

О микробныхъ ферментахъ и дѣйствіи ихъ по сравненію съ ферментами животныхъ (амилолитическими и протеолитическими).

(Изъ гигиенической лабораторіи Харьковскаго Университета).

Извлечение изъ работы студента Ф. Н. Жмайловича ¹⁾.

При выращиваніи различныхъ микроорганизмовъ какъ на искусственныхъ, такъ и на естественныхъ питательныхъ средахъ, весьма часто наблюдается образованіе ферментовъ или бродиль, выделяемыхъ микроорганизмами во внѣшнюю среду и превращающихъ ее въ легко растворимое и усвояемое состояніе. По характеру производимыхъ этими ферментами измѣненій, они могутъ быть раздѣлены на діастазическіе или амилолитическіе и протеолитическіе. Благодаря первымъ, нерастворимые и неусвояемые углеводы превращаются въ легко растворимыя и усвояемыя измѣненія,—благодаря вторымъ происходитъ аналогичное измѣненіе бѣлковыхъ тѣлъ—пептонизація ихъ.

Всѣ процессы гніенія и разложенія мертвой бѣлковой субстанции обусловливаются именно пептонизаціею и дальнѣйшимъ разложениемъ бѣлковой молекулы. Расщепленіе бѣлка въ кишечникѣ животныхъ также въ значительной мѣрѣ обязано дѣйствію трипсино-подобныхъ ферментовъ, выделяемыхъ физиологическими микробами; очень многіе изъ патогенныхъ микроорганизмовъ выделяютъ такіе же бродила, разжижаютъ, благодаря послѣднимъ, желатину, а въ живыхъ тканяхъ оказываютъ растворяющее дѣйствіе на бѣлковыя тѣла, подготавливая себѣ такимъ образомъ легко усвояемый пищевой матеріалъ и облегчая себѣ пути распространенія по организму.

Несмотря однако на такое важное значеніе ферментовъ микробическаго происхожденія въ бродильныхъ, физиологическихъ и патологическихъ процессахъ, свойства этихъ ферментовъ изучены пока еще очень мало.

Исслѣдователи, работавшіе по этому вопросу показали, что ферменты дѣйствительно выделяются микроорганизмами во внѣшнюю среду и легко могутъ быть отдѣлены отъ микробическихъ тѣлъ, хотя и не

¹⁾ Работа удостоена золотой медали Медицинскимъ Факультетомъ Харьковскаго Университета.

въ чистомъ видѣ. Что же касается вопроса о дѣйствіи этихъ ферментовъ, въ особенности протеолитическихъ, то мнѣнія авторовъ раздѣлились: такъ Герми считаетъ эти ферменты способными лишь растворять бѣлки, но отнюдь не пептонизировать ихъ, причемъ превращеніе въ его опытахъ не доходило даже до образованія альбумозъ, — Kalischer пришелъ къ тому заключенію, что эти ферменты не только пептонируютъ бѣлокъ, но разлагаютъ его далѣе съ образованіемъ NH_3 и амидокислотъ.

Въ предпринятомъ мною изслѣдованіи, я старался выяснитъ причины этого разногласія и по возможности точно установить не только продукты гидролиза микробическихъ ферментовъ и способы ихъ выдѣленія, но также и условія, благопріятствующія выдѣленію микроорганизмами ферментовъ и наиболѣе энергичному дѣйствію этихъ послѣднихъ. Съ выясненія этихъ условій я началъ свое изслѣдованіе.

Изучая условія, вліяющія на выдѣленіе микробами ферментовъ, я пришелъ къ слѣдующимъ заключеніямъ:

1) Микроорганизмы, находясь въ состояніи голоданія, вовсе не вырабатываютъ гидролитическихъ ферментовъ.

Такъ *b. pyocyaneus*, *subtilis* и *prodigiosus*, *v. cholerae*, F. Priori и Мечникова, при культивированіи ихъ на бѣлковыхъ питательныхъ средахъ, вырабатываютъ съ различною силою дѣйствующіе ферменты, что доказывается разжиженіемъ желатины, раствореніемъ свернутого бѣлка, крахмала и т. д. Если же какой нибудь изъ этихъ микробовъ перенести съ косою поверхности агаровой культуры въ стерилизованную воду, въ которой, по недостатку питат. веществъ, микробъ не размножается, а сохраняется лишь болѣе или менѣе продолжительное время, то выработки фермента въ этомъ случаѣ не происходитъ вовсе, доказательствомъ чему служитъ то обстоятельство, что вода эта, будучи отфильтрована отъ микробовъ, даже спустя очень продолжительное время, не оказываетъ никакого дѣйствія ни на бѣлокъ ни на крахмалъ.

2) Микроорганизмы не вырабатываютъ ферментовъ и въ тѣхъ случаяхъ, когда они имѣютъ въ своемъ распоряженіи питат. вещества легко усвояемые, растворимыя и диффундирующія, а потому не требующія предварительной переработки.

Дѣйствительно, при культивированіи перечисленныхъ выше микроорганизмовъ на безбѣлковыхъ средахъ, растворахъ сахара и мочевины, хотя въ нѣкоторыхъ случаяхъ и получался довольно удовлетворитель-

ный ростъ, выработки же ферментовъ вовсе или почти не происходило, доказательствомъ чему служило то обстоятельство, что отфильтрованная отъ микробовъ среда или не оказывала никакого дѣйствія на желатину, или же разжижала ее весьма медленно и слабо.

Аналогичные описаннымъ факты наблюдаются и у высшихъ растительныхъ организмовъ. Весьма интересными въ этомъ отношеніи являются опыты Down'a надъ прорастаніемъ сѣмянъ ячменя. Въ кожурѣ этихъ сѣмянъ находится, какъ извѣстно, амилолитическій ферментъ—діастазъ—, выделяемый особыми клѣтками; при прорастаніи сѣмянъ, когда развивающійся зародышъ требуетъ усиленнаго питанія, ферментъ этотъ растворяетъ и превращаетъ въ сахаръ крахмальные зерна, находящіеся внутри сѣмянъ.

Выращивая эти сѣмена въ различныхъ средахъ, авторъ убѣдился, что во всѣхъ тѣхъ случаяхъ, когда среды содержали сахаръ и сѣмена получали его въ достаточномъ количествѣ извнѣ, выделения фермента не происходило вовсе, и заключающіяся внутри сѣмянъ крахмальные зерна оставались нерастворенными.

3) Между свойствами выделяемыхъ ферментовъ и свойствами питат. среды, на которой развиваются микроорганизмы, существуетъ тѣсная зависимость. Этотъ выводъ, логически вытекающій изъ 2-хъ предыдущихъ вполне подтверждается опытами, которые были произведены мною и заключались въ слѣдующемъ.

Одинъ и тотъ же микробическій видъ посѣвался на средахъ различнаго состава; черезъ опредѣленный промежутокъ времени полученныя такимъ образомъ культуры убивались тимоломъ и испытывались на содержаніе въ нихъ того или другого фермента.

Опредѣленіе относительнаго количественнаго содержанія протеолитическаго фермента производилось по способу Fermi, заключающемуся въ томъ, что отмѣренное количество убитой культуры приливается въ пробирку съ горизонтально застывшею желатиной, при чемъ скорость разжиженія, по которой судятъ о большемъ или меньшемъ содержаніи фермента въ средѣ, отсчитывается прямо въ миллиметрахъ.

Для количественнаго опредѣленія амилолитическаго фермента, которое производилось также лишь относительно, я поступалъ слѣдующимъ образомъ: отмѣренное количество убитой культуры я приливалъ къ 10 куб. с. крахмального клейстера, приготовленнаго въ концентраціи 15:100. Черезъ опредѣленный промежутокъ времени я разрушалъ ферментъ кипяченіемъ и производилъ количественное опредѣленіе сахара по тому или другому способу; сравнивая полученныя при различныхъ пробахъ цифры, я судилъ о большемъ или меньшемъ содержаніи ферментовъ въ той или другой пробѣ.

Поступая такимъ образомъ я убѣдился, что при культивированіи микроорганизмовъ на бѣлковыхъ питат. средахъ, въ бѣльшемъ количествѣ выдѣляются протеолитическіе ферменты,—при культивированіи же на средахъ крахмалистыхъ и вообще углеводныхъ, количество протеолитического фермента значительно понижается, а амилолитическаго—соотвѣтственно увеличивается, какъ это видно напр. изъ прилагаемой таблицы:

(Возрастъ культ.=1 нед.).

1 куб. сант. культуры, убитой тимол. на	Количество разж. желатины черезъ			Колич. сахара въ крахм. клейст. черезъ	
	24 ч.	1 нед.	2 нед.	1 нед.	2 нед.
Пептоновой водѣ .	2 mm.	6 mm.	14 mm.	0,01 grm.	0,03 grm.
Желатинѣ	3 mm.	9 mm.	19 mm.	0,015 —	0,03 —
Картофел. бульонѣ	0 mm.	3 mm.	9 mm.	0,07 —	0,15 —
Картофельн. кашѣ	0 mm.	4 mm.	8 mm.	0,10 —	0,3 —

Совершенно аналогичные описаннымъ факты наблюдаются и у плѣсневыхъ грибовъ—*aspergillus niger* и *penicillium glaucum*, какъ это видно изъ опытовъ Duclaux и его учениковъ.

У высшихъ животныхъ организмовъ, какъ извѣстно изъ физиологіи, въ состояніи голоданія не происходитъ выдѣленія пищеварительныхъ соковъ, если только вліяніе центральной нервной системы совершенно исключено; количество же и качество выдѣляемыхъ соковъ находится въ прямой зависимости отъ свойствъ принятой пищи.

Такимъ образомъ, изъ сопоставленія приведенныхъ выше литературныхъ и экспериментальныхъ данныхъ, можно сдѣлать то заключеніе, что законы, по которымъ происходитъ выдѣленіе ферментовъ и пищеварительныхъ соковъ, какъ у микроорганизмовъ такъ и у высшихъ растительныхъ и животныхъ организмовъ—совершенно аналогичны между собою, съ тою только разницей, что у высшихъ животныхъ выдѣленіе пищеварительныхъ соковъ можетъ быть вызвано рефлекторно.

Изслѣдуя условія, наиболѣе благопріятствующія выдѣленію ферментовъ микроорганизмами, я старался установить такіе способы и методы для выдѣленія этихъ ферментовъ изъ питат. средъ, которые гарантировали бы наибольшую чистоту ихъ.

Прежде чѣмъ говорить о результатахъ, полученныхъ мною въ этомъ направленіи, я вкратцѣ изложу существующіе уже способы.

Изъ способовъ выдѣленія животныхъ ферментовъ наиболѣе распространенными являются способы Wittich'a, Petit и Brücke.

Для добыванія фермента по способу Wittich'a, ткань или органъ, изъ котораго желаютъ получить ферментъ, мелко растираютъ и обрабатываютъ крѣпкимъ алкоголемъ впродолженіи 24-хъ часовъ, для того чтобы превратить бѣлковыя вещества въ нерастворимое состояніе; затѣмъ алкоголь сливаютъ и экстрагируютъ остатокъ глицериномъ изъ котораго, спустя нѣсколько дней, осаждаютъ ферментъ крѣпкимъ алкоголемъ.

Не говоря уже о томъ, что получаемый по этому способу ферментъ всегда содержитъ нѣкоторую примѣсь бѣловыхъ тѣлъ, способъ этотъ является весьма неудобнымъ въ томъ отношеніи, что сила дѣйствія фермента, вслѣдствіе продолжительной обработки алкоголемъ значительно понижается, и ферментъ иногда даже совершенно разрушается.

Послѣднее неудобство совершенно устраняется при пользованіи способомъ Petit, который заключается въ томъ, что органъ, предварительно измельченный, вымачивается въ водѣ, къ которой прибавляютъ 10% крѣпкого алкоголя; большая часть бѣловыхъ веществъ при этомъ не переходитъ въ растворъ,—ферментъ же растворяется отлично. Спустя нѣсколько дней жидкость сливаютъ и выпариваютъ ее при 40°C въ vacuum-аппаратѣ. Получающійся послѣ выпариванія остатокъ обладаетъ весьма энергичными ферментативными свойствами. Способъ этотъ весьма простъ и пригоденъ для практическихъ цѣлей; существенный недостатокъ его заключается въ томъ, что получаемый ферментъ содержитъ весьма значительную примѣсь бѣловыхъ тѣлъ.

Наилучшіе результаты даетъ весьма хлопотливый способъ Brücke, основанный на способности ферментовъ увлекаться изъ растворовъ образующимися въ нихъ объемистыми осадками.

Для полученія фермента по этому способу органъ вымачиваютъ въ водѣ при соблюденіи антисептическихъ предосторожностей; спустя нѣкоторое время воду фильтруютъ, сильно подкисляютъ фосфорной кислотой и насыщаютъ затѣмъ известковой водой до яснощелочной реакціи. Образующійся при этомъ объемистый осадокъ 3-хъ основной фосфорно-кальціевой соли, механически увлекаетъ за собою ферментъ.

Для очищенія отъ постороннихъ примѣсей осадокъ собираютъ на фильтрѣ и повторно растворяютъ въ сильно разведенной HCl , осаждавая его опять нейтрализаціей Na OH . Очищенный такимъ образомъ осадокъ выпечлачиваютъ въ водѣ, для растворенія фермента. Къ полученному такимъ образомъ раствору фермента, освобожденному фильтрованіемъ отъ извести, при соблюденіи извѣстныхъ манипуляцій, приливаютъ спиртный растворъ холестерина. Образующійся осадокъ холестерина, всплывая на поверхность, увлекаетъ за собою ферментъ. Осадокъ собираютъ на фильтрѣ и обрабатываютъ смѣсью спирта съ эфиромъ, при чемъ холестеринъ переходитъ въ растворъ, а ферментъ остается. Получающіеся по такому способу ферменты довольно чисты и обла- даютъ значительною силою дѣйствія.

На этомъ же принципѣ основанъ методъ А. Данилевскаго для разьединенія ферментовъ поджелудочной железы.

Кромѣ перечисленныхъ методовъ выдѣленія животныхъ ферментовъ существуютъ еще и другіе, болѣе сложные, не дающіе впрочемъ замѣтно лучшихъ результатовъ. Методы эти будутъ описаны ниже, теперь же я перехожу къ описанію способовъ выдѣленія микробныхъ ферментовъ; способы эти слѣдующіе:

1) *Способъ Bitter'a.*

Разводки пептонизирующихъ микробовъ приготавливаются на молокѣ. Черезъ нѣсколько времени молоко освобождается путемъ фильтрованія отъ микробовъ и насыщается ClNa до образованія пленки на поверхности. Эта пленка содержитъ въ себѣ различныя бѣлковыя тѣла, а если микробъ вырабатываетъ сычужный ферментъ, то и послѣдній цѣликомъ переходитъ въ пленку. Жидкость, содержащая въ себѣ протеолитическій ферментъ, осаждается алкоголемъ, при чемъ ферментъ выпадаетъ вмѣстѣ съ пептонами. Описанный способъ пригоденъ развѣ только къ тому, чтобы доказать что ферменты могутъ быть отдѣлены отъ микробовъ, такъ какъ о чистотѣ ферментовъ, въ этомъ случаѣ не можетъ быть и рѣчи.

2) *Способъ Fermi.*

Нѣсколько чище получаются ферменты по способу, предложенному Fermi. Для добыванія фермента въ этомъ случаѣ разводки микробовъ приготавливаютъ на желатинѣ или картофельной кашницѣ. Черезъ нѣсколько времени, когда желатина уже совершенно разжижена, приступаютъ къ выдѣленію фермента, которое производится при помощидробнаго осажденія алкоголемъ различной концентраціи.

Осаждение производится 2 раза; при первом осаждении слабым спиртом выпадают альбуминоиды—при втором осаждении крепким алкоголем—выпадают ферменты.

Количество и крепость приливаемого в первый раз алкоголя зависит не только от количества желатины, разжиженной микробом, но и от микроба, вызвавшего разжижение, как это видно из прилагаемой автором таблицы:

1) Для очищения 200 куб. с. желатины, разжиженной холерным вибрионом, требуется 200 куб. с. смѣси изъ 35 частей воды и 65 частей алкоголя крепостью в 96°.

2) Для очищения 200 куб. с. желатины, разжиженной *v. Finkler-Priori*—200 куб. с. смѣси изъ 30 частей воды и 70 частей спирта.

3) Для очищения 200 куб. с. культуры *b. prodigiosum*—200 куб. сант. смѣси изъ 25 частей воды и 75 частей спирта.

Описанный способ является весьма неудобнымъ. Не говоря уже о томъ, что для каждого микробического вида приходится подыскивать соответствующія количества алкоголя,—ферментъ всегда получается очень загрязненнымъ, не только находящимися в средѣ альбуминоидами, но также и микробическими тѣлами.

Изыскивая способы получения микробныхъ ферментовъ в наиболѣе чистомъ видѣ, я остановился на слѣдующихъ методахъ:

1) Разводки микробовъ приготовляются на растворѣ чистыхъ пептоновъ. Для этой цѣли необходимо пользоваться химически чистыми пептонами и готовить ихъ в лабораторіи, такъ какъ продажные „пептоны“ не содержатъ в себѣ даже слѣдовъ истинныхъ пептоновъ и представляютъ собою лишь смѣсь различныхъ альбумозъ и другихъ бѣлковыхъ тѣлъ, дающихъ осадокъ при кипяченіи. В своихъ опытахъ я пользовался пептонами, получающимися послѣ продолжительнаго трипсиннаго перевариванія фибрина и тщательно очищенными отъ альбумозъ при помощи сѣрнокислаго аммонія. На средѣ, представляющей собою 2% растворъ такихъ пептоновъ, прекрасно растутъ всѣ микробы.

Приготовивъ разводки, я помещалъ ихъ при t° наиболѣе благоприятной для роста микроба. Чтобы имѣть большія количества культуръ, я производилъ посѣвы в колбы, изъ которыхъ каждая заключала в себѣ до 400 куб. с. питательной жидкости. Черезъ нѣкоторое время, послѣ того какъ в колбахъ получался пышный ростъ, я производилъ пробы на содержаніе в нихъ фермента; для этого я отливалъ часть культуры в пробирку, убивалъ тимоломъ находившихся в ней микробовъ и бросалъ туда же кусочекъ фибрина. Если послѣдній растворялся хотя бы черезъ 24 часа, то тогда я приступалъ къ выдѣленію фермента.

Для этого я прежде всего отфильтровывалъ культуры черезъ фильтр Chamberland'a; къ отфильтрованной средѣ я прибавлялъ затѣмъ, въ избыткѣ, сѣрнокислаго аммонія и помѣщалъ ее въ термостатъ при t^0 въ 40^0 С. Черезъ нѣсколько часовъ начиналось уже выдѣленіе фермента, а черезъ сутки уже на поверхности жидкости образовывалась пленка, содержащая въ себѣ кромѣ ферментовъ еще другіе продукты жизнедѣятельности микробовъ, каковы пигменты, азотистые продукты регрессивнаго метаморфоза микробовъ и т. д.

Для очищенія отъ примѣсей я собиралъ лопаточкой всю пленку, растворялъ ее въ водѣ, подвергалъ діализу и вновь осаждалъ сѣрнокислымъ аммоніемъ.

Полученный осадокъ я собиралъ на фильтрѣ, растворилъ его въ водѣ, взятой въ весьма маломъ количествѣ и вновь осаждалъ, путемъ прибавленія 4-хъ объемовъ алкоголя. Поступая такимъ образомъ я получилъ ферментъ въ видѣ бѣлаго порошка, не дающаго ни одной реакціи на бѣлокъ и обладающаго значительной силой дѣйствія. Добываніе фермента по этому способу нужно вести очень осторожно, такъ какъ выходъ получается весьма незначительный.

2) Для добыванія ферментовъ изъ желатиновыхъ культуръ я поступалъ слѣдующимъ образомъ: послѣ того, какъ микробъ, посѣянный на желатинѣ совершенно разжижалъ эту послѣднюю, я насыщалъ ее сѣрнокислымъ аммоніемъ при комнатной температурѣ и собиралъ быстро всплывающій на поверхность жидкости объемистый осадокъ, состоящій изъ клеевыхъ веществъ, механически увлекающихъ за собою ферментъ. Собранный осадокъ я высушивалъ; растиралъ въ мелкій порошокъ и переносилъ его затѣмъ въ 0,5% растворъ дубильной или фосфорно-вольфрамовой кислоты. Съ этими кислотами клеевыя вещества образуютъ нерастворимый осадокъ, ферменты же, не измѣняясь, переходятъ въ растворъ, который, послѣ фильтраціи черезъ свѣчу Chamberland'a, осаждается крѣпкимъ алкоголемъ, причѣмъ ферментъ выпадаетъ черезъ нѣсколько часовъ. Полученные по этому способу ферменты не давали реакцій на бѣлокъ.

Описанные способы добыванія микробныхъ ферментовъ особенно пригодны въ томъ случаѣ, если желаютъ получить хорошо дѣйствующій протеолитическій ферментъ. Для полученія же амилолитическихъ ферментовъ я предлагаю слѣдующіе способы:

1) Разводки микробовъ приготовляются на лишенной бѣлковъ картофельной вытяжкѣ. Такая вытяжка представляетъ собою прекрасную питательную среду, на которой хорошо развиваются даже такіе виды, какъ холерный и Finkler-Prior'овскій вибрионъ. Черезъ нѣкоторое

время, когда описанная выше проба на ферментъ давала хорошіе результаты, я отфильтровывалъ культуры черезъ фильтръ Chamberland'a и насыщалъ ихъ азотно-кальціевою солью $(\text{NO}_3)_2 \text{Ca}$; затѣмъ я приливалъ къ нимъ насыщенный растворъ фосфорно-двунатріевой соли PO_4HNa_2 и амміакъ. Образующійся при этомъ осадокъ фосфорно-трехкальціевой соли $(\text{PO}_4)_2 \text{Ca}_3$ механически увлекалъ за собою ферментъ. Такой способъ образованія осадка этой соли я считаю болѣе удобнымъ на томъ основаніи, что образованіе его происходитъ нѣсколько медленнѣе и равномернѣе по всему объему жидкости, вслѣдствіе чего увлекается весь ферментъ, тогда какъ образованіе такого же осадка по способу Brücke происходитъ быстро и преимущественно въ верхнихъ слояхъ жидкости, вслѣдствіе чего иногда значительная часть фермента остается въ растворѣ.

Собранный на фильтрѣ осадокъ соли я выщелачивалъ водою въ продолженіе 12-ти часовъ, послѣ чего отфильтровывалъ воду и насыщалъ ее сѣрнокислымъ амміакомъ; получающійся черезъ нѣсколько часовъ хлопьевидный осадокъ, всплывающій на поверхность жидкости, я собиралъ лопаточкой, растворялъ въ водѣ, подвергалъ діализу и осаждалъ крѣпкимъ алкоголемъ. Выходъ, какъ и въ предыдущихъ случаяхъ, получался весьма незначительный.

2) Въ нѣсколько большемъ количествѣ получаютъ амиолитическіе ферменты при культивированіи микробовъ на твердой питательной средѣ—картофельной кашѣ, которая готовится слѣдующимъ образомъ: 400 граммовъ мелко изрѣзаннаго картофеля вымачивается въ водѣ 24 часа. По истеченіи этого срока вода сливается, и картофель вновь обливается чистой водою, въ которой вываривается на голомъ огнѣ въ продолженіе 3-хъ—4-хъ часовъ. Отваръ затѣмъ сливается, а картофель растирается въ кашу, къ которой прибавляютъ 20 куб. с. NaOH въ 1% растворѣ. Полученная такимъ образомъ каша размывается тонкимъ слоемъ на стеклянныхъ пластинкахъ, которыя стерилизуются въ автоклавѣ. Приготовивъ культуры на этой средѣ, черезъ нѣсколько дней, когда въ нихъ замѣчался ныншній ростъ, я соскабливалъ ихъ и растиралъ съ тройнымъ количествомъ воды. Давши жидкости отстояться, я отфильтровывалъ ее отъ микробовъ и насыщалъ сѣрнокислымъ аммоніемъ при t въ 40° . Полученный на поверхности жидкости осадокъ, я переносилъ въ 25% алкоголь и оставлялъ въ немъ на 12 часовъ. По истеченіи этого срока, я отфильтровывалъ настой отъ нераствореннаго осадка и осаждалъ изъ него ферментъ крѣпкимъ алкоголемъ.

Получающійся по этому способу ферментъ не давалъ ни одной реакціи ни на бѣлокъ, ни на крахмалъ.

Установивши методы выдѣленія ферментовъ въ наиболѣе чистомъ видѣ я перешелъ къ изученію химическаго строенія ихъ.

Изученіе приведенныхъ выше способовъ выдѣленія ферментовъ показываетъ намъ, что ни одинъ изъ нихъ не даетъ гарантіи въ томъ, что выдѣляемый ферментъ есть дѣйствительно совершенно чистое дѣятельное вещество, не содержащее постороннихъ примѣсей. Мы можемъ только говорить о томъ, что по тому или другому способу получается какое то вещество, обладающее большею или меньшею діастатическою способностью и, слѣдовательно, содержащее большее или меньшее количество дѣятельнаго фермента. Каково же это количество, мы къ сожалѣнію не знаемъ и не имѣемъ никакихъ положительныхъ данныхъ для его опредѣленія.

Справедливость сказаннаго подтверждается результатами многочисленныхъ анализовъ, произведенныхъ надъ многими гидролитическими ферментами. Возьмемъ для примѣра числовыя данныя, полученныя при анализахъ діастаза ячменныхъ сѣмянъ. Zubkovski (1), Krauch (2), Szibagyí (3), Zintner (4) и Егоровъ (5) получили различныя цифры, какъ это видно изъ прилагаемой таблицы:

	1	2	3	4	5
N.	5,14.	4,57.	9,98.	8,92.	4,70.
H.	6,49.	6,90.	7,44.	6,38.	6,78.
C.	45,57.	45,68.	46,80.	44,33.	40,24.
S.	—	—	—	—	0,70.
O.	37,64.	36,77.	34,64.	34,46.	41,53.
P.	—	—	—	1,12.	1,45.
Зола.	3,16.	6,08.	1,14.	4,79.	4,60.

Такія же колебанія цифровыхъ данныхъ были получены и въ анализахъ папайотина (Wurtz), пепсина (Шумова-Симиновская), инвертина и эмульсина (Barth). Хотя полученные во всѣхъ этихъ анализахъ цифровыя данныя и не имѣютъ абсолютнаго значенія, тѣмъ не менѣе они въ общемъ указываютъ на то обстоятельство, что количество N въ амилолитическихъ и инвертирующихъ ферментахъ значительно ниже чѣмъ въ протеолитическихъ. Желая изучить причины такого колебанія числовыхъ данныхъ, полученныхъ разными авторами, Wroblewski предпринялъ рядъ новыхъ анализовъ, объектомъ для которыхъ послужилъ наиболѣе изученный діастатическій ферментъ ячменныхъ сѣмянъ.

Для добыванія этого фермента авторъ вымачивалъ высушенный солодъ въ разведенномъ спиртѣ, откуда онъ осаждалъ ферментъ крѣпкимъ алкоголемъ; полученный осадокъ онъ растворялъ въ водѣ, осаждалъ его сѣрнистой магнезіей, вновь растворялъ въ водѣ, подвергалъ діализу и осаждалъ крѣпкимъ алкоголемъ. Полученный въ концѣ концовъ бѣлый осадокъ очень хорошо растворялся въ водѣ и не давалъ реакцій ни на бѣлокъ и пептоны, ни на крахмалъ и декстрины. Приготовивъ этотъ ферментъ по описанному способу изъ 4-хъ пробъ солода и подвергнувъ его анализу, авторъ получилъ все таки различныя цифры, какъ это видно изъ прилагаемой таблицы:

	1	2	3	4
C.	45,8.	48,0.	50,1.	46,2.
H.	6,9.	7,3.	7,2.	7,6.
N.	3,96.	6,01.	8,13.	4,54.
O. и S.	43,34.	38,69.	33,57.	41,66.
Зола.	2,1.	4,01.	1,2.	4,2.

Изъ полученныхъ цифровыхъ данныхъ авторъ сдѣлалъ тотъ выводъ, что полученный имъ діастазъ содержалъ примѣсь бѣлковъ и углеводовъ. Пытаясь отдѣлить ихъ, авторъ поступилъ слѣдующимъ образомъ: приготовивъ растворъ неочищеннаго діастаза, онъ обработалъ его реактивомъ Brücke и соляной кислотой. Въ результатѣ получился объемистый осадокъ бѣлковыхъ веществъ, механически увлекшихъ за собою ферментъ. Изъ этого осадка авторъ удалялъ ртуть и іодъ, растворялъ его въ водѣ и осаждалъ крѣпкимъ алкоголемъ. Полученный осадокъ онъ обрабатывалъ крѣпкимъ алкоголемъ и растворялъ его въ водѣ. Полученный такимъ образомъ растворъ фермента давалъ нѣкоторыя реакціи на бѣлокъ и обладалъ весьма ослабленною силою дѣйствія. Содержаніе азота въ этомъ ферментѣ = 15,3%. Сравненіе результатовъ полученныхъ въ обоихъ случаяхъ показываетъ, что по второму способу авторъ получилъ еще болѣе загрязненный ферментъ чѣмъ въ первомъ опытѣ, что однако не мѣшаетъ ему сдѣлать тотъ неожиданный выводъ, что ферментъ относится къ разряду альбуминоидовъ.

Другой изслѣдователь—Hirschfeld, выдѣливши ферментъ вмѣстѣ съ веществомъ, дающимъ при кипяченіи съ кислотами арабинозу, относитъ его къ разряду углеводовъ.

Очевидно, что оба автора упустили изъ виду какія то побочныя причины, благодаря которымъ, у одного изъ нихъ діастазъ оказался фиксированнымъ къ бѣлковымъ веществамъ, а у другого къ углеводамъ.

Произведенный мною анализ нѣкоторыхъ микробныхъ ферментовъ обнаружилъ, что ферментъ *b. ruosyanei* и *v. cholerae* содержатъ фосфоръ и сѣру, которая была опредѣлена только качественно. Что же касается азота, то количественно онъ былъ опредѣленъ по способу Kieldahl'я въ ферментѣ *v. F. Priori*, въ которомъ содержаніе его = 8,148%.

Полученная цифра показываетъ содержаніе N только приблизительно, такъ какъ опредѣленіе его было произведено только въ одной пробѣ.

Къ протеолитическимъ энзимамъ животнаго происхожденія относятся, какъ извѣстно, пепсинъ и трепсинъ. Хотя оба эти фермента растворяютъ бѣлковыя вещества, однако, какъ условія такъ и результаты ихъ дѣйствія значительно различаются между собою.

Пепсинъ дѣйствуетъ исключительно при кислой реакціи, причемъ наиболѣе благоприятною является кислотность, зависящая отъ присутствія свободной HCl. Раствореніе бѣлка въ этомъ случаѣ происходитъ такимъ образомъ, что онъ вступаетъ прежде всего въ соединеніе съ HCl, образуя съ нею синтонинъ, который уже подѣ дѣйствіемъ пепсина превращается далѣе съ образованіемъ альбумозъ и пептоновъ. Конечнымъ результатомъ дѣйствія этого фермента является, слѣдовательно, образованіе пептоновъ, которые, по изслѣдованіямъ Kühne, состоятъ изъ двухъ группъ: антипептоновъ—не измѣняющихся подѣ дѣйствіемъ панкреатическаго сока и гемипептоновъ—расщепляющихся далѣе съ образованіемъ азотистыхъ продуктовъ разложенія. Смѣсь этихъ пептоновъ была названа Kühne амфопептонами; схематически измѣненіе бѣлковой частицы подѣ дѣйствіемъ пепсина можетъ быть представлено въ слѣдующей таблицѣ:

альбуминъ		
геми-группа		анти-группа
прото-альбумоза	гетеро-альбумоза	анти-альбумидъ
геми-дейтеро-альбумоза	амфо-дейтеро-альбумоза	анти-дейтеро-альбумоза
геми-пептонъ	амфо-пептонъ	анти-пептонъ

Другая протеолитическая энзима-трипсинъ дѣйствуетъ лишь при нейтральной и щелочной реакціи и разлагаетъ геми-пептоны на лейцинъ, тирозинъ, амидо-янтарную кислоту, триптофанъ и т. д. Схематически такое разложеніе можетъ быть представлено слѣдующимъ образомъ:

альбуминъ	
глобулинъ	
анти-альбумоза	геми-альбумоза
анти-дейтеро-альбумоза	геми-дейтеро-альбумоза
анти-пептонъ	геми-пептонъ
	лейцинъ, тирозинъ, NH_3 , амидо-янтарная кислота, триптофанъ.

Клеевые вещества подъ дѣйствіемъ трипсина даютъ клеевые пептоны и амміакъ.

Разсматривая вопросъ о томъ, къ какой изъ этихъ энзимъ ближе стоятъ микробные протеолитическіе ферменты, авторы разошлись во мнѣніяхъ. Такъ Fermi, изучая продукты гидролиза, вызываемаго нѣкоторыми микробными ферментами, пришелъ къ тому заключенію, что ферменты эти способны лишь растворять, но отнюдь не пептонизировать альбуминоиды. Доказательствомъ этому предположенію авторъ считаетъ то обстоятельство, что ему не удалось найти пептоновъ въ продуктахъ гніенія и что выдѣленные имъ по вышеописанному способу ферменты, при дѣйствіи своемъ на свернутый бѣлокъ давали лишь одно измѣненіе бѣлка, которое осаждалось изъ раствора при насыщеніи его хлористымъ натріемъ и при кипяченіи съ азотной кислотой.

Въ совершенной противоположности съ результатами Fermi находятся результаты, полученные другими авторами. Такъ Kalischer, изучая дѣйствіе нѣкоторыхъ ферментовъ на казеинъ, получилъ въ результатъ пептоны, лейцинъ, тирозинъ, амміакъ и ароматическіе оксикислоты. Результаты Kalischer'a находятъ себѣ подтвержденіе въ опытахъ Duciaux. Этотъ ученый добылъ изъ культуръ палочки *Tyrotrix tenuis* протеолитическій ферментъ, который весьма быстро вызывалъ пептонизацію молока. Другіе изслѣдователи, какъ, напр., Hahn и Geret, идя по совершенно иному пути, пришли къ аналогичнымъ результатамъ. Эти авторы, желая доказать присутствіе въ клѣточкахъ дрожжей протеолитическихъ ферментовъ, подвергли ихъ высокому давленію при помощи гидравлическаго прессы и, собравъ выжатый такимъ образомъ сокъ, помѣстили его въ термостатъ при $t\ 37^\circ\text{C}$, тщательно соблюдая антисептическія предосторожности; предоставленный самому себѣ этотъ

сокъ далъ черезъ нѣсколько часовъ бѣлый аморфный осадокъ, состоявшій изъ бѣловыхъ тѣлъ. Черезъ 8 дней этотъ осадокъ вполне растворился и еще нѣсколько времени спустя замѣнился другимъ осадкомъ, состоявшимъ изъ тирозина. Выпаренная жидкая часть, дала осадокъ лейцина.

Такимъ образомъ всѣ послѣднія изслѣдованія ставятъ микробные ферменты ближе къ трипсину, тогда какъ *Fermi* обособляетъ ихъ въ отдѣльную группу растворяющихъ, но не пептонизирующихъ ферментовъ. Но, хотя перечисленные изслѣдователи и пришли къ результатамъ, совершенно противоположнымъ, чѣмъ *Fermi*, однако ни одинъ изъ нихъ не доказалъ ошибочности его выводовъ, такъ какъ не работалъ надъ тѣми же микробическими видами и бѣловыми тѣлами. Для провѣрки опытовъ *Fermi* я изучалъ дѣйствіе на желатину и фибринъ ферментовъ, добытыхъ изъ тѣхъ микроорганизмовъ, надъ которыми онъ производилъ свои опыты; микробы эти слѣдующіе: *b. subtilis*, *b. prodigiosus*, *b. pyocyaneus*, *v. cholerae*, *F. Priori*, и *v. Мечникова*; кромѣ этихъ видовъ я изучалъ еще *b. mesentericus vulgatus*, *staphylococcus pyog. citreus*, и *bac. proteus mirabilis*. Результаты моихъ изслѣдованій въ этомъ направленіи изложены въ нижеслѣдующихъ таблицахъ.

1) *B. Subtilis*.

0,5 gm. фермента, добытаго изъ желатиновыхъ культуръ этого микроба по описанному выше способу, было растворено въ 100 куб. сант. дистилл. воды и къ полученному раствору было прибавлено 2 куб. с. 10% раств. соды. Щелочная жидкость была раздѣлена на 3 части; къ одной изъ нихъ было прибавлено 40 gm. застывшей желатиновой студени, къ другой—10 gm. сырого фибрина и къ третьей—15 gm. казеина.

Первая проба съ желатиной была оставлена при комнатной температурѣ, послѣднія же двѣ были помѣщены въ термостатъ при t въ 37°C .

Наблюдая за всѣми этими пробами я получилъ нижеслѣдующіе результаты:

1) Въ пробахъ съ желатиной эта послѣдняя оказалась растворенной черезъ 3 дня. Изслѣдованіе взятой части этой пробы показало, что она содержитъ въ себѣ два различныя вещества: одно осаждающееся при насыщеніи сѣрнистымъ аммоніемъ и представляющее собою смѣсь различныхъ клеевыхъ пропептоновъ, и другое, осаждавшееся изъ раствора лишь спиртомъ, дубильной, фосфорно-вольфрамовой,—молибденовой, пикриновой съ уксусной кислотой и сулемой въ щелочномъ растворѣ. Оба эти вещества растворялись въ водѣ и давали біуретовую реакцію.

Черезъ 10 дней проба заключала въ себѣ уже исключительно второе вещество, представляющее собою очевидно настоящій клеевой пептонъ.

Черезъ 3—4 недѣли жидкость содержала уже NH_3 , а при выпариваніи ея на поверхности получалась кожистая пленка, состоящая, какъ оказалось при ближайшемъ изслѣдованіи, изъ лейцина.

Наряду съ лейциномъ находился и неизмѣнный клеевой пептонъ. Реакціи на амидоуксусную кислоту дали отрицательный результатъ.

2) Во второй пробѣ съ фибриномъ этотъ послѣдній оказался совершенно раствореннымъ черезъ 6 дней послѣ начала опыта. Изслѣдованіе небольшой части этой пробы обнаружило въ ней 2 бѣлковыя вещества, изъ которыхъ одно осаждалось при кипяченіи съ азотной кислотой, а другое при насыщеніи раствора NaCl или MgSO_4 .

Въ этомъ случаѣ получился слѣдовательно какой то альбуминъ и смѣсь изъ прото и гетеро-альбумозъ.

Черезъ 10 дней проба заключала въ себѣ уже только такія бѣлковыя вещества, которыя осаждались лишь частью при насыщеніи раствора ClNa и SO_4Mg , частью же при насыщеніи сѣрнокислымъ аммоніемъ. Эти вещества составляли, слѣдовательно, смѣсь изъ прото и дейтеро-альбумозъ. Отфильтрованная отъ осадковъ жидкость не давала биуретовой реакціи.

Черезъ 18 дней, отфильтрованная отъ осадка, образующагося при насыщеніи сѣрнокислымъ аммоніемъ, новая проба давала прекрасную, характерную для пептоновъ биуретовую реакцію.

Черезъ 7 недѣль насыщеніе пробы сѣрнокислымъ аммоніемъ давало весьма незначительный осадокъ: большая часть альбумозъ превращалась въ пептоны.

Къ этому же времени наблюдалось образованіе лейцина и тирозина, опредѣленіе которыхъ производилось по элементарнымъ извѣстнымъ способамъ.

Реакціи на NH_3 дали положительный результатъ, бромовая же реакція и реакція на амидо-янтарную кислоту дали отрицательный результатъ, точно также какъ и реакція на оксикислоты аромат. ряда.

Такимъ образомъ расщепленіе бѣлка подъ дѣйствіемъ изслѣдуемаго фермента схематически можетъ быть представлено слѣдующимъ образомъ:

альбуминъ	
геми-прото-альбумоза	анти-прото-альбумоза
геми-дейтеро-альбумоза	анти-дейтеро-альбумоза
геми-пептонъ	анти-пептонъ
лейцинъ, тирозинъ и амміакъ.	

3) Въ третьей пробѣ съ казеиномъ этотъ послѣдній вполне растворился черезъ 8 дней: прибавленіе уксусной кислоты не давало осадка казеина.

Изслѣдованіе части пробы на альбумозы и пептоны обнаружило въ ней смѣсь изъ прото и дейтеро-альбумозъ и небольшое количество пептоновъ.

Количество послѣднихъ со дня на день возрастало и, черезъ 20 дней, біуретовая реакція, послѣ осажденія раствора сѣрнокислымъ аммоніемъ, давала прекрасный результатъ. Черезъ 2 мѣсяца жидкость содержала наряду съ настоящими пептонами—лейциномъ, тирозиномъ и небольшое количество NH_3 .

Реакціи на амидо-янтарную, арапат. оксикислоты и триптофанъ дали отрицательный результатъ. Гниеніе во всѣхъ этихъ опытахъ совершенно исключалось посредствомъ прибавленія къ пробамъ тимола.

Совершенно аналогичные результаты были получены мною и при опытахъ надъ другими ферментами; измѣнялась лишь скорость превращенія, какъ это видно изъ прилагаемыхъ таблицъ:

II. *Bac. prodigiosus*.

Постановка опыта совершенно такая же, какъ и въ предыдущемъ случаѣ.

1. Проба съ желатиной:

- a) разжиженіе желатины наступило черезъ 12 дней.
- b) образованіе пептона черезъ 20 дней.
- c) образованіе лейцина и NH_3 черезъ 9 недѣль.

2. Проба съ фибриномъ:

- a) раствореніе фибрина черезъ 3 недѣли.
- b) образованіе пептона черезъ 7 недѣль.
- c) образованіе лейцина и NH_3 черезъ 12 недѣль.

3. Проба съ казеиномъ дала вполне аналогичные результаты.

III. *B. pyocyaneus*.

1. Проба съ желатиной:

- a) разжиженіе желатины черезъ 5 дней.
- b) образованіе пептона черезъ 9 дней.
- c) образованіе лейцина черезъ 5 недѣль.

2. Проба съ фибриномъ:

- a) раствореніе фибрина черезъ 14 дней.
- b) образованіе пептоновъ черезъ 3 недѣли.
- c) образованіе лейцина и тирозина черезъ 4 недѣли.

3) Проба съ казеиномъ дала аналогичные результаты.

IV. *Vibrio cholerae*.

1. Проба съ желатиною:

- a) разжиженіе желатины черезъ 5 дней
- b) образованіе пептона черезъ 7 дней
- c) образованіе лейцина черезъ 4 недѣли.

2. Проба съ фибриномъ:

- a) фибринъ растворился черезъ 8 дней
- b) образованіе пептона черезъ 18 дней
- c) образованіе лейцина и т. д. черезъ 4 недѣли.

V. V. Finkler Priori.

1. Проба съ желатиной:

- a) разжиженіе желатины черезъ 4 дня
- b) образованіе пептона черезъ 5—7 дней
- c) образованіе лейцина черезъ 3 недѣли.

2. Проба съ фибриномъ:

- a) раствореніе его черезъ 5 дней
- b) образованіе пептоновъ черезъ 12 дней
- c) образованіе лейцина, тирозина и NH_3 черезъ 4 недѣли.

VI. Вибріонъ Мечникова.

1. Проба съ желатиной:

- a) разжиженіе желатины черезъ 6 дней
- b) образованіе пептона черезъ 16 дней
- c) образованіе лейцина и NH_3 черезъ 6 недѣль.

2. Проба съ фибриномъ:

- a) раствореніе фибрина черезъ 14 дней
- b) образованіе пептона черезъ 3 недѣли
- c) образованіе лейцина, тирозина и амміака черезъ 6 недѣль.

3. Образованіе казеинового пептона черезъ 3 недѣли, лейцина тирозина и NH_3 черезъ 6—7 недѣль.

Опыты надъ другими микроорганизмами, каковы *b. mesentericus vulgatus*, *Staphyloc. pyog. citreus*, *bac. proteus mirabilis* дали въ общемъ совершенно аналогичные съ предыдущими результаты, съ тою лишь разницею, что при дѣйствіи фермента *st. pyog. citrei* на желатину и фибринъ не наблюдалось развитія NH_3 .

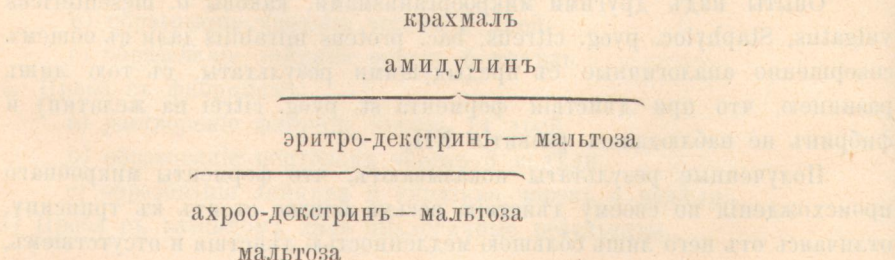
Полученные результаты показываютъ, что ферменты микробнаго происхожденія по своему дѣйствію весьма близко стоятъ къ трипсину, отличаясь отъ него лишь болѣею медленностью дѣйствія и отсутствіемъ,

въ продуктахъ производимаго ими гидролиза, амидо-янтарной кислоты и триптофана. Какимъ же образомъ Ферми пришелъ къ заключенію о способности микробныхъ ферментовъ лишь растворять, но не пептонизировать бѣлки?

Грубая ошибка этого изслѣдователя заключается въ томъ, что въ опытахъ надъ перевариваніемъ фибрина онъ дѣлалъ пробы на пептонъ тотчасъ послѣ растворенія фибрина и конечно получалъ отрицательный результатъ, такъ какъ для полнаго гидролитическаго разложенія бѣлка требуются недѣли и мѣсяцы; Ферми же производилъ пробы черезъ 15 часовъ; въ тѣхъ же случаяхъ, когда онъ продолжалъ наблюденіе въ продолженіе нѣсколькихъ недѣль—онъ пользовался крутосвареннымъ яичнымъ бѣлкомъ, который вообще представляетъ собою плохой матеріалъ для подобнаго рода опытовъ, такъ какъ онъ весьма трудно разлагается даже сильно дѣйствующими пищеварительными соками животнаго организма.

Что же касается разнорѣчивости моихъ опытовъ и опытовъ Kalischer'a, нашедшаго въ продуктахъ дѣйствія фермента на казеинъ ароматическія окислительныя кислоты, тогда какъ я, пользуясь его же способомъ этихъ кислотъ не нашелъ,—то эта разнорѣчивость можетъ быть объяснена тѣмъ обстоятельствомъ, что мы работали надъ различными микробическими видами. Точно же проверить опыты Kalischer'a я не могъ по той простой причинѣ, что авторъ ничего не упоминаетъ о томъ, съ какимъ именно видомъ онъ имѣлъ дѣло.

Къ амилолитическимъ ферментамъ животнаго организма относятся птѣалинъ слюны и амилолитическій ферментъ поджелудочной железы. Оба эти фермента лучше всего дѣйствуютъ при нейтральной или щелочной реакціи и превращаютъ крахмалъ въ мальтозу съ небольшимъ количествомъ глюкозы. Схематическое послѣдовательное превращеніе крахмала можетъ быть представлено слѣдующимъ образомъ:



Различіе между этими двумя ферментами заключается лишь въ томъ, что птіалинъ поджелудочной железы дѣйствуетъ значительно энергичнѣе чѣмъ птіалинъ слюны.

Изученіе дѣйствія амилолитическихъ ферментовъ микробнаго происхожденія ограничилось пока лишь тремя работами. Marcano ¹⁾ Wortmann'a ²⁾ и Fermi ³⁾.

Markano производилъ свои опыты надъ вибриономъ, выдѣленнымъ изъ рисовыхъ сѣмянъ. Разводки этого микроба онъ отфильтровывалъ черезъ свѣчу Chamberland'a, прибавлялъ къ нимъ небольшое количество хлороформа и испытывалъ ихъ дѣйствіе на крахмалъ; пробы на сахаръ давали положительный результатъ.

Wortmann употреблялъ для своихъ опытовъ гніющіе настои картофеля и бобовъ. Осаждая эти настои абсолютнымъ алкоголемъ и растворяя полученный осадокъ въ водѣ, авторъ прибавлялъ къ такому раствору крахмальный клейстеръ; реакціи на сахаръ, производимыя черезъ нѣкоторое время, давали положительный результатъ.

Аналогичные результаты были получены и Fermi, который наблюдалъ образованіе сахара въ крахмальномъ клейстерѣ подъ дѣйствіемъ ферментовъ, выдѣленныхъ изъ различныхъ культуръ по описанному выше способу.

Ни одинъ изъ приведенныхъ авторовъ не говоритъ о томъ, какой именно видъ сахара былъ полученъ и въ какомъ порядкѣ происходилъ процессъ превращенія.

Объектомъ для моихъ изслѣдованій послужили: *b. megatherium*, холерный вибрионъ, *F. Priori'a*, *bac. Subtilis*, и *b. mesenteriaes vulgaris*.

Ферментъ этихъ микробовъ былъ полученъ мною изъ культуръ на картофельной вытяжкѣ по описанному выше способу; 0,5 gr. такого фермента я растворялъ въ 100 куб. с. воды, подщелачивалъ растворомъ соды и приливалъ 20 куб. с. 10% крахмального клейстера, послѣ чего, изо дня въ день, слѣдилъ за раствореніемъ крахмала. Дѣйствуя такимъ образомъ я получилъ результаты, изложенныя въ нижеслѣдующихъ таблицахъ.

¹⁾ Marcano. Fermentation de la fécule ets. Com. rend. 1882.

²⁾ Wortmann. Diastatische Fermente der Bacterien. Zeitschr. f. physiol. Chemie 1882 Bd. IV.

³⁾ Fermi. Arch. f. Hygien. 1890 S. 31.

I. B. megaterium.

Растворъ фермента съ крахмальнымъ клейстеромъ былъ помѣщенъ въ термостатъ при t въ 37°C .

Ислѣдованіе пробы:

a) черезъ 24 часа:—реакція съ іодомъ—фіолетовое окрашиваніе; проба Trommer'a—положительный результатъ.

b) черезъ 3 дня:—реакція съ іодомъ—красное окрашиваніе;—проба Trommer'a—положительный результатъ.

c) черезъ 5 дней:—реакція съ іодомъ—никакого результата; прибавленіе спирта вызывало образованіе аморфнаго осадка;—проба Trommer'a—положительный результатъ.

d) черезъ 7 дней:—прибавленіе спирта не давало осадка;—проба Trommer'a—положительный результатъ.

II. B. mesentericus vulgatus.

Ислѣдованіе пробы обнаружило:

a) образованіе сахара черезъ 24 часа.

b) полное превращеніе крахмала въ эритро-декстринъ и сахаръ черезъ 2 дня.

c) превращеніе всего эритро-декстрина въ ахроо-декстринъ и сахаръ черезъ 5 дней.

d) превращеніе всего ахроо-декстрина въ сахаръ черезъ 6 дней.

III. B. subtilis.

Ислѣдованіе пробы обнаружило:

a) образованіе сахара черезъ 48 часовъ.

b) превращеніе крахмала въ декстрины и сахаръ черезъ 4—7 дней.

c) полное превращеніе декстриновъ въ сахаръ черезъ 9 дней.

IV. V. cholerae.

Ислѣдованіе пробы обнаружило:

a) образованіе сахара черезъ 24 часа.

b) превращеніе крахмала въ декстрины и сахаръ черезъ 3—4 дня.

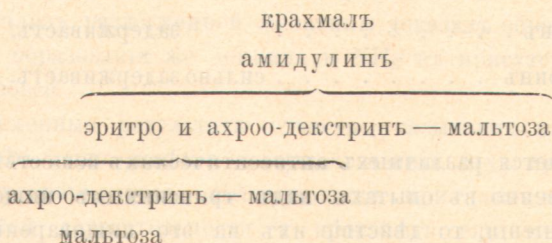
c) полное превращеніе декстриновъ въ сахаръ черезъ 6 дней.

V. V. Finkler-Priori.

- а) образованіе сахара черезъ 18 часовъ.
- б) полное превращеніе крахмала въ декстрины и сахаръ черезъ 2 дня.
- в) полное превращеніе декстриновъ въ сахаръ черезъ 5 дней.

Для изслѣдованія вопроса о томъ, какой видъ сахара получился во всѣхъ этихъ случаяхъ, въ каждомъ опытѣ я производилъ, послѣ полного превращенія крахмала, пробы Trommer'a, Fischer'a съ фениль гидразиномъ, Braun'a съ NaOH и пикриновой кислотой и пробу Мооге'a. Положительные результаты, получавшіеся всегда послѣ этихъ пробъ, указывали на содержаніе въ растворѣ либо мальтозы, либо глюкозы, либо же смѣси этихъ веществъ, различимыхъ по формѣ кристалловъ. Для опредѣленія ихъ растворъ подвергался выпариванію на банѣ до весьма малаго объема, причемъ всегда выпадали бѣлые игольчатые кристаллы мальтозы.

Сравненіе всѣхъ этихъ результатовъ показываетъ намъ, что крахмалъ во всѣхъ случаяхъ подвергался одинаковому превращенію, причемъ измѣнялась нѣсколько лишь скорость этого превращенія. Схематически оно можетъ быть представлено слѣдующимъ образомъ:



На сырой крахмалъ и клѣтчатку эти ферменты не оказывали никакого дѣйствія.

Въ кислой жидкости они также не дѣйствовали.

Всѣ эти факты указываютъ на то, что микробные амилалитическіе ферменты по своимъ свойствамъ и дѣйствию близко стоятъ лишь къ птіалину слюны, отличаясь отъ него лишь болѣею медленностью дѣйствія.

Изучивши продукты гидролиза, вызываемаго микробными ферментами, я перешелъ къ изслѣдованію условій, вліяющихъ какимъ либо образомъ на теченіе этого процесса.

Изъ описанныхъ выше опытовъ мы видѣли, что микробные протео и амилалитическіе ферменты приближаются по своему дѣйствию къ трипсину и птіалину; поэтому, при изученіи вліянія различныхъ условий на свойства и дѣйствіе ферментовъ, я оставлялъ безъ вниманія другія животныя экцимы. Относительно вліянія солей на трипсинное пищевареніе установлено, что соли, обладающія щелочной реакціей: каковы бура, сода, и друг. благоприятствуютъ этому пищеваренію, соли же тяжелыхъ металловъ задерживаютъ его. Не безъ вліянія остается также и реакція среды; лучше всего трипсинъ дѣйствуетъ при щелочной реакціи, хуже при нейтральной; при кислой же реакціи онъ не дѣйствуетъ совершенно.

Какъ показали опыты Wroblewsk'aro, на трипсинное пищевареніе оказываютъ вліяніе и алкалоиды, какъ это видно изъ нижеслѣдующей таблицы:

кофеинъ	благопріятствуетъ.
никотинъ	„
коніинъ	„
атропинъ	„
морфинъ	задерживаетъ.
вератринъ	сильно задерживаетъ.

Что же касается различныхъ антисептическихъ веществъ, употребляемыхъ обыкновенно въ опытахъ надъ трипсиннымъ пищевареніемъ для избѣжанія гніенія, то дѣйствіе ихъ на это пищевареніе изучено очень мало.

Еще менѣе данныхъ извѣстно относительно вліянія различныхъ веществъ на дѣйствіе птіалина.

Несомнѣннымъ является только тотъ фактъ, что наиболѣе благоприятной реакціей для дѣйствія этого фермента является щелочная или нейтральная реакція. При кислой же реакціи дѣйствіе фермента прекращается и самъ онъ разрушается.

Изслѣдованіе о вліяніи кислотъ и щелочей на дѣйствіе микробныхъ ферментовъ было произведено однимъ лишь Fermi.

Прибавляя къ раствору фермента небольшое количество соляной кислоты, авторъ замѣтилъ, что разжиженіе желатины, подъ дѣйствіемъ такого раствора нѣсколько замедляется, растворенія же фибрина не происходитъ вовсе.

Продѣлавъ нѣсколько разъ подобный опытъ, Fermi пришелъ къ тому заключенію, что одинъ и тотъ же ферментъ, въ присутствіи HCl растворяетъ желатину и теряетъ способность растворять фибринъ. Я же полагаю, что причина этого явленія можетъ быть объяснена тѣмъ обстоятельствомъ, что микробы, по крайней мѣрѣ изслѣдованные мною, вырабатываютъ два протеолитическихъ фермента, изъ которыхъ одинъ разжижаетъ лишь желатину и можетъ дѣйствовать при кислой, нейтральной и щелочной реакціи; другой, растворяющій бѣлковыя тѣла, дѣйствуетъ лишь при нейтральной и щелочной реакціи.

Произведенные мною опыты, которые будутъ описаны ниже, отчасти доказали справедливость приведеннаго предположенія.

Въ дальнѣйшихъ своихъ опытахъ Fermi доказалъ, что прибавленіе къ растворамъ ферментовъ такихъ антисептиковъ какъ сулема, карболовая и салициловая кислоты не только задерживаетъ дѣйствіе ферментовъ, но даже совершенно разрушаетъ ихъ. Провѣряя опыты Fermi надъ дѣйствіемъ кислотъ на ферменты я получилъ слѣдующія результаты

1) HCl , прибавленная даже въ весьма малыхъ количествахъ, задерживаетъ совершенно дѣйствіе фермента на фибринъ, но не препятствуетъ разжиженію желатины;

2) анализъ разжиженной желатины доказалъ образованіе клеевыхъ пептоновъ, образованія же лейцина и NH_3 въ присутствіи HCl не происходило вовсе.

Приведенные результаты отчасти указываютъ на справедливость приведеннаго выше мнѣнія о существованіи 2-хъ протеолитическихъ микробныхъ ферментовъ, дѣйствующихъ при различныхъ реакціяхъ. Для большей доказательности я произвелъ еще слѣдующій опытъ: 0,5 гр. фермента я растворилъ въ 100 куб. сант. дистиллированной воды и къ полученному раствору прибавилъ 5% HCl ; оставивши такой растворъ стоять на нѣсколько дней, я убѣдился, что 1-й ферментъ, растворяющій желатину не измѣнился, тогда какъ второй оказался совершенно разрушеннымъ; разрушеніе этого фермента доказывалось, тѣмъ обстоятельствомъ, что нейтрализованный NaOH растворъ не оказывалъ никакого вліянія на фибринъ, а растворялъ лишь желатину съ образованіемъ клеевого пептона, но безъ образованія лейцина и NH_3 .

Эти же опыты указываютъ на то обстоятельство, что подъ дѣйствіемъ перваго фермента желатина гидролизуетъ лишь до образованія клеевого пептона; дальнѣйшее же превращеніе этого послѣдняго и разложеніе его съ образованіемъ лейцина и NH_3 происходитъ подъ дѣйствіемъ втораго фермента.

Описанные опыты были произведены надъ ферментами, добытыми изъ культуръ всѣхъ упомянутыхъ выше микробовъ, причемъ результатъ всегда получался одинаковый.

Такое же точно вліяніе на ферментъ оказываютъ еще сѣрная, азотная, фосфорная, уксусная, лимонная, молочная и муравьиная кислоты, взятія въ количествѣ отъ 1⁰/1000 до 5⁰/1000; взятія въ большихъ количествахъ эти кислоты останавливаютъ дѣйствіе какъ 1-го, такъ и 2-го фермента.

Амилолитическіе микробные ферменты непременно требуютъ для своего дѣйствія нейтральной или слабощелочной среды. Незначительная кислотность среды, напр., при содержаніи 1⁰/1000 HCl, совершенно задерживаетъ дѣйствіе фермента. При болѣе высокомъ содержаніи кислоты въ средѣ, напр., 40⁰/1000 HCl ферментъ уже черезъ нѣсколько минутъ совершенно разрушается.

Менѣе энергично дѣйствуютъ въ этомъ случаѣ органическія кислоты, которыя въ такихъ же количествахъ лишь задерживаютъ дѣйствіе фермента, не разрушая его.

Изслѣдованіе вліянія щелочей на дѣйствіе ферментовъ дало слѣдующіе результаты:

1) наиболѣе благоприятною реакціей для дѣйствія ферментовъ микробнаго происхожденія, какъ протеолитическихъ, такъ и амилолитическихъ, является ясная но не сильно щелочная, соотвѣтствующая, напр., 4 grm. CO_3Na_2 на 1000 или 2 grm. NaOH.

2) химическія свойства щелочи не имѣютъ вліянія; исключеніе составляетъ одинъ лишь NH_3 , который въ количествѣ 10% задерживаетъ дѣйствіе фермента, а въ большемъ количествѣ даже совершенно разрушаетъ его.

3) щелочность среды, необходимая для энергичнаго дѣйствія фермента, не должна превышать опредѣленной нормы. Въ противномъ случаѣ щелочи въ особенности углекислыя, начинаютъ дѣйствовать обратно, т. е. сначала задерживаютъ дѣйствіе фермента, а потомъ совершенно разрушаютъ его.

Изученіе вліянія различныхъ солей на ферменты показало, что въ малыхъ количествахъ эти соли не оказываютъ никакого дѣйствія на процессъ гидролиза; при увеличеніи ихъ количества дѣйствіе фермента ослабляется и, наконецъ, ферментъ разрушается. Въ нижеслѣдующей таблицѣ указаны соли, надъ которыми производились опыты и дозы этихъ солей вызывающія различное дѣйствіе: („a“ — недѣятельныя дозы; „b“ — задерживающія дѣйствіе фермента и „c“ — разрушающія):

Соли.	a	b	c
Хлористый натръ	70:1000	120:1000	160:1000.
Уксусно-кислый натръ .	1:1000	4:1000	8:1000.
Бромистый калий	80 "	110 "	150 "
Иодистый калий	80 "	110 "	130 "
Сѣрно-кислый магній . .	100 "	130 "	145 "
Хлористый аммоній . . .	30 "	40 "	60 "
Сѣрно-кислая мѣдь . . .	25 "	35 "	50 "
Сѣрно-кислый цинкъ . .	30 "	45 "	55 "
Фосфорно-кислый натръ .	30 "	40 "	80 "
Салициловый натръ . . .	4 "	6 "	9 "
Сулема	2 "	4 "	5 "
Полутор. хлор. жел. . .	30 "	38 "	45 "
Сѣрно-кисл. желѣзо . .	2 "	4 "	8 "

Антисептическія вещества, употребляемыя въ опытахъ надъ пищевареніемъ въ очень малыхъ дозахъ, не вліяютъ замѣтно на скорость и силу ферментативнаго дѣйствія; при повышеніи дозъ задерживается дѣйствіе фермента и онъ наконецъ разрушается; такими разрушительными для фермента дозами являются:

Карболовая кислота 30:1000.

Алкоголь 165:1000.

Тимоль 30 куб. с. насыщ. спиртнаго раств. на 1000.

Совершенно аналогичные результаты были получены мною и въ опытахъ надъ трипсиномъ и птѣиномъ.

Большое вліяніе на дѣйствіе и свойства всѣхъ вообще ферментовъ оказываютъ температурныя условія. Для cadaго фермента существуетъ извѣстный температурный optimum, отклоненіе отъ котораго въ ту или другую сторону вызываетъ замедленіе или даже совершенное прекращеніе дѣйствія фермента.

Наиболѣе благоприятною температурою для дѣйствія ферментовъ животнаго происхожденія является т тѣла въ 37—40°C. При повышеніи t до 70°C ферменты разрушаются; при пониженіи t до 0° дѣйствіе ферментовъ задерживается, но сами они не измѣняются.

Въ сухомъ состояніи ферменты выдерживаютъ нагрѣваніе до 100° , не теряя при этомъ своихъ свойствъ. Изслѣдованіе вліянія t на дѣйствіе микробныхъ ферментовъ было произведено однимъ лишь Fermi, который нашелъ, что optimum $t = 37^{\circ}\text{C}$, minimum $4^{\circ} - 10^{\circ}\text{C}$ и maximum 50°C .

Изучая вліяніе температурныхъ условій на дѣятельность микробныхъ ферментовъ и помѣщая для этого пробы фермента съ желатиной и фибриномъ, приготовленныя по описанному выше способу, при различныхъ температурахъ, я получилъ слѣдующія результаты:

1) t въ 0° задерживаетъ дѣйствіе ферментовъ совершенно, но не измѣняетъ ихъ свойствъ, такъ какъ при восстановленіи температурнаго optimum'a процессъ гидролиза протекаетъ нормальнымъ порядкомъ.

2) При t $16^{\circ} - 22^{\circ}\text{C}$ ферменты обнаруживаютъ довольно замѣтное дѣйствіе; особенно энергичнымъ дѣйствіемъ при этой температурѣ обладаютъ ферменты тѣхъ микроорганизмовъ, для развитія которыхъ эта температура (22°C) является наиболѣе благоприятной.

3) Для дѣйствія ферментовъ, полученныхъ отъ микробовъ, требующихъ для своего развитія температуры тѣла, — наиболѣе благоприятной является t въ $37^{\circ} - 38^{\circ}\text{C}$.

4) При t въ 45°C дѣйствіе ферментовъ сильно задерживается.

5) При 15-ти часовомъ дѣйствіи t въ 55° или при 10-ти минутномъ нагрѣваніи раствора фермента до 100°C — ферментъ совершенно разрушается.

6) Въ сухомъ состояніи микробные ферменты свободно выдерживаютъ нагрѣваніе до $100^{\circ} - 120^{\circ}\text{C}$ впродолженіе 10-ти и болѣе минутъ, нисколько при этомъ не измѣняясь.

Разсматривая полученные результаты, легко можно замѣтить одно очень интересное обстоятельство: микробные ферменты относятся къ температурнымъ вліяніямъ въ общемъ такъ же, какъ и выработавшіе ихъ микроорганизмы.

Что касается вопроса о вліяніи микробныхъ ферментовъ на животный организмъ, то мною былъ произведенъ всего лишь одинъ опытъ: растворъ протеолитическаго фермента, добытаго изъ культуръ Мечникова вибриона, былъ впрыснутъ въ грудную мышцу голубя, причемъ не получилось никакого результата. Этотъ опытъ, какъ единичный, не даетъ мнѣ права дѣлать изъ него какого либо заключенія.

Изложенные въ данной работѣ литературныя данныя и мои опыты указываютъ на то, что между микробными гидролитическими ферментами и соотвѣтствующими имъ ферментами животнаго организма существуетъ весьма большое сходство не только по результатамъ ихъ дѣйствія, но также и по условіямъ ихъ выдѣленія изъ организма и по тѣмъ условіямъ, соблюденіе которыхъ необходимо для ихъ дѣйствія.
