторых, что они могут быть очень тесны.

Другой общий вопрос, которого нам пришлось слегка коснуться,—это вопрос об optimum'e действия ферментов. Мы видели, что если исследовать ферментативные процессы при различной температуре в течение короткого промежутка времени,—напр. нескольких минут, то окажется, что температурный optimum лежит значительно выше того, который считается общепризнанным (около 40°—45° C); при более долгом наблюдении температура этого optimum'a будет понижаться и приближаться к установленной для того или другого фермента; спрашивается, если наблюдать ферментативный процесс очень долгое время, напр. неделю—не является ли оптимальной температура еще более низкая? Дело в том, что температура влияет на ферментативный процесс в двух совершенно различных направлениях: с одной стороны она его ускоряет, как всякую химическую реакцию; с другой стороны ускоряет разрушение

фермента; отъ соотношенія этихъ двухъ противоположно дѣйствующихъ влiянiй зависитъ конечный эффектъ ферментативнаго процесса, т. е. количество превращенныхъ продуктовъ. Если взять короткiй промежутокъ времени, то скажется главнымъ образомъ влiянiе температуры самой по себѣ, ибо ферментъ не сразу перейдетъ въ недѣятельное состоянiе, и произведетъ то дѣйствиe, на которое онъ способенъ; поэтому наибольшiй эффектъ дастъ температура значительно высшая *optimum'a* дѣствiя. При болѣе долгомъ наблюденiи окажется, что *maximum* превращенныхъ продуктовъ дастъ температура болѣе низкая, ибо при болѣе высокой ферментъ уже успѣетъ перейти въ недѣятельное состоянiе, т. е. процессъ прекратится; такимъ образомъ температурный *optimum* дѣствiя понизится. Эту мысль мы можемъ продолжать далѣе, и вотъ на какихъ основанiяхъ. Мы видѣли, что ферментъ приходитъ въ недѣятельное состоянiе не только при температурахъ высокихъ, но и болѣе низкихъ, какъ напр. 40°-ой и обыкновенной, и вообще тѣмъ скорѣе, чѣмъ выше температура. Поэтому справедливо предположенiе, что въ то время, какъ при оптимальной температурѣ процессъ прекратится вслѣдствiе перехода фермента въ недѣятельное состоянiе, — при температурѣ обыкновенной онъ еще идетъ впередъ и можетъ не только сравняться съ предыдущимъ по количеству превращенныхъ продуктовъ, но и превзойти его. За это же говорятъ данныя, полученныя нами при наблюденiи регенерации диастазы въ зависимости отъ той или другой температуры. Именно, здѣсь съ особенной ясностью выступаетъ термолability ферментовъ и становится очевидной условность понятiя о температурномъ *optimum'e*; если наблюдать регенеративный процессъ въ теченiе немногихъ часовъ, то *optimum* регенерации будетъ лежать при 40°С; при болѣе долгомъ наблюденiи *optimum* перейдетъ на температуры болѣе низкiя, гдѣ

начавшаяся регенерация не такъ рѣзко ослабляется протекающимъ въ то же время процессомъ разрушенiя фермента.

Итакъ, при одинаковыхъ количествахъ фермента и субстрата *optimum температуры* (resp. *maximum* превращенныхъ продуктовъ) *будетъ лежать тѣмъ выше, чѣмъ короче промежутокъ времени, въ теченiе котораго наблюдается ферментативный процессъ.*

Наблюдая за регенеративнымъ процессомъ ферментовъ, мы пришли къ заключенiю, что всѣ попытки, направленныя къ опредѣленiю ихъ эмпирическаго состава, независимо отъ болѣе тонкой химической конституцiи, безсильны приблизить насъ къ пониманiю способа дѣствiя ферментовъ. Въ самомъ дѣлѣ, одво и то же вещество, которое по нашему произволу можетъ терять и приобретать вновь ферментативныя свойства, дастъ при химическомъ анализѣ одинъ и тотъ же составъ, и составъ этотъ будетъ не характеренъ для фермента, какъ таковаго.

По всей вѣроятности, дѣятельность ферментовъ связана съ наличиемъ особаихъ, специфическихъ для каждаго фермента, химическихъ группъ, которыя испытываютъ то или другое измѣненiе при переходѣ ферментовъ въ недѣятельное состоянiе и обратно; совершенно неизвѣстно, какого рода измѣненiе испытываютъ эти группы при переходѣ въ недѣятельное состоянiе—есть ли это процессъ *диссоциации*, *полимеризации*, *дегидратации* или *интрузмолекулярной перестановки атомовъ или ихъ комплексовъ (инверсий)*. Чтобы уяснить нашу мысль, позволимъ себѣ одно сравненiе. Возьмемъ живую протоплазму и подвергнемъ ее химическому анализу, опредѣлимъ ея качественный и количественный составъ; что дастъ намъ этотъ анализъ? Приблизитъ ли онъ насъ къ пониманiю того, что такое жизнь? Не будемъ ли мы имѣть дѣло съ однимъ остовомъ вещества, потерявшимъ всѣ свои жизненныя свойства? Жизнь исчезла въ тотъ

моментъ, какъ мы подошли къ ней съ грубыми приемами анализа; печала та лябильность, та раздражимость протоплазмы, которая позволяла назвать ее живою и способною къ многообразнымъ реакціямъ; нарушены тѣ невидимыя соотношенія, которыя связывали воедино комплексъ различныхъ органическихъ веществъ. И если мы не знаемъ, что лежитъ въ основѣ смерти ферментовъ, то тѣмъ болѣе для насъ неизвѣстно, съ какими химическимъ процессомъ можно связать умираніе протоплазмы.

Итакъ, химическій анализъ ферментовъ не даетъ возможности проникнуть въ сущность ихъ дѣйствія. Однако, нѣтъ сомнѣній въ томъ, что та физико-химическая основа, съ которой тѣснѣйшимъ образомъ связаны ферментныя свойства, является въ общемъ очень постоянной и должна имѣть особое значеніе. Она между прочимъ обуславливаетъ коллоидальность ферментовъ, т. е. даетъ имъ громадную поверхность при небольшомъ объемѣ, что имѣетъ существенное значеніе для реакцій, производимыхъ ими. Въ этомъ отношеніи ферменты тоже сходны съ плазмой, структура которой признается коллоидальной. Легче всего можно себѣ представить ферменты, точнѣе говоря тѣ группы, которыя производить ферментацію, въ видѣ боковыхъ цѣпей одного общаго ядра, одной общей молекулы, аналогично "боковымъ цѣпямъ" клятки въ теоріи *Ehrlich'a*. Этихъ боковыхъ цѣпей можетъ быть нѣсколько, и характеръ ихъ можетъ быть различнымъ, въ зависимости отъ того, какого рода химическій реакціи онѣ производятъ. Предположеніе о различныхъ боковыхъ цѣпяхъ при одной и той основѣ ферментовъ подтверждается тѣмъ, что мы можемъ совершенно уничтожить одни ферментативныя свойства, сохранивъ другія. Если мы возьмемъ растворъ Така-диастазы и доведемъ его напр. до 70°C, то уничтожатся свойства каталитическія, но сохраняются въ той или другой степени инвертирующія и диастатическія; если мы

доведемъ до 100°C, то уничтожатся инвертирующія и диастатическія свойства, однако съ той разницей, что диастатическія могутъ возродиться, а инвертирующія—нѣтъ. Если мы возьмемъ растворъ Maltin'a, то доведеніемъ до 100°C уничтожается амиломальтаза, а амилаза и оксидаза могутъ возродиться; если мы прокипятимъ растворъ Maltin'a 15 минутъ, то совершенно уничтожается амилаза, и можетъ возродиться одна оксидаза. Однимъ словомъ, въ температурѣ мы имѣемъ средство раздѣлять одни ферменты отъ другихъ, точнѣе говоря—уничтожать одни ферментныя свойства, сохраняя въ то же время въ той или другой степени другія. Этотъ фактъ говоритъ повидному за то, что предполагаемая боковая цѣпь специфически—различнаго характера и къ одному и тому же вліянію относятся весьма неодинаковымъ образомъ, при чемъ одніе приходятъ лишь въ скрытое состояніе, своего рода "паралитичъ", отъ котораго могутъ оправиться, а другія безповоротно "умирають".

Мы должны предположить, что температура является лишь однимъ изъ способовъ, которыми можно перевести ферментъ въ бездѣтельное состояніе и вновь вызвать къ дѣятельности. Мы должны предположить, что въ живомъ организмѣ такихъ способовъ существуетъ весьма много, благодаря чему является возможность совершеннымъ образомъ регулировать различные химическіе процессы, давая имъ то или другое направленіе, ту или другую интенсивность, или прекращая ихъ. Живая клятка лишь по мѣрѣ необходимости, при строго опредѣленныхъ условіяхъ проявляетъ свою ферментативную способность, въ той или другой степени накопя или расходуя питательный матеріалъ. Опыты *in vitro* являются лишь грубой схемой и слабымъ отраженіемъ процессовъ органической жизни. Помимо температуры, аналогичнымъ образомъ могутъ дѣйствовать на ферменты и другія вліянія, напр. различные яды и даже соли. Въ этомъ

отношении является интересной работа *Н. П. Краккова*¹²⁷⁾. Изучая влияние морской воды на ферментативные процессы, он установил, что „существуют такие дозы солей, которые совершенно приостанавливают диастатические процессы и в то же время ускоряют триптические“; таким образом, является „возможность бездействия фермента, несмотря на его присутствие, и в то же время усиление действия другого фермента“. Если к этому добавить указанный выше факт, что оксидаза, приходя в бездвительное состояние, проявляет свойства прямо противоположные, то быть может, вопрос о тождестве ферментов (напр. о тождестве пепсина и химозина) примет новую постановку и найдет более легкое объяснение.

Что касается вопроса о способе действия ферментов, то этот последний продолжает быть весьма загадочным, подобно способу действия катализаторов вообще. Несомненно одно, что необходимы известные количественные соотношения для того, чтобы ферментативный процесс начался и шел вперед; одного „присутствия“ фермента, неизменно малых „следов“ его недостаточно для наступления ферментной реакции. Наоборот, чем в большем количестве взять фермент, тем энергичнее идет реакция и быстрее достигает конца; если прибавить к этому строгую специфичность действия ферментов, так блестяще доказанную *E. Fischer*¹²⁸⁾ом, то естественнее всего является предположение, что ферментативный процесс идет в несколько промежуточных фаз, путем образования ферментом нестойких химических соединений, легко распадающихся.

Заканчивая свою работу, считаю приятным долгом выразить глубокую благодарность своему учителю многоуважаемому профессору *Николаю Павловичу Краккову* за неизменное руководство и живой интерес к моей работе.

Ассистента при кафедре фармакологии, приват-доцента Медицинской Академии *Николая Ивановича Бочарова* искренно благодарю за постоянную готовность помочь словом и делом в затруднительных случаях.

Выражаю свою глубокую благодарность профессору *Михайловской Артиллерийской Академии Владимиру Николаевичу Ипатьеву* за те ценные указания, которые я получил от него по различным, затронутым в работе, вопросам.

Профессора Медицинской Академии *Сергия Яковлевича Терещина* сердечно благодарю за разрешение пользоваться некоторыми аппаратами физического кабинета, и ассистента при кафедре физики *Николая Алексеевича Орлова* за любезное руководство при производстве некоторых наблюдений

Литературный указатель.

- 1) M. Berzelius. Quelques idées sur une nouvelle Force agissant dans les combinaisons des corps organiques. *Annal. de Chimie et de Physique*, T. 61. 1836.
- 2) M. Berzelius. Einige Ideen über eine bei der Bildung organischer Verbindungen in der lebendigen Natur wirksame, aber bisher nicht bemerkte Kraft. *Berzelius' Jahresber. üb. d. Fortstr. d. phys. Wissenschaft*, Bd. 15. 1836.
- 3) Kirchhoff. *Schweigg. Journ.* Bd. 14. 1815. Цитир. по № 73-му.
- 4) Davy. *Annal. de Chimie et de Physique*, T. 4. 1817. Цитир. по № 74-му.
- 5) Thenard. Цитир. по № 44-му.
- 6) Döbereiner. *Annal. de Chimie et de Physique*, T. 24. 1823. Цитир. по № 11-му.
- 7) Dulong et Thenard. *Annal. de Chimie et de Physique*, T. 24. 1823. Цитир. по № 11-му.
- 8) Payen et Persoz. Mémoire sur l'Amidone et suite de recherches sur la Diastase. *Annal. de Chimie et de Physique*, T. 56. 1834.
- 9) Опп же. Ueber die Diastase und das Dextrin und über die gewerbliche Anwendung dieser Substanzen. *Poggendorf. Annal. d. Physik und Chemie*, Bd. 32. 1834.
- 10) Biot et Persoz. Ueber die Veränderungen, welche Stärkmehl und Gummi durch Säuren erleiden. *Poggendorf. Annal. d. Physik und Chemie*, Bd. 32. 1834.
- 11) M. Faraday. Ueber das Vermögen der Metalle und anderer Körper Gase mit einander zu verbinden. *Poggendorf. Annal. d. Physik und Chemie*, Bd. 33. 1834.
- 12) Fusinieri. *Giornale di fisica*, T. 8. 1825. Цитир. по № 11-му.
- 13) Döbereiner. Sauerstoffabsorption des Platins. *Poggendorf. Annal. d. Physik und Chemie*, Bd. 33. 1834.
- 14) E. Mitscherlich. Sur la formation de l'Ether. *Annal. de Chimie et de Physique*, T. 56. 1834.
- 15) Th. Schwann. Ueber das Wesen des Verdauungsprocesses. *Poggendorf. Annal. d. Physik und Chemie*, Bd. 38. 1836.
- 16) Döbereiner. Ueber Platinmohr. *Poggendorf. Annal. d. Physik und Chemie*, Bd. 37. 1836.
- 17) Poggendorf. Elementar-Zusammensetzung der bisher zerlegten Substanzen organischen Ursprung. *Poggendorf. Annal. d. Physik und Chemie*, Bd. 37. 1836.
- 18) Payen et Persoz. *Poggendorf. Annal. d. Physik und Chemie*, Bd. 37. 1836.
- 19) E. Mitscherlich. Ueber die chemische Zersetzung und Verbindung mittelst Contactsubstanzen. *Poggendorf. Annal. d. Physik und Chemie*, Bd. 55. 1842.
- 20) Опп же. Sur les réactions chimiques produites par les corps qui n'interviennent que par leur contact. *Annal. de Chimie et de Physique*, T. 7. 1843.
- 21) J. Reiset et E. Millon. Mémoire sur les phénomènes chimiques dus au contact. *Annal. de Chimie et de Physique*, T. 8. 1843.
- 22) Liebig. *Liebig's Annal.* Bd. 30 и *Poggendorf. Annal. d. Physik und Chemie*, Bd. 48. 1839. Цитир. по № 74-му.
- 23) Д. И. Менделеев. Замѣтка о вліянні прикосновенія на ходъ химическихъ превращеній. *Журн. Русск. Физ.-Химич. О-ва за 1886 годъ*, Т. 13.
- 24) Skraup. *Wiener Monatsch.* 12. Цитир. по № 74-му.
- 25) Bunsen. *Gasometrischen Methoden*, 1857. Цитир. по № 74-му.
- 26) G. Hüfner. Zur Lehre von den katalytischen Wirkungen. *Journ. f. prakt. Chem.* Bd. 10. 1874.
- 27) J. Mayer. *Mechanik der Wärme*, 1867. Цитир. по № 26-му.
- 28) Loew. Zur Lehre von den katalytischen Erscheinungen. *Journ. f. prakt. Chem.* Bd. 11. 1875.
- 29) Brodie et Glausius. *Poggendorf. Annal. d. Physik und Chemie*, Bd. 103. Цитир. по № 37-му.
- 30) Schönbein. *Journ. f. prakt. Chem.* Bd. 105. 1868.
- 31) Hoppe Seyler. *Zeitschr. f. Physiol. Chem.* Bd. 2. 1877. Цитир. по № 37-му.
- 32) M. Traube. Zur Lehre von der Autoxydation. *Berich. d. d. chemisch. Gesellsch.* Bd. 22. 1889.
- 33) Berthelot. Ueber die Rolle der nebenwirkenden Säuren bei der Aetherification. *Berich. d. d. chemisch. Gesellsch.* Bd. 12. 1879.

- 34) Van't Hoff. Zeitschr. f. physik. Chem. Bd. 16. 1895.
- 35) W. Jorissen. Die Sauerstoffaktivierung bei der langsamen Oxydation von Triäthylphosphin und Benzaldehyd. Zeitschr. f. physik. Chem. Bd. 22. 1897.
- 36) Овъ же. Sauerstoffaktivierung bei der langsamen Oxydation von Natriumsulfid. Zeitschr. f. Physik. Chem. Bd. 23. 1897.
- 36) Ewan. Ueber die Oxydationsgeschwindigkeit von Phosphor, Schwefel und Aldehyd. Zeitschr. f. Physik. Chem. Bd. 16. 1895.
- 37) C. Engler u. W. Wild. Ueber die sogenannte Aktivierung des Sauerstoffs und über Superoxydbildung. Berich. d. d. chemisch. Gesellsch. Bd. 22. 1897.
- 38) C. Engler u. J. Weissberg. Ueber Aktivierung des Sauerstoffs. Berich. d. d. chemisch. Gesellsch. Bd. 31. 1898.
- 39) J. Brode. Katalyse bei der Reaktion zwischen Wasserstoffsuperoxid und Jodwasserstoff. Zeitschr. f. physik. Chem. Bd. 37. 1901.
- 40) Ernst. Ueber die Katalyse des Knallgases durch kolloidales Platin. Zeitsch. f. physik. Chem. Bd. 37. 1901.
- 41) H. Euler. Katalyse durch Fermente. Zeitsch. f. physiol. Chem. Bd. 45. 1905.
- 42) Овъ же. Zur Frage der Inversion des Rohrzuckers. Berich. d. d. Chemisch. Gesellsch. 1901.
- 43) Cohen. Studien über die Inversion. Zeitsch. f. physik. Chem. Bd. 37. 1901.
- 44) В. Оствальдъ, Катализъ. 1903.
- 45) W. Ostwald. Übersättigung und Überkältung. Zeitschr. f. physik. Chem. Bd. 22. 1897.
- 46) V. Meyer u. W. Raun. Über die andauernde Einwirkung schwacher Erhitzung auf Knallgas. Berich. d. d. chemisch. Gesellsch. Jahrg. 28. Bd. 3. 1895.
- 47) В. Н. Пинъевъ. Каталитическая реакція при высокихъ температурахъ и давленіяхъ. 1907.
- 48) C. Engler u. R. Herzog. Zur chemischen Erkenntnis biologischer Oxydationsreaktionen. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 59. 1906.
- 49) Stahl. Zymotechnia fundamentalis seu fermentationis theoria generalis. 1897. Hurrup. no № 73-my.
- 50) Liebig. Liebig's Annal. Bd. 60. Hurrup. no № 74-my.
- 51) Cl. Bernard. Leçons de Physiologie expérimentale. 1856. Hurrup. no № 90-my.

- 52) Schönbein. Ueber die katalytische Wirksamkeit organischer Materien und deren Verbreitung in der Pflanzen und Thierwelt. Journ. f. prakt. Chem. Bd. 89. 1863.
- 53) Hüfner. Ueber ungeformte Fermente und ihre Wirkungen. Journ. f. prakt. Chem. Bd. 10. 1874.
- 54) G. Hüfner u. E. Marckwort. Ueber ungeformte Fermente und ihre Wirkungen. Journ. f. prakt. Chem. Bd. 11. 1875.
- 55) O. Nasse. Untersuchungen über die ungeformten Fermente. Pflüger's Arch. f. d. gesamt. Physiol. Bd. 11. 1875.
- 56) O. Loew. Ueber die chemische Natur der ungeformten Fermente. Pflüger's Arch. f. d. gesamt. Physiol. Bd. 27. 1882.
- 57) Naegeli. Theorie der Gärung. 1879. Hurrup. no № 74-my.
- 58) G. Tammann. Die Reaktionen der ungeformten Fermente. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 16. 1892.
- 59) G. Tammann. Zur Wirkung ungeformter Fermente. Zeitschr. f. physik. Chem. Bd. 18. 1895.
- 60) O. Nasse. Ueber die Wirkung der Fermente. Jahresh. üb. d. Fortschr. d. Thierchem. Bd. 24. 1894.
- 61) M. Arthus. Nature des enzymes. Thèse de Paris. 1896.
- 62) A. Fick. Ueber die Wirkungsart der Gerinnungsfermente. Pflüger's Arch. f. d. gesamt. Physiol. Bd. 45. 1889.
- 63) Jäger. Erklärungsversuch über die Wirkungsart der ungeformten Fermente. Virchow's Arch. Bd. 121. 1890.
- 64) Moraczewski. Ueber die Enzyme. Pflüger's Arch. f. d. gesamt. Physiol. Bd. 69. 1898.
- 65) Dubois. Sur les phénomènes électriques produits par l'activité des zymases. Journ. d. Physiol. et d. Pathol. génér. T. 2. 1900.
- 66) Chanoz e. Doyen. Phénomènes électriques pendant la coagulation du lait et du sang. Comp. Rend. Soc. d. Biol. 52. 1900.
- 67) F. Donnat. Versuch einer Theorie des kolloidalen Auflösungen. Zeitschr. f. physik. Chem. Bd. 37. 1901.
- 68) A. Noyes u. G. Sammet. Vorlesungsversuche zur Veranschaulichung verschiedener Typen von katalytischen Wirkungen. Zeitschr. f. physik. Chem. Bd. 41. 1902.
- 69) Brown. Enzyme Action. Journ. d. Physiol. et d. Pathol. génér. T. 4. 1902.
- 70) Loew. Ueber den Zusammenhang zwischen Labilität und Activi-

tät bei den Enzymen. Pflüger's Arch. f. d. gesamm. Physiol. Bd. 102. 1904.

71) Tiemann. Neuere Beobachtungen über Amidoxime und Azoxime. Berich. d. d. chemisch. Gesellsch. Bd. 22.

72) Le Play. Du rôle des substances minérales en biologie. Thèse de Paris. 1906.

73) Czapek. Biochemie der Pflanzen. 1905.

74) Леотоничъ. Материалы къ изученію явленія катализа. 1904.

75) Oppenheimer. Die Fermente und ihre Wirkungen. 1904.

76) H. Euler. Gleichgewicht und Endzustand bei Enzymreaktionen. Chemisch. Centrbl. 1907.

77) Bokorny. Platinkatalyse und physiologische Katalyse. Centrbl. f. Bakteriol. Bd. 21. 1908.

78) G. Senter. Katalyse durch Fermente. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 47. 1907.

79) R. Chodat. Neue Untersuchungen über die oxydierenden Enzyme. Chemisch. Centrbl. 1907.

80) H. B. Schade. Die Bedeutung der Katalyse für die Medicin. 1907.

81) Heffter. Medic. Naturwiss. Arch. 1907. Царип. no № 120-ny.

82) Agazzotti. Osservazioni ultramicroscopiche sui processi fermentativi. Journ. d. Physiol. et d. Pathol. génér. 1907.

83) G. Bredig u. M. Berneck. Ueber anorganische Fermente. Ueber Platinkatalyse und die chemische Dynamik des Wasserstoffsperoxyds. Zeitschr. f. physik. Chem. Bd. 31. 1899.

84) Bredig u. Jkeda. Ueber anorganische Fermente. Die Lähmung des Platinkatalyse durch Gifte. Zeitschr. f. physik. Chem. Bd. 37. 1901.

85) Bredig. Altes und Neues von der Katalyse. Biochem. Zeitschr. Bd. 6. 1907.

86) Jacobsohn. Untersuchungen über lösliche Fermente. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 16.

87) Schönbein. Ueber das Vorkommen des thätigen Sauerstoffs in organischen Materien. Journ. f. prakt. Chem. Bd. 105. 1868.

88) Loew. Zur Lehre von der chemischen Energie in den lebenden Zellen. Centrbl. f. Bakteriol. Bd. 21. 1908.

89) E. Fischer. Untersuchungen über Kohlenhydrat und Fermente. 1909.

90) Paschutin. Einige Versuche mit Fermenten welche Stärke und

Rohrzucker in Traubenzucker verwandelt. Du Bois Reymond's Arch. 1871.

91) R. Marckwort. u. G. Hüfner. Ueber ungeformte Fermente und ihre Wirkungen. Journ. f. prakt. chem. Bd. II. 1875.

92) Grützner. Notizen über einige ungeformte Fermente des Säugethierorganismus. Pflüger's Arch. f. d. gesamm. Physiol. Bd. 12. 1876.

93) Hüppe. Ueber das Verhalten ungetormter Fermente gegen hohe Temperatur. Chemisch. Centrbl. 1881.

94) Н. П. Бравковъ. Общій способъ получения неорганизованныхъ ферментовъ въ чистыхъ водныхъ настояхъ. Жур. Русск. Физ. Хим. Общ.—ва. Т. 19. 1887.

95) Lintner. Studien über Diastase. Journ. f. prakt. Chem. Bd. 36. 1886.

96) Оузъ же. Studien über Diastase. Journ. f. prakt. Chem. Bd. 34. 1887.

97) Fermi. Die Leimgelatine als Reagens zum Nachweis tryptischer Enzyme. Arch. f. Hygiene. Bd. 12. 1891.

98) Оузъ же. Weitere Untersuchungen über die tryptischen Enzyme der Mikroorganismen. Arch. f. Hygiene. Bd. 14. 1892.

99) Fermi u. Pernossi. Ueber die Enzyme. Centrbl. f. Bakter. Bd. 15. 1895.

100) Fermi. Ueber die antienzymatische Wirkung des Blutsorums. Centrbl. f. Bakteriol. Bd. 22. 1897.

101) Gorini. Studi sperimentali sur latte. Centrbl. f. Bakteriol. Bd. 12. 1892.

102) Pugliese. Ueber den Einfluss der Erwärmung auf diastatische Fermente. Pflüger's Arch. f. d. gesamm. Physiol. Bd. 69. 1898.

103) Beijerinck. Ueber ein Contagium vivum fluidum als Ursache der Fleckenkrankheit der Tabakblätter. Centrbl. f. Bakteriol. Bd. 5. 1899.

104) Camus et Gley. Sur quelques propriétés et réactions du liquide de la prostate interne du herisson. Journ. d. Physiol. et d. Pathol. génér. T. 2. 1900.

105) Issajew. Ueber die Malzoxydase. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 45. 1905.

106) W. Cramer u. A. Bearn. The effect of heat of enzyme activity. The Journ. of Physiol. V. 34. 1906.

107) Roger. Action de la salive chauffée. Comp. Rend. Soc. d. Biolog. 62. 1907.

108) Allaria. Untersuchungen über die Amylase in Kote des Neugeborenen und des Säuglings. *Bioch. Centrbl.* Bd. 5. 1907.

109) Pailhade. Le rôle diastatique de Phlothion vis-à-vis de l'oxygène. *Цитир. no Bloch. Centrbl.* Bd. 7. 1908.

110) Klempin. Studien über das amylytische Ferment im Hafer. *Bioch. Zeitschr.* Bd. 10. 1908.

111) Slosser u. Limbösch. De l'action du ferment salivaire dans les rapports avec la température du milieu. *Bioche. Centrbl.* Bd. 7. 1908.

112) Shaklee. Über den Einfluss der Körpertemperatur auf Pepsin. *Centrbl. f. Physiolog.* Bd. 23. 1909.

113) Gerber. La presure des crustacés decapodes. *Comp. Rend. hebdomad. de l'Acad. d. scienc. T.* 147. 1908.

114) H. Euler. Allgemeine Chemie der Enzyme. *Ergebn. d. Physiol. Jahrg.* 6. 1907.

115) Sieber. *Zeitschr. f. physiol. Chem.* Bd. 39. 1903.

116) Samyely. Thierische Fermente. *Handb. d. Biochemie d. Mensch. u. d. Thier.* Bd. 1. 1908.

117) F. Behrens. Ueber die oxydierende Bestandtheile und die Fermentation des deutschen Tabaks. *Centrbl. f. Bakteriol.* Bd. 7. 1901.

118) K. Aso. Ueber oxydierende Enzyme im Pflanzenkörper. *Bull. of. the coll. of. Agric. Цитир. no Chem Centrbl.* 1902.

119) Gerber. Action comparée des présures végétales sur la pepton et la casein. *Soc. Biol. Bd.* 46. 1909. *Цитир. no Biochem. Centrbl.* Bd. 9. 1909.

120) Кузьмовъ. Материалы къ изученію физико-химическихъ свойствъ оксидаза. 1908.

121) Menyhert. Eine rasche und genaue Bestimmung der Endreaktion bei der Zuckertitration mittels Fehlingscher Lösung. *Deutsch. Medic. Wochenschr.* 1908 № 36.

122) E. Schmidt. *Anstühr. Lehrb. d. pharmac. Chemie* 1901.

124) M. Ascoli u. g. Isar. Katalytische Beeinflüsse der Leberautolise durch kolloidale Metalle. *Berl. Klin. Wochenschr.* 1907. № 4.

123) М. Грамелинскій. О влияніи высокихъ температуръ на диастатическій ферментъ. *Русскія Врачи.* 1908 г. 47.

125) Ostwald-Luther. *Physico-Chemische Messungen.* 1902.

126) Heinz. *Handb. d. experim. Pathol. u. Pharmacol.* 1904. Bd. 1.

127) Н. П. Кравковъ. О влияніи безвоздушнаго Труды С.-Петербургск. Общ-ва естествоиспытателей. Томъ 29-й 1888 г.

ПОЛОЖЕНИЯ.

1. Химическія реакціи, протекающія въ живыхъ организмахъ, носятъ по преимуществу характеръ реакцій каталитическихъ.
2. Химическая индивидуальность ферментовъ еще не доказана, и всѣ существующія данныя скорѣе говорятъ за непостоянство химическаго состава, чѣмъ за его строгую опредѣленность.
3. Привыканіе къ некоторымъ ядамъ констатируется и на изолированномъ сердцѣ.
4. Препараты стрихнина при леченіи сердечныхъ аритмій, судя по экспериментальнымъ даннымъ, заслуживаютъ полного вниманія клиницистовъ.
5. Внутривенный эфирный наркозъ опасенъ, а потому не можетъ быть рекомендованъ.
6. Явленія анафилаксіи заслуживаютъ глубокаго изученія.

Curriculum vitae.

Михаилъ Иваповичъ Граменщкій, сынъ врача, православногъ вѣроисповѣданія, родился въ 1882 году. Среднее образованіе получилъ во Владимірской гимназіи, по окончаніи которой въ 1901-мъ году поступилъ въ Императорскую Военно-Медицинскую Академію. Въ 1907-мъ году окончилъ академическій курсъ со званіемъ лекаря съ отличіемъ (*medicus cum eximia laude*) и по конкурсу оставленъ при Академіи для усовершенствованія на казенный счетъ. Для занятія избранъ фармакологическую лабораторію профессора Николая Павловича Кравкова. Экзамены на степень доктора медицины сдалъ въ 1908—9-мъ году.

За докладъ, сдѣланный въ 1908-мъ году въ Обществѣ Русскихъ Врачей подъ заглавіемъ „О вліяніи высокихъ температуръ на диастатическій ферментъ“ удостоенъ преміи академика Ивана Петровича Павлова.

Настоящую работу подъ заглавіемъ „Вліяніе различныхъ температуръ на ферменты и регенерація ферментныхъ свойствъ“ представляетъ для полученія степени доктора медицины.