

Hans v. Euler

Chemie der Enzyme

CHEMIE DER ENZYME

VON

HANS v. EULER

IN DREI TEILEN

II. TEIL:

**SPEZIELLE CHEMIE
DER ENZYME**



ZWEITE UND DRITTE, NACH SCHWEDISCHEN
VORLESUNGEN VOLLSTÄNDIG UMGEARBEITETE AUFLAGE

Springer-Verlag Berlin Heidelberg GmbH 1927

CHEMIE DER ENZYME

CHEMIE DER ENZYME

VON

HANS v. EULER

II. TEIL:
**SPEZIELLE CHEMIE
DER ENZYME**

2. ABSCHNITT:

**DIE HYDROLYSIERENDEN ENZYME
DER NUCLEINSÄUREN, AMIDE, PEPTIDE UND PROTEINE**

BEARBEITET VON

HANS v. EULER UND KARL MYRBÄCK

MIT 47 TEXTFIGUREN

AUTOREN-VERZEICHNIS ZUM 1. UND 2. ABSCHNITT



ZWEITE UND DRITTE, NACH SCHWEDISCHEN
VORLESUNGEN VOLLSTÄNDIG UMGEARBEITETE AUFLAGE

Springer-Verlag Berlin Heidelberg GmbH 1927

ISBN 978-3-662-42641-8 ISBN 978-3-662-42918-1 (eBook)
DOI 10.1007/978-3-662-42918-1

**ALLE RECHTE, INSBESONDERE DAS DER ÜBERSETZUNG
IN FREMDE SPRACHEN, VORBEHALTEN.**

COPYRIGHT 1927 BY Springer-Verlag Berlin Heidelberg
Ursprünglich erschienen bei J. F. Bergmann, München 1927.
Softcover reprint of the hardcover 1st edition 1927

Inhalt des 2. Abschnittes.

	Seite
Einteilung	315
13. Kap. Die hydrolysierenden Enzyme der Nucleinsäuren und ihrer Spaltprodukte	316
A. Einleitung	316
B. Spaltung der Nucleoproteide und Nucleine	316
Substrate 317. — Einwirkung enzymhaltiger Säfte 318.	
C. Der enzymatische Abbau der Nucleinsäuren (Nucleotide)	319
1. Substrate 319. — 2. Vorkommen der Nucleotidasen 325. — 3. Darstellung	
327. — 4. Wirkungsbedingungen 327. — 5. Physiologische und pathologische	
Einflüsse auf den enzymatischen Nucleinstoffwechsel 329. — 6. Andere	
Nucleinsäurespaltungen 329.	
D. Der enzymatische Abbau der Nucleosidasen	329
1. Substrate 329. — 2. Vorkommen der Nucleosidasen 330.	
E. Methodik	331
14. Kap. Urease	334
A. Allgemeines über Ureasen	334
1. Substrat 334. — 2. Vorkommen 335. — 3. Darstellung 339. — 4. Reinigung	
der Enzympräparate 342. — 5. Wirksamkeitsbedingungen 342.	
B. Kinetik	351
C. Einfluss der Temperatur und Strahlung	365
1. Hitzeempfindlichkeit der Urease	365
2. Temperaturkoeffizient der Harnstoffspaltung	367
D. Praktische Anwendung der Urease und Methoden zur Messung der enzy-	
matischen Harnstoffspaltung	370
15. Kap. Amidasen, Arginase und Purinaminasen	375
A. Amidasen	375
B. Arginase	381
C. Purin-Aminasen	384
D. Die biologische Spaltung der Aminosäuren	386
16. Kap. Di-Peptidasen	391
A. Die am Aufbau der Proteine beteiligten Aminosäuren	392
B. Die Polypeptide	397
C. Vorkommen der Peptidasen	400
D. Darstellung und Reinigung	406
E. Wirkungsbedingungen	409
F. Kinetik	413
G. Spezifität der Peptidasewirkungen	420
H. Stabilität der Peptidase. — Einfluss der Temperatur auf die Dipeptidspaltung	426
17. Kap. Beobachtungen über enzymatische Spaltung von Peptonen und höheren	
Polypeptiden	428
A. Substrate	429

	Seite
B. Peptonspaltende Säfte und Sekrete	432
C. Darstellung und Reinigung peptonspaltender Enzympräparate	434
D. Kinetische Messungen	437
E. Einfluss der Acidität auf die Polypeptid- und Peptonspaltung	438
F. Einfluss von Salzen und Nichtelektrolyten	440
G. Einfluss der Temperatur und Strahlung auf die enzymatische Peptonspaltung	440
H. Versuche über Synthese von Polypeptiden und Peptonen	440
Anhang zum 16. und 17. Kapitel. Methoden zur Bestimmung der Peptid- und Pepton- spaltung	442
A. Physikalische Methoden	442
B. Chemische Methoden	443

Die eigentlichen Proteasen. Bearbeitet von Karl Myrbäck.

Einleitung	451
Einteilung der eigentlichen Proteasen	458
18. Kap. Tryptase	459
A. Substrate	460
B. Ausgangsmaterial und dessen Behandlung (Reinigung)	462
C. Aktivierung der Tryptase	466
D. Wirksamkeit und Reinheitsgrad	469
E. Kinetik	472
F. Die Aktivitäts-pH-Kurve	483
G. Einwirkung von Neutralsalzen	488
H. Reversible und irreversible Hemmungen (Giftwirkungen)	489
J. Stabilität der Tryptase	494
19. Kap. Die Co-Tryptase (Enterokinase)	497
A. Vorkommen der Co-Tryptase (Enterokinase)	497
B. Bestimmung der Co-Tryptase	497
C. Co-Tryptase-Präparate	498
D. Eigenschaften der Co-Tryptasepräparate	500
E. Wirkung der Co-Tryptase. Kinetik	501
20. Kap. Pepsin	505
A. Substrate	506
B. Vorkommen des echten Pepsins	507
C. Darstellung und Reinigung von Pepsinpräparaten	508
D. Kinetik	510
E. Hemmungserscheinungen	521
F. Bestimmung der Wirksamkeit	522
G. Die Stabilität des Pepsins	523
H. Synthetische Wirkungen des Pepsins	525
21. Kap. Die übrigen Proteasen der mehrzelligen Tiere	527
A. Autolyse von Organen	527
B. Blutproteasen	540
C. Proteasen der niederen Tiere	542
22. Kap. Proteasen der höheren Pflanzen	543
A. Papain	543
B. Die Ananasprotease (Bromelin)	552
C. Die Protease aus Cucurbita Pepo	554
D. Andere Proteasen in Säften und Früchten	556
E. Proteasen der Samen	557
F. Proteasen der carnivoren Pflanzen	561
23 Kap. Proteasen der Pilze, Hefen und Bakterien	564

	Seite
Anhang zum Abschnitt über Proteasen. Methoden zur Bestimmung der Eiweiss-	
spaltung	574
A. Bestimmung des unveränderten Substrates.	574
B. Chemische Bestimmung der Reaktionsprodukte	579
C. Physikalisch-chemische Methoden	581
24. Kap. Lab, Chymosin	583
A. Einleitung	583
B. Darstellung einer Chymosinlösung aus Magenschleimhaut	587
C. Wirkungsgrad und Bestimmung	587
D. Kinetik und Hemmungen	590
E. Einfluss der Temperatur auf die Labwirkung und die Stabilität des Chymosins	592
F. Die Parachymosine	594
G. Methoden zur Bestimmung der Labwirkung	595
Anhang.	
25. Kap. Chemische Vorgänge bei der Blutgerinnung. (Bearbeitet von H. v. Euler)	596
A. Einleitung	596
B. Substrat und Reaktionsprodukt. Fibrinogen und Fibrin.	597
C. Vorkommen und Gewinnung des Thrombins und der übrigen, an der Blut-	
gerinnung mitwirkenden Substanzen	599
D. Eigenschaften des Thrombins und der Thrombokinase	603
E. Kinetische Probleme	604
F. Einfluss der Temperatur	606
G. Zur Pathologie der Blutgerinnung. Hämophilie	607
Anhang: Methoden zur Messung der Blutgerinnungszeit	608
Nachträge u. Druckfehler	609
Verzeichnis der hydrolytischen (und koagulierenden) Enzyme und ihrer spe-	
zifischen Aktivatoren und Hemmungskörper	612
Autorenverzeichnis für den 1. und 2. Abschnitt	613

2. Abschnitt.

**Die hydrolysierenden
Enzyme der Nucleinsäuren, Amide,
Peptide und Proteine.**

Einteilung.

Stellt man die chemische Gleichung der katalysierten Reaktionen in den Vordergrund der Betrachtung, so wird man in diesem Abschnitt alle Enzyme zusammenfassen, welche die Bindung zwischen Kohlenstoff und Stickstoff lösen oder vermitteln, ganz besonders alle auf die Carbamin-Gruppierung



eingestellten Enzyme, welche man demgemäss Carbamasen (oder — da sie die typische Peptidbindung lösen — Peptidasen) nennen kann. Wenn wir nun auch wissen, dass die Hydrolyse dieser Peptidbindung bei der Proteolyse eine dominierende — keineswegs die einzige — Rolle spielt, so sind wir doch über die Einzelvorgänge der Eiweisspaltung noch ungenügend unterrichtet und deshalb nicht imstande, die hierher gehörenden Enzyme vom chemischen Gesichtspunkt aus zu differenzieren. Wir müssen also einstweilen noch die Einteilung vom biologischen Standpunkt aus vornehmen, und die enzymatischen Stoffgemische verschiedener Herkunft einzeln beschreiben; soweit möglich werden dabei die Zusammenhänge zwischen gleichgearteten Wirkungen von Enzymen ungleicher Abstammung hervorgehoben.

Die wichtigsten Enzyme, welche in diesem Abschnitt zu behandeln sind, werden oft als Pepsin, Trypsin und Erepsin zusammengefasst. Dem Fachmann ist dabei bereits klar, dass man damit nicht mehr einzelne Enzyme meint, sondern Enzymgruppen gewisser Organe zusammenfasst, wie überhaupt Namen mit der Endsilbe -in zweckmässig als Bezeichnungen für natürliche Enzymgruppen — z. B. Emulsin — gebraucht werden.

Bevor wir auf die Hauptgruppe der Proteasen eingehen, also auf diejenigen, welche die Gruppe $CO-NH$ angreifen, haben wir im Anschluss an die im vorhergehenden Band behandelten Glucosidasen die Nucleosidasen nochmals zu besprechen; dies geschieht am besten im Zusammenhang mit den übrigen Enzymen der Nucleinspaltung, die man als Nucleasen zusammenfassen kann.

Darauf behandeln wir die Gruppe der Amid-spaltenden Enzyme oder Amidasen, unter denen die Urease am besten bekannt ist.

Die Enzyme vom Typus des Pepsins, Trypsins und Erepsins, welche am Abbau der eigentlichen Proteine beteiligt sind, werden in tierische und pflanzliche Enzyme und nach Organen geschieden; weitere Einteilungsprinzipien bieten die Substrate und bis zu einem gewissen Grade auch der Aciditätsgrad, bei welchem die einzelnen Enzyme ihre optimale Wirkung entfalten.

13. Kapitel.

Die hydrolysierenden Enzyme der Nucleinsäuren und ihrer Spaltprodukte.

A. Einleitung.

Nucleoproteide und die phosphorreichereren Nucleine werden in Eiweiss und Nucleinsäuren gespalten; über die bei diesen Reaktionen eventuell beteiligten spezifischen Enzyme ist noch wenig bekannt.

Typische Repräsentanten der Nucleinsäuren sind bekanntlich nunmehr als Verbindungen je eines Moleküls Phosphorsäure, einer Monose und einer Pyrimidin- oder Purinbase erkannt. Levene, dem man in erster Linie diese Einsicht verdankt, bezeichnet diese einfachen Stoffe als Nucleotide und die darauf eingestellten Enzyme als Nucleotidasen, während Nucleoside dem gleichen Forscher zufolge die entsprechenden phosphorsäurefreien Verbindungen darstellen, welche also nur noch die Monose und die Base enthalten.

Zur Klärung der Nomenklatur mag folgendes Schema dienen:

Substrat	Enzym	Reaktionsprodukt
Nucleoproteide	(Nucleoproteidasen)	Nucleine
Nucleine	(Nucleinasen)	Eiweiss + Nucleinsäuren
Poly-Nucleinsäuren (Poly-Nucleotide)	Poly-Nucleotidasen ¹	Nucleotide
Nucleotide	Nucleotidasen	Nucleoside + Phosphorsäure
Nucleoside	Nucleosidasen	Monose + Base

Aus dem S. 3 über die Nucleoproteide und Nucleine Gesagten geht hervor, dass die Existenz besonderer Spaltungs-Enzyme für Nucleoproteide und Nucleine (Nucleoproteidasen und Nucleinasen) wenig wahrscheinlich ist.

B. Spaltung der Nucleoproteide und Nucleine.

Nucleoproteide und Nucleine spielen bekanntlich in den Zellkernen eine dominierende Rolle; viele Kerne (z. B. der Eiterzellen und der Spermatozoen [Miescher²]) bestehen zum grössten Teil aus diesen Stoffen.

¹ Levene nennt diese Enzyme Nucleinasen. Levene und Medigreceanu, JI Biol. Chem. 9, 65 und 389; 1911.

² Miescher, Ges. Abh. Bd. 2; 1897.

Substrate.

Als Nucleoproteide bezeichnet man zusammengesetzte, native Proteine, welche durch die beiden Bestandteile, Nucleinsäuren und Eiweiss, charakterisiert sind. Sie enthalten demgemäss Phosphor (meist 0,5—2%), in manchen Präparaten wurde ein Gehalt von Eisen gefunden¹. Nucleoproteide sind Säuren, die sich in Wasser wenig oder nicht, in Alkalien unter Salzbildung lösen und durch Essigsäure wieder gefällt werden². Die Eiweisskomponente, über die noch wenig bekannt ist, wurde in einzelnen Fällen als Histon erkannt.

Je nachdem Nucleoproteide durch kalte oder heisse Lösungsmittel aus den Organen extrahiert worden sind, unterscheidet man

α -Nucleoproteide und
 β -Nucleoproteide.

Die neutralen Lösungen der Alkali-Nucleoproteide erfahren durch Erhitzen eine Spaltung. Dabei wird unter Gerinnung einer abgetrennten Eiweisskomponente der nucleinsäurehaltige Rest freigemacht; für denselben ist eine besondere Bezeichnung eingeführt worden, nämlich

Nuclein oder „echtes Nuclein“. Aus der eben erwähnten Entstehungsweise geht hervor, dass die Nucleine phosphorreicher sein müssen als die natürlichen Ausgangsprodukte; Hammarsten¹ gibt einen Gehalt von mindestens 5% P an. Im übrigen sind die Nucleine gegen die Nucleoproteide nicht scharf abgegrenzt, da auch die Nucleine noch abtrennbares Eiweiss enthalten.

Alkali spaltet aus Nucleoproteiden und Nucleinen anorganisches Phosphat ab, aber nicht so leicht, wie aus Nucleoalbuminen [Unterscheidung durch 1%ige Natronlauge nach Plimmer und Scott³].

Zur Darstellung der Nucleine empfiehlt Hammarsten die Hauptmasse des Eiweisses im Ausgangsmaterial durch Pepsinsalzsäure zu zerlegen, den Rückstand mit verdünnter NH_3 auszulaugen, mit Salzsäure zu fällen und durch Umfällen zu reinigen.

Auch den Nucleinen werden saure Eigenschaften zugeschrieben; sie sind in Alkohol ganz unlöslich, in Wasser sehr wenig, in Alkalien mehr oder weniger leicht löslich. Bemerkenswert ist die Salzbildung mit basischen Farbstoffen.

Die Nucleine sind Denaturationsprodukte und können wohl im allgemeinen als salzartige Verbindungen von Nucleinsäuren mit basischen Eiweisskörpern aufgefasst werden.

¹ Siehe O. Hammarsten, Lehrbuch, 9. Aufl., S. 132. — Siehe auch O. Hammarsten, H. 19, 19; 1894. Kein Eisen findet Sauerland, H. 64, 16; 1909.

² Untersucht sind besonders eingehend die Nucleoproteide des Pankreas, der Leber (Wohlgemuth, H. 37, 42 u. 44), des Gehirns (A. Levene), der Spermatozoen (Kossel) und Bakterien (Toeniessen, Zbt. Bakt. I, 85, 379; 1921). — Zur Literatur siehe ferner Burian, Erg. d. Physiol. 5, 768; 1906.

³ Plimmer und Scott, Jl Chem. Soc. 93 und 94, 1699; 1908.

Ob in den Nucleoproteiden eine eigentliche Bindung an das abspaltbare Eiweiss vorkommt, oder ob dieses immer nur durch seine basischen Gruppen mit den Nucleinsäuren salzartige Verbindungen eingeht, eine Auffassung, die Steudel¹ vielfach mit Erfolg vertritt, und die sich auch sonst bestätigt², ist noch nicht endgültig entschieden.

Einwirkung enzymhaltiger Säfte.

Sind die Nucleoproteide wirklich Salze von Nucleinsäuren im oben erwähnten Sinne, so könnte man die Tatsache, dass der Magensaft Nucleine aus Nucleoproteiden entstehen lässt ohne weiteres auf die Einwirkung der Salzsäure zurückführen und bräuchte nicht die Wirkung des Pepsins bzw. eines besonderen Bestandteiles, einer Nucleoproteidase, anzunehmen.

Das gleiche gilt hinsichtlich der Wirkung des Magensaftes auf Nucleine. Auch aus diesen wird durch den Magensaft zuweilen Eiweiss abgespalten; welchen Anteil daran die Salzsäure und welchen Anteil Enzyme haben, liess sich aus den Angaben der älteren Literatur nicht entnehmen. Eine Mitteilung von Nakagawa aus dem Steudelschen Laboratorium bahnt eine Klärung der Verhältnisse an.

Nakagawa³ hat ein Präparat aus Heringssperma, welches nach der gegenwärtigen Nomenklatur als Nucleoprotein zu bezeichnen ist und ein daraus dargestelltes „Nuclein“ auf ihr Verhalten zu Pepsinpräparaten geprüft. Seiner Mitteilung entnehmen wir folgendes:

Von einem Pepsinpräparat wurden 0,2 g in 500 ccm etwa 0,2% Salzsäure aufgelöst. Zu je 100 ccm der wasserklaren Lösung wurde je 1 g der zu untersuchenden Substanz zugesetzt. Es wurden so der Pepsinverdauung unterworfen:

1. ein aus-Köpfen von Heringsspermien dargestelltes neutrales nucleinsaures Protamin, wie auch
2. ein nach Miescher durch Essigsäure-Fällung hergestelltes Produkt, welches als Nucleoprotein angesehen werden kann.

Die einzelnen Ansätze wurden bei 37° aufbewahrt und vor der Ablesung klar filtriert. Dann zeigten im 2 dm-Rohr die Ansätze folgende Drehung:

	nach Tagen			
	1	2	3	4
Pepsinsalzsäure	0	0	0	0
Salzsäure + reine Köpfe	-0,20	-0,24	-0,26	-0,26
Pepsinsalzsäure + reine Köpfe	-0,24	-0,28	-0,32	-0,36
Salzsäure + Essigsäurefällung	-0,21	-0,24	-0,26	—
Pepsinsalzsäure + Essigsäurefällung	-0,49	-0,58	-0,60	-0,62

Die Pepsinsalzsäure hatte also sowohl bei den reinen Köpfen wie besonders bei der Essigsäurefällung eine Zunahme des Drehungsvermögens bewirkt; ferner genügte ein kurzer Aufenthalt im Brutschrank, um merkliche Mengen der untersuchten Körper zu lösen; nach einigen Tagen war fast alles gelöst.

¹ Steudel, H. 90, 300; 1914. — 122, 298; 1922.

² E. Hammarsten, Privatmitteilung.

³ Nakagawa, H. 124, 274; 1923.

Da das Protamin gegen Pepsinsalzsäure beständig ist, so bleibt als angreifbare Komponente die Nucleinsäure übrig. Dieselbe ist bekanntlich gegen Mineralsäuren äusserst unbeständig, spaltet sehr leicht Alloxurbasen ab und geht in Thyminsäure und andere leicht lösliche Produkte über. „An den reinen Köpfen kann man sich von der leichten Abspaltbarkeit der Alloxurbasen rasch durch Anstellung der Diazoreaktion überzeugen“ — das Protaminsulfat, allein mit Pepsinsalzsäure behandelt, gab keinen positiven Ausfall der Diazoreaktion.

Mit ammoniakalischer Silberlösung gaben einen deutlichen Niederschlag nach der Behandlung mit Pepsinsalzsäure:

1. thymonucleinsaures Natrium,
2. Nucleohiston nach Lilienfeld.

Histon allein gab unter den gleichen Bedingungen keinen Niederschlag.

Nakagawa zieht aus seinen Versuchen den Schluss, dass „die bisher benutzte Methode, durch Pepsinverdauung eines Nucleoproteides zu einem Nuclein zu kommen, nicht brauchbar ist“.

Es lässt sich also kein unzersetztes „Nuclein“ gewinnen, und es ist fraglich, ob die älteren Beobachter überhaupt „Nuclein“, d. h. Körper mit unzersetzter Nucleinsäure in Händen gehabt haben. Bei den früheren unvollkommenen Kenntnissen über die Zusammensetzung der Nucleinsäuren hat man die Einwirkung der Pepsinsalzsäure meist durch Bestimmung des Phosphorsäuregehaltes der unlöslichen Körper verfolgt. „Es leuchtet aber ein, dass man phosphorreichere Körper aus den Nucleoproteiden nicht nur erhalten kann durch Abspaltung locker gebundener Eiweisskörper, wie die älteren Forscher annahmen, sondern dass die Produkte auch phosphorreicher werden können dadurch, dass die Nucleinsäure unter Abspaltung der Nucleinbasen zerlegt wird.“

C. Der enzymatische Abbau der Nucleinsäuren (Nucleotide).

1. Substrate (vgl. auch 1. Abschnitt, S. 59 u. ff.).

Die Nucleinsäuren enthalten drei typische Komponenten: Purin- oder Pyrimidinbasen, Zucker und Phosphorsäure. Bei der Einteilung der Nucleinsäuren kann man nach verschiedenen Grundsätzen verfahren. Kossel¹ legt die Natur der Basen zugrunde, von Levene² stammt die Einteilung in einfache Nucleinsäuren oder Mononucleotide und zusammengesetzte Nucleinsäuren oder Polynucleotide, und Feulgen³ hebt neuerdings hervor, dass die Zuckergruppe das wesentlichste Kennzeichen der Nucleinsäuren ausmacht. In Anlehnung an Levene und Feulgen stellen wir folgende Einteilung voran:

- A. Einfache Nucleinsäuren, Mononucleotide,
 - Pentoside,
 - Hexoside.

¹ Kossel, Chemische Zusammensetzung der Zelle. Arch. (Anat. u.) Physiol. 181; 1891.

² Levene und Medigreceanu, Jl Biol. Chem. 9, 65 u. 389; 1911.

³ Feulgen, H. 123, 197; 1922. — Eine Übersicht über die Chemie der Nucleinsäuren geben Steudel, Thannhauser und Winterstein im Handb. d. Bioch. Arbeitsmeth. 2. Aufl., Abt. I, Tl. 8, Heft 1; 1920.

B. Polynucleotide

1. Pentosenhaltige Polynucleotide

Hefennucleinsäure (Triticonucleinsäure),

2. Hexosenhaltige Polynucleotide (mit echter Aldehydreaktion).

C. Gekoppelte Nucleinsäuren.

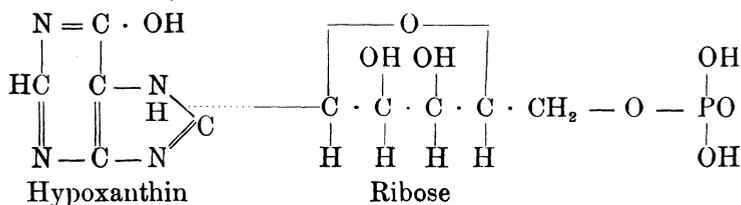
I. Mononucleotide.

Pentoside.

In dieser Gruppe sind Inosinsäure und Guanylsäure zuerst genau beschrieben worden.

In beiden Nucleotiden ist nach Levene und Jacobs¹ die Pentose die gleiche, nämlich d-Ribose; beide enthalten ferner Purinbasen.

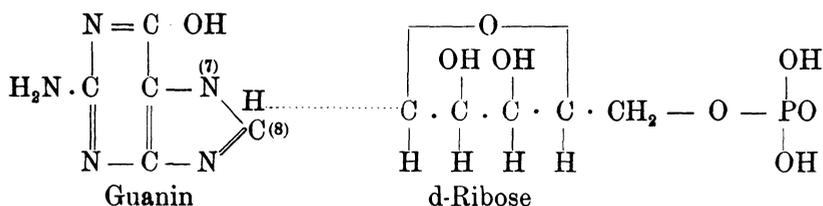
Die im Fleischextrakt aufgefundene Inosinsäure ist als Phosphorsäure-Ribose-Hypoxanthin erkannt. Ihre Zusammensetzung wird durch die Formel dargestellt:



Durch Abspaltung der Phosphorsäure aus der Inosinsäure entsteht das Inosin, ein Hypoxanthinpentosid. Bezüglich der Bindungsstellen besteht noch insofern eine Unsicherheit, als zwischen den Ringatomen 7 und 8 noch zu entscheiden ist².

Levene hat für Stoffe vom Typus des Inosins den Namen Nucleoside vorgeschlagen (vgl. S. 329).

Analog ist die Konstitution der Guanylsäure, welche aus dem Rinder-Pankreas (Bang), Milz³ (Jones) oder Leber⁴ gewonnen wird, und von Levene aus Hefennucleinsäure in Krystallen (+ 2 H₂O, Schmelzpunkt 180°) erhalten wurde (Jl Biol. Chem. 40).



¹ Levene und Jacobs, Chem. Ber. 42, 2102, 2469, 2474, 3247; 1909. — 43, 3147; 1910. — 44, 746; 1911. — Neuberg hält die Pentose der Inosinsäure für l-Xylose (Chem. Ber. 43, 3501; 1910).

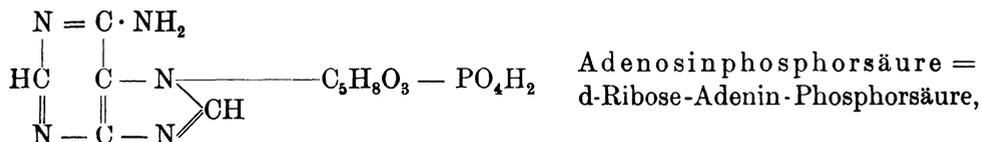
² Vgl. Hans Fischer, H. 60, 69; 1909.

³ Jones und Rowntree, Jl Biol. Chem. 4, 289; 1908.

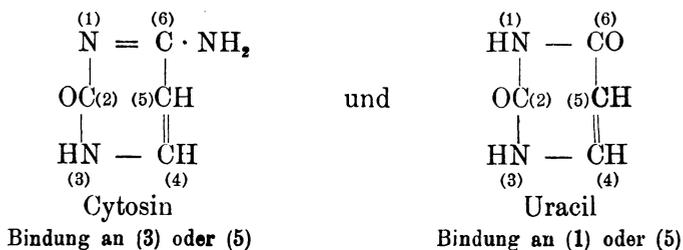
⁴ Levene und Mandel, Biochem. Zs 10, 221; 1908.

Die Guanylsäure hat also (wie die Inosinsäure) sauren Charakter; sie löst sich in Natronlauge leicht auf. Durch Mineralsäuren wird aus einer solchen Lösung die Säure freigemacht, welche in Wasser löslich ist; durch Essigsäurezusatz entsteht hingegen unter Gelatinieren der gesamten Flüssigkeit das saure Alkalisalz (Feulgen, H. 106). Vgl. zur Kenntnis der Guanylsäure auch W. Jones, JI Biol. Chem. 12, 31; 1912. — Levene, JI Biol. Chem. 40, 415; 1919.

Ausserdem sind (aus Hefennucleinsäure) isoliert worden:



ferner die Verbindungen der d-Ribose-Phosphorsäure mit den Pyrimidinbasen:



Daraus entstehen:

Cytidinphosphorsäure¹ und Uridinphosphorsäure¹.

Endlich ist die entsprechende Verbindung



die d-Ribose-Thymin-Phosphorsäure in einem Polynucleotid der Thymusdrüse enthalten.

Hexoside.

Thymin ist auch in Hexosiden gefunden; eine Thymin-Hexose-Phosphorsäure entsteht nämlich aus Thymusnucleinsäure [bzw. aus der entsprechenden Diphosphorsäure²] durch Hydrolyse mit Pikrinsäure.

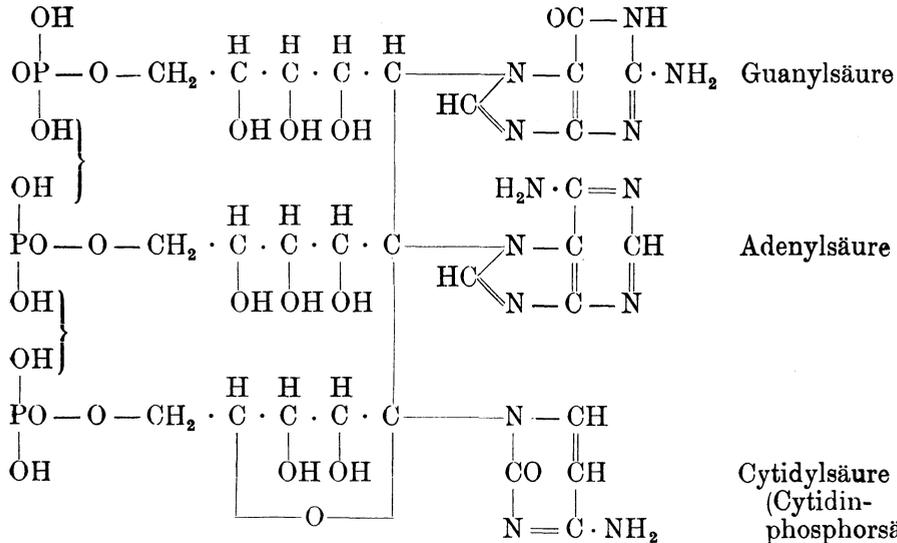
Thannhauser und Ottenstein³ haben auch eine entsprechende Cytosin-Hexose-Phosphorsäure dargestellt, und zwar ebenfalls aus der Thymusdrüse.

¹ Siehe Thannhauser und Dorfmueller, H. 100, 121; 1917 und 104, 65; 1919. — Levene, JI Biol. Chem. 33, 425; 1918 und 40, 395; 1919.

² Levene und Mandel, Chem. Ber. 41, 1905; 1908.

³ Thannhauser und Ottenstein, H. 114, 39; 1921.

1917 ist es Thannhauser aber gelungen, die Hefenucleinsäure in Uridinphosphorsäure (Phosphorsäure — Kohlehydrat — Uracil) und folgendes Trinucleotid zu spalten¹.



Thannhauser und Dorf Müller² stellten daher für die Hefenucleinsäure eine Formel auf, in der die Uridinphosphorsäure nur durch eine Phosphorsäurebindung fixiert ist, während der Rest, den Thannhauser als Triphosphornucleinsäure bezeichnet, noch durch eine intramolekulare Bindung zusammengehalten wird. Er gelangte mit Dorf Müller durch die Hydrolyse mit Pikrinsäure zu den beiden krystallisierten Spaltprodukten:

1. dem Dinucleotid Guanodin-Adenosinphosphorsäure³ und
2. Cytidinphosphorsäure.

Aus dem erstgenannten Dinucleotid konnte dann auch bald darauf die Adenosinphosphorsäure isoliert werden⁴.

Hefenucleinsäure ist sehr alkaliempfindlich und spaltet mit verdünnter Natronlauge äusserst leicht Guanylsäure ab, bzw. zerfällt in die einzelnen einfachen Nucleinsäuren⁵; dieser Umstand dürfte für die Konstitutionsbestimmung wichtig sein. Thymusnucleinsäure wird dagegen von Alkalien bei Zimmertemperatur nicht angegriffen⁶.

Polynucleotidasen.

Falls sich die nunmehr naheliegende Auffassung bestätigt, dass in einer Gruppe von Polynucleotiden die Bindung der Mononucleotide durch die

¹ Thannhauser und Dorf Müller, H. 100, 121; 1917. — Siehe hierzu auch Levene, JI Biol. Chem. 43, 379; 1920.

² Thannhauser und Dorf Müller, Chem. Ber. 51, 467; 1918.

³ Thannhauser und Dorf Müller, H. 104, 65; 1919.

⁴ Thannhauser, H. 107, 157; 1919.

⁵ Siehe hierzu Steudel und Peiser, H. 120, 292; 1922.

⁶ Steudel und Nakawa, H. 128, 129; 1923.

Phosphorsäure erfolgt, so wären die diese Bindung lösenden Enzyme den Esterasen anzureihen. Dagegen dürfte die Aufspaltung einer zwischen den Kohlehydratresten statthabenden Verkettung durch Glucosidase-ähnliche Enzyme geschehen. Man wird deshalb die Existenz mindestens zweier verschiedener Polynucleotidasen (Nucleinasen nach Levene) vermuten.

2. Hexosenhaltige Polynucleotide; Thymusnucleinsäure.

Die Natur der Hexosen, welche in diese Gruppe eingehen und die Anzahl der Hexosenreste ist noch nicht näher bekannt; der Menge der gebildeten Lävulinsäure zufolge kann man vier solche Reste annehmen. Feulgen¹ nimmt an, dass das Kohlehydrat dem von Fischer beschriebenen Glucal² nahe steht. Pentosen scheinen in der Thymonucleinsäure nicht vorzukommen.

Charakteristisch für die Thymonucleinsäure bzw. für die Hexosenhaltigen Polynucleotide soll nach Feulgen die Reaktion mit fuchsinschwefliger Säure und die Fichtenspanreaktion sein.

III. Gekoppelte Nucleinsäuren.

„Gekoppelte“ oder zusammengesetzte Nucleinsäuren haben gleichzeitig und unabhängig von einander Feulgen³ und Einar Hammarsten⁴ beschrieben, und zwar ist am besten untersucht die Guanylnucleinsäure von der Pankreasdrüse des Rindes⁵.

Die Charakterisierung der hierhergehörenden Stoffe ist noch nicht ganz fest, was neuerdings besonders Levene⁶ hervorhebt. Auch über die Bindungsart der Komponenten stehen noch entscheidende Versuche aus, und demgemäss ist es fraglich, ob spezifische Enzyme existieren, welche die „gekoppelten“ Nucleinsäuren in die Polynucleotide der bekannten Typen auflösen. — Chemie und biologische Bedeutung der Nucleinsäure-Verbindungen behandelt in einer sehr bemerkenswerten Arbeit Einar Hammarsten (Biochem. Zs 144, 383; 1924).

2. Vorkommen der Nucleotidasen.

Der Nachweis von nucleotidspaltenden Enzymen (sie werden von Jones „Phosphonucleasen“ genannt) ist oft in methodisch unzulänglicher Weise geführt worden, indem die Zunahme von anorganischem Phosphat oder einer Purin- bzw. Pyrimidinbase der Entscheidung zugrunde gelegt wurde. In dieser Hinsicht bleibt viel nachzuholen, besonders was die Trennung und Isolierung der einzelnen Enzyme betrifft.

¹ Feulgen, H. 92, 154; 1914. — 100, 241; 1917.

² E. Fischer, Chem. Ber. 47, 196; 1914.

³ Feulgen, H. 108, 147; 1919. — 123, 145; 1922.

⁴ Einar Hammarsten, H. 109, 141; 1920. — Hammarsten und Jorpes, H. 118, 224; 1921.

⁵ Siehe hierzu auch Steudel und Nakagawa, H. 126, 250; 1923.

⁶ Levene, JI Biol. Chem. 48, 177; 1921.

Wichtig ist in erster Linie der von Nakayama¹ geführte Nachweis, dass reines Erepsin Nucleinsäuren gegenüber wirkungslos ist. Das gleiche gilt nach den Arbeiten von Schittenhelm² und Sachs für reines Trypsin.

Nucleotidasen machen sich in erster Linie bei der Autolyse von Zellen und Geweben geltend und ihre Mitwirkung bei der Autolyse ist auch zeitig gefunden worden (Araki³, Reh⁴, 1903).

a) Tierische Enzyme. Sachs⁵ verdankt man die ersten eingehenderen Versuche über selbständige, zur Gruppe der „Nucleasen“ gehörige Enzyme. Ein sehr geeignetes Material zur Darstellung von Nucleotidasen ist Pankreas. Von anderen Organen sind zu nennen:

Magensaft ist ganz unwirksam. Darmsaft von Fistelhunden⁶ spaltet aus Nucleinsäuren Phosphorsäure und (in geringem Grad) Purinbasen ab, und zwar erfolgt die Spaltung hauptsächlich im unteren Jejunum und Ileum.

Thannhauser und Dorf Müller (H. 100, 121; 1917) betonen, dass im Darm vermutlich keine vollständige Aufspaltung des Nucleinsäurekomplexes stattfindet, sondern dass im Darm enzymatisch Mononucleotide gebildet werden, welche zur Resorption gelangen und erst im Kreislauf ihre Phosphorsäure verlieren. — Milz des Rindes nach A. Schittenhelm, H. 42, 251; 1904.

Leber⁷, Thymus, Darm^{1, 8}, Hoden⁹ (Stier); ferner nach Juschtschenko¹⁰ Nieren, Schilddrüse, Nebennieren, Hirn, Lunge und Herz. Muskeln von Säugetieren scheinen aber arm an Nucleotidasen zu sein (siehe Sachs, l. c.). — In der Haut: Wohlgemuth, Biochem. Zs 153, 487; 1924. — Organe von Fischen und Mollusken: Y. Okuda, JI Coll. Agr. Tokyo 5; 1916.

Auch Jones fand bei seinen eingehenden Versuchen das Enzym in den meisten Organen¹¹. — Carcinome sind von Goodman¹² untersucht worden.

Sehr reich an Nucleotidasen sind nach Tschernorutzky¹³ die Leukozyten. Satta und Lattes¹⁴ fanden Nucleinsäurespaltung durch kernhaltige Erythrocyten. — Pathologische Sera: Pincussen und Krause, Bioch. Zs 63.

b) Pflanzliche Enzyme. Bezüglich höherer Pflanzen liegen positive

¹ Nakayama, H. 41, 348; 1904.

² Schittenhelm und Schrötter, H. 39, 203; 1903. — 40, 62; 1904. — 41, 284; 1904. — Abderhalden und Schittenhelm, H. 47, 452; 1906. — Steudel, H. 55, 408; 1908.

³ Araki, H. 38, 84; 1903.

⁴ Reh, Hofm. Beitr. 3, 569; 1903.

⁵ Fr. Sachs, H. 46, 337; 1906.

⁶ London und Schittenhelm, H. 70, 10; 1910.

⁷ Amberg und Jones, H. 73, 407; 1911.

⁸ Carbone, Arch. di Fisiol. 4.

⁹ Mihara, H. 75, 443; 1911.

¹⁰ Juschtschenko, Bioch. Zs 31, 377; 1911. — H. 75, 141; 1911.

¹¹ Siehe Jones, JI Biol. Chem. 9, 169; 1911 und 12, 31; 1912.

¹² Goodman, JI exp. Med. 15, 477; 1912.

¹³ Tschernorutzky, H. 80, 298; 1912 und Biochem. Zs 44, 353; 1912.

¹⁴ Satta und Lattes, Giorn. R. Accad. Med. Torino 71, 88. Biochem. Zbt. 8, 1421.

Angaben nur von Tschernorutzky vor (l. c.), welcher Nucleinsäurespaltung durch Emulsinpräparate fand, und von A. Schittenhelm, der Lupinenkeimlinge mit Erfolg untersucht hat (H. 63, 289, 1909).

Algen und Farnkräuter sind nach Teodoresco¹ gegen Nucleinsäuren wirksam; in einem japanischen Hutpilz fand Kikkoji² eine Nukleotidase.

Unter den niederen Pilzen und Bakterien dürften die meisten fähig sein, aus Nucleinsäuren Phosphorsäure abzuspalten. Besondere Angaben findet man bei folgenden Autoren:

Hefe	Hahn u. Geret	Zs Biol. 40, 117.
Torula	von Herwerden	Folia Microbiol. I. 1918.
Schimmelpilze	L. Iwanoff	H. 39, 31; 1903.
„	Dox	U. S. Dep. Agr. Nr. 120; 1910.
Bakterien	Schittenhelm u. Schrötter	H. 39, 203; 1903. — 41, 4; 1903.
„	Thannhauser u. Dorf Müller	H. 102, 148; 1918.
„	Plenge	H. 39, 190; 1903.

3. Darstellung.

Man zerreibt gehackten Rinderpankreas mit feinem Sand und presst unter Zusatz von etwas Kieselgur einen Saft aus, der filtriert werden kann, ohne etwas von seiner enzymatischen Wirksamkeit zu verlieren. Er enthält natürlich sehr viele unwirksame Bestandteile und zahlreiche andere Enzyme, welche zum Teil auf die Reaktionsprodukte der Nucleotidasen einwirken, z. B. Desamidasen und Oxydasen³. Über die Ausfällung der Nucleotidasen aus Presssäften und Organextrakten und über die Reinigung von Nucleotidase-Präparaten ist noch wenig bekannt. Sachs (l. c. 348) hat Pankreaspresssaft mit Ammoniumsulfat gesättigt und die Fällung mit Alkohol und Äther getrocknet. In ähnlicher Weise hat L. Iwanoff Presssäfte aus Schimmelpilzen dargestellt.

A. Schittenhelm, dem man eingehende Studien über die Enzyme des Nucleinstoffwechsels verdankt, hat „Nucleasen“ aus Rindermilz und aus Rinderleber gewonnen (H. 42, 251; 1904). Er mischt das fein zerriebene Organ mit 1—2 Teilen Wasser, lässt mit Toluol mehrere Stunden stehen, koliert und filtriert.

4. Wirkungsbedingungen.

Verschiedene Substrate scheinen, wie auch zu erwarten ist, mit verschiedener Geschwindigkeit gespalten zu werden. Die vorhandenen Tatsachen reichen auch noch nicht aus, um den Vorschlag eines Standard-

¹ Teodoresco, C. r. 155, 300, 464, 554; 1912.

² Kikkoji, H. 51, 201; 1907.

³ Siehe Neuberg, Biochem. Zs 30, 505; 1911. — Pighini, H. 70, 85; 1911.

substrates, etwa Guanylsäure oder Inosinsäure zu begründen. Jedenfalls wird man die Wirkung auf Pentosenucleotide und Hexose-Nucleotide genau zu unterscheiden haben.

Auch über die Aciditätsbedingungen liegen nur wenige Anhaltspunkte vor, welche darauf hindeuten, dass die Nucleotidspaltung bei der Autolyse tierischer Organe ihr Optimum etwa zwischen $\text{pH} = 6$ und 7 besitzt¹. Die vorhandenen, wenig genauen Angaben beziehen sich auf „Nucleasen“, also ein Enzymgemisch, dessen Komponenten sich vermutlich bezgl. des Aciditätsoptimums unterscheiden.

Über Aktivatoren ist bis jetzt nichts bekannt geworden. Nach Ergebnissen aus dem hiesigen Laboratorium beeinflussen Kalksalze die Wirkung der Nucleotidasen, für welche auch ein organisches „Co-Enzym“ zu bestehen scheint.

Von einem genaueren Studium der Kinetik der am Nucleinstoffwechsel beteiligten Enzyme kann erst die Rede sein, wenn die einzelnen Enzyme vollständiger als jetzt voneinander geschieden sind. Ansätze zu einer Kinetik machte Pighini (H. 70). Dass die Spaltprodukte die „Nuclease“-Wirkung stark hemmen, betont Schittenhelm² auf Grund von Versuchen mit Enzym aus Rindermilz.

Einfluss der Temperatur: Den Angaben von Sachs (l. c. S. 316) wäre zu entnehmen, dass die hierhergehörenden Enzyme verhältnismässig wenig hitzeempfindlich sind (nach kürzerem Erhitzen auf 75° blieb ein Teil der Wirksamkeit erhalten).

W. Jones³ fand, dass beim Kochen des wässrigen Extraktes von Schweinepankreas die Zerlegung der Hefenucleinsäure in Mononucleotide nicht gehemmt ist, indessen ist zweifelhaft, ob diese Reaktion rein enzymatisch ist. In diesem Zusammenhang sei auch noch auf die Befunde von W. Jones und Richards (Jl Biol. Chem. 17, 71; 1914) hingewiesen, nach welchen sie annehmen, dass Hefenucleinsäure durch frischen Schweinepankreas stufenweise über Dinucleotide zu Mononucleotiden hydrolysiert wird. Eine enzymatische Abspaltung von Phosphorsäure findet nach dem Kochen des Extraktes nicht mehr statt (Jones), die Nucleotidase ist also zerstört.

Einfluss von Licht- und Röntgen-Strahlung: Siehe Pincussen⁴ und Momferratos-Floros, Biochem. Zs 126, 86; 1922. Uran-Photokatalyse: Neuberg, Bioch. Zs 13, 305; 1910.

Einfluss radioaktiver Stoffe: In Hinsicht auf die Gichttherapie hat Jastrowitz⁵ die Wirkung des Thoriums X auf den Purinstoffwechsel und dabei auch auf die Pankreasnuclease untersucht, aber ohne endgültiges Ergebnis.

¹ Vergl. hierzu auch Arinkin, H. 53, 192; 1907.

² Schittenhelm und Wiener, H. 77, 77; 1912.

³ W. Jones, Amer. Jl Physiol. 52, 203; 1920.

⁴ Pincussen, Strahlenther. 3, 644; 1913.

⁵ Jastrowitz, Biochem. Zs 94, 313 u. zw. 329; 1919.

5. Physiologische und pathologische Einflüsse auf den enzymatischen Nucleinstoffwechsel.

Thannhauser und Dorf Müller weisen in einer eingehenden Arbeit darauf hin, dass Hefenucleinsäure durch die Darmenzyme (wie auch durch milde, ammoniakalische Hydrolyse) in komplexe Nucleotide zerlegt wird, welche durch die Darmenzyme nicht weiter gespalten, sondern resorbiert und erst im Kreislauf abgebaut werden (sofern nicht Darmbakterien die Hydrolyse vorher weitergeführt haben) (H. 100 u. 102; 1917/18).

Nina Kotschneff¹ hat in Seren normaler und gravider Frauen die nukleolytischen Wirkungen mittels der optischen Methode verglichen und eine geringe, im Anfang der Schwangerschaft beginnende, zum Schluss zunehmende Steigerung dieser Wirkung beobachtet. — Bei Nephritis fand sie keine wesentliche Abweichung von normalen Verhältnissen.

Pankreasextirpation bedingt nach W. Stawraki² eine bedeutende Abnahme der nucleolytischen Wirkung des Serums.

6. Andere Nucleinsäure-Spaltungen.

Die Enzyme, welche die zweite Art der Nucleotidspaltung bewirken, nach dem Schema: Phosphorsäure — Zucker — Pyrimidin(Purin)base sind, da sie die typische Nucleosidspaltung an Phosphatnucleosiden bewirken, folgerichtig als Phosphat-Nucleosidasen zu bezeichnen. Zu diesen wäre z. B. ein Enzym zu rechnen, welches Inosinsäure in Ribose-Phosphorsäure und Hypoxanthin spaltet.

Nach de la Blanchardière (H. 87) enthalten Sojasamen ein Enzym, welches a-thymusnucleinsäures Natrium verflüssigt. Was sich ausser der PO_4 -Abspaltung ereignet, ist unklar.

Gleichzeitige Spaltung (durch 1 Enzym?) von thymonucleinsäurem Na und von Kohlehydratphosphaten fand L. Rosenfeld (Chem. d. Zelle u. Gew. 12; 1925).

D. Der enzymatische Abbau der Nucleosidasen.

1. Substrate.

1. Ribose-Nucleoside. Man kann dieselben einteilen in Purin-Riboside und Pyrimidin-Riboside. Aus der Hefenucleinsäure entstehen die Purin-Riboside Guanosin und Adenosin und die Pyrimidin-Riboside Cytidin und Uridin (Konstitutionsformeln siehe S. 320 u. ff.).

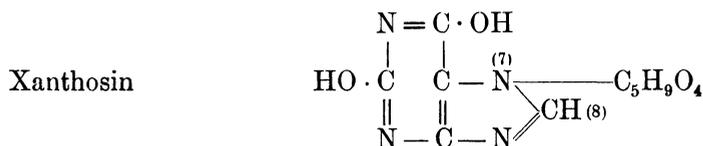
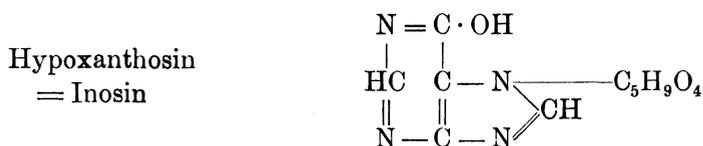
Freies Guanosin kommt nach Levene und Jacobs³ im Pankreas vor.

Ferner sind isoliert:

¹ Kotschneff, Biochem. Zs 67, 163; 1914.

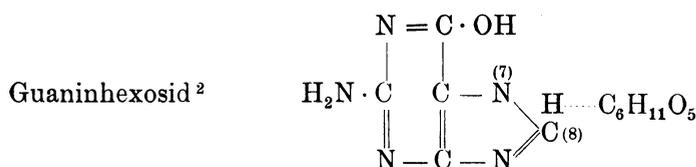
² Stawraki, Biochem. Zs 69, 363; 1915.

³ Levene und Jacobs, Biochem. Zs 28, 127; 1910.



Unsicher ist noch, ob die Ribose an (7) oder (8) gebunden ist.

2. Hexosen-Nucleoside. Hierher gehört das Guaninhexosid, welches Levene und Jacobs¹ aus der Thymusnucleinsäure isoliert haben.



Über synthetische Puringlucoside siehe E. Fischer und Helferich (Chem. Ber. 47, 210; 1914).

Inwieweit die Purin- und Pyrimidinbasen durch die gleichen Nucleosidasen auch aus den Mono- und Polynucleotiden direkt abgespalten werden, bleibt noch zu untersuchen.

2. Vorkommen der Nucleosidasen.

Die Wirkung dieser besonderen Enzyme des Nucleinstoffwechsels ist getrennt von den übrigen höchstens in einigen, sicher in sehr wenigen Fällen exakt gemessen worden; aber Angaben über Auftreten von Purin- und Pyrimidinbasen als enzymatische Spaltprodukte lassen den Schluss zu, dass Nucleosidasen in tierischen Organen, besonders in der Milz und im Pankreas vorkommen. Dagegen ist zweifelhaft, ob sie sich in der Leber finden. Im Darmsaft dürften sie nicht oder nur in geringer Menge vorhanden sein³.

In einer sehr bemerkenswerten Arbeit haben Thannhauser und B. Ottenstein⁴ die Einwirkung menschlichen Leberextraktes auf Nucleoside (Guanosin, Adenosin und Xanthosin) untersucht. Sie deuten ihre Versuchsergebnisse dahin, „dass auch im intermediären Stoffwechsel die Desamidierung und Oxydation der Nucleoside nicht bis zum Xanthosin bei intakter Nucleosid-

¹ Levene und Jacobs, JI Biol. Chem. 12, 377; 1912.

² Guaninhexoside wären auf ihr Verhalten gegen Glucosidasen zu prüfen.

³ Vgl. Martin Krüger und Schittenhelm, H. 35, 153; 1905. — Abderhalden und Schittenhelm, H. 47, 452; 1906.

⁴ Thannhauser und Ottenstein, H. 114, 17; 1921. — Vgl. hierzu auch Schittenhelm, l. c.

bindung vor sich geht.“ Wahrscheinlich fällt auch im Stoffwechsel gleichzeitig mit der Desamidierung die Purinzuckerbindung auseinander.

Nucleosidasen höherer Pflanzen sind zwar noch nicht eingehender studiert; Nucleoside sind aber in Pflanzen und zwar zuerst von Andriik 1909 und Schulze 1910 nachgewiesen worden. Nach Schulze (H. 66) ist Vernin identisch mit Guanosin. Vicin und Convicin (im Wicken- und im Rübensaft von v. Lippmann gefunden) sind Pyrimidinglucoside (Schulze und Trier, H. 70 und 76; 1911).

Auch Pilze und Mikroorganismen enthalten zweifellos Nucleosidasen.

Wichtige und eingehende Untersuchungen über Nucleosidasen verdankt man Levene¹ und seinen Schülern. Das Aciditäts-Optimum der Adenosin- und Inosin-Spaltung durch Nucleosidasen aus Milz und Niere liegt bei pH = 7,5. Die Nucleosidasen wirken spezifisch auf Ribose-Verbindungen; die Spaltprodukte (Ribose und Base) hemmen. Wegen der Kinetik sei auf die Original-Abhandlungen verwiesen, in welchen man auch Angaben über Reinigungsverfahren findet.

Am Nucleinstoffwechsel sind ausser den in diesem Kapitel behandelten Enzymen noch zwei andere Enzymgruppen beteiligt, nämlich Reduktasen und Oxydationsenzyme. Dieselben werden im 3. Abschnitt besprochen. Siehe auch 15. Kapitel dieses Abschnittes.

E. Methodik.

Bei den bisher angestellten Versuchen über den Einfluss der als Nucleasen bezeichneten Enzymgemische auf Polynucleotide, besonders auf Hefenucleinsäure kamen im wesentlichen drei Methoden zur Anwendung:

1. Die polarimetrische Methode. Sie wurde zuerst von Pighini² angewandt und von Neuberg³ empfohlen, und zwar unter Hinweis auf die zweckmässige Verwendung Boehringer'scher Nucleinsäure als Substrat.

„Löst man 2,0 g Nucleinsäure (Boehringer) in 80,0 ccm Wasser unter Zusatz von so viel KOH oder NH₃, dass gerade deutlich alkalische Reaktion auf Lackmus besteht, und füllt auf 100,0 ccm auf, so ist die Rechtsdrehung im 2 dm-Rohr genau gleich einer 3,0%igen Glucoselösung. Besonders bequem ist die Anwendung des Boehringer'schen nucleinsauren Natriums, das sich völlig klar in Wasser löst. Die starken polarimetrischen Ausschläge machen die Benützung der Methode sehr bequem.“

Da die Spaltprodukte eine verschiedene Drehung besitzen und ihr gleichzeitiges Freiwerden nicht sichergestellt und nicht einmal wahrscheinlich ist, so lässt sich mit dieser bequemen Methode zwar eine Vorstellung von der enzymatischen Wirksamkeit des zu untersuchenden Saftes usw. gewinnen, aber eine exakte Berechnung des Vorganges bietet einstweilen noch Schwierigkeiten.

¹ P. A. Levene, Yamagawa und Weber, JI Biol. Chem. 60, 693; 1924. — Levene und Weber 60, 707 u. 717; 1924. — Levene und Sobotka 65, 463; 1925.

² Pighini, H. 70, 85; 1910.

³ Neuberg, Biochem. Zs 30, 505; 1911. — Siehe auch Amberg und Jones, JI Biol. Chem. 10, 81; 1911.

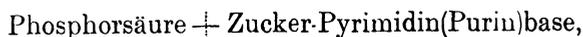
2. Eine nephelometrische Methode, welche darauf beruht, dass Hefenucleinsäure durch verdünnte Eier-Albuminlösung ausgeschieden wird, haben Kober und S. S. Graves¹ ausgearbeitet; sie scheint bei Untersuchung der Spaltung der genannten Nucleinsäure befriedigende Resultate zu geben.

3. Zum qualitativen Nachweis von Nucleinasen hat man öfters a-thymus-nucleinsaures Natrium verwendet, das in 4%iger Lösung die Eigenschaft hat, Gallerten zu bilden. Den Eintritt der Verflüssigung derselben hat man mit mehr oder weniger primitiven Mitteln gemessen.

Eine viscosimetrische Methode unter Benützung eines Auslauf-Viscosimeters wurde von P. de la Blanchardière² in Kossels Institut benutzt, um die Verflüssigung des a-thymusnucleinsauren Natriums zu verfolgen³; dabei wurde auch die Verflüssigung der Nucleinsäure und ihre Zersetzung durch Pankreasextrakt und Pankreassekret verglichen. Um die Zersetzung der Nucleinsäure zu verfolgen, hat sich der genannte Autor eines Verfahrens bedient, welches darauf beruht, dass die Nucleinsäure durch Kupfersalze quantitativ gefällt wird, dass hingegen ihre hauptsächlichsten Zersetzungsprodukte (Purin- und Pyrimidinbasen) hierbei unter 100° nicht niedergeschlagen werden. „Fällt man also in einer Flüssigkeit, welche Nucleinsäure gleichzeitig mit ihren Zersetzungsprodukten enthält, die Nucleinsäure als nucleinsaures Kupfer und filtriert, so wird die Bestimmung des gesamten Stickstoffs im Filtrat eine Vorstellung von der Zersetzung der Nucleinsäure geben. Eine solche Methode kann natürlich nur als eine empirische betrachtet werden, weil man im besten Fall den Stickstoff nur in einem Gemisch bestimmt, und weil ausser den Endprodukten der Zersetzung noch Zwischenstufen vorhanden sein können, über deren Verhalten zu Kupfersalzen wenig bekannt ist.“ Wie zu erwarten ist, fand de la Blanchardière, dass die verflüssigende und die zersetzende Wirkung verschiedener Enzympräparate nicht immer parallel laufen. Was er schon in Erwägung zog, ist nunmehr zweifellos, nämlich dass es sich hierbei um wenigstens zwei verschiedene Enzyme handelt. Die Zersetzung ist auf Nucleosidasen zurückzuführen, während die Verflüssigung den Polynucleotidasen zuzuschreiben ist.

Bezüglich des chemischen Nachweises von Nucleotiden als Brucinsalze und von Nucleosiden als Pikrate siehe Thanuhauser, H. 107, 157; 1919.

Da nach der S. 316 gegebenen Definition die Wirkung der Nucleotidasen in der Abspaltung der Phosphorsäure vom Nucleosidrest besteht, nach dem Schema



¹ Kober und S. S. Graves, JI Amer. Chem. Soc. 36, 1304; 1914.

² de la Blanchardière, H. 87, 291; 1913.

³ An Stelle des Auslauf-Viscosimeters, welches sich für Messungen von Flüssigkeiten mit hoher innerer Reibung nicht eignet, empfiehlt sich vielleicht eine Anordnung, wie sie U. Olsson im Laboratorium des Verf. zur Messung der Stärkeverflüssigung verwendet hat. (H. 119, 1; 1922).

so ist das einzig sichere und einwandfreie Verfahren zum Studium der enzymatischen Nucleotid-Spaltung die Bestimmung einer der beiden freiwerdenden Komponenten, Phosphorsäure oder Nucleosid unter Verwendung eines Mononucleotides als Substrat¹. Man hat also entweder die Menge der Phosphorsäure gewichtsanalytisch oder massanalytisch (ev. durch eine Mikromethode) zu ermitteln (die Methoden hierzu siehe 1. Abschn., S. 64) oder das Nucleosid polarimetrisch zu messen.

Handelt es sich um den qualitativen Nachweis von Nucleosidasen (neben Nucleotidasen) in Organextrakten oder Presssäften, so kann man (falls kein Mononucleotid zur Verfügung steht) Hefenucleinsäure als Substrat zusetzen (2—5 g auf 100 ccm Flüssigkeit) und nach einer gewissen Reaktionszeit auf die Anwesenheit oder die Zunahme von Purinbasen oder Pyrimidinbasen prüfen. Zu diesem Zweck hat man zuerst die filtrierte Flüssigkeit mit Schwefelsäure zu versetzen, um etwa noch anwesende Nucleinsäure zu entfernen. Aus der filtrierten Lösung werden dann die Purinbasen mit Quecksilbersulfatlösung ausgefällt. Der aus Quecksilbersalzen bestehende Niederschlag wird nach Ansäuerung mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Aus der wiederum filtrierten und von H₂S befreiten Lösung werden die Basen mit ammoniakalischer Silberlösung gefällt. Die Silberfällung wird mit Salzsäure zerlegt und aus dem Filtrat werden die salzsauren Purinbasen gewonnen (Sachs, l. c.).

Auf die Purinbasen kann man dann noch mittels der Diazoreaktion von Burian² prüfen.

Über die für die Nuclealreaktion verantwortlich zu machenden Gruppen siehe Feulgen und Imhäuser H. 136 u. 148, 1; 1924/26.

¹ Mehrere derselben, und zwar alle vier Mononucleotide der Hefenucleinsäure, sind bereits rein und in kristallisiertem Zustand erhalten worden. Vgl. Levene, JI Biol. Chem. 41, 1; 1920.

² Burian, Chem. Ber. 37, 696; 1904. — H. 51, 425; 1907. — Pauly, H. 42, 516; 1904.

14. Kapitel.

Urease.

Berücksichtigt man nur die Bruttoreaktion der Harnstoffspaltung



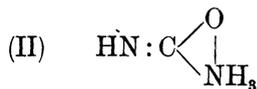
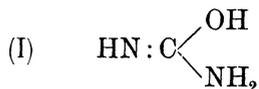
so ist die Urease zu den übrigen, im nächsten Kapitel behandelten Desamidasen zu zählen, welche Säureamide in Säuren und Ammoniak hydrolysieren.

Indessen scheinen manche Tatsachen anzudeuten, dass die enzymatische Harnstoffspaltung nicht als einfache Hydrolyse verläuft, und die Unwirksamkeit der Urease gegen andere Säureamide spricht auch dafür, dass die Urease ein Enzym eigener Art ausmacht. Aus diesem Grund ist ihr ein besonderes Kapitel gewidmet worden.

A. Allgemeines über Ureasen.

1. Substrat.

Der Harnstoff wird durch Umkrystallisieren aus Wasser oder Alkohol leicht in reinem Zustand erhalten und ist dann durch seinen Schmelzpunkt 132,2—132,7° gekennzeichnet. Die Konstitution dieses Stoffes als Diamid der Kohlensäure ist so allgemein bekannt, dass eine Besprechung dieses Substrates vielleicht überflüssig erscheinen könnte. Indessen darf bei der Beurteilung des Verlaufes der enzymatischen Spaltung nicht ausser acht gelassen werden, dass noch andere Atomkombinationen möglich sind, nämlich (neben einer von Armstrong und Horton diskutierten Hydratform) besonders das Isomere (I) und die von Werner¹ in Betracht gezogene Form (II):



Ferner ist noch zu betonen, dass der Harnstoff bei der katalytischen Spaltung durch Säuren und Basen nicht als solcher reagiert, sondern unter Umlagerung zu Ammoniumcyanat², und dass auch in wässriger Lösung ein Gleichgewicht zwischen Harnstoff und Ammoniumcyanat besteht, an welchem allerdings das Cyanat nur in sehr geringer Menge beteiligt ist. Die Kenntnis dieser Gleichgewichte

Harnstoff — Ammoniumcyanat

¹ Werner, JI Chem. Soc. 103, 1010 u. 2275; 1913. — 113, 84; 1918. — 117, 1078; 1920. Siehe auch: Chemistry of urea. London, 1923.

² Fawsitt, Zs physik. Chem. 41, 601; 1902.

verdankt man J. Walker und Hambly¹, sowie G. N. Lewis und Burrows². Mack und Villars³ haben 1923 an diese Arbeiten mit neuen Untersuchungen angeknüpft.

Jedenfalls sind für die Kinetik der enzymatischen Harnstoffspaltung die Fragen wesentlich, ob dieser Vorgang tatsächlich eine monomolekulare Reaktion ist, oder ob der Bruttovorgang $\text{CO}(\text{NH}_2)_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CO}_2 + 2\text{NH}_3$ nicht etwa — trotz eines mehr oder weniger guten Anschlusses an die Reaktionsgleichung erster Ordnung — in Teilreaktionen verläuft, etwa unter primärer Aufspaltung in carbaminsaures Ammonium



welches dann durch Eintritt eines weiteren Wassermoleküls vollständig in die Endprodukte zerfällt. Für eine solche stufenweise Reaktion sind auch bereits starke Stützen beigebracht worden [E. Mack und D. S. Villers, l. c., sowie W. R. Fearon⁴], wie S. 352 eingehender besprochen wird.

Die Soja-Urease ist nach Armstrong auf den Harnstoff als Substrat beschränkt; Methylharnstoff und andere Harnstoffderivate werden nicht angegriffen (Proc. Roy. Soc. 85 und 86; 1912/13).

Mit negativem Resultat sind ferner mit Soja-Urease untersucht:

Alanin, Allantoin, Arginin, Benzamid, Glykokoll, Guanin, Hippursäure, Histidin, Kreatinin, Leucin, Tyrosin, Harnsäure und Biuret (?) (Takeuchi, 1909). Aminosäuren, Pepton und Casein (van Slyke, JI Biol. Chem. 16). Das Verhalten von Guanidin bleibt weiter zu prüfen. Bakterien-Urease greift nach Jacoby weder Methylharnstoff, noch Thioharnstoff noch Acetamid an (Biochem. Zs 76).

Mit Robinia-Urease glaubt Pin Yin Yi (l. c.) eine Spaltung des asymmetrischen Dimethyl- und Diäthyl-Harnstoffs beobachtet zu haben.

2. Vorkommen.

Dass sich Urease in normalen Organen höherer Tiere findet, ist jetzt⁵ festgestellt. Luck⁶ fand nämlich in der Magenwand von Fleischfressern ein der Soja-Urease nahestehendes Enzym. Ferner enthält nach den Erfahrungen dieses Laboratoriums sowohl Niere⁷ als Rattenblut Urease (Brandting). György und Stenström⁸ fanden Urease im Harn eines 6 Monate alten Säuglings. Bakterienwirkung ist nicht ausgeschlossen (s. A. Lublin, Biochem. Zs 133). Die von Musculus 1876 in pathologischen Harnen gefundene Urease (C. r. 83) wurde von Pasteur auf Bakterien zurückgeführt.

¹ Walker und Hambly, JI Chem. Soc. 67, 746; 1895.

² G. N. Lewis und Burrows, JI Amer. Chem. Soc. 34, 1516; 1912.

³ Mack und Villars, JI Amer. Chem. Soc. 45, 501 u. 505; 1923.

⁴ Fearon, Biochem. JI 17, 84; 1923.

⁵ Rovere glaubt eine Urease in Thymusdrüsen junger Kälber gefunden zu haben, Tanaka (Biochem. Zs 37) in Milz, Buetow in Hypophyse (Biochem. Zs 54) Steppuin in Leber (Biochem. Zs 146).

⁶ Luck, Biochem. JI 18, 825; 1924. — Luck und Seth, Biochem. JI 19, 357; 1925.

⁷ Siehe hierzu auch Me Cance, Biochem. JI 18, 486; 1924.

⁸ György und Stenström, Biochem. Zs 128, 407; 1922.

Przylecki¹ teilt Befunde über das Vorkommen von Urease in Invertebraten (besonders *Helix pomatia* und *Mytilus edulis*) mit. Ob das Ausbleiben von Harnstoffausscheidung bei den Wirbellosen auf ihren Ureasegehalt zurückzuführen ist, bleibt festzustellen. Zweifellos spielt die Urease auch im Körper höherer Tiere (Blut; Euler und Mitarbeiter) eine wichtige spaltende und synthetische Rolle.

a) Höhere Pflanzen.

Als enzymreichstes Material werden die Bohnen folgender Pflanzen angegeben:

Canavalia ensiformis (Jackbohne, Schwertbohne): Annett², Mateer und Marshall³, *Ricinus* (Castor-Bohne): Falk und Sugiura⁴,

Soja *hispida*: Takeuchi⁵, Plimmer, Bayliss u. a.

Robinia pseudacacia und andere Papilionaceen: Zemplén⁶, Pin Yin Yi⁷.

Nakagawa (Mitt. Med. Fak. Tokyo 28, 546: 1922).

Der Gehalt der Bohnen an Urease variiert in den einzelnen Arten bei Soja den Angaben von Annett (Biochem. JI 8) zufolge nur wenig. (Siehe auch Wester⁸, Chem. Weekbl. 16, 1552; 1919). In frischen Sojabohnen ist der Ureasegehalt konstant (Amer. JI of Pharm. 92; 1920).

Das Alter der Bohnen scheint keine erhebliche Rolle zu spielen.

Dagegen wird mehrfach angegeben, dass der Ureasegehalt der Bohnen beim Reifen von Samen und Früchten [Kiesel und Troitzki⁹] und beim Keimen zunimmt, und letzteres entspricht auch den Erfahrungen des Verfassers (3 Tage Keimung). Der Ureasegehalt der Keimlinge ist sehr hoch. Über die Verteilung von Enzym und Co-Enzym beim Keimen gibt Onodera eine Beobachtung an (Biochem. JI 9, 583; 1915).

Was die Lokalisation innerhalb des Samens betrifft, so fanden Onodera und Groll¹⁰ die Urease in den innersten Samenteilern, nicht in der Schale.

Die folgende Tabelle enthält einige ältere Arbeiten über solche Pflanzen, bei welchen Urease in den Samen nachgewiesen werden konnte.

¹ Przylecki, Arch. intern. physiol. 20, 103; 1922.

² Annett, Biochem. JI 8, 449; 1914.

³ Mateer und Marshall, JI Biol. Chem. 25, 297; 1916.

⁴ K. G. Falk und Sugiura, JI Amer. Chem. Soc. 35, 292 u. 36, 2166; 1914.

⁵ Takeuchi, JI Coll. agric. Tokyo 1, 1; 1909.

⁶ Zemplén, H. 79, 229; 1912 u. Zs angew. Chem. 25, 1560; 1912.

⁷ Pin Yin Yi, Diss. Berlin 1919. — Ber. d. deutsch. Pharm. Ges. 30, 178; 1920. —

Siehe hierzu auch Thoms, ebenda, 30, 175; 1920.

⁸ Wester, Chem. Weekbl. 16, 1548 u. 1552; 1919.

⁹ Kiesel und Troitzki, H. 118, 247, 1922.

¹⁰ Groll, Chem. Weekbl. 13, 254; 1916. — Polemik mit Mom (Chem. Weekbl. 13, 72) siehe ebenda 13, 333; 1916. Zitiert nach Chem. Zbl. 1916. Mom schrieb die harnstoffspaltende Wirkung der Sojabohnen Bakterien zu, vermutlich infolge einer Verwechslung (Beijerinck, Chem. Weekbl. 13, 285; 1916). — Siehe auch Wagenaar, Pharmac. weekbl. 51; 1924.

Familie	Art oder Pflanze	Verfasser	Schriftstelle
Papilionaceen	Phaseolus vulg.	Takeuchi	Jl agric. Tokyo 1, 1; 1909.
	Lupinus-Arten	Kiesel	H. 75, 169; 1911.
	" "	Kiesel u. Troitzki	H. 118, 247; 1922.
	Lupinus albus	Muenck	Landw. Vers. 85, 393; 1914.
	Trifolium-Arten	Fosse	Soc. biol. 77, 129; 1914.
Apocynaceen	Strophanthus-Arten	Wabulenko	Landw. Vers. 82, 313; 1913.
Umbelliferen	Daucus	Fosse	Soc. biol. 77, 129; 1914.
	(nicht in Daucus carota)	Kiesel u. Troitzki	H. 118, 247; 1922.
Cannabinaceen	Cannabis sativa	Fosse	Soc. biol. 77, 129; 1914.
Graminaceen	Reis	Annett	Biochem. Jl 8, 449; 1914.

Anhaltspunkte über den relativen Urease-Gehalt gibt folgender Auszug aus einer Tabelle von Zemplén (H. 79).

Je 1 g der fein zermahlenden Samen wurde mit 200 ccm 1—2%iger Harnstofflösung (+ 2 ccm Toluol) 4—5 Tage bei Zimmertemperatur aufbewahrt; nach Zusatz von 25 ccm Kalkmilch wurde NH_3 abdestilliert und titriert. Die Tabelle gibt das der Enzymwirkung zuzuschreibende NH_3 .

Nameu der Pflanze	g NH_3	Namen der Pflanze	g NH_3
Amorphe fruticosa	0,861	Glycyrrhica glabra	0,070
Robinia pseudacacia	0,670	Colutea arborescens	0,066
Erbsenbaum, Caragana arborescens	0,551	Schottenklee, Lotus corniculatus .	0,064
Lupinus albus	0,373	Stechginster, Ulex europaeus . . .	0,062
Lupinus luteus	0,358	Meerkiefer, Pinus maritima	0,053
Goldregen, Cytisus laburnum . . .	0,182	Ornithopus sativus	0,050
Tannenklee, Anthyllis vulneraria .	0,133	Medicago sativa	0,050
Esparsette, Onobrychis sativa . . .	0,122	Spartium scoparium	0,049
Morus alba	0,101	Galega officinalis	0,041
Canabis sativa	0,095	Käseklee, Melilotus coeruleus . . .	0,029
Pferdebohnen	0,089	Pisum sativum	0,024
Trifolium incarnatum	0,085	Taxus baccata	0,012
Medicago lupulina	0,074	Capparis spinosa	0,008
Paliurus aculeatus	0,074	Buchweizen, Polygonum fagopyrum	0,007

Dass Papilionaceen besonders grosse Mengen von Urease enthalten, wird übereinstimmend von allen Forschern gefunden. Es erbot ein nicht geringes Interesse, den Reichtum der Samen dieser Pflanzenfamilie mit der Grösse und den Besonderheiten des starken Eiweissumsatzes, mit dem die Symbiose der Papilionaceen und der Knöllchenbakterien (*Bacillus radicicola*) zusammenhängt, in Beziehung zu setzen. Diesbezügliche Versuche wurden hier bereits 1923 zusammen mit Chr. Barthel begonnen. Etwa gleichzeitig teilte Werner in einem interessanten Brief an „Nature“ (Vol. 112) mit, dass sich Urease in Knöllchen-Wurzeln zahlreicher Leguminosen findet, nicht aber in knöllchenfreien Wurzeln. Siehe auch 3. Abschnitt.

Keine oder sehr geringe NH_3 -Mengen erhielt Zemplén in Samen von: Goldregen-Hafer, Sommerweizen, Sommergerste, *Cercis siliquastrum*, *Lathyrus odoratus*, Stoppelrübe, Mohn (blauer), *Sinapis alba*, *Helianthus annuus*, Lein, Linse, Sommerroggen, weisse Hirse, *Vicia sativa*, Feldmais.

Hinsichtlich der Gramineen besteht eine ausgesprochene Verschiedenheit der Ergebnisse, welche noch der Aufklärung bedarf: Zemplén (l. c.) fand ihre Körner nämlich so gut wie ureasefrei, während Annett (1914) in Reis, Némec¹ in Weizen, Gerste, Hafer und Roggen Urease nachweisen konnten.

Auch sonst findet man viele sich widersprechende Ergebnisse. So fand Annett bei einer allerdings sehr oberflächlichen Prüfung keine Urease in Samen von: *Phaseolus vulgaris*, *radiatus* und *mungo*, *Brassica campestris*, *Sesamum indicum* u. a. — Mit einer etwas besseren Methodik konnte in folgenden Samen keine Spur einer Urease gefunden werden: *Sida spinosa*, *Oryza sativa*, *Setaria italica*, *Pisum arvense*, *Phaseolus mungo* und *radiatus*, *Mucuna pruriens*. Urease fehlt nach Kiesel (H. 118) in *Allium cepa*, *Beta vulgaris* und *Phaseolus vulgaris*.

Urease findet sich zwar in besonderem Masse, aber nicht ausschliesslich in Samen und Früchten höherer Pflanzen; nämlich auch in Blättern (grünen und etiolierten), Stengeln und Wurzeln, worüber Kiesel und Troitzki für *Pisum sativum* und *Vicia sativa* u. a. quantitative Versuche angeben. In Bambusschösslingen fand Kan Kato (H. 75) Ureasewirkung, in jungen Soja- und Erbsenpflänzchen Fosse (C. r. 158; 1914).

Bei langdauernden Versuchen mit enzymarmem Material ist die Möglichkeit der Infektion durch Pilze und Bakterien, welche in der Regel Urease enthalten, zu berücksichtigen.

b) Pilze und Bakterien.

Kikkoji² fand Urease im Hutpilz *Cortinellus edodes*.

In niederen Pilzen wurde Urease von Shibata³ nachgewiesen, und zwar in *Aspergillus niger*. Dox⁴ gibt eine grössere Anzahl von ureaseführenden Schimmelpilzen an, ebenso Kossowicz (Zs Gär. Phys. 1912). Kiesel und Troitzki (H. 118) fanden Urease in *Aspergillus niger* (und *Boletus edulis*). Goris und Costy⁵ haben Urease in einer grossen Anzahl Ascomyceten und Basidiomyceten nachgewiesen. (Negative Resultate bei den Gattungen *Amanita*, *Lepiota*, *Lycoperdon*, *Tricholoma*, *Clitocybe*, *Clitopilus*, *Psalliota*, *Coprinus* und *Paxillus*, in welchen aber Harnstoff vorkommt.) Das Hymenium war am enzymreichsten.

Nachdem durch die Arbeiten von Fosse⁶ (Ann. Pasteur 30, 1; 1916) und besonders durch die ausgezeichneten Forschungen von N. N. Iwanoff (Biochem. Zs 135, 1. — 136, 1. — 143, 62; 1923. — 154, 376; 1924. — 157, 229; 1925) die Verbreitung des Harnstoffs im Pflanzenreich dargetan ist, erhält

¹ Némec, Biochem. Zs 91, 126; 1918.

² Kikkoji, H. 51, 201; 1907.

³ Shibata, Hofm. Beitr. 5, 385; 1904.

⁴ Dox, JI Biol. Chem. 6, 461. — U.S. Dep. Agr. Bull. 120; 1910.

⁵ Goris und Costy, C. r. 175, 539; 1922.

⁶ Siehe auch den ersten Nachweis von Harnstoff in Pilzen durch M. Bamberger und Landsiedl, Monatsh. f. Chem. 24, 218; 1903.

der Nachweis der Urease in Pflanzen, besonders Pilzen, eine neue Bedeutung, da sie nun auch als synthetisches Enzym in Betracht kommt. Eine Untersuchung an Lycoperdon-Arten wäre sehr erwünscht.

Lebende Hefen spalten Harnstoff nicht (P. Thomas, Ann. Pasteur 33, 777; 1919. — M. Sandberg, Biochem. Zs 128, 78; 1922). Für *Sacchar. cervisiae* Froberg gibt Kiesel Ureasewirkung an (?).

Pasteur hatte bekanntlich 1862 die Harnsäuregärung auf die Wirkung eines Mikroorganismus, später *Micrococcus ureae* genannt, zurückgeführt¹. Später wurden von Leube und Graser aus Luftstaub gewonnene stäbchenförmige Erreger der Harnstoffgärung beschrieben. Die Harnstoffspaltung durch *B. fluor. liquef.* haben Emmerling und Reiser 1902 erkannt (Chem. Ber. 35), diejenige durch *Proteus vulgaris* Schnitzler 1892, durch *Bac. radicola* Beijerinck. Eine neue Untersuchung hat J. Arlington Anderson angestellt.

Wegen der Systematik der Mikroorganismen, Urokokken und Urobazillen, verweisen wir auf die Monographie von Miquel in Lafars Handbuch (3, 71; 1904—1906), sowie auf neuere Studien von Viehoveer², sowie von Beijerinck³ und Horowitz⁴.

3. Darstellung.

A. Aus Pflanzensamen.

1. Lösungen. Als Ausgangsmaterial wurden meist trockene Sojabohnen verwendet. Es bleibt zu untersuchen, ob nicht die Anwendung enzymreicherer Bohnen, etwa von *Robinia pseudacacia*, *Canavalia* und *Ricinus* zu empfehlen ist und ob es sich auch bei diesen Samen lohnt, sie vor der Verarbeitung eine bestimmte Zeit keimen zu lassen und die Keimlinge zu verwenden.

Die Samen werden fein gemahlen und dann extrahiert, und zwar

a) mit 5—10 Teilen Wasser oder (nach van Slyke) mit neutraler oder sehr schwach saurer Phosphatlösung [Pufferlösung zur Aufrechterhaltung der geeigneten Reaktion oder nach Pin Yin Yi (Diss. 1919) mit 5 prozentiger Natriumacetatlösung (45°)] während kurzer Zeit, sei es direkt oder noch besser nach vorausgegangener Entfettung mittels Äther oder Petroleumäther (Armstrong und Horton [1912]) im Soxhletapparat. Die Dauer der Wassereextraktion war meist unnötig lang, 10—30 Minuten genügen.

Das von Fett befreite Pulver lässt sich in Wasser (mit wenig Alkoholzusatz) gut aufschlemmen. Die wässrigen Extrakte sind kaum länger als 1—2 Tage haltbar.

¹ Pasteur, Ann. chim. phys. (3) 64, 52; 1862. — Pasteur et Joubert, C. r. 83, 1; 1876.

² Viehoveer, Zbt. Bakt. II, 39, 209; 1913.

³ Beijerinck, Zbt. Bakt. II, 113; 1917.

⁴ Horowitz, Ann. Pasteur, 30, 307; 1916.

Die zeitliche Abnahme der Wirksamkeit wird z. B. aus folgendem Versuch von Lövgren (Biochem. Zs 119, 215; 1921) ersichtlich: 200 g Sojabohnenmehl und 1 l Wasser 3 Stunden gerührt. Über Nacht sinken die unlöslichen Stoffe, dann wird die überstehende Flüssigkeit abgegossen; unter Toluol im Eisschrank aufbewahrt, war sie am zweiten Tag noch klar. Am dritten war sie hellgelb geworden (pH = ?) und ein reichlicher gelber Bodensatz hatte sich abgesetzt. An diesem und einigen folgenden Tagen wurden aus der tüchtig geschüttelten Flüssigkeit 2 ccm Portionen genommen und filtriert. Das Filtrat + Waschwasser und der gewaschene Rückstand wurden teils für sich und teils vereint auf ihre Wirksamkeit geprüft.

Enzym	H ₂ O ccm	m/3- Phos- phat ccm	1 n.- Harn- stoff ccm	Alter der Enzym- lösung in Tagen						
				1	3	4	5	6	11	
Filtrat von 2 ccm der Enzymlösung	5	2	1	—	6	3,1	1,3	0,4	0,2	mg NH ₃
Niederschlag v. 2 ccm d. Enzymlös.	5	2	1	—	—	3,9	2,7	0,6	0,3	mg NH ₃
2 ccm der unfiltriert. Enzymlösung	5	2	1	12,8	—	11,9	8,3	—	0,7	mg NH ₃

Totalvolumen: 10 ccm. — Harnstoffkonzentration: 0,1 Mol. pro Liter. — Temperatur: 17°. — Phosphatlösung: 165 ccm m/2-Na₂HPO₄ + 35 ccm m/2-KH₂PO₄; pH = 7,13, nach dem Zusatz des Enzyms etwa 7. — Reaktionszeit: 30 Minuten.

Wegen der starken Abschwächung der enzymatischen Wirksamkeit empfehlen van Slyke und Cullen das Arbeiten mit frisch bereiteten Enzymlösungen.

Um die Haltbarkeit zu erhöhen hat van Slyke¹ den Zusatz von neutralem Phosphatpuffer vorgeschlagen. Barendrecht² extrahiert 0,4 g Bohnenmehl mit einer Mischung von 7,28 g Na₂HPO₄ und 2,32 g KH₂PO₄ in 100 ccm bei 27°, und filtriert dann unter Zusatz von 0,4 g Kieselgur. Die wässrigen Extrakte enthalten grosse Mengen von Verunreinigungen. Extrahiert man Sojabohnenmehl z. B. zwei Stunden bei Zimmertemperatur mit 5 Teilen Wasser, so enthält die Enzymlösung rund 6% Trockensubstanz (B. Holmgren). Marshall³ macht deswegen den enzymhaltigen Extrakt etwa 0,01 n. an Salzsäure und fällt durch 5–15 Minuten langes Erhitzen auf 35° die Eiweissstoffe zum Teil aus (ein Verfahren, das van Slyke aber nicht empfiehlt);

- b) mit Glycerin [Jansen⁴, Groll u. a.]. Diese Glycerinextrakte sind lange ohne Abschwächung wirksam, wie Verf. aus eigener Erfahrung bestätigen kann. Über die (nicht sehr starke) Hemmung der enzymatischen Wirksamkeit durch Glycerin siehe S. 350.

Wester⁵) kombiniert die Verfahren von Jansen und Marshall. Er extrahiert 25 g Sojabohnen 48 Stunden lang mit 200 g 50%igem Glycerin, setzt dann 26 ccm 0,1 n. Salzsäure zu, füllt mit 50%igem Glycerin auf 250 ccm auf und erwärmt auf 35°.

¹ van Slyke, JI Biol. Chem. 19, 141; 1914.

² Barendrecht, Rec. Trav. Chim. Pays-Bas 39, 1; 1920.

³ Marshall, JI Biol. Chem. 14, 283; 1913. — 17, 351; 1914.

⁴ Jansen, Chem. Weekbl. 12, 483; 1915.

⁵ Wester, Pharm. Ber. 30, 163; 1920.

2. Trockenpräparate können aus Lösungen gefällt werden a) durch Alkohol [Takeuchi 1909, Hahn und Saphra¹], b) durch Aceton (1 Teil Enzymlösung und 10 Teile Aceton) nach van Slyke und Cullen (Jl Biol. chem. 19; 1914). Der Niederschlag wird im Vakuum getrocknet und trocken zerrieben und ist dann unbegrenzt haltbar. Die aktive Substanz löst sich in Wasser; der geringfügige flockige Rückstand ist von keiner Bedeutung. Ein völlig lösliches Präparat wird durch nochmalige Acetonfällung der filtrierten Lösung erhalten [van Slyke und Zacharias²]. Diese Methode wurde auch von Onodera (1915), Rona sowie Kay angewendet³.

Pin Yin Yi (Diss. 1919) fand starke Enzymschädigung durch Alkohol und Aceton. — Carnot, Gérard und Moissonier empfehlen Alkohol-Äther (Ann. Past. 35). Siehe auch Revoltella, Biochem. Zs 144, 229; 1924.

Auch durch Eindunsten wässriger Bohnenextrakte hat man Trockenpräparate erhalten: van Slyke und Cullen (1914), Jacoby und Sugga⁴. Trocknet man im Faust-Heimschen Apparat durch einen Luftstrom bei Zimmertemperatur, so erhält man einen hornartigen Rückstand, der nach Pulverisieren in Wasser teilweise löslich ist.

B. Aus Pilzen und Bakterien.

Die ersten Extrakte sind von Musculus (1874), Lea⁵ und Miquel⁶ dargestellt, ferner sei auf die S. 336—339 angegebene Literatur verwiesen.

Musculus⁷ hat Urease (1876) zum erstenmal aus alkalischem (bakterienhaltigem) Harn durch Alkoholfällung gewonnen.

Miquel (Lafars Handb. III, S. 82) gibt zur Darstellung der Bakterienurease folgende Vorschrift:

In einem geräumigen Gefäß, enthaltend wässrige Peptonlösung oder noch besser eine mit Pepton versetzte Bouillon, sät man, nachdem man für alkalische Reaktion durch Zugabe von Ammoniumcarbonat oder vorteilhafter 2—3 g Harnstoff pro Liter gesorgt hat, eine sehr kräftige Art von Harnstoffbakterien ein und hält dann die Zucht bei 30—35°. Der Zuwachs wird beschleunigt durch einen sehr schwachen Strom keimfreier Luft oder durch Anwendung flacher Gefäße. Nach einigen Tagen enthält die Flüssigkeit bereits reichliche Enzymmengen. Filtrieren der Bouillon durch ein Porzellanfilter verursacht nur geringen Verlust an Enzym. Die ureasehaltige Bouillon behält bei geeigneter Aufbewahrung (ohne fremde Infektion) ihr Spaltungsvermögen 3—4 Monate.

Ein Trockenpräparat von Bakterienurease erhielt Moll⁸ aus *Micrococcus ureae* durch Alkoholfällung.

Eine Darstellung durch Trocknung von Bakterien beschreibt Jacoby⁹:

¹ Hahn und Saphra, Deutsche med. Wochenschr. 40, 430; 1914.

² van Slyke und Zacharias, Deutsche med. Wochenschr. 40, 1219; 1914.

³ H. D. Kay, Biochem. Jl 17, 277; 1923.

⁴ Jacoby und Sugga, Biochem. Zs 69, 116; 1915.

⁵ Lea, Jl of Physiol. 6, 136; 1885.

⁶ Miquel, C. r. 111, 397; 1890.

⁷ Musculus, C. r. 82, 334; 1876.

⁸ Moll, Hofm. Beitr. 2, 344; 1902.

⁹ Jacoby, Biochem. Zs 84, 354; 1917. — Takahata, ebenda 140, 168; 1923.

Agar-Massenkulturen von nicht näher bezeichneten Urobakterien werden auf Tontellern ausgestrichen, am nächsten Tag wird die trockene Bakterienmasse pulverisiert. „Die (mit Ton verunreinigten) Pulver sind immer gut wirksam.“

4. Reinigung der Enzympräparate und ihre Wirksamkeit.

Reinigungsmethoden sind für Urease erst in neuester Zeit im Laboratorium des Verf. ausgearbeitet worden. Als Sorptionsmittel für Verunreinigungen scheint Kieselgur in geringen Mengen verwendet werden zu können. Lövgren hat durch Kaolin seine Sojamehlextrakte nicht reinigen können¹.

Anwendung von Tonerdehydrat und Dialyse (Euler und B. Holmgren) ergab eine Verbesserung der Wirksamkeit auf $U_f = 1$ bis 10.

Die Wirksamkeit der bis jetzt erhaltenen Präparate ist also sehr gering. Nimmt man nach einem Vorschlag von Euler und Josephson² als Einheit der Wirksamkeit $U_f = k \cdot g$ Harnstoff : g Enzympräparat, so erhält man für einen ungereinigten Extrakt von Sojabohnen etwa $U_f = 10^{-2}$.

5. Wirksamkeitsbedingungen.

Während der Harnstoffspaltung ändert sich — falls die Lösung keine Puffer enthält — die Acidität durch das gebildete Ammoniak bedeutend, so dass die Reaktionsgeschwindigkeit dadurch stark beeinflusst wird. Will man den Einfluss der Acidität auf den Reaktionskoeffizienten k studieren, so muss man entweder in Gegenwart einer hinreichenden Puffermenge arbeiten, sofern man nicht ausschliesslich einen Teil der Reaktion berücksichtigt, in welchem schon so viel Ammoniak gebildet ist, dass eine weitere Ammoniakentwicklung keine bedeutende Veränderung von pH hervorruft. Interpolationstabellen zur Ablesung der pH-Steigerung durch Ammoniak bei verschiedenen Phosphatmengen siehe Lövgren.

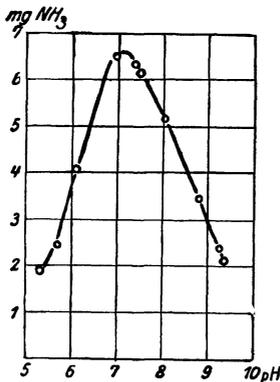


Fig. 45.

1 ccm Enzymlösung (0,02 g Acetonpräparat) + 10 ccm 2% Harnstoff + 10 ccm $\frac{1}{8}$ mol. Phosphormischung. Totalvolumen 21 ccm. — Temp. 20°. — Reaktionszeit 30 Min.

Acidität. Nach älteren Versuchen von Armstrong wurde 1914 der Einfluss der Acidität auf die Ureasewirkung eingehender von Marshall jun. untersucht, der durch Verwendung von Indicatoren das Optimalgebiet zwischen $pH = 6$ und $pH = 8$ fand (l. c. S. 357). Van Slyke und seine Mitarbeiter haben diese orientierenden Versuche bald darauf mit der

modernen Sörensenschen Methodik wesentlich erweitert. Die folgende Tabelle ist der Arbeit von van Slyke und Zacharias³, S. 191, entnommen.

¹ Siehe auch Sunner und Graham, Zl Biol. Chem. 63, XLIII; 1925. — Proc. Soc. exp. Biol. a. Med. 21; 1924.

² Euler und Josephson, Chem. Ber. 56, 1749; 1923.

³ Van Slyke und Zacharias, Jl Biol. Chem. 19, 181; 1914.

(Geschwindigkeit umgerechnet auf mg NH₃.)

pH	5,3	5,7	6,1	6,97	7,38	7,50	8,04	8,80	9,24	9,36
mg NH ₃	1,86	2,43	4,07	6,50	6,36	6,14	5,18	3,46	2,39	2,13

Die Figur 1 zeigt, dass das Optimum der Reaktion sehr nahe am Neutralpunkt (pH = 7) liegt. Dieses Ergebnis wird auch durch zahlreiche andere Arbeiten bestätigt; Rona u. György; besonders Lövgren (Bioch. Zs 119).

Der Optimalpunkt der Azidität ändert sich, wie van Slyke gefunden und Lövgren später an einem ausführlicheren Material bestätigt hat, ein wenig (um etwa 1/2 pH-Einheit) mit der Harnstoff-Konzentration der Lösung.

Folgende Tabelle ist der Arbeit von Lövgren (1921) entnommen, der erste Wert ist von ihm nach Barendrechts (Rec. 39) Resultat berechnet.

Harnstoffkonzentration Mol. pro Liter	pH-Optimum zwischen	Wahrscheinlicher Optimalpunkt
0,00167		7,90
0,00625	7,74—7,78	7,76
0,0125	7,66—7,72	7,69
0,025	7,55—7,65	7,62
0,05	7,50—7,60	7,55
0,1	7,40—7,50	7,48
0,2	7,30—7,50	7,41
0,4	7,30—7,40	7,35
0,8	7,25—7,35	7,27
1,6	7,15—7,25	7,20

Von der Konzentration des zugesetzten Phosphates ist die Lage der pH-Optima unabhängig, wie z. B. aus folgender Figur (Lövgren) hervorgeht.

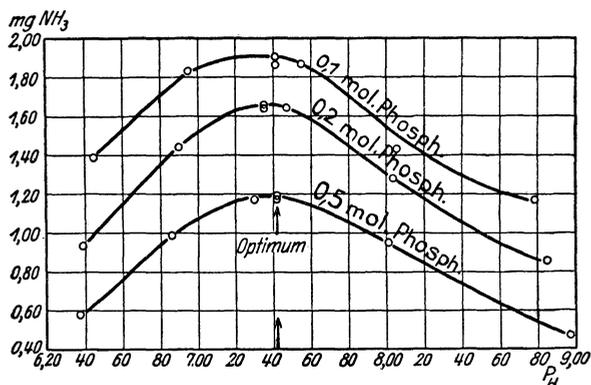


Fig. 46.

(Temp. 19,7°. — 1 ccm Enzymlösung + 5 ccm 1 mol. Phosphat + 4 ccm 0,5 n. Harnstoff.)

Die Enzymkonzentration hat auf die Lage des pH-Optimums keinen und auf den Verlauf der Optimalkurven wenig Einfluss.

Bei der Untersuchung der Wirkung verschiedener Säuren fand Onodera¹⁾ Zahlen, welche darauf hindeuten, dass neben der Aciditätswirkung auch gelegentlich noch die spezifische Wirkung der Anionen in Betracht kommt, z. B. bei Buttersäure.

Salzwirkung. Der Einfluss von Neutralsalzen ist systematisch zuerst von van Slyke und seinen Mitarbeitern und bald darauf auf Veranlassung von Bayliss durch Onodera¹ untersucht worden. In 2 n. Lösungen erniedrigen NaCl, CaCl₂, BaCl₂ die Ureasewirkung deutlich (van Slyke); in 0,1 n. Lösungen fand Onodera die Erniedrigung gering. Vermutlich handelt es sich hier in erster Linie um eine kleine Beeinflussung der Acidität durch die Neutralsalze (Vergrößerung des Dissoziationsgrades von NH₄OH durch NaCl) und in zweiter Linie um eine Beeinflussung des Dispersitätsgrades der kolloiden Enzymlösung.

Die Grösse dieses Einflusses geht aus folgenden Zahlen Onoderas (S. 560) hervor, die sich auf eine Lösung von 0,4 % Urease und eine Reaktionszeit von 17,5 Stunden beziehen:

Opt. Salz	Entwickelt ccm 0,1 n. NH ₃
ohne Zusatz	12,10
NaCl	5,73
BaCl ₂	5,52
CaCl ₂	5,62

J. T. Groll (Proc. Akad. Amsterdam 20, 559; 1917/18) findet, dass der Einfluss der Kationen dominiert; sie hemmen in der Reihenfolge NH₄, K, (Ca, Mg), Na, Sr, Ba. — Schon 5 % KCl setzt die Wirkung herab (Barendrecht, Rec. 39; 1920). — Die verstärkende Wirkung von KCN (Jacoby, Biochem. Zs 76, 275) dürfte eine Aciditätsbeeinflussung sein.

Inwieweit die Wirksamkeit der Urease an die Gegenwart von Neutralsalzen, besonders Phosphat gebunden ist, was durch die Dialyse-Versuche von Onodera nahegelegt wird, wird im hiesigen Laboratorium untersucht.

Neuere Versuche über den Einfluss von Neutralsalzen und Elektrolytmischungen (allerdings nicht konstantes pH) beschreibt Wester².

Aktivatoren. Zahlreiche Angaben über aktivierende Wirkung von Aminosäuren³ und anderen amphoterer Elektrolyten sind, wie Rona und György⁴ gezeigt haben, darauf zurückzuführen, dass die Lösung durch den Zusatz der betreffenden Stoffe näher an das pH-Optimum gebracht worden ist; in Gegenwart von Phosphatpuffer bleiben die Aktivierungen durch

¹ Onodera, Biochem. JI 9, 544; 1915. — Kochmann, Biochem. Zs 151; 1924. (Aktivierung durch Ca.)

² Wester, Biochem. Zs 128, 279; 1922. — Zahlreiche kleinere Mitteilungen des gleichen Autors über Urease findet man in der Pharm. Zentralhalle und in Chemisch Weekblad.

³ Besonders Jacoby u. Mitarb. Takahata, Biochem. Zs 140, sowie Katô, Biochem. Zs 136.

⁴ Rona und György, Biochem. Zs 111, 115; 1920.

Aminosäuren aus. Entsprechende Wirkungen von Seren [Marg. Falk¹, Jacoby und Umeda², Neumann³] fanden Rona und György bei Phosphatpufferung sehr schwach, es ist also sehr wahrscheinlich, dass auch hier eine Aciditätsbeeinflussung etwa auch die komplexe Bindung eines vergiftenden Metalls vorliegt; ob sich daneben noch ein anderer spezifischer Effekt geltend macht, wie Jacoby⁴ und sein Schüler Katô⁵ meinen, ist noch nicht vollkommen aufgeklärt⁶. Bezügl. Atoxyl (Rona) vgl. S. 349.

Bemerkenswert ist der Befund von Onodera, dass Urease durch Dialyse ihre Wirksamkeit verliert, und dass die enzymatische Wirkung durch Mischung von Dialysat und Rückstand wieder hergestellt werden kann. Onodera sieht darin einen Analogiefall mit dem gegenseitigen Verhältnis der „Zymase“ und des von Harden und Young entdeckten spezifischen Aktivators (Co-Zymase) und nimmt die Existenz eines Urease-Co-Enzyms (Co-Urease) an. Der Stoff, den Onodera als Co-Enzym bezeichnet, wird aber durch Erhitzen zerstört.

„Einstündiges Erhitzen auf 80° oder Erhitzen auf den Siedepunkt zerstören sowohl das freie als das gebundene Co-Enzym der Ureaselösung. Aber das Hinzufügen von Co-Enzym bzw. von frischer Urease belebte die Wirkung der Urease ausserordentlich stark.“

Will man einen der beiden Teile der Urease als Co-Enzym bezeichnen, so erscheint es geeigneter, die von Onodera vorgeschlagenen Namen zu vertauschen.

Lövgren gibt Onoderas Versuche in folgender Weise wieder:

Es bedeuten:

E	frische Enzymlösung	da	äussere Flüssigkeit nach der Dialyse
di	innere Flüssigkeit nach der Dialyse	daN	Niederschlag davon
diN	Niederschlag davon	daF	Filtrat
diF	Filtrat		

Eine Ziffer als Exponent bedeutet Erhitzung auf die angegebene Temperatur während 1 Stunde.

In allen Versuchen Onoderas ist das Totalvolumen 50 ccm; die Harnstoffkonzentration 0,15% (max. NH₃ = 42,5 mg); Enzym acetongefällt; Reaktionszeit 16–20 Stunden bei Zimmertemperatur; NH₃ nach Folin bestimmt. Dialysedauer 4–5 Tage.

Tab. III.	mg NH ₃	Tab. V.	mg NH ₃
E	26,7	diF	1,62
di	0,2	diN	1,50
da	0	diF + diN	5,22
di + da	0,4	diF + 2 ccm E	27,29
		diN + 2 ccm E	14,79
		2 ccm E	3,4
Tab. IV.		Tab. XVIII.	
di + da	0,1	E _i Std. ^{80°}	0,1
di + da + 1 ccm E	13,1	E _i Std. ^{80°} + 1 ccm E	19,74
1 ccm E	1,0		

¹ Marg. Falk, Biochem. Zs 59, 298; 1914.
² Jacoby und Umeda, Biochem. Zs 68, 23; 1915.
³ R. Neumann, Biochem. Zs 69, 134; 1915.
⁴ Jacoby, Biochem. Zs 114, 152; 1921.
⁵ N. Katô, Biochem. Zs 136, 498; 1923. Siehe auch Taubmann, Biochem. Zs 157; 1925.
⁶ Nakagawa (Mitt. Med. Fak. Tokyo 28; 1922) nimmt Schutzwirkungen an.

	mg NH ₃
1 ccm E	0,71
Durch einstündige Erhitzung bei 80° wird das Co-Enzym zerstört.	

Tab. XIX.

E ₀ ^{100°} (zum Kochen erhitzt)	0
E ₀ ^{100°} + 1 ccm E	18,58
1 ccm E	0,73
Kochen zerstört das „Co-Enzym“, nicht das Enzym.	

Tab. XX.

di	0,44
di + 1 ccm E	7,77
1 ccm E	0,10
d _{1 Std.} ^{80°}	0,11
d _{1 Std.} ^{80°} + 1 ccm E	4,40
d ₀ ^{100°}	0,03
d ₀ ^{100°} + E	2,86

Tab. XXI.	mg NH ₃
0,5 ccm E frisch	0,19
5 ccm E nach 15 Tagen Stehen bei 36,5°	8,79
5 ccm E nach 15 Tagen Stehen bei 36,5° + 0,1 E (frisch)	18,48

Das „Co-Enzym“ wird beim Stehen zerstört.

Tab. XXII.

2 ccm E (frisch)	2,89
2 ccm E (frisch) + 1 ccm Ochsen-serum	29,19
1 ccm Ochsen Serum	0
di	0,44
di + 1 ccm Ochsen Serum	2,06
5 ccm E _{1 Std.} ^{80°}	0
5 ccm E _{1 Std.} ^{80°} + Ochsen Serum	0,09
5 ccm E _{1 Std.} ^{80°} + 1 ccm E	17,14

Ochsen Serum enthält keine Urease. Alle diese Versuche sind ohne Puffer und ohne Messung von pH ausgeführt.

Auf Veranlassung des Verf. hat Lövgren einige eigene Versuche über den spezifischen Aktivator der Urease ausgeführt, welche hier referiert seien, da noch keine erschöpfende Untersuchung abgeschlossen ist.

Die Bezeichnungweise ist die gleiche wie die oben für Onoderas Versuche angegebene.

7tägige Dialyse und Erhitzung.

Enzym	m/2-Phosphat ccm	H ₂ O ccm	5 m Harnstoff ccm	NH ₃ mg
di	2	25	1	7,8
dy	2	19	1	6,8
di ^{80°}	2	25	1	0,1
dy ^{80°}	2	19	1	0,1
di + dy	2	17	1	22,2
di + dy ^{80°}	2	17	1	17,2
di ^{80°} + dy	2	17	1	7,3

Totalvolumen: 30 ccm. — Temperatur: 16°. — Reaktionszeit: 10 Stunden. — Aussenwasser 3mal gewechselt (bei dy). — di in fließendem Wasser im Dunkeln dialysiert.

Zusammenstellung: di = 7,8	di = 7,8	di ^{80°} = 0,1
dy = <u>6,8</u>	dy ^{80°} = <u>0,1</u>	dy = <u>6,8</u>
14,6	7,9	6,9
di = dy = 22,2	di + dy ^{80°} = <u>17,2</u>	di ^{80°} + dy = <u>7,3</u>
Diff. = <u>7,6</u>	9,3	0,4

Dass die Wirkung von di + dy zusammen bedeutend grösser ist als die Summe deren Wirkungen, kann dadurch erklärt werden, dass durch die Dialyse eine teilweise Scheidung von Enzym und „Co-Enzym“ stattgefunden hat. Nimmt man nun an, dass das Enzym schlechter dialysierbar ist als das „Co-Enzym“ und dass das Enzym hochbeständig sei, so sollte

- di: Enzym + wenig Co-Enzym — di^{80°}: nur Enzym
- dy: Co-Enzym + wenig Enzym — dy^{80°}: nur wenig Enzym

enthalten. Demnach sollte die Wirkung von $dy + di^{80^\circ}$ grösser sein als die Wirkung von $di + dy^{80^\circ}$ — aber das Gegenteil ist tatsächlich der Fall. Nimmt man dagegen an, dass das „Co-Enzym“, aber nicht das Enzym hitzebeständig ist, so enthalten:

di : Enzym + wenig Co-Enzym; di^{80° : nur Co-Enzym (wenig)

dy : Co-Enzym + wenig Enzym; dy^{80° : nur Co-Enzym.

Die Wirkung von $di + dy^{80^\circ}$ muss dann weit grösser ausfallen als die Wirkung von $dy + di^{80^\circ}$, was mit den Ergebnissen des Versuchs übereinstimmt.

Um einen eventuellen pH-Effekt zu eliminieren, machte Lövgren die folgenden Versuche mit der Phosphatkonzentration 0,5 mol. bei $pH = 6,86$. In jeder Probe kamen 5 ccm einer Phosphatmischung von 600 ccm mol.- $Na_2HPO_4 + 250$ ccm NaH_2PO_4 .

Totalvolumen: 10 ccm. — Temperatur: 17° . — Enzym: 10 Tage in fliessendem Wasser im Dunkeln dialysiert. Niederschlag mitgenommen. — Kollodiumschlauch.

Dialysiertes Enzym ccm	$m/1$ -Phosphat ccm	H_2O ccm	Harnstoff	Harnstoffkonzentration Mol. pro Liter	Zeit Min.	NH_3 mg	Max. NH_3 mg	k	a k
2	5	1	2 ccm $m/_{16}$	0,0125	80	2,32	4,26	43	3
2	5	2	1 ccm $m/_{4}$	0,025	80	3,97	8,52	34	4
2	5	1	2 ccm $m/_{4}$	0,05	80	6,45	17,03	26	6
2	5	2	1 ccm $m/_{1}$	0,1	80	8,97	34,06	17	8
2	5	1	2 ccm $m/_{1}$	0,2	80	11,10	68,12	10	10
2	5	2	1 ccm 4 m	0,4	80	12,77	136,24	5,3	11
2	5	1	2 ccm 4 m	0,8	80	13,64	272,48	2,8	11
2	5	2	1 ccm 8 m	1,6	80	14,55	545	1,5	11,5

In den oberen Zeilen sank k bei verdoppelter Harnstoffkonzentration um etwa die Hälfte; a k zeigt in den letzten 4 Zeilen eine ganz geringe Steigerung.

Dann wurde festgestellt, welchen Einfluss eine zugesetzte Menge „Co-Enzym“ — durch einstündige Erhitzung einer frischen Enzymlösung bei 80° erhalten — ausüben würde, wenn durch die starke Pufferkonzentration 0,5 mol. eine Verschiebung von pH ausgeschlossen wird.

Totalvolumen: 10 ccm. — Temperatur: 17° . — Phosphat $m/_{1}$ von $pH = 6,86$. — di : Frische Enzymlösung, 16 Tage in fliessendem Wasser im Dunkeln dialysiert. — E^{80° : Frische Enzymlösung, 60 Minuten bei 80° gehalten.

di ccm	E^{80° ccm	$m/1$ -Phosphat ccm	H_2O ccm	Harnstoff	Harnstoffkonzentration Mol. pro Liter	Zeit Min.	NH_3 mg	Max. NH_3 mg	k	a k
A.										
1	—	5	2	2 ccm $m/_{16}$	0,0125	100	0,58	4,26	6,4	0,4
1	—	5	2	2 ccm $m/_{4}$	0,05	100	1,18	17,03	3,1	0,8
1	—	5	2	2 ccm $m/_{1}$	0,2	100	2,05	68,12	1,3	1,3
1	—	5	2	2 ccm 4 m	0,8	100	2,52	272,5	0,4	1,6
1	—	5	2	2 ccm 8 m	1,6	100	2,62	545	0,21	1,7
										1,5
B.										
1	2	5	—	2 ccm $m/_{16}$	0,0125	100	0,76	4,26	8,5	0,5
1	2	5	—	2 ccm $m/_{4}$	0,5	100	1,50	17,03	4	1,0
1	2	5	—	2 ccm $m/_{1}$	0,2	100	2,50	68,12	1,6	1,6
1	2	5	—	2 ccm 4 m	0,3	100	2,90	272,5	0,5	1,9
1	2	5	—	2 ccm 8 m	1,6	100	3,06	545	0,25	2,0
										1,8

Hier steigt a · k innerhalb der früheren Grenzen nur schwach.

Ein weiterer Versuch gab ein ähnliches Resultat.

Wie erwähnt, bedürfen also diese recht interessanten Verhältnisse weiterer Aufklärung.

Anorganische Paralysatoren.

Wie alle darauf hin untersuchten Enzyme wird auch Urease durch Schwermetallsalze mehr oder weniger vollständig inaktiviert. Besonders wirksam sind, wie immer, Quecksilbersalze — Hata¹, Jacoby² und Yamazaki³ haben besonders Sublimat untersucht —, ferner Silbersalze³, auch Nickelsalze², ferner Kupfer-, Blei- und Mangansalze³ (letztere drei an Ricinus-Urease untersucht). Die meisten der diesbezüglichen Zahlenangaben dürften durch die (leider nicht gemessene) Änderung der Acidität der Enzymlösung beeinflusst sein. Diese Schwermetallsalzwirkungen erfolgen nach stöchiometrischen Verhältnissen und sind reversibel, d. h. das Enzym gewinnt seine Wirksamkeit wieder, wenn es vom Schwermetallsalz befreit wird. So kann Urease nach Quecksilbervergiftung z. B. durch Cyankalium regeneriert werden (Jacoby). Quantitative Vergiftungsversuche lassen sich zu Schlüssen über die Beschaffenheit des Enzyms natürlich nur verwerten, wenn die Enzymlösungen weitgehend gereinigt und das Enzym hinsichtlich seiner Wirksamkeit charakterisiert wurde. Versuche an gereinigten Ureaselösungen lagen bis jetzt nicht vor, die diesbezüglichen Untersuchungen im Laboratorium des Verfassers sind noch nicht abgeschlossen. Das eben erwähnte gilt auch für Fluornatrium, das Urease stark inaktiviert (Falk und Sugiura⁴, Jacoby), sowie Jod (Wester, Chem. Weekbl. 1920).

Alkaliarsenit hemmt nicht (vgl. Tabelle S. 349); Borsäure hemmt vermutlich nur, indem es den Abstand der Lösung vom optimalen pH vergrößert.

Organische Paralysatoren.

Toluol ist, wie zu erwarten, ohne Einwirkung. Phenol, Resorcin, Guajacol, Natrium-Salicylat und Saligenin hemmen in verdünnten Lösungen (0,04 m.) nur wenig⁴. Dagegen sind Hydrochinon und dessen Methyläther ausgesprochene Paralysatoren [H. E. Armstrong, Benjamin und Horton⁵]. Aldehyde inaktivieren (Armstrong, Benjamin und Horton l. c. 1913; Onodera, Biochem. JI 9, 1915; Jacoby, Biochem. Zs 85; 1918), auch Glucose (van Slyke und Zacharias), zum Teil durch Bindung an den Harnstoff, ferner Mannit (Barendrecht). Dichlordiäthylsulfid und Sulfon

¹ Hata, Biochem. Zs 17, 156; 1909.

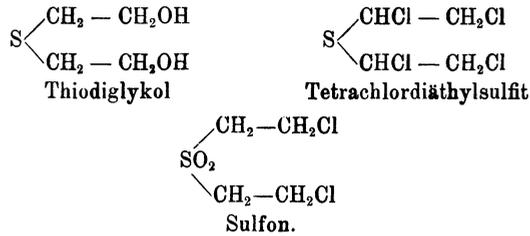
² Jacoby, Biochem. Zs 76, 275; 1916.

³ Yamazaki, Sc. Rep. Tōhoku Imp. Univ. 9, 97; 1920.

⁴ K. G. Falk und Sugiura, JI Am. Chem. Soc. 36, 2166; 1914.

⁵ H. E. Armstrong, Benjamin und Horton, Proc. Roy. Soc. B 86, 328; 1913.

hemmen wenig, Tetrachlordiäthylsulfid hemmt stark. Thiodiglykol und Thiodiglykolacetat sind indifferent¹.



Eine starke Giftwirkung übt nach Jacoby das Senföl aus (Biochem. Zs 74, 107). Cyankalium und Blausäure wirken durch Veränderung der Acidität. Freies Chinin, Atropin und Pilocarpin vergiften, die gemischten Basen Atropin und Pilocarpin wirken additiv auf Urease, nicht antagonistisch. Tannin hemmt nach Wester².

Die Kenntnis der Einwirkung organischer Arsenverbindungen verdankt man Rona und György³, und zwar kamen zur Untersuchung Phenylarsinoxyd, Diphenylarsinchlorid, Diphenylarsinoxyd, Methylarsinoxyd und Atoxyl.

Die folgende Tabelle (vgl. l. c. S. 129) gibt bei 3stündiger Versuchsdauer den Umsatz des Harnstoffes in Prozenten.

Zusammensetzung der Lösung: 1 ccm 2%iger Harnstofflösung + 2 ccm 1/3 m. Phosphatgemisch + 2 ccm destilliertes Wasser (bzw. die entsprechende Giftlösung) + 0,2 ccm 1%ige filtrierte Ureaselösung. Acidität: pH (elektrom.) 7,27—7,34.

Substanz	Umsatz %	Substanz	Umsatz %
1. Phenylarsinoxyd (wässer. Lös.) . .	17,5	4. Methylarsinoxyd	9,7
„ (alkoh. Lös.) . .	4,8	5. Arsenige Säure ⁴	23,9
2. Diphenylarsinchlorid (wässer. Lös.)	0	6. Atoxyl	30,8
„ (alkoh. Lös.)	0	Alkohol 1:4	22,1
3. Diphenylarsinoxyd (wässer. Lös.)	11,7	Destilliertes Wasser	21,9
„ (alkoh. Lös.)	4,3		

Wie ersichtlich hemmen die vier ersten Stoffe erheblich, bzw. vollständig, während Atoxyl aktiviert. Die Vergiftung durch Methylarsinoxyd macht sich noch bei ca. 1 Millimol/Liter der Substanz stark geltend.

Alkohole. Den nicht sehr stark hemmenden Einfluss dieser Stoffe fanden schon Armstrong, Marshall und van Slyke. In kleineren Konzentrationen üben Alkohole eine geringe aktivierende Wirkung aus, wie die folgende Tabelle von Onodera zeigt (Versuch mit 0,5% Urease).

¹ Rona und Petow, Biochem. Zs 111, 134; 1920. — Bezüglich der Giftwirkung der Chlorderivate des Thiodiglykols siehe Heubner, Naturwissenschaft 8, 247; 1919.
² Wester, Chem. Weekbl. 17, 222; 1920.
³ Rona und György, Biochem. Zs 111, 115; 1920.
⁴ Richtiger Na-Arsenit. Vielleicht würde arsenige Säure (auf der sauren Seite des Aciditäts-Optimums) hemmen.

Alkohol und Konzentration	ccm 0,1 n. NH ₃ in 7 St.	Alkohol und Konzentration	ccm 0,1 n. NH ₃ in 7 St.
—	5,99	0,2 m. Propyl	1,21
0,2 m. Methyl	6,08	0,025 m. Amyl	6,46
0,2 m. Äthyl	6,06		

Schon durch 5%igen Äthylalkohol fand Barendrecht¹ eine kleine Hemmung.

Auch die Wirkung von Glycerin ist nur gering (Wester, Spillmann). Einige Autoren bringen den Einfluss der höheren Alkohole mit ihrer Eigenschaft, die Oberflächenspannung des Wassers stark zu erniedrigen in Beziehung. Isocapillare Alkohole zeigen nämlich gleichen Effekt gegenüber Urease (Onodera, S. 568). Auch die hemmende Wirkung der Saponine wird auf die gleichen Ursachen zurückgeführt (Bayliss, Arch. Neerl. Physiol. 2, 1918).

Organische Lösungsmittel.

Auch in solchen Mengen, in welchen der zugesetzte Äthyl-Alkohol bereits einen erheblichen Teil des Lösungsmittels ausmacht (etwa 10—40 Volum.-%), ist sein verzögernder Einfluss nur gering. Der folgende Auszug aus einer Tabelle von Marshall jr.² (l. c., S. 360) zeigt die Grössenordnung dieses Einflusses.

5 ccm 2%ige Harnstofflösung mit Wasser oder Alkohol auf 95 ccm verdünnt, auf 35° erwärmt und versetzt mit 1 ccm Soja-Bohnen-Extrakt + 9 ccm Wasser. Reaktionszeit: 30 Minuten.

Volum.-% Alkohol:	0	10	20	30	40	60	80
% Harnstoff zerlegt:	23,1	22,8	21,7	20,8	19,0	15,5	6,9

Auch das längere Verweilen des Enzyms in wässrig-äthylalkoholischer Lösung bei Zimmertemperatur bewirkt nach Marshall keine grosse Schädigung.

1 ccm Soja-Bohnen-Extrakt wurde gemischt mit 9 ccm Alkohol und Wasser zur Herstellung des gewünschten Alkoholgehaltes. Die Mischungen blieben dann 2 bzw. 22 Stunden bei Zimmertemperatur stehen. Dann wurden dieselben mit Wasser auf 95 ccm verdünnt, auf 35° erwärmt und mit 5 ccm einer 5%igen Harnstofflösung versetzt. Der Fortschritt der Reaktion nach 60 Minuten ist durch die Anzahl ccm 0,1 n. HCl angegeben.

Volum.-% Alkohol:	0	10	20	30	40	60	80	90
Inkubationszeit 2 St.:	15,85	15,80	15,70	15,62	15,39	15,40	15,38	15,16
Inkubationszeit 22 St.:	14,69	14,75	14,48	14,26	13,62	13,04	12,41	12,75

¹ Barendrecht, Rec. Trav. Chim. P. B. 39, 1; 1920.

² Marshall, JI Biol. Chem. 17, 351 und zw. 360; 1914.

Nach N. N. Iwanoff¹ ist Urease in 95 %igem Alkohol unlöslich, aber noch wirksam. Einen Versuch mit 30 Volum.-% Alkohol haben auch D. D. van Slyke und Zacharias angestellt; sie berechnen daraus, dass die beiden Konstanten c und d der van Slykeschen Formel (vgl. S. 358 und Tl. I, 4. Kap. B.) erniedrigt werden, und zwar d um 50%, c nur um 29%.

Aceton verhält sich gegenüber Urease ungefähr wie Äthylalkohol.

B. Kinetik.

1. Reaktions-Stufen und zeitlicher Verlauf.

Bevor wir auf die Formeln eingehen, welche für den zeitlichen Verlauf der Urease-Wirkung angegeben worden sind, müssen wir nochmals den schon einleitungsweise S. 335 erwähnten chemischen Vorgang der enzymatischen Harnstoff-Spaltung besprechen.

Zunächst können wir aus den Erfahrungen der chemischen Kinetik, besonders bezüglich der Verseifung der Ester zweibasischer Säuren den Schluss entnehmen, dass der Harnstoff nicht beide Amid-Gruppen gleichzeitig gegen OH austauschen wird, dass also die Hydrolyse nicht in einem Stadium nach dem Schema verläuft:



Vielmehr haben wir anzunehmen, dass die Reaktion, wie immer in ähnlichen Fällen, in zwei Stufen verläuft, von denen hier die Bildung von Ammoniumcarbamat die erste ist:

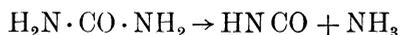


welcher dann die Spaltung nachfolgt

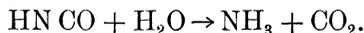


Es würden also nur noch die Fragen zu beantworten sein a) mit welchen relativen Geschwindigkeiten die beiden Vorgänge verlaufen und b) welche der beiden Reaktionen von der Urease katalysiert wird, wenn nicht Untersuchungen der nicht-enzymatischen Harnstoffspaltung Tatsachen ergeben hätten, welche hier zunächst eine kurze Besprechung erfordern.

Gestützt auf eine ältere Untersuchung von J. Walker und Hambly (1895) hatte Fawsitt² 1902 gezeigt, dass die Hydrolyse des Harnstoffs durch Säuren, Alkalien oder kochendes Wasser nicht als einfache Hydrolyse verläuft, sondern dass als 1. Stufe bzw. als Zwischenprodukt Ammoniumcyanat auftritt, welches hierauf zu Ammoniumcarbonat hydrolysiert wird, gemäss den auch durch E. A. Werners Arbeiten (1918—1920) gestützten Formeln:



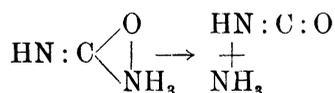
und



¹ N. N. Iwanoff, *Biochem. Zs* 150, 108; 1924. — Siehe auch Bayliss, *Jl of Physiol.* 50, 85; 1915. — Jacoby, *Biochem. Zs* 158, 334; 1925.

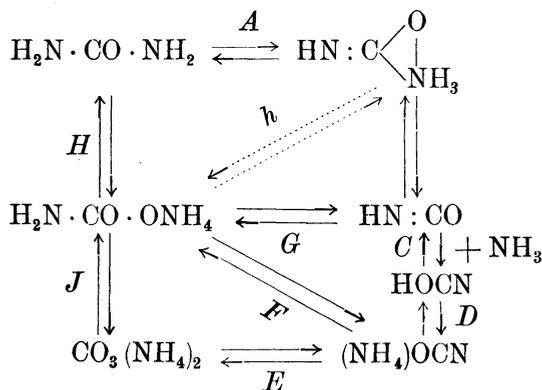
² Fawsitt, *Zs physik. Chem.* 41, 601; 1902. — Burrows und Fawsitt, *Jl Chem. Soc.* 105, 609; 1914.

Kürzlich (1923) hat nun Fearon¹ auch nach der Einwirkung von Urease auf Harnstoff Cyansäure als Silbersalz aus der Lösung isolieren können; im Verlauf der enzymatischen Reaktion erreicht die Menge nachweisbarer Cyansäure bald ein Maximum. Allerdings sind die Mengen Cyanat im Verhältnis zum angewandten Harnstoff nur klein (0,1 g Silbercyanat aus 1 l 5%iger Harnstofflösung). Die Gründe, welche Fearon für die Annahme beigebracht hat, dass die kleinen Mengen Cyansäure nicht ein Nebenprodukt, sondern das Zwischenprodukt der Gesamtreaktion sind, scheinen dem Verf. nicht beweisend, und ich kann also der Auffassung, dass die Urease ein dissoziierendes Enzym ist, welches der Harnstoff nach der Formel spaltet:



nicht beistimmen, besonders nachdem Mack und Villars² gezeigt haben, dass bei der Einwirkung von Ureasen auf Harnstoff Ammoniumcyanat neben Ammoniumcarbonat entsteht (vgl. auch S. 354).

Mack und Villars haben an eigene, bemerkenswerte Versuche eine Kritik angeschlossen, welche die Sachlage gut beleuchtet:



Der Übergang des Harnstoffs in Ammoniumcyanat durch die Reaktionen *A B C D* ist sehr langsam. Von den vier Teilvorgängen verläuft *D* (als einfache Neutralisation) sehr schnell. Auch *A* und *C*, tautomere Umlagerungen, gehen wahrscheinlich schnell vor sich. Somit bleibt *B* als diejenige Reaktion übrig, deren Geschwindigkeit diejenige des Totalumsatzes *A B C D* bestimmt. Indessen kann *B* nicht die durch die Urease katalysierte Reaktion sein, denn 1. wird mit den Versuchen von Mack und Villars die entgegengesetzte Reaktion: Cyanat \rightarrow Harnstoff durch das Enzym nicht katalysiert und 2. sind die Reaktionen *E* und *FJ* langsamer als *B* (nach den Ergebnissen von Walker-Kay und von Werner). Somit kann die Urease keinen Teilvorgang

¹ Fearon, Biochem. JI 17, 84; 1923.

² Mack und Villars, JI Amer. Chem. Soc. 45, 505; 1923.

der Kette $ABCD$ katalysieren. Das Stadium E scheidet (in der Reihe $ABCDE$) aus, da B viel langsamer verläuft als die gemessenen Umwandlungsgeschwindigkeiten Harnstoff \rightarrow Ammoniumkarbonat in Gegenwart von Urease. J verläuft zwar beinahe augenblicklich in saurer Lösung, aber sehr langsam in neutraler oder alkalischer Lösung. Der Vorgang F muss, wenn er überhaupt eintritt, nach Walkers und Kays Versuchen sehr langsam verlaufen. Die Reihen $ABCDE$ und $ABCDFJ$ sind damit ausgeschlossen. Nun ist H als ausserordentlich langsame Reaktion bekannt, und da E sehr langsam ist, so sind die beiden Ketten HFE und $HGCDE$, welche beide H und E enthalten, unmögliche Vorgänge. . . . „Wir sind nun beschränkt auf die Möglichkeiten $ABGJ$ und HJ . Es ist aber bereits gezeigt worden, dass B nicht die katalysierte Reaktion ist und jede andere Stufe von $ABGJ$ ist wegen der ausserordentlichen Langsamkeit von B ausgeschlossen.“

Es bleiben nun die Stufen H und J über. Mack und Villars haben nun an 0,1 mol. Harnstofflösung und 0,1% Urease bei 25° die Harnstoffspaltung nach der Stufe HJ mit der Methode von Fosse verfolgt und gleichzeitig den Einfluss der Urease auf die Bildung von Ammoniumcyanat studiert. Während nun Armstrong und Horton behaupteten, dass Urease die Bildung von Cyanat hindert, fanden die amerikanischen Autoren, dass die Umwandlung Harnstoff \rightarrow Ammoniumkarbonat von der Bildung von Ammoniumcyanat begleitet wird, welche vermutlich unbeeinflusst von Cyanat verläuft.

Die Geschwindigkeit der Reaktion Ammoniumcarbammat \rightarrow Ammoniumcarbonat verläuft nach einer von Faurholt¹ in Bjerrums Laboratorium ausgeführten Untersuchung in schwach saurer Lösung in weniger als einer Sekunde.

Auch in annähernd neutraler Lösung (beim Wirkungsoptimum der Urease, $\text{pH} = 7,4$) ist die Zersetzungsgeschwindigkeit noch gross, es wird aber ein Gleichgewichtszustand erreicht, welcher vorwiegend Carbonat enthält. Dass die Urease die Stufe J nicht beeinflusst, hat schon Bayliss gezeigt.

Aus den Versuchen von Yamasaki² — die freilich analytisch noch verfeinert werden müssen — zeigt sich, dass Carbamat als Zwischenprodukt bei der enzymatischen Harnstoffspaltung gebildet wird; die Carbamatkonzentration erreicht im Verlauf der Harnstoffspaltung ein Maximum und nimmt dann wieder ab.

Als Folgerung aus obiger Überlegung ergibt sich, dass es die Stufe H oder h ist, welche von der Urease beschleunigt wird. Ammoniumcyanat wird auch bei der enzymatischen Harnstoffspaltung als Nebenreaktion gebildet.

¹ Faurholt, Zs anorg. Chem. 120, 85; 1921. — Siehe auch Fenton, Proc. Roy. Soc. 39, 386; 1886.

² Yamasaki, Sc. Rep. Tôhoku. Univ. 9, 97; 1920.

Die enzymatische Reaktion

Harnstoff \rightleftharpoons Ammoniumcarbamat

ist reversibel; wir werden auf die Synthese noch besonders zurückkommen.

Den nun zu besprechenden kinetischen Untersuchungen muss noch folgende Bemerkung vorausgeschickt werden. Bei den meisten der hier in Betracht kommenden Untersuchungen wurde die Harnstoffspaltung durch die Messung des aus der Harnstofflösung nach Zusatz von Soda oder Pottasche austreibbaren Ammoniaks nach der Methode von Folin (vgl. Methodik S. 372) verfolgt. Es fragt sich nun, was dabei bestimmt wird.

a) Ohne weiteres wird freigemacht:

1. Das gesamte Ammoniak des Ammoniumcarbonats,
2. das Ammonium des Ammoniumcarbamats,
3. das Ammonium des als Nebenprodukt gebildeten Ammoniumcyanates.

b) Nach sekundärer Einwirkung der alkalischen Lösung

4. das aus der NH_2 -Gruppe des Carbamats stammende Ammoniak,
5. das durch Umwandlung des Cyansäurerestes freiwerdende Ammoniak.

Die unter b) angegebenen Ammoniakmengen entstehen nicht augenblicklich, und ob sie im Verlauf des Luftdurchleitens quantitativ gebildet werden und in die vorgelegte Schwefelsäure übergehen, hängt von den speziellen Versuchsbedingungen ab.

Jedenfalls stammt aber die in jeder Probe gefundene Ammoniakmenge aus verschiedenen Reaktionsstadien her, und dies darf bei der genauen, rechnerischen Verwertung der gefundenen Zahlen nicht übersehen werden.

Da die Umwandlung Ammoniumcarbamat — Ammoniumcarbonat bei der für Urease optimalen Acidität recht rasch verläuft, wird man im allgemeinen keine grossen Fehler begehen, wenn man die gefundene Ammoniakmenge mit dem nach Stufe *H* (oder *h*) zersetzten Harnstoff proportional setzt. Weitere Prüfungen sind aber erforderlich.

Der zeitliche Verlauf der Harnstoffspaltung.

Die ersten Versuche, eine Einsicht in das zeitliche Fortschreiten der Reaktion zu gewinnen, verdankt man Moll¹. Etwa ein Dezennium später haben Armstrong und seine Mitarbeiter² einen Anschluss des Reaktionsverlaufes an die für monomolekulare Reaktionen gültige Formel gesucht, aber nicht gefunden. Da wir nunmehr wissen, dass einfache Beziehungen nicht zu erwarten sind, wenn wir nicht die Urease durch Konstanthaltung der

¹ Moll, Hofm. Beitr. 2, 344; 1902.

² H. E. Armstrong und Horton, Proc. Roy. Soc. B. 85, 109; 1912 und 86, 561; 1913. — H. E. Armstrong, Benjamin und Horton, 86, 328; 1913.

optimalen Acidität durchweg auf das Maximum ihrer Wirksamkeit einstellen, so lassen sich die genannten Arbeiten in kinetischer Hinsicht nicht mehr bewerten, und wir gehen gleich zu den Untersuchungen D. D. van Slykes und seiner Schüler über, welche den Einfluss der Wasserstoffionen-Konzentration berücksichtigt haben. Besondere Massregeln zur Aufrechterhaltung einer bestimmten Acidität sind ja bei dieser Enzymreaktion um so notwendiger, als die Lösung mit fortschreitendem Grad der Harnstoffspaltung immer ammoniakreicher und also um so alkalischer wird; so änderte sich pH z. B. in einer 5%igen Harnstofflösung nach Zusatz von Enzym von 6,5 bis 9,3 (van Slyke und Zacharias, S. 184).

„Durch Zufügen einer Mischung von primärem und sekundärem Phosphat in Mengen, welche im Verhältnis zum gebildeten Ammoniak gross sind, kann der Einfluss des letzteren auf die Acidität der Lösung gegen die alkalische Seite hin fast vollständig¹ aufgehoben werden. Unter diesen Bedingungen beeinflusst Ammoniak die Reaktionsgeschwindigkeit nicht.“

¹/₂-molekulare Phosphat-Konzentration.

0,5 m. Na ₂ HPO ₄	70 ccm	pH zu Anfang 6,97 pH nach 260 Minuten 7,16 Temperatur 20°
0,5 m. KH ₂ PO ₄	30 „	
10%ige Urease-Lösung	1 „	
Harnstoff	1 g	

Minuten	x 1 n. NH ₃ per Liter	Mittlere Geschwindigkeit x : t	10 ⁴ /t log $\frac{a}{a-x}$ (ber. Euler)
7	3,4	0,48	21
14	6,8	0,48	22
25	12,2	0,48	22
33	15,2	0,46	22
55	26,4	0,48	25
66	28,7	0,44	22
85	39,7	0,47	26

„Das Enzym — schreiben van Slyke und Zacharias (S. 190) — zersetzt während eines erheblichen Teiles des Reaktionsverlaufes per Minute die gleiche Menge Harnstoff, und die Geschwindigkeitskurve wird eine gerade Linie.“ „Diese Beziehung bleibt aber nicht bestehen, bis der gesamte Harnstoff zersetzt ist, sondern nur so lang er sich in genügendem Überschuss befindet“.

Wir führen ferner eine Versuchsreihe von Barendrecht (Rec. 39,1, und zwar 15, 1916) an, die allerdings mit der sehr geringen Harnstoffkonzentration 0,02% angestellt ist (um pH konstant zu halten); deshalb sind die

¹ Die völlige Ausschaltung des Einflusses der fallenden h ist aber nur möglich, wenn man sich, wie van Slyke getan hat, auf kleine Harnstoffkonzentrationen (unter 0,2 m.) beschränkt und hohe Pufferkonzentrationen (0,5 m. PO₄) verwendet; in späteren Arbeiten waren diese Bedingungen nicht immer eingehalten. Bei Verwendung hoher Konzentrationen von Phosphatpuffer ist aber die hemmende Wirkung des PO₄-Ions zu beachten.

Fehlergrenzen der Werte der Spalte 2 zu gross, um eine genaue Prüfung der Formel zuzulassen.

3 g Soja in 100 ccm mit 7,28 g Na_2HPO_4 , 2 aq + 2,32 g KH_2PO_4 . — 50 ccm des Filtrates gemischt mit 100 ccm H_2O + 1,92 g Na_2HPO_4 + 7,68 g KH_2PO_4 . Temperatur 27°. pH = 6,13.

Minuten	0,02 n. NH_3 korr. ccm	x	$k \cdot 10^4 = 10^4/t \log \frac{a}{a-x}$	m (Barendrecht)
60	0,6	0,15	11,8	0,00090
90	0,8	0,20	10,8	82
120	1,0	0,25	10,4	79
150	1,25	0,31	10,7	82
180	1,45	0,36	10,8	82
210	1,7	0,425	11,4	87
240	1,85	0,46	11,1	84
270	2,1	0,525	12,0	90
315	2,2	0,55	11,0	83
370	2,4	0,60	10,7	81

Wir geben von den zahlreichen Versuchen Barendrechts noch einen zweiten an, der bei optimaler Acidität angestellt ist (Tab. 9, S. 16).

0,75 g Soja in 100 ccm mit 7,28 g Na_2HPO_4 , 2 aq + 2,32 g KH_2PO_4 . — 50 ccm des Filtrates gemischt mit 100 ccm H_2O + 8,64 g Na_2HPO_4 , 2 aq + 0,96 g KH_2PO_4 . pH = 7,21.

Minuten	0,02 n. NH_3 korr. ccm	x	$k \cdot 10^4$	m (Barendrecht)
20	0,95	0,238	60	0,00060
40	1,70	0,425	60	58
60	2,30	0,575	62	57
80	2,78	0,695	64	57
100	3,15	0,788	67	57
120	3,45	0,86	71	58
150	3,65	0,91	70	55
180	3,75	0,94	68	52
210	3,90	0,975	76	56

Bei Versuchen mit pH = 7,52 und 7,64 sowie 7,75 fand Barendrecht Werte für x, aus welchen sich zeitlich ziemlich stark ansteigende Reaktionskoeffizienten 1. Ordnung ergaben.

Die Geschwindigkeits-Konstanten m der letzten Spalte in den beiden letzten Tabellen beziehen sich auf die von Barendrecht aufgestellte Formel:

$$\frac{nc}{0,434} \log \frac{1}{1-x} + ax = mt,$$

in welcher bedeutet: c die Konzentration der Wasserstoffionen (g in 100 ccm)

n den Absorptionskoeffizienten der Wasserstoffionen (1 g H' absorbiert n-mal mehr Strahlung als 1 g Harnstoff).

Diese Formel ist abgeleitet unter der Annahme, dass die aktive Urease (wie auch andere Enzyme) eine Strahlung aussendet, welche in einem gewissen Abstand vom Enzymmolekül

wirksam ist und sowohl vom Substrat¹ als von den Wasserstoffionen absorbiert wird. Da bisher keine Tatsachen vorliegen, welche es wahrscheinlich machen, dass Enzyme sich bezüglich einer eventuellen Emission von Strahlen anders verhalten als andere organische Katalysatoren, so kann ich die Theorie von Barendrecht einstweilen nicht als genügend begründet ansehen; ich verweise übrigens auf das im I. Teil der 3. Auflage dieses Buches Gesagte.

Was die Konstanz der Reaktionskoeffizienten 1. Ordnung $k = 1/t \ln a/a-x$ betrifft, so weichen die oben angegebenen Versuche nicht sehr stark von der Forderung der Theorie ab.

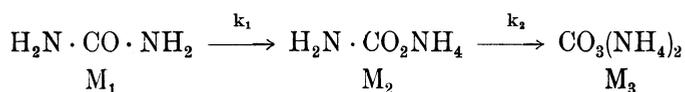
Das gleiche gilt z. B. für die folgenden Versuche von Yamasaki (1920, S. 119). Die k -Werte sind mit natürlichen Logarithmen berechnet².

Totalvolumen: 100 ccm. Temp. 25°. Harnstoff-Konzentration = 0,0200. g-Urease = 0,05 g.

a			b		
Minuten	Harnstoff-Konz.	$k \cdot 10^4$	Minuten	Harnstoff-Konz.	$k \cdot 10^4$
0	0,02000	—	0	0,02000	—
45,5	0,01892	12,0	45,9	0,01864	15,5
96,6	0,01624	21,6	96,2	0,01776	12,4
157,5	0,01574	15,2	158,0	0,01586	14,7
217,5	0,01444	15,0	216,0	0,01442	15,7
273,4	0,01330	14,9	273,8	0,01300	15,7
345,9	0,01238	13,9	346,0	0,01176	15,3

Bei anderen Reihen ist die Konstanz der k -Werte weniger deutlich oder kommt gar nicht zum Vorschein. Dies ist z. B. beim ersten der folgenden Versuche von Lövgren (1921, S. 269) der Fall.

Der theoretische Teil der Arbeit von Yamasaki verdient besondere Erwähnung. Er betont nämlich den stufenweisen Verlauf der Reaktion



Bezeichnet man mit $a-x_1$ die Konzentration von M_1 zur Zeit t

„ $a-x_2$ „ „ „ M_2 „ „ t

und mit k_1 und k_2 die entsprechenden Geschwindigkeitskonstanten, so erhält man durch Integrierung der Differentialgleichungen

$$\frac{d x_1}{d t} = k_1 (a - x_1) \quad \text{und} \quad \frac{d x_2}{d t} = k_2 (a - x_2)$$

die Ausdrücke, welche gestatten, C_{M_1} , C_{M_2} und C_{M_3} zu bestimmen, wenn k_1 , k_2 und a bekannt sind.

¹ Siehe auch Barendrecht, Zs physik. Chem. 40, 456; 1904 und Biochem. JI 7, 559; 1913.

² Yamasaki puffert mit Ammoniumcarbonat bzw. mit einem CO_2 -Strom (wie früher Armstrong).

$$\text{Wenn} \quad t = \frac{\ln k_2 - \ln k_1}{k_2 - k_1},$$

so hat C_{M_1} sein Maximum und C_{M_2} die Inflexion. Die Konzentration von M_3 wird vernachlässigt werden können, wenn t sich 0 nähert.

Die Konzentration des durch die Reaktion gebildeten Ammoniaks ist offenbar gegeben durch die Formel:

$$C_{NH_3} = C_{M_1} + 2 C_{M_2},$$

daher ist der zeitliche Verlauf der NH_3 -Bildung

$$\frac{d C_{NH_3}}{d t} = \frac{d C_{M_1}}{d t} + 2 \frac{d C_{M_2}}{d t}.$$

Für eine eingehendere Prüfung dieses Ansatzes reichen die vorliegenden Versuchsdaten noch nicht ganz aus, besonders weil auch noch die Konzentration des Cyanations ermittelt werden muss; es ist aber wünschenswert, dass das experimentelle Material in dieser Hinsicht bald ergänzt wird.

Ich führe schliesslich noch einige Versuche von Lövgren (1921, S. 269) an:

5 ccm 1 mol. Phosphatmischung + 4 ccm 0,25 n. Harnstoff + 1 ccm Enzymlösung. Totalvolumen somit 10 ccm. Temperatur 17°. (Harnstoff-Konzentration 0,1 Mol. per Liter.)

E ₁						
Minuten	NH ₃ mg	Max. NH ₃ mg	k	a k	pH	c
15	7,21	34,06	69	34	7,0	28
30	13,95	34,06	76	38	7,15	31
45	20,38	34,06	88	44	7,28	38
60	26,47	34,06	109	54	7,41	49
						37
F ₁						
15	8,06	68,12	37	37	7,02	23
30	15,53	68,12	37	37	7,18	24
45	22,21	68,12	38	38	7,31	24
60	28,57	68,12	39	39	7,47	25
Mittel: 38						24

Zum Teil mögen die steigenden k -Werte mit der Inkonzanz der Acidität (siehe vorletzte Spalte) zusammenhängen.

Die letzte Spalte der beiden Tabellen enthält die Konstante c der Formel von D. D. van Slyke

$$t = \frac{1}{E} \left(\frac{1}{c} \log \frac{a}{a-x} + \frac{x}{d} \right)$$

E = Enzymkonzentration, c = Geschwindigkeit der Enzymbindung,
 a = Substratkonz. am Anfang, d = „ „ „ Substratzersetzung.
 $a-x$ = Substratkonz. zur Zeit t ,

[Siehe I. Teil, 4. Kapitel, Formel (24).]

Wie im I. Teil ausführlicher besprochen, hat van Slyke, wie früher Adrian Brown, die Annahme gemacht, dass die Bindung zwischen dem Enzym und seinem Substrat eine gewisse messbare Zeit erfordert, welche neben der Zeit der Substratspaltung für den Gesamtverlauf der Reaktion in Betracht kommt. Wir werden aber auch in dem speziellen Fall der Urease-spaltung sehen, dass gegen die von van Slyke vorgeschlagene theoretische Behandlung schwerwiegende Einwände gemacht werden können.

Einfluss der Harnstoffkonzentration.

Zahlreiche ältere Versuche (Marshall, Armstrong und Horton, auch einige Serien von van Slyke und Cullen) sind ohne Puffer und teilweise bei nicht konstantem pH angestellt; bei anderen war die Acidität einigermaßen konstant, indem das auftretende Ammoniak während der ganzen Reaktion durch einen CO_2 -Strom neutralisiert wurde (Armstrong, Benjamin und Horton); dies entspricht gewissermaßen einem Ammoniumcarbonatpuffer.

Berechnet man aus der Tabelle C (S. 33) der letzteren Forscher die Reaktionskonstanten 1. Ordnung k für die Zeit 30 Minuten, so erhält man folgende Werte:

Harnstoff-Konz. a	$k \cdot 10^4$	$a \cdot k \cdot 10^4$
0,2	150	30
0,5	35	17,5
1,0	18	18 (Mittelw.)
2,0	6,5	13
5,0	3	15

Der Reaktionskoeffizient 1. Ordnung k fällt also mit steigender Harnstoffkonzentration. Im vorliegenden Fall ist $a \cdot k$ von der Konzentration $a = 0,5$ an einigermaßen konstant¹. Das Bereich der Konstanz von $a \cdot k$ hängt, wie wir später sehen werden, von der anwesenden Enzymmenge und einigen anderen Umständen ab.

Andere diesbezügliche Versuche ohne Puffer findet man bei van Slyke und Cullen (S. 143 und 144).

Aus der Tabelle S. 143 entnehmen wir:

Harnstoffkonzentration, a in %	1	2	3	4	5	10	20	40
In 15 Min. bei 20° % Harnstoff zersetzt . .	30,6	15,5	9,6	7,6	6,1	3,0	1,1	0,4
$a \times$ % zersetzt Harnstoff	30,6	31	23,8	30,4	30,5	30	22	16

Bei 1—10%igen Harnstofflösungen wäre also auch hier $a \cdot k$ konstant.

Weitere Versuche bei Wester² und Lövgren (1921, S. 245).

¹ Die Salzwirkung des Ammoniumcarbonats macht sich hier auch geltend.

² Wester, Ber. d. Dtsch. pharm. Ges. 30, 163; 1920.

Grösseres Interesse bieten natürlich die Versuche, bei welchen die Konstanz der Acidität durch Puffer eingehalten und durch pH-Messungen garantiert wurde.

Hier sind zunächst die folgenden Ergebnisse von van Slyke und Cullen (S. 146) anzuführen:

1 ccm Enzymlösung (1%) + 5 ccm 1 mol. Phosphatmischung + 4 ccm Harnstofflösung wechselnder Konzentration. Gesamtvolumen 10 ccm. Temperatur 20°. Reaktionszeit 60 Minuten.
pH etwa 6,8–6,9. $E = 0,1$.

1	2		3	4		5	6	7	8		
Harnstoffkonz. %	n/100-NH ₃		Harnstoffkonzentration Mol. pro Liter	NH ₃		$k \cdot 10^4$ $\frac{1}{t} \log \frac{a}{a-x}$	a · k · 10 ⁴	d	0,4343 c =		
	a Max.	x gefund.		a Max.	x gefund.				$\frac{d}{dEt-x} \cdot \log \frac{a}{a-x}$	van Slyke	Barendrecht
	ccm	ccm		g	g						
0,0375	12,5	5,8	0,00625	2,13	0,99	45	0,27		0,055	0,056	
0,075	25	10,4	0,0125	4,26	1,77	39	0,49		58	59	
0,15	50	15,5	0,025	8,52	2,64	27	0,67		53	54	
0,3	100	21,2	0,05	17,03	3,60	17,3	0,86		52	55	
0,6	200	24,8	0,1	34,06	4,22	9,6	0,96		51	48	
1,2	400	27,0	0,2	68,12	4,59	5,0	1,01		52	39	
2,4	800	28,5	0,4	136,24	4,85	2,6	1,04		52	33	
4,8	1600	31,0	0,8	272,48	5,27	1,4	1,13	5,17			
9,6	3200	31,0	1,6	544,96	5,27	0,7	1,12	5,17			

Betrachten wir die aus den gemessenen NH₃-Mengen berechneten k-Werte, so sehen wir, dass dieselben auch im Gebiet der kleinsten Harnstoffkonzentrationen nicht konstant sind. Von etwa 0,1 n. Harnstoff an finden wir $a \cdot k \cdot 10^4$ rund 1,0; auf diesen letzten Wert kommen wir noch zurück.

Die drei letzten Spalten der Tabelle beziehen sich auf die Theorie von van Slyke. Zunächst finden wir d angegeben und hierauf (in der vorletzten Spalte) die von van Slyke und Cullen berechneten Werte 0,4343 · c. Ohne zu wiederholen, was im I. Teil über die van Slykesche Voraussetzung als Grundlage einer allgemeinen Theorie der Enzymreaktionen gesagt wurde, sei hier nur darauf hingewiesen, dass — worauf Barendrecht (Rec. 39, S. 3) aufmerksam machte — der Ausdruck 0,4343 c keineswegs eine gute Konstanz aufweist, sondern schon im Gebiet mässiger Harnstoffkonzentrationen, 0,1 n. bis 0,4 n., bei richtiger Rechnung erheblich fällt.

Aus Messungen von Barendrecht (l. c. S. 45) ersieht man ebenfalls das Konzentrationsgebiet des Harnstoffs, in welchem unter gleichen Umständen in gleichen Zeiten gleiche NH₃-Mengen entwickelt werden. Ich gebe folgenden Auszug:

ccm 0,02 n. NH₃, gebildet in 120 Minuten.

Harnstoff-Konz. ‰	pH = 6,68	pH = 6,89	pH = 7,14	pH = 7,47	pH = 8,10
0,03	0,58	1,2	1,65	3,2	2,9
0,05	0,90	1,7	2,25	3,45	3,2
0,08	1,3	2,3	2,7	4,05	3,2
0,1	1,6	2,5	3,0	4,15	3,4
0,2	2,3	3,4	3,55	4,65	3,7
0,5	3,3	4,3	4,1	5,0	3,8
1,0	3,9	4,65	4,3	5,05	3,9
2,0	4,45	5,2	4,5	5,15	4,1
4,0	4,8	5,4	4,45	5,25	3,9
6,0	4,85	5,3	4,45	4,45	3,65
8,0	4,8	5,15	4,25	4,60	3,25

Auch hier zeigt sich wie oben das Maximum der NH₃-Entwicklung bei einer Harnstoff-Konzentration von 0,05 n. bis 1 n.

Schliesslich können noch die Versuche 22, 23 und 46 von Lövgren (1921, S. 265, 266 und 284) erwähnt werden. Letzterer Versuch sei mitgeteilt:

1 ccm Enzymlösung + 5 ccm 1 mol. Phosphatmischung. Gesamtvolumen 10 ccm. Temperatur 17°.

Harnstoff- konzentration Mol. pro Liter	Minuten	NH ₃ mg	Maximum NH ₃ mg	k · 10 ⁴	a k · 10 ⁴	pH Mittel	pH- Optimum
0,0125	4	1,70	4,26	553	35	7,68	7,69
0,025	8	3,53	8,52	290	36	7,62	7,62
0,05	8	3,86	17,03	139	35	7,50	7,55
0,1	8	4,13	34,06	70	35	7,50	7,48
0,2	8	4,24	68,12	35	35	7,39	7,41
0,4	8	4,33	136,24	17,5	35	7,30	7,35
0,8	8	4,40	272,48	8,8	35	7,30	7,27
1,6	8	4,46	545	4,4	35,5	7,20	7,20

Hiernach wäre das Bereich der Konstanten a · k noch grösser als nach van Slykes Messungen; ob die Grenze tatsächlich bis etwa 0,016 n. geht, wird noch weiter zu prüfen sein.

Aus dieser vorläufig angenommenen Zahl würde sich für die Affinitätskonstante K_M der Urease zum Substrat berechnen, wenn [] die Konzentrationen bedeuten:

$$K_M = \frac{[\text{Enzym-Substrat}]}{[\text{Enzym}] [\text{Substrat}]} = \frac{1}{0,008} = 125.$$

Da wir aber über die Mitwirkung des Co-Enzyms und sonstiger Aktivatoren noch nicht genügend unterrichtet sind, sei der genannte Wert mit allem Vorbehalt mitgeteilt.

Die von van Slyke und Zacharias gefundene Tatsache, dass sich das pH-Optimum der Harnstoffspaltung etwas mit der Harnstoffkonzentration verschiebt, ist S. 343 bereits erwähnt worden.

Einfluss der Enzymkonzentration.

Marshall (Jl Biol. Chem. 17, 1913) konnte zuerst¹ zeigen, dass auch bei Urease in gewissen Grenzen die Beziehung gilt: Die zu einem bestimmten Umsatz erforderliche Zeit t ist der Enzymkonzentration $[E]$ der Lösung umgekehrt proportional, also

$$t [E] = \text{konst.}$$

Als Beleg sei ein Auszug aus der Tab. 1 von Marshall (S. 353) angeführt:

Enzymkonz. ccm	Minuten	% Harnstoff gespalten	
		10 ccm 1%ige Harnstofflösung	10 ccm 0,5%ige Harnstofflösung
5	16,0	53,3	92,7
4	20,0	53,2	93,1
3	26,0	52,6	94,1
2	40,0	52,0	94,0
1	80,0	51,2	92,9

Den Tabellen IV—VI van Slykes und Cullens entnehme ich die folgenden Zahlen, geltend für 20° und $a = 40$.

0,03%iges Ureasepräparat				0,3%iges Ureasepräparat			
Minuten	a — x	k · 10 ⁴	0,4343 c (van Slyke)	Minuten	a — x	k · 10 ⁴	0,4343 c (van Slyke)
60	35,80	8,0	0,0527	20	25,92	94	0,0577
120	31,60	8,1	0,0557	30	19,78	102	0,0603
186	27,90	8,4	0,0520	40	14,94	107	0,0600
240	25,16	8,4	0,0500	51	10,80	111	0,0601
300	21,92	8,7	0,0503	60	8,02	116	0,0593
360	18,90	9,0	0,0513	75	4,88	122	0,0586
420	16,30	9,0	0,0513	90	3,10	123	0,0559
			$d = 4,73$				$d = 5,12$

0,1%iges Ureasepräparat

Minuten	a — x	k · 10 ⁴	0,4343 c (van Slyke)
30	32,76	29	0,0576
45	29,48	30	49
60	26,72	29	16
90	21,10	31	04
120	16,60	32	16
150	12,46	34	27
180	8,70	37	27
225	5,46	38	50
255	3,66	40	76
			$d = 5,17$

¹ Proportionalität zwischen Grösse der Ureasewirkung und Bakterienmenge hat 1913 Viehoveer [Zbt. Bakt. (II) 39, 209] in Kulturen von Urobakterien gefunden.

Vergleichen wir die für den halben Umsatz gültigen Konstanten ($a - x = 20$), so ergibt sich:

$k \cdot 10^4$	Enzymkonz.	$k \cdot 10^4/E$
8,8	0,03	293
31	0,10	310
100	0,30	333

Weitere Versuche haben Labberté (Pharm. Weekbl. 1915) und Wester (Chem. Weekbl. 13; 1916 und 16, 1442; 1919 — Ber. d. Dtsch. pharm. Ges. 30, 163; 1920) angestellt.

Schliesslich führe ich noch eine Versuchsreihe aus meinem Laboratorium (Lövgren) an.

Phosphat in der Reaktionsmischung 0,2 m. Temperatur 18°.

Reihe	Enzym	Harnstoffkonzentr.	Reaktionszeit Minuten	Max. NH ₃ mg	NH ₃ mg	pH			$\frac{a}{E}$
						vor	nach	Mittel	
A ₁	1 ccm E/18	0,00625 m.	27	2,13	0,56	7,68	7,75	7,71	27,6
A ₂	1 „ E/6	„	9	2,13	0,59	7,68	7,76	7,72	29,4
A ₃	1 „ E/2	„	3	2,13	0,59	7,66	7,74	7,70	29,4
B ₁	1 „ E/18	0,05 m.	27	8,52	0,68	7,50	7,57	7,54	29,6
B ₂	1 „ E/6	„	9	8,52	0,74	7,50	7,58	7,54	32,4
B ₃	1 „ E/2	„	3	8,52	0,72	7,50	7,58	7,54	31,6
C ₁	1 „ E/18	0,8 m.	27	272,54	0,87	7,20	7,26	7,23	36,8
C ₂	1 „ E/6	„	9	272,54	0,92	7,20	7,27	7,23	39,2
C ₃	1 „ E/2	„	3	272,54	0,9	7,20	7,27	7,23	37,8

Enzym: frisch (10:100, 1 Stunde), in A₃, B₃, C₃ unverdünnt, in A₂, B₂, C₂ dreifach verdünnt, in A₁, B₁, C₁ neunfach verdünnt.

Zusammenfassend können wir sagen, dass die vorliegenden Zahlenresultate in einem anscheinend ziemlich grossen Gebiet eine so vollständige Proportionalität zwischen Enzymkonzentration und Reaktionsgeschwindigkeit zeigen, als man gegenwärtig, wo die Einflüsse der Salze und Aktivatoren noch nicht genügend aufgeklärt sind, erwarten kann.

Umkehrbarkeit der enzymatischen Harnstoffspaltung.

Nachdem die Ureasewirkung längere Zeit als nicht umkehrbar gegolten hatte¹, war Barendrecht (1920, S. 76) der erste, welcher — auf Grund seiner eigenen verdienstlichen Experimente — die Umkehrbarkeit der enzymatischen Harnstoffbildung erkannt hat: „Diese Versuche zeigen deutlich, dass ein kleiner Teil des Ammoniumcarbonats durch die Wirkung der Urease

¹ Siehe hierzu Bayliss, Brit. Assoc. Repts 85, 687; 1915. — Kiesel, H. 75, 169; 1911. — Jacoby, Biochem. Zs 74, 93 u. zw. 96; 1916.

verschwindet, und dass dieser Teil proportional der Menge der anwesenden Urease ist.“ Der von Barendrecht beobachtete Effekt war allerdings klein.

Die Kritik, welche gegen den von Barendrecht gezogenen Schluss gerichtet wurde¹, ist durch die späteren Untersuchungen widerlegt worden. Bevor wir das in ureasehaltigen Lösungen eintretende Gleichgewicht betrachten, muss erwähnt werden, dass Lewis und Burrows schon 1912 gezeigt hatten, dass in einer auf 77° erhitzten (natürlich enzymfreien) Lösung von Ammoniumcarbamat oder Harnstoff nach 95 Tagen ein Gleichgewicht statthat, welches 1% Harnstoff neben 99% Carbamat-Carbonat enthält. Neuerdings (1921) ist der Badischen Anilin- und Sodafabrik ein Verfahren patentiert worden, durch welches bei 135–140° unter 15 Atm. Druck in der Ammoniumcarbamatschmelze bis 25% Harnstoff auftreten.

Bei Zimmertemperaturen stellen sich aber die Gleichgewichte ohne Katalysatoren ausserordentlich langsam ein², so dass hier ein Einfluss des Enzyms deutlich hervortreten kann.

In zwei Untersuchungen aus dem Jahr 1923 wurde nun, wie es scheint einwandfrei, die Bildung von Harnstoff durch Urease nachgewiesen.

Mack und Villars³ wiesen die Bildung von Harnstoff durch die Xanthidrol-Reaktion von Fosse nach, durch welche Dixanthyl-Harnstoff als Niederschlag entsteht. Sie untersuchten die Synthese bei 55° (der Optimum-Temperatur für Urease) und bei 25°. Ihre Lösungen enthielten die beiden Ammoniumsalze in folgenden Normalitäten:

	Carbonat	Carbamat	Summe
Lösung II . . .	5,466	4,864	10,330
Lösung III . . .	5,133	6,091	11,224

Damit wurden folgende Ergebnisse erzielt:

Reaktion bei 55°.					
Lösung II			Lösung III		
Stunden	Niederschlag von Dixanthylharnstoff		Stunden	Niederschlag von Dixanthylharnstoff	
	Keine Urease	0,1% Urease		Keine Urease	1% Urease ⁴
0,33	0,0000	0,0000	0,5	0,0000	0,0098
1,5	0,0000	Spuren	1,0	0,0000	0,0340
4,33	0,0000	Spuren	2,0	0,0000	0,0382
27,5	0,0000	0,0164	4,0	0,0000	0,0382
52,0	0,0000	0,0188	7,75	0,0000	0,0768 (?)
98,33	0,0051	0,0314	23,5	Spuren	0,0544
∞		0,0937	47,0	0,0000	0,0513
(ber. f. Gleichgewicht)			∞		0,1018
			(ber. f. Gleichgewicht)		

¹ Mattaar, Rec. trav. chim. 39, 495; 1920 und 40, 65; 1921. — Siehe hierzu Barendrecht, Rec. 39, 603 und 40, 66; 1921.

² Zum Mechanismus der nichtenzymatischen Harnstoffsynthese siehe auch E. A. Werner, JI Chem. Soc. 117, 1046; 1920.

³ Mack und Villars, JI Amer. Chem. Soc. 45, 501; 1923.

⁴ Käufliches Präparat nicht bezeichneter Herkunft.

Reaktion bei 25° (Lösung II).

0,1% Urease

Stunden	1,5	4,5	27,75	98,5	197,25	293,25	∞ (ber. f. Gleichgew.)
mg Dixanthylharnstoff	0,0	0,0	1,6	4,8	10,5	16,2	39,6

In der ureasefreien Lösung trat keine Spur Dixanthylharnstoff auf.

1% eines kräftigen Ureasepräparates stellt somit in einer 10 norm. Ammoniumcarbonat-Carbamat-Lösung, welche etwa gleiche Teile der beiden Salze enthält, bei 55° in etwa 10 Stunden die halbe theoretische Gleichgewichtskonzentration des Harnstoffs her.

Dieses Ergebnis wurde, wenigstens qualitativ, bald darauf durch H. D. Kay¹ bestätigt. Kay konnte Harnstoff gewinnen aus Ammoniumcarbonat-Carbamatlösungen, welche aktive Urease enthielten; dies gelang aber nicht, wenn das Enzym zerstört war, oder in Abwesenheit von Ammoniumcarbonat oder Enzym. Kontrollversuche zeigten, dass Harnstoff auch weder

vom Ammoniumcarbonat-Carbamat allein kommen konnte,

noch von der Urease allein,

noch von der Urease in Gegenwart eines anderen Ammoniumsalzes.

Es erübrigt also für die weitere Forschung nur noch der quantitative Vergleich des nicht enzymatischen und des enzymatischen Gleichgewichtes.

C. Einfluss der Temperatur und Strahlung.

1. Hitzeempfindlichkeit der Urease.

Die ersten Versuche über die Temperaturtoleranz gibt Moll² an.

D. D. van Slyke und Cullen (l. c., S. 175) haben einen 1:5 verdünnten Enzymextrakt während 30 Minuten erhitzt und dann 1 ccm 15 Minuten auf 5 ccm 5%ige Harnstofflösung bei der gleichen Temperatur einwirken lassen, während in einem Kontrollversuch die nicht erhitzte Enzymlösung bei der gleichen Temperatur zur Wirkung kam.

Temperatur	ccm 0,02 n. HCl zur Neutralisation des NH ₃ verbraucht	
	Vorher erhitzt	Nicht erhitzt
60°	24,36	24,15
70°	15,74	20,56
80°	0,85	18,8

Aus diesem, allerdings ergänzungsbedürftigen Material würde sich der Inaktivierungskoeffizient $10^4 \cdot k_c$ (siehe Teil I, 6. Kap.) bei 70° zu rund 40 berechnen.

Auf einen grösseren Koeffizienten, etwa $k_c = 125$ könnte man aus einigen von Jacoby und Sugga³ für die Lösung eines Trockenpräparates angegebenen Zahlen schliessen.

Ein Präparat von hoher Stabilität beschreiben Goris und Costy (C. r. 176, 412).

¹ H. D. Kay, Biochem. JI 17, 277; 1923.

² Moll, Hofm. Beitr. 2, 344; 1902.

³ Jacoby und Sugga, Biochem. Zs 69, 116; 1915.

Lövgren (1921, S. 250) gibt folgende Versuche an:

4 Kolben mit 1 ccm frischer Enzymlösung + 2 ccm 0,5 m.-Phosphatmischung (pH = 7) + 6 ccm H₂O wurden im Wasserbade 60 Minuten bei verschiedenen Temperaturen gehalten, nach Ende dieser Zeit durch eine Kältemischung rasch bis 17° abgekühlt und mit 1 ccm 1 m.-Harnstofflösung versetzt. Nach 60 Minuten Reaktion bei 17° wurde das Ammoniak nach Folin bestimmt. In allen Kolben entstand während der Erhitzung ein Niederschlag.

Temperatur ° C	NH ₃ mg	Max. NH ₃ mg	k	k Mittel
50,4	12,42	34,06	32,8	} 32
50,4	12,17	34,06	32,0	
62	11,66	34,06	30,3	} 30
70	7,36	34,06	17,6	} 18
70	7,39	34,06	17,7	
80	0,19	34,06	0,4	—
80	0,17	34,06	0,4	—
nicht erhitzt	12,64	34,06	33,5	} 34
nicht erhitzt	12,85	34,06	34,3	

Daraus berechne ich für 70°

$$10^4 \cdot k_C = 46,$$

was mit van Slykes und Cullens Wert 40 ziemlich gut übereinstimmt; indessen sind eingehendere Versuche wünschenswert, insbesondere um den Einfluss der Temperatur auf die Stabilität des Enzyms und Co-Enzyms festzustellen.

J. Temminck Groll¹ ist auf Grund einer Reihe von Versuchen an Soja-Urease zum Ergebnis gelangt, dass die Wirksamkeit der gelösten Urease nicht nach dem Gesetz für monomolekulare Reaktionen oder nach einem anderen Zeitgesetz abnimmt, sondern dass die Kurve, welche die Abnahme der Wirksamkeit des Enzyms mit der Zeit darstellt, einer Sinusoide gleicht. Bei Versuchen, welche Verf. mit G. Brandting² angestellt hat, kam aber ein derartiger Effekt zwischen 17,5° und 50° nicht zum Vorschein.

Durch die einstündigen Erhitzungen auf 45° und 50° wurde die Wirksamkeit etwas (ca. 6%) geschwächt, aber auch bei diesen Temperaturen traten keine anderen Schwankungen ein als diejenigen, die durch die Versuchsfehler bedingt waren.

Nach Goris und Costy³ soll die Urease aus jungen Pilzen (*Boletus edulis* u. a.) gegen Erhitzen widerstandsfähiger sein, als Enzym aus alten Pilzen.

Es kann im Zusammenhang mit oben für k_C erhaltenen Werten von Interesse sein, die Abschwächung zu berechnen, welche *Onodera*⁴ bei

¹ Groll, Kolloid-Zs 21, 138; 1917.

² Euler und Brandting, Bioch. Zs 97, 113; 1919.

³ Goris und Costy, C. r. 176, 412; 1923.

⁴ Onodera, Bioch. JI 9, 544; 1915.

Zimmertemperatur und diffusum Licht in Ureaselösungen (unter Toluol) gemessen hat.

Aus seiner Tabelle (S. 571) entnehme ich:

Anfubewahrung Tage	a — x	k · 10 ⁴ (t = Tage)	k · 10 ⁴ (Mittel)
0	100	—	t = Minuten
2	97	152	
5	88	256	
13	55	460	0,3
20	41	446	
40	25	346	
52	17	341	

Rechnen wir mit der üblichen Zeiteinheit t = Minuten, so ist der Wert für $k \cdot 10^4 = 0,3$. Vergleicht man denselben mit dem bei 70° erhaltenen Wert 45, so fällt der für k_0 ungewöhnlich kleine Temperaturkoeffizient auf; mit anderen Worten, es ist wahrscheinlich, dass sich bei dem 52tägigen Versuch noch ein besonderer zerstörender Einfluss, etwa auf das Co-Enzym (das Onoderasche Enzym) geltend gemacht hat. Siehe Onodera, S. 586.

Schliesslich ist von Revoltella¹ untersucht worden, wie sich ein Trockenpräparat der Soja-Urease beim Erhitzen auf höhere Temperaturen verhält; bei 95° wurde das Präparat erheblich geschwächt. Wir geben die Zahlen nicht an, da ja die Stabilität von Enzymtrockenpräparaten in höchstem Grad von den Verunreinigungen, besonders aber von den Spuren Wasser, die sie enthalten, abhängig ist.

Nach Nakagawa wird durch Aminosäuren, Pepton, Serum und Proteine eine Stabilisierung der Urease erreicht².

2. Temperaturkoeffizient der Harnstoffspaltung.

Van Slyke und Cullen geben (S. 174) die Versuchszahlen der folgenden Tabelle an:

Enzym: 1 ccm. 5%iger Harnstoff: 5 ccm (250 mg, 0,7 m.). Max. NH₃ = 141,67 mg. Totalvolumen: 6 ccm. 15 Minuten.

Enzymlösung	Temperatur	NH ₃ mg
Frisch (1 Teil Sojabohnenmehl + 5 Teile Wasser)	0	1,54
	10	3,64
	20	6,09
Derselbe Extrakt, fünfmal verdünnt	20	1,44
	30	2,52
	40	4,15
	50	6,80
	60	7,24

Daraus berechnet sich eine mittlere Steigerung der Reaktionskonstanten für 10° Temperaturzunahme zwischen 10° und 50° um das (rund) 1,91fache.

¹ Revoltella, Bioch. Zs 134, 336; 1922.

² Nakagawa, Mitt. Med. Fak. Tokyo, 28, 383; 1922.

Mit G. Brandting hat der Verfasser¹ den Zuwachs der Reaktionsgeschwindigkeit zwischen 30° und 40° bestimmt. Es ergaben sich die folgenden relativen Mengen des enzymatisch entwickelten Ammoniaks:

Temperatur	30°	35°	40°
ccm 0,1005 n. H ₂ SO ₄ (Mittel) . .	7,15	10,3	14,15

Für 10° Temperatursteigerung stieg die entwickelte NH₃-Menge zwischen 30° und 40° auf das 1,92fache.

Ein etwas kleineres Verhältnis findet Yamasaki (l. c., S. 113), nämlich 1,81 zwischen 15° und 35°.

Unter Annahme des Wertes 1,9 zwischen 20° und 40° berechnet sich aus der Formel

$$Q = \frac{\log k_2/k_1 \cdot T_1 \cdot T_2 \cdot R}{0,4343 (T_2 - T_1)}$$

$$Q = (\text{rund}) 12000.$$

Einfluss der Strahlung auf die Urease.

An der von Onodera gemessenen Inaktivierung gelöster Urease bei Zimmertemperatur (vgl. S. 367) hat vielleicht auch das diffuse Tageslicht mitgewirkt.

Eine Angabe, dass Urease (wie übrigens die meisten Enzyme) durch langdauernde (50 stündige) Belichtung im Sonnenlicht geschwächt wird, macht Wester (Pharm. Zentralhalle 57, 423; 1916).

Pincussen und Kato² haben einige orientierende Versuche über den Einfluss des Sonnenlichtes und des ultravioletten Lichtes einer Quecksilberlampe mitgeteilt.

Bei ihren Versuchen war für konstante Temperatur (die Lösungen standen im Wasserbad) und (durch Phosphatpuffer) für konstante Azidität gesorgt. Bezüglich der Strahlung ist nur die Belichtungszeit angegeben.

Quecksilberlicht 2 Stunden. Belichtungstemperatur 22°. Darauf folgende Reaktion bei 40° unter Phosphatzusatz.

pH beim Belichten	Menge des entstandenen NH ₃ in mg	
	Belichtet	im Dunkeln
8,2	1,12	1,22
6,7	1,10	1,44
6,1	1,38	1,44
5,6	1,30	1,44

Der beobachtete Effekt war, wie ersichtlich, gering; er ist noch geringer in Gegenwart von Harnstoff, welcher als Lichtschutzstoff wirkt.

¹ Euler und G. Brandting, Bioch. Zs 97, 113; 1919.

² Pincussen und N. Kato, Bioch. Zs 134, 470; 1923.

Über Bestrahlung eines Ureasetrockenpräparates mit Sonnenlicht und mit Radiumstrahlen macht Revoltella¹ Mitteilung.

Physiologische Notizen.

1. Urease-Bildung.

Orientierende Versuche über die Bildung von Urease in Bakterien unter verschiedenen Bedingungen haben Jacoby und Mitarbeiter² ausgeführt.

2. Toxische Wirkungen.

Subkutane oder intravenöse Injektionen von Bakterienextrakten rufen nach Moll³, von Soja- oder Robinia-Extrakten oder daraus hergestellten Präparaten nach Marg. Falk⁴, Carnot, Gérard⁵ und Moissonier⁶ sowie Lublin⁷ starke physiologische Wirkungen verschiedener Art hervor. Welchen Anteil daran andere, nichtenzymatische Substanzen haben, scheint noch nicht festzustehen.

Marg. Falk⁴ gibt die tödliche Dose zu 3 bis 4 ccm Sojaextrakt (1 Teil entfettetes Sojamehl, 5 Teile Wasser) pro g Körpergewicht (Kaninchen) an. Bei intravenöser Injektion treten nach Carnot, Gérard und Moissonier die Erscheinungen der Ammoniakvergiftung ein.

Auch Lublin⁸ beobachtete bei weissen Mäusen (nicht bei Kaninchen), und zwar nach subkutaner Injektion, innerhalb 24 Stunden Tod durch Ammoniakvergiftung. Bei Kaninchen stellte er nach intravenöser Ureaseinjektion Tod durch Embolien fest, vermutlich durch Agglutination der roten Blutkörperchen, welche auch auf Ureasezusatz *in vitro* auftritt.

Marg. Falk⁹ hat ihren Kaninchen Soja-Urease intraperitoneal injiziert und konnte durch Steigerung der injizierten Dosen eine hohe Konzentration der kreisenden Urease im Blut erreichen. Ob im menschlichen Organismus bei Urämie Urease im Organismus auftritt, ist noch zweifelhaft.

Die Urease der Magenschleimhaut studierten Luck und Seth, *Biochem. JI* 19.

Hervorzuheben ist hier, dass sich die früheren Angaben von Moll¹⁰ über die Bildung einer Antiurease nach Ureaseinjektion nicht zu bestätigen

¹ Revoltella, *Bioch. Zs* 134, 336; 1923.

² Jacoby, *Biochem. Zs* 81, 332; 1917. — Tetsugora Takahata, *Biochem. Zs* 140, 147; 1923.

³ Moll, *Hofm. Beitr.* 2, 344; 1902.

⁴ Marg. Falk, *Bioch. Zs* 59, 298 und 316; 1914.

⁵ Carnot und Gérard, *Soc. Biol.* 82, 391; 1919. — *C. r.* 169, 88; 1919.

⁶ Carnot, Gérard und Moissonier, *Ann. Pasteur*, 35, 1; 1921.

⁷ A. Lublin, *Arch. exp. Path. Pharmak.* 92, 280; 1922.

⁸ A. Lublin, *Bioch. Zs* 133, 21; 1922.

⁹ Marg. Falk, *Bioch. Zs* 59, 298 und 316; 1914.

¹⁰ Moll, *Hofm. Beitr.* 2, 344; 1902.

scheinen. Carnot, Gérard und Moissonier fanden nach intravenöser Einspritzung bei Hunden weder im Serum noch in solchen Organen, welche Urease aufnehmen, eine Antiurease. Dagegen lässt sich nach der intravenösen Injektion die Urease selbst im Serum nachweisen; nach subkutaner Injektion ist der Ureasegehalt im Serum geringer.

D. Praktische Anwendung der Urease und Methoden zur Messung der enzymatischen Harnstoffspaltung.

Die analytische Anwendung der Urease der Sojabohnen zur quantitativen Bestimmung des Harnstoffs im Urin stammt von Marshall¹ (1913). Die Bohnen werden zerrieben und 25 g des Pulvers werden mit 250 ccm Wasser 1 Stunde lang extrahiert. Hierauf werden 25 ccm 0,1 n. HCl hinzugefügt, die Mischung wird bei etwa 35° noch einige Minuten stehen gelassen, wodurch ein grosser Teil der Eiweissstoffe des Extraktes gefällt wird. Die Lösung wird filtriert und mit einigen Tropfen Toluol in einer Stöpselflasche zum Gebrauch aufbewahrt. Die ursprünglich klare Lösung wird bald opaleszent und es entsteht schliesslich ein Niederschlag; die Lösung bleibt aber bei Zimmertemperatur wenigstens 5 Tage lang hinreichend aktiv zum Gebrauch.

Ausführung der Methode, l. c., S. 285 u. ff. Siehe auch D. D. van Slyke, JI Biol. Chem. 16, 125, u. zw. 128, 1913; mit Cullen 19, 211; 1914. — Fiske, JI Biol. Chem. 23, 455; 1915.

Die Methode von Marshall hat allgemein günstige Aufnahme gefunden. Zur Ausführung dieser Methode sind jetzt mehrere Ureasepräparate im Handel; indessen dürfte sich die Verwendung eines selbstbereiteten Extraktes aus Sojapulver oder Robiniapulver am meisten empfehlen.

Folin² gibt folgendes Verfahren an: In eine 200 ccm Flasche werden ca. 3 g Permutit³ (bas. Aluminiumsilikat) gegeben; derselbe wird zunächst darin durch Dekantation mit 2%iger Essigsäure und hierauf zweimal mit Wasser ausgewaschen. Zu dem feuchten Permutit werden 100 ccm 30%igen Alkohols, hierauf 5 g Sojabohnenmehl zugegeben und 10 Minuten geschüttelt. Das in 3—4 kleinen Flaschen gesammelte Filtrat ist bei Zimmertemperatur wenigstens 1 Woche, auf Eis 3—5 Wochen haltbar.

Unter den zahlreicheren kleineren Modifikationen der klinisch sehr wertvollen Marshallschen Methode seien noch die Ausführungsformen von Hahn und Saphra⁴, von Geselschab (1914) sowie von Deist⁵ erwähnt.

¹ Marshall jr., JI Biol. Chem. 14, 283; 1913. — Siehe auch 15, 487 und 495; 1913.

² Folin und Wu, JI Biol. Chem. 28, 81 u. zw. 92; 1919.

³ An Stelle von Permutit lässt sich zur Entfernung des Ammoniaks aus dem Urin auch Kieselgur verwenden.

⁴ Hahn und Saphra, Dtsch. med. Wochenschr. 40, 430; 1914.

⁵ Deist, Klin. Wochenschr. 2, 930; 1923.

Nach vollzogener Harnstoffspaltung wird die Lösung mit Soda oder Pottasche versetzt und das gebildete Ammoniak in der Regel nach der Methode von Folin durch einen Luftstrom in titrierte Säure übergetrieben (siehe Methode S. 372).

Neuerdings hat Wishart¹ vorgeschlagen, das Durchleiten von Luft zur Entfernung des Ammoniaks während der enzymatischen Spaltung vorzunehmen; es soll bei Verwendung von grob gepulverten Sojabohnen möglich sein, die zur Entbindung des Ammoniaks erforderliche Menge Soda zuzusetzen ohne die hydrolytische Wirkung der Urease zu hindern.

Eine Abänderung der Methode von Marshall zur Urinanalyse hat Partos² insofern vorgenommen, als er nach Einwirkung der Urease nicht das Ammoniak, sondern die gebildete CO₂-Menge, und zwar volumetrisch, bestimmt.

Methoden zur Messung der enzymatischen Harnstoffspaltung.

Will man in Proben des ureasehaltigen Reaktionsgemisches den Grad der erreichten Spaltung bestimmen, so wird man zunächst die Enzymwirkung durch Zusatz von Alkali oder Säure unterbrechen. Dann kann man messen:

- I. Das gebildete Ammoniumkarbonat-Karbamat, und zwar
 1. durch das Ammoniak oder
 2. durch das CO₂ [Jacquemart 1843. — Partos (l. c.)].
- II. Den unzersetzten Harnstoff: Ausser älteren Methoden, unter denen diejenige von Liebig (Titration mit Quecksilbernitrat und Soda) und von Mörner und Sjöqvist³, sowie die Hypobromitmethode genannt seien, muss besonders das Verfahren von Fosse⁴ mit Xanthidrol erwähnt werden.

I. Methoden zur Bestimmung des gebildeten Ammoniaks.

Die anscheinend einfachste Methode, die Alkalinität der Lösung selbst mit einer gestellten Säurelösung zu titrieren, ist wenig genau und nicht zu empfehlen.

Nunmehr kommen zu wissenschaftlichen Untersuchungen folgende Arbeitsweisen in Betracht.

a) Der Probe wird überschüssige Säure zugegeben, welche mit Alkali zurücktitiert wird. Das CO₂ haben Armstrong und Horton (1912), sowie Marshall (1914) in der Siedehitze vertrieben, Armstrong, Benjamin und Horton (1913) durch einen Luftstrom. Die Nachteile der Methode liegen besonders darin, dass die Titration durch die in der Lösung vorhandenen Eiweisskörper und anderen Ampholyte sowie durch die anwesenden Salze gestört und undeutlich gemacht wird. Immerhin sind verschiedene brauchbare Ausführungsformen der Methode angegeben worden, z. B. von Hahn⁵.

¹ G. M. Wishart, *Biochem. J.* 17, 403; 1923.

² Partos, *Bioch. Zs.* 103, 292; 1920. — Siehe auch Aszódi, *Biochem. Zs.* 128, 391; 1922.

³ K. A. H. Mörner und J. Sjöqvist, *Skand. Arch. f. Physiol.* 2, 440; 1890.

⁴ Fosse, *Ann. Pasteur.* 30, 525; 1916.

⁵ Hahn, *Dtsch. med. Wochenschr.* 41, 134; 1915 und 45, 911; 1919. — Siehe auch Hahn und Saphra, l. c.

b) Das Ammoniak wird durch Nesslerisation bestimmt, nachdem die Eiweissstoffe durch Essigsäure gefällt worden sind¹.

c) Das aus der Reaktionsflüssigkeit entfernte Ammoniak wird in eine bekannte vorgelegte Säurelösung übergeführt und zurücktitriert. Hierher gehören die zuverlässigsten Methoden.

In älteren Arbeiten wurde das durch MgO (Kiesel, H. 75) oder Kalk (Zemplén, H. 79) freigemachte Ammoniak abdestilliert oder ohne Zusatz von Basen im Wasserdampfstrom übergetrieben [Armstrong und Mitarbeiter; Jacoby und Schüler; Němec²].

Wie Němec betont, ist dabei mit einer teilweisen, allerdings nicht grossen³ Zersetzung des Harnstoffs während der Destillation zu rechnen.

Das Verfahren c) ist von Folin⁴ angegeben: Das Ammoniak wird durch Alkalikarbonat entbunden und durch einen ammoniakfreien Luftstrom in titrierte Säure übergeführt und dann zurücktitriert. (Angewandt in den früher zitierten Arbeiten von Viehoveer, Marshall, van Slyke, Barendrecht und Lövgren.)

Modifikationen der Folinschen Methode sind vorgeschlagen von Fiske⁵ und Bahlmann⁶. Das Verfahren von Wishard, während der Einwirkung der Urease das NH_3 durch Lüften überzutreiben, ist bereits S. 370 erwähnt.

Zur Anwendung der Folinschen Methodik bei Studien über Urease-wirkung ist aber noch folgendes zu beachten:

1. Wie auf S. 351 betont wurde, verläuft die Harnstoffspaltung in zwei Stufen, nämlich unter Bildung von Ammoniumkarbamat, welches dann in saurer und neutraler Lösung schnell in Ammoniumkarbonat übergeht. In ammoniakalischer Lösung ist NH_4 -Karbamat aber beständiger. Was wir eigentlich messen sollen ist, a) die Menge des jeweils angegriffenen Harnstoffs, b) die Menge des enzymatisch gebildeten Ammoniumkarbamates⁷.

Bestimmt man nun den Fortschritt der Reaktion durch die nach der Folinschen Methode ermittelte NH_3 -Menge, so muss — was bisher in der Regel nicht geschehen ist — genau darauf geachtet werden, dass alles Ammoniumkarbamat in Karbonat übergegangen ist, andernfalls findet man zu wenig Ammoniak.

Es ist von Interesse, in der Reaktionslösung das gebildete Karbaminat und das Karbonat getrennt zu bestimmen. Dazu kann man entweder nach

¹ Folin und Youngburg, *Jl Biol. Chem.* 38, 111; 1919. — Youngburg, *Jl Biol. Chem.* 45, 391; 1921. — Grigaut und Guérin, *Soc. Biol.* 82, 25; 1919.

² Němec, *Biochem. Zs* 91, 126; 1918.

³ Siehe hierzu Malte Ljungdahl, *Soc. biol.* 87, 1411 und 1414; 1922.

⁴ Folin, *H.* 37, 161; 1903.

⁵ Fiske, *Jl Biol. Chem.* 23, 455; 1915.

⁶ Bahlmann, *Ned. Tijdschr. f. Geneesk.* 64 (1) 473; 1920.

⁷ Über Beziehungen zwischen Ammonium-Carbonat und -Karbamat siehe Wegscheider, *Zs anorg. Chem.* 121, 110 und Faurholt, ebenda 122, 132 sowie Diss. Kopenhagen 1924.

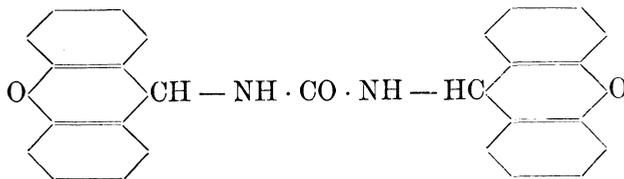
einer von Faurholt¹ angegebenen Methodik das Karbonat als Bariumsalz fällen, ohne dass das Karbaminat dabei mitgefällt wird, oder aber die verschiedene Löslichkeit des Silberkarbonates und Silberkarbaminates benutzen.

2. Wie aus den Untersuchungen von Mack und Villars hervorgeht, ist Ammoniumcyanat ein ständiges Nebenprodukt auch bei der enzymatischen Hydrolyse des Harnstoffs. Für genaue reaktionskinetische Messungen wird es auch notwendig, das gebildete Cyanat zu bestimmen, was am besten durch die Fällung mit Silbernitrat geschieht. Zu beachten ist, dass besondere Massnahmen zur Trennung von Silbercyanat und Silberkarbonat erforderlich sind; nach Fearon² (l. c. S. 87) gelingt diese Trennung durch Einstellung der Azidität der Lösung auf pH = 5 mittels Salpetersäure (Methylrot als Indikator).

II. Methoden zur Bestimmung des Harnstoffs.

Zunächst sei an die Mörner-Sjöqvistsche Methode erinnert. Wie A. H. Todd³ fand, bringt die Abänderung dieser Methode durch Braunschtein keinen Vorteil; die ursprüngliche Vorschrift ist vorzuziehen.

In neuerer Zeit hat Fosse⁴ im Xanthydrol einen Körper gefunden, welcher auch den Nachweis sehr kleiner Harnstoffmengen gestattet. Das Reagenz wird hergestellt durch Reduktion von Xanthon mit Natriumamalgam in alkoholischer Lösung und wird dann aus Wasser kristallisiert erhalten. Setzt man eine 10%ige Lösung von Xanthydrol in absolutem Methylalkohol zu einer Harnstoff enthaltenden Lösung, welche mit dem gleichen Volumen Essigsäure versetzt ist, so reagieren 2 Mol. Xanthydrol mit 1 Mol. Harnstoff fast augenblicklich unter Bildung von Dixanthylnharnstoff:



Aus reinen und verdünnten Harnstofflösungen setzt sich der Niederschlag von Dixanthylnharnstoff kristallisiert und fast analysenrein ab. Nach der Formel liefert Harnstoff beinahe das siebenfache seines Gewichtes an Dixanthylnharnstoffverbindung. Um kleine Harnstoffmengen quantitativ auszufällen, muss man nach Zusatz des Reagenzes mehrere Stunden stehen lassen. Sehr kleine Mengen von Dixanthylnharnstoff kann man in Zentrifugieröhrchen messen.

¹ Faurholt, Zs anorg. Chem. 120, 85; 1921. — Über die Beziehungen zwischen Ammonium-Carbonat und Ammonium-Carbamat siehe auch Wegscheider, Zs anorg. Chem. 121, 110; 1921 und Faurholt, ebenda 122, 132; 1922.

² Fearon, Biochem. JI 17, 84; 1923.

³ Alen Herapath Todd, Biochem. JI 14, 252; 1920.

⁴ Fosse, Ann. Pasteur 30, 525, 642 und 739; 1916.

Zur Gewichtsanalyse ist das Fossesche Prinzip neuerdings von Nicloux und Welter¹ ausgearbeitet worden.

Leider ist Xanthydrol sowohl in festem Zustand als gelöst nur begrenzt haltbar.

Besonders wertvoll war das Xanthydrol zum Nachweis der enzymatischen Harnstoffsynthese (Mack und Villars, H. D. Kay).

Kay hat dabei den Umstand benützt, dass Harnstoff, nicht aber Ammoniumkarbonat in Butylalkohol löslich ist, und hat demgemäss den durch enzymatische Synthese gebildeten Harnstoff mit Butylalkohol ausgeschüttelt².

Weitere Beiträge zur Analyse:

Gruskin, JI Lab. Clin. Med. 10, 233; 1924.

Eine Methode zur Bestimmung von Harnstoff in kleinen Blutmengen hat Patterson³ angegeben.

¹ Nicloux und Welter, C. r. 173, 1490; 1921.

² H. D. Kay, Biochem. JI 17, 275 u. zw. 278; 1923.

³ Patterson, Biochem. JI 19, 601; 1925.

15. Kapitel.

Amidasen, Arginase und Purinaminasen.

A. Amidasen.

Die biochemische Spaltung der Säureamide und der Abbau der Aminosäuren¹ sind in der Fachliteratur oft zu wenig scharf unterschieden worden. Soviel sich bis jetzt beurteilen lässt sind die Amidasen — früher oft als Desamidasen bezeichnet — mit den Enzymen, welche den Austausch von NH_2 gegen OH in eigentlichen Aminosäuren oder Aminen bewirken, durchaus nicht wesensgleich. Keine der Amidasen reicht an Verbreitung oder biochemischer Bedeutung an die Urease heran. Über die Verbreitung und Spezifität der Amidasen, welche die Amide einbasischer Säuren angreifen, lässt sich bis jetzt noch nichts endgültiges sagen.

Sofern die Säureamidasen, wie Verf. vermutet, reversibel wirkende Enzyme sind, handelt es sich bei der Synthese um eine Dehydratation im Sinne der Gleichung



also um einen noch wenig bekannten Typus enzymatischer Reaktionen.

Immerhin ist es nach den wenigen bis jetzt vorliegenden Tatsachen nicht ausgeschlossen, dass die Synthese der Säureamide einen besonderen Reaktionskomplex ausmacht und durch eine besondere „Amidase“ vermittelt wird.

1. Übersicht über die Substrate.

Untersucht sind in ihrem Verhalten zu tierischen und pflanzlichen Organextrakten

die Amide einbasischer und zweibasischer Carbonsäuren, Acetamid, Benzamid, Oxamid;

monosubstituierte Amide, Acetanilid;

Hippursäure, $\text{C}_6\text{H}_5 \cdot \text{CO} \cdot \text{HN} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{COOH}$, Phenacetursäure, $\text{C}_6\text{H}_5 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CO} \cdot \text{NH} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{COOH}$;

Benzoylalanin, $\text{C}_6\text{H}_5 \cdot \text{CO} \cdot \text{HN} \cdot \text{CH}(\text{CH}_3) \cdot \text{COOH}$;

¹ Literatur siehe auch bei Effront, *Les Catalisateurs Biochimiques dans la Vie et dans l'Industrie*. Paris 1914.

Amide der Aminosäuren, Asparagin und Glutamin, dl-Alaninamid und dl-Leucinamid.

Rein chemisch lassen sich Säureamide sowohl in saurer wie alkalischer Lösung leicht spalten; die Aciditätsverhältnisse sind vom Verf. und E. Rudberg¹ untersucht worden. Ferner kommt noch die Spaltung durch salpetrige Säure in Betracht, welche bei der Amidspaltung verbraucht wird und sich dadurch von reinen Katalysatoren unterscheidet.

2. Amidspaltende Gewebe und Säfte.

Viele ältere Angaben über enzymatische Amidspaltung bedürfen einer kritischen Prüfung; teils ist nicht einwandfrei gezeigt worden, dass es sich um die Hydrolyse eines Säureamides in Ammoniak (bzw. Amin) und freie Säure handelt; teils hat Bakterieninfektion das Vorkommen in manchem Material vorgetäuscht.

Gonnermanns² Angabe, dass in tierischen Geweben Amidasen verbreitet sind, scheint sich zu bestätigen³. Bergell und Brugsch⁴ wiesen Spaltung nach von

dl-Leucinamid durch Presssaft von Kalbsleber, Kalbsniere und Placentabrei.

dl-Alaninamid „ „ „ Kalbsniere und Muskelfleisch.

Spaltung bei subcutaner Injektion in Katzen: C. H. Fiske, JI Biol. Chem. 55, 191; 1923.

Über die Acetamidspaltung durch Pflanzensäfte ist nichts sicheres bekannt. Nur mit Schimmelpilzen wurde NH₃-Entwicklung erzielt (Dox⁵, Shibata⁶).

Um zu zeigen, wie schwach die beobachteten Wirkungen waren, seien folgende Ergebnisse von Dox wiedergegeben:

Substrat, 0,2 g	Spaltungsdauer	mg N
	Tage	entw. als NH ₃
Harnstoff	4	17,4
Asparagin	4	14,4
Biuret	5	0,6
Acetanilid	5	0,0
Alanin	5	1,5
Benzamid	5	2,1

Was die Spaltung von Acetamid und seiner Homologen durch pflanzliche Gewebe und Säfte betrifft, so sind spezifische Enzymwirkungen noch unsicher; insbesondere bedürfen die gelegentlich erhobenen positiven Befunde an Hefe noch einer weiteren Prüfung.

¹ Euler und Rudberg, Zs anorg. Chem. 127, 244; 1923.

² Gonnermann, Pflüg. Arch. 89, 493; 1902. — 95, 278; 1903.

³ Keine „Desamidase“ in Hypophysen: Buetow, Biochem. Zs 54, 40; 1913.

⁴ Bergell und Brugsch, H. 67, 97; 1910.

⁵ A. W. Dox, JI Biol. Chem. 6, 461; 1909.

⁶ Shibata, Hofm. Beitr. 5, 385; 1904.

Synthese.

Besondere Aufmerksamkeit verdient die vom enzymatischen Standpunkt aus noch wenig studierte biochemische Bildung der Säureamide, und zwar nicht nur des Asparagins (siehe unten), sondern des Milchsäureamids, des Bernsteinsäureamids u. a. nach der Gleichung



Zur Methodik.

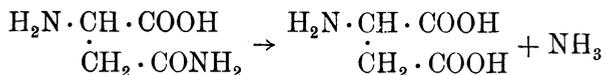
In der Regel Bestimmung des entwickelten Ammoniaks (vgl. S. 371 u. ff.).

Bergell und Brugsch (H. 67) fällen die unveränderten Substrate Leucinamid und Alaninamid mit β -Naphthalinsulfochlorid als Naphthalinsulfoverbindungen.

Unter den in Betracht kommenden Substraten sind ohne Zweifel das Asparagin, sein Homologes, das Glutamin und die Hippursäure die biologisch interessantesten. Ob die wirksamen Gewebe und Säfte eine besondere „Asparaginase“ enthalten kann noch nicht als ganz entschieden angesehen werden; wahrscheinlicher ist die Existenz eines Hippursäure-Enzyms. Bei der Asparaginase handelt es sich also einstweilen nur um eine vorläufige Bezeichnung, unter welcher das Tatsachenmaterial zusammengefasst wird.

3. Asparaginase.

Die hier zu besprechende Reaktion ist also die Spaltung des Asparagins in Asparaginsäure und Ammoniak.



Die weitere Umwandlung der Asparaginsäure in Äpfelsäure und NH_3 wird im nächsten Kapitel behandelt.

Säfte und Gewebe, welche Asparagin spalten.

Die ersten eingehenderen Angaben über die Verbreitung einer evtl. „Asparaginase“ machte v. Fürth¹, welcher mit den Versuchstieren Schwein und Pferd fand, dass „eine Asparaginspaltung niemals vermisst wurde, sich vielmehr in allen Organen, und zwar in einem Ausmass vollzieht, dass keinem derselben die überragende Ausnahmestellung eingeräumt werden kann“. Auch Clementi² spricht sich auf Grund eigener systematischer Versuche für eine ziemlich weite aber nicht allgemeine Verbreitung der „Asparaginase“ aus; er fand sie, und zwar besonders in der Leber, bei den Omnivoren Schwein und Ratte, nicht bei Menschen und Affen, ferner unter den Pflanzenfressern beim Meerschweinchen (im Serum), ferner bei Vögeln (in Leber und Niere). Bei Carnivoren soll sie fehlen, auch nach Asparaginfütterung nicht auftreten.

¹ v. Fürth und M. Friedmann, Biochem. Zs 26, 435; 1910.

² Clementi, Arch. Intern. Physiol. 19, 369 u. zw. 395; 1922.

Dass „Trypsin“ keine „Asparaginase“ enthält, betont Schwarzschild¹.

In den Spaltproduktion der tryptischen Verdauung des Caseins bleiben Amide, wohl besonders Glutamin, zurück; sie können direkte Spaltprodukte des Caseins sein, aber nach Luck² ist die Wirkung einer sekundären enzymatischen Synthese nicht ausgeschlossen.

Bei Pflanzen fand Kiesel³ Asparaginspaltung durch den Saft (nicht durch die alkoholgefällten Präparate) von *Vicia sativa* und *Lupinus albus* (4-wöchige Keimpflanzen).

Nach zuverlässigen Versuchen von Dieter⁴ wird die Amidgruppe des Asparagins weder durch gärende noch durch nichtgärende Hefen (sofern diese nicht wachsen) abgespalten; demgegenüber muss gefragt werden, ob die gegenteiligen Befunde von Effront⁵ und von O. v. Fürth und Friedmann⁶ an autolyseierter Brauereihefe und an Sakéhefe (Kurono⁷) nicht durch Infektionen beeinflusst sind.

Schimmelpilze greifen Asparagin an (Dox⁸, vgl. Tab. S. 376; Shibata), ebenso viele Bakterien (Nawiasky; S. A. Waksman, *Jl Agric. Res.* 30; 1925).

Darstellung. Im Autolysesaft tierischer und pflanzlicher Organe kommt die enzymatische Hydrolyse, wie erwähnt, zur Wirkung. Kurono gibt an, aus Hefesaft durch Fällung mit Alkohol ein aktives Präparat erhalten zu haben (ob der Saft bakterienfrei war lässt sich nicht beurteilen). Clementi fällt tierisches Enzym mit Aceton.

Wirkungsbedingungen: Nach Clementi (*Arch. int.* 19, S. 394) liegt das Optimum bei neutraler oder ganz schwach alkalischer Reaktionen; pH-Messungen wünschenswert.

Synthese: Eventuelle synthetische Wirkungen einer Asparaginase verdienen noch weitere Erforschung, besonders in Rücksicht auf die interessanten Ergebnisse von Prjanischnikow⁹, seiner Schüler und Mitarbeiter, besonders Smirnow¹⁰, G. G. Petrow und J. Schulow, über die Beziehungen zwischen Asparagin und Harnstoff. — Asparagin aus Eiweiss: Borodin (1878); Schulze; Butkewitsch; Chibnall (*Biochem. Jl* 18; 1924).

Methodik: Von Clementi u. a. wurde mit Vorteil die Formoltitration benützt.

¹ Schwarzschild, *Hofm. Beitr.* 4, 34; 1903.

² Luck, *Biochem. Jl* 18, 679; 1924.

³ Kiesel, *H.* 60, 476; 1909.

⁴ Dieter, *H.* 120, 281; 1922.

⁵ Effront, *C. r.* 146, 779; 1908.

⁶ v. Fürth und Friedmann, *Biochem. Zs* 26, 435; 1910.

⁷ K. Kurono, *Coll. Agric. Tokyo* 1, Nr. 3, 295; 1911.

⁸ Dox, *Jl Biol. Chem.* 6, 461; 1910.

⁹ Prjanischnikow, *Biochem. Zs* 150, 407; 1924. — Siehe auch *Rev. gén. de Bot.* 25, 5; 1913.

¹⁰ Smirnow, *Biochem. Zs* 137, 1; 1923.

4. Hippuricase (Histozyim).

Die Spaltung der Hippursäure in Benzoesäure und Glykokoll durch einen Bestandteil der Nieren des Schweines wurde bekanntlich durch Schmiedeberg¹ entdeckt, von dem auch die Bezeichnung Histozyim stammt. Smorodinzew² schlug den Namen Aminoacylase vor, Clementi³ neuerdings den hier gewählten, Hippuricase.

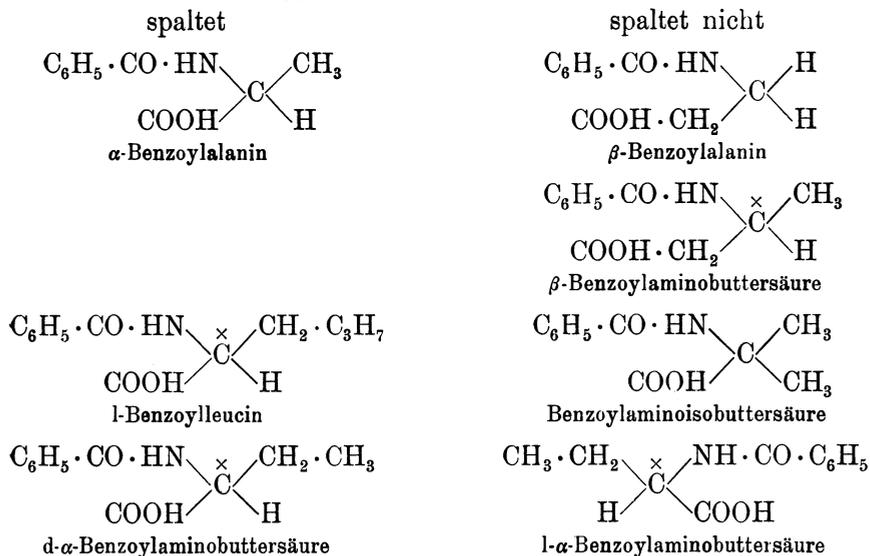
Substrate.

Hippursäure (rhomb. Krist. Schmp. 187,5) kommt bekanntlich im Harn von Pflanzenfressern vor⁴.

Die Spaltungsfähigkeit ist nicht auf Benzoylglykokoll beschränkt, sondern erstreckt sich nach Smorodinzew² auch auf Homologe, und zwar der α -Aminosäuren, z. B. auf die d - α -Benzoylaminobuttersäure, und zwar sind diese Spaltungen asymmetrisch. Ferner auf Glykocholsäure und Taurocholsäure.

Neuberg und Linhardt⁵ haben hierauf eine Methode zur Zerlegung racemischer Aminosäuren gegründet (Versuch mit Benzoylalanin).

Hippuricase (Smorodinzew)



Die von Neuberg⁶ gefundene Spaltung der Phenacetursäure (Phenyl-essigsäureglykokoll) durch Takadiastase ist wohl der Hippuricase zuzuschreiben.

¹ Schmiedeberg, Arch. exp. Path. 14, 288 u. 379; 1881.

² Smorodinzew, H. 124, 123; 1922.

³ Clementi, Atti Lincei (5) 32 II, 172; 1923.

⁴ Auch der Mensch scheidet nach Eingabe von 5 g Benzoesäure 5 g Hippursäure im Harn aus. Harn aus normalen Nieren kann bis zu 2% Hippursäure enthalten. Snapper, Klin. Woch. 3, 55; 1924.

⁵ Neuberg und Linhardt, Biochem. Zs 147, 372; 1924. — Hoppert, Biochem. Zs 149, 510; 1924.

⁶ Neuberg und Noguchi, Biochem. Zs 147, 370; 1924.

Verbreitung der Hippuricase.

Während sich nach Jacoby¹ das Enzym in allen Organen der untersuchten Tiere finden soll, ist es nach Smorodinzew² und Clementi (1923) u. a. bei Schwein (grosse Mengen), Hund, Pferd und Ratte in der Niere konzentriert, findet sich beim Schwein aber auch in der Leber, ferner im Skelettmuskel des Hundes².

Synthese: Widmark und Jensen-Carlen, C. r. Soc. Biol. 90, 1185; 1924. Verminderte Synthese bei Skorbut (A. Palladin, 1925).

Über das Vorkommen in höheren Pflanzen finden sich keine Angaben.

In Schimmelpilzen (Dauerpräparate) fanden Shibata und besonders Dox (l. c.) Hippuricase³; die Angaben von Kossowicz⁴ über die Zersetzung von Hippursäure durch eine Anzahl von lebenden Pilzen unter Ammoniakbildung lassen sich enzymchemisch nicht verwerten. In Takadiastase wiesen Neuberger und Noguchi (1924) wie erwähnt, Spaltung der Phenacetursäure nach.

Angaben über die Spaltung durch Bakterien bei van Tieghem (1864), Y. Seo⁵ und in der „Mikrobiologie“ von V. Kruse. Dass die Hippuricase von Erepsin verschieden ist, wird neuerdings wieder von Clementi (l. c. 32) betont, denn weder Pankreas noch Darmsaft spalten Hippursäure.

Wirkungsweise.

Nach Mutch⁶ verläuft die Hippursäurespaltung bis zum Eintritt eines Gleichgewichts. Mutch fand bei seinen Versuchen 97% Spaltung. Eine seiner kinetischen Versuchsreihen sei angeführt, um eine Vorstellung von der Wirksamkeit der enzymreichsten Gewebe zu geben.

20 ccm Na-Hippurat, enthaltend 0,28 g Hippursäure + 0,8 g Nierenextrakt + 5 ccm Toluol.

Inkubationsdauer Stunden	mg Benzoesäure gefunden	% Hippursäure hydrolysiert
11	10	7
17	14,7	10
36	31	21
60	45	30
82	69,5	46
106	83,2	55
157	118,7	79
208	140,5	94
255	147,2	97
399	146,5	97

Natriumbenzoat hemmt.

Die im Gleichgewicht vorhandene kleine unzersetzte Hippursäuremenge

¹ M. Jacoby, H. 30, 148; 1900.

² Smorodinzew, H. 124, 123; 1922.

³ Siehe auch Dox und Neidig, H. 85, 68; 1913.

⁴ Kossowicz, J. Gärungsphys. 1, 60; 121, 317; 1912. — 2, 51, 81; 1913.

⁵ Y. Seo, Arch. exp. Path. 58, 440; 1908.

⁶ Mutch, J. of Physiol. 44, 176; 1912.

soll nach Mutch und auch nach Abelous und Ribaut¹ (durch Brei von Pferdenieren) enzymatisch synthetisiert werden können. Effekt allerdings gering. Wirkungsoptimum scheint bei etwa pH = 7 zu liegen.

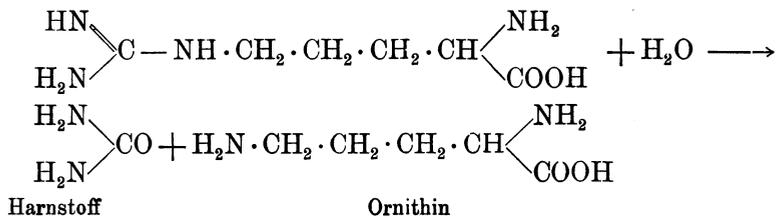
Methodik.

1. Bestimmung der Benzoesäure: Die Benzoesäure wird aus der Reaktionsmischung abdestilliert und im Destillat titriert (Pfeiffer, Block und Riehe 1902, sowie Wiechowski²).
2. Bestimmung des Glykokolls: Formoltitration nach Sörensen (Clementi) oder nach Fischer³ mit Naphthalinsulfochlorid oder nach Neuberg und Manasse⁴ mit Naphthylisocyanat.
3. Bestimmung der Hippursäure: Colorimetrisch nach Mutch, l. c.

B. Arginase.

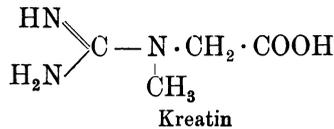
1. Substrat.

An die Amidasen kann die von Kossel und Dakin⁵ entdeckte und besonders im Kosselschen Laboratorium studierte Arginase angereicht werden, deren spezifische Reaktion in der Hydrolyse des d-Arginins besteht:



Diese Spaltung wird auch durch Alkali erreicht⁶.

Andere Substrate sind untersucht worden: Kreatin⁷ und Guanidin⁸



(Guanidinessigsäure, Guanidylcapronsäure), sowie l-Arginin, ferner Clupeon-Diarginylpeptid (Felix und Morinaka, H. 132) werden nicht angegriffen, wohl aber nach Thomas⁹ γ -Guanidylbuttersäure, welche durch Leberpresssaft in Harnstoff und γ -Aminobuttersäure zerlegt wird.

¹ Abelous und Ribaut, Soc. Biol. 52, 543; 1900.

² Wiechowski, Hofm. Beitr. 7, 204; 1906.

³ Fischer und Bergell, Chem. Ber. 35, 3779; 1902. — F. Aminosäuren S. 796.

⁴ Neuberg und Manasse, Chem. Ber. 38, 2359; 1905.

⁵ Kossel und Dakin, H. 41, 321; 1904 und 42, 181; 1904.

⁶ Kossel und Weiss, H. 59, 492; 1909.

⁷ Bierry und Ranc, Soc. Biol. 67, 184; 1909.

⁸ A. Clementi, Lincei (5) 30; 1921. — 31, 454, 559; 1922. — Clementi, Arch. di Fisiol. 21; 1923.

⁹ Thomas, H. 88, 465; 1913. — Arginin im Protein: Sakaguchi, JI of Biochem. 5; 1923.

An racemischem Arginin beobachtete Riesser¹ asymmetrische Spaltung (der d-Komponente), dagegen fanden Felix und Morinaka² eine totale Hydrolyse bei Durchströmung der Leber.

Im Arginylarginin wird nur der eine Argininrest abgebaut, und zwar derjenige, welcher die freie Carboxylgruppe trägt (Edlbacher).

2. Vorkommen der Arginase.

In Säugetieren ist die Leber^{3: 7} dasjenige Organ, in welchem die Arginase stets und in verhältnismässig reichlicher Menge vorkommt. Die früheren Angaben über die Verbreitung der Arginase in anderen Organen (Niere⁴, Thymus⁴, Darmschleimhaut⁴ usw.⁵) werden durch die methodisch zuverlässigeren Versuche, die Edlbacher in Kossels Institut angestellt hat, nicht bestätigt. Nach Edlbachers⁶ Angaben fehlt Arginase (ausser bei weiblichen Enten und Hühnern) bei Vögeln in der Leber. Letzterer Befund wird durch Felix und Tomita (l. c.) bestätigt. Auch Milz, Gehirn und Serum von Katzen fand Edlbacher frei von Arginase.

Nach Clementi wäre allerdings eine noch weitere Verbreitung der Arginase in der Tierwelt, auch bei Vögeln und bei Avertebraten anzunehmen⁷.

Neuerdings kommt Edlbacher⁸ zu folgenden Ergebnissen:

Die Arginase lässt sich nicht nachweisen in der Darmschleimhaut von Hund, Katze und Taube.

Beim Huhn unterscheiden sich männliche und weibliche Tiere, indem erstere in der Leber reichliche Mengen Arginase enthalten, letztere meistens nicht. Es wird dadurch eine grundsätzliche Verschiedenheit zwischen männlichem und weiblichem Argininstoffwechsel bewiesen. Die Hoden von Hähnen, Taubern, Stieren, Hunden und Meerschweinchen enthalten in Übereinstimmung damit reichliche Mengen von Arginase, Kälberhoden dagegen nur wenig; dies weist auf die Funktion dieses Organs vor und nach der Pubertät hin.

In den meisten Ovarien von Hühnern, Tauben und Hunden lassen sich nur ganz geringe Mengen von Arginase nachweisen.

In den Nieren von Hund, Katze, Kaninchen, Maus, Meerschweinchen findet sich in den meisten Fällen Arginase; Wirksamkeit dieser Organextrakte jedoch schwankend.

In der Milz von Hund, Katze, Maus, Kaninchen, Meerschweinchen, Huhn

¹ Riesser, H. 49, 210; 1906.

² Felix und Morinaka, H. 132, 152; 1923. — Felix und Tomita, H. 128, 40; 1922.

³ Berthold Fuchs, H. 101, 114; 1921. — Sowohl in gesunden wie in pathologischen menschlichen Lebern, sowie in Carcinom-Metastasen der Leber kommt Arginase reichlich vor.

⁴ Kossel und Dakin, H. 41, 321; 1904 und 42, 181; 1904.

⁵ Mihara fand Arginase im Stierhoden, H. 75, 443; 1911.

⁶ Edlbacher, H. 95, 81; 1915. — 100, 111; 1917. — 145, 69; 1925.

⁷ Clementi, Lincei (5) 23; 1914. — Fisiol. 13, 189; 1915 u. 14, 207; 1916. — Arch. di Farm. 26, 84; 1921.

⁸ Edlbacher und Bonem, H. 145, 69; 1925.

und Taube fand Edlbacher keine Arginase, auch nicht in den Nebennieren des Meerschweinchens. Nach Sendju¹ enthalten Hühner-Nieren Arginase. Ferner Organe von Amphibien, Reptilien und Fischen.

In der Pflanzenwelt ist die Verbreitung der Arginase auf Veranlassung Kossels von Kiesel² studiert worden, und zwar wurde das Enzym gefunden im Mutterkorn, in Keimlingen von *Vicia sativa*, in grünen Keimpflanzen von *Trifolium pratense* und in reifen Früchten von *Angelica silvestris*.

Was die Argininspaltung durch die Hefe betrifft, so scheint die Angabe von Shiga³ nach den negativen Befunden von Edlbacher recht zweifelhaft. Bakterien wurden mit Edlbachers Methodik von Hino⁴ sowie (Methodik S. 384) von Kossel u. Mitarb.⁴ untersucht, welche Spaltung von d-Arginin durch lebende *Bac. pyocyaneus* und *Bac. fluorescens*, sowie durch ihre Aceton-Trockenpräparate fanden (letztere spalten wahrscheinlich auch l-Arginin). Mit zahlreichen anderen Bazillenleibern (*Bac. coli*, Streptokokken u. a.) konnte Arginin nicht gespalten werden. *Penicillium* scheint neben Arginase noch andere verwandte Enzyme zu enthalten. *Aspergillus oryzae* enthält Arginase (Sendju).

3. Darstellung und Reinigung von Arginase-Präparaten.

Edlbacher stellte ein Arginase-Pulver in folgender Weise her (H. 100): 500 g ganz frische Kalbsleber wurden in der Hackmaschine zerkleinert, mit Kieselgur gut verrieben und in der Buchnerschen Presse bei 300 Atmosphären ausgepresst. Man erhielt 200 ccm klaren Presssaft, der unter heftigem Umrühren in dünnem Strahl in zwei Liter Aceton gegossen wurde. Das Ausgeschiedene wurde abgesaugt, mit Aceton gewaschen und im Vakuum getrocknet.

4. Wirkungsbedingungen.

Aciditätsoptimum der Arginase (aus Rattenleber) liegt nach Hunter und Dauphinee⁵ bei pH = 9,8 (nicht nach Hunter und Morell⁶ bei pH = 7,0). In naher Übereinstimmung hiermit finden Edlbacher und Bonem⁷ das Optimum für 26° und 38° bei pH = 9,5—9,8. Dabei ist der Abbau des Arginins fast vollständig. (In Hunters Arbeit findet man Angaben über den Einfluss der Temperatur.) Die von Edlbacher früher beobachtete Aktivierung durch Natriumphosphat ist vielleicht auf die Annäherung an die Optimalacidität zurückzuführen. Mit Calciumsalzen (in $\frac{1}{15}$ n-Lösung) wurde eine erhebliche Hemmung der Enzymwirkung erzielt.

¹ Sendju, JI of Biochem. 5, 229; 1925.

² Kiesel, H. 60, 460; 1909. — 118, 267; 1922.

³ Shiga, H. 42, 502; 1904.

⁴ Hino, H. 133, 100; 1924. — Kossel und F. Curtius, H. 143, 283; 1925.

⁵ Hunter und Dauphinee, Proc. R. Soc. B. 97, 209; 1924.

⁶ Hunter und Morell, Trans. Proc. R. Soc. Canada (III) 16, 75; 1922.

⁷ Edlbacher und Bonem, H. 145, 69; 1925.

Die Kinetik der monomolekular verlaufenden Arginasespaltung bei pH = 6,62 hat Eberh. Gross¹ untersucht. Der zeitliche Verlauf folgt bei pH = 6,6 nicht einer Reaktionsgleichung 1. Ordnung. Bei dieser Acidität geht die enzymatische Spaltung nach Gross nicht zu Ende, sondern bleibt bei 70—85% Abbau stehen. Von den beiden Spaltungsprodukten hemmt nur Ornithin, diese Hemmung wird allerdings durch Harnstoffzusatz noch verstärkt.

Zur Spezifität der Arginasen findet man ausser den bereits zitierten Angaben solche von Dakin², Kossel³, Gottlieb⁴ u. a.

Besonders verdient noch die Zerlegung des Kreatins weitere Aufmerksamkeit. Dass es sich aber kaum um ein Enzym im Sinne von Gottlieb und Stangassinger handelt, dürfte durch die Arbeiten von Hammett⁵ sowie von Hahn⁶ und Barkan nachgewiesen sein.

5. Methodik.

Der älteren Methodik von Kossel und Dakin ist die Formoltitration zur Messung des Reaktionsverlaufes vorzuziehen (Clementi; Edlbacher). Da im Arginin nur das α -N-Atom formoltitrierbar ist und der gebildete Harnstoff keinen formoltitrierbaren Stickstoff besitzt, wohl aber im Ornithin beide Aminogruppen mit Formol reagieren, so steigt offenbar bei der Spaltung der formoltitrierbare Stickstoff auf das Doppelte.

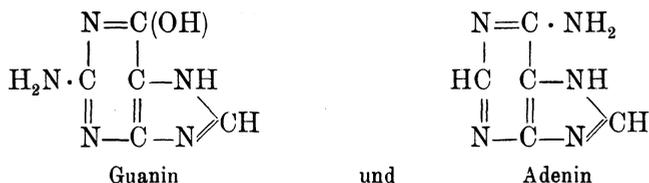
Hunter und Dauphinee (l. c.) haben 1924 eine neue Methode vorgeschlagen: Die Spaltung von Arginin in Ornithin und Harnstoff wird so ermittelt, dass der gebildete Harnstoff mit Urease als Ammoniumcarbonat bestimmt wird. Diese Methode hat neuerdings auch Edlbacher benützt; während sich mit der Formoltitration Arginase in den Nieren der Vögel nicht nachweisen liess, wurden mit der Urease-Methode reichliche Mengen von Arginase (bzw. gebildetem Harnstoff) gefunden.

Kossel, E. Gross (H. 135) und F. Curtius fällen Arginin als Flavianat.

C. Purin-Aminasen.

Substrate.

Die hier in Betracht kommenden Amine sind:



¹ Eberh. Gross, H. 112, 236; 1921.

² Dakin, JI Biol. Chem. 3, 435; 1908.

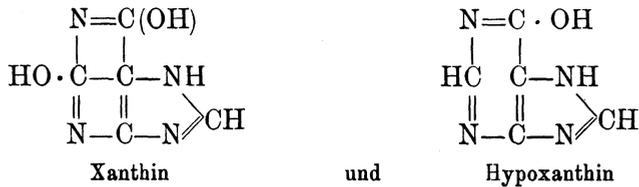
³ Kossel und Mitarb., H. 72, 486; 1911. — 76, 457; 1911. — 78, 402; 1912. — 84, 1; 1913.

⁴ Gottlieb und Stangassinger, H. 52, 1; 1907.

⁵ Hammett, JI Biol. Chem. 48, 133 u. 53, 323; 1923.

⁶ A. Hahn und G. Barkan, Zs Biol. 72, 25; 305. — A. Hahn und Georg Meyer, Zs Biol. 76, 247. — 78, 91; 1923.

welche in die entsprechende Oxy-Purine übergehen:



Ob ausserdem noch Cytosin in Uracil desamidiert wird, ist noch unsicher¹.

An diese Stufe des Purinstoffwechsels schliesst sich dann in der Regel die weitere Oxydation zur Harnsäure an, welche den Purin-Oxydasen zugeschrieben wird.

Ausserdem wurden noch für die entsprechenden Purin-Riboside Guanosin und Adenosin (siehe S. 329) besondere Enzyme angenommen.

Man muss sagen, dass über den Reaktionsmechanismus dieser Amino-Purindesamidierungen noch wenig bekannt ist; man weiss nicht einmal, ob es sich wirklich um reine hydrolytische Katalysen handelt, oder ob nicht Oxydo-Reduktionsmittel dabei verbraucht werden.

Verbreitung der Purin-Aminasen.

Ob die beiden desamidierenden Wirkungen, welche gewisse Organbreie auf Guanin bzw. auf Adenin ausüben und welche besonders durch Schittenhelm und Jones eingehend studiert wurden, einem einzigen oder zwei Enzymen zuzuschreiben sind, lässt sich noch nicht entscheiden. Es ist nach neueren enzymchemischen Erfahrungen wahrscheinlich, dass die Verschiedenheit der Begleitsubstanzen aus verschiedenem Material Differenzen zwischen einer „Guanase“ und einer „Adenase“ nur vortäuscht.

Schittenhelm schreibt darüber in Oppenheimers Handbuch IV, 1:

„... So stellt sich die bemerkenswerte Tatsache heraus, dass man bei Verwendung von Rinder- und Pferdeorganen in den Extrakten stets die Umsetzung von Guanin und Adenin in gleich intensivem Grade erweisen kann; bei Verwendung von bestimmten Organen des Menschen, des Schweines, des Hundes und des Kaninchens dagegen geht die Umsetzung häufig scheinbar nur für den einen Körper; so vermag Menschenmuskel und Menschenleber, Kaninchen- und Hundeleber nur Guanin, Schweineleber und Schweinemilz nur Adenin umzusetzen Jones hat deshalb zwei verschiedene Fermente angenommen, eine Guanase und eine Adenase (W. Jones und Partridge, H. 42, 343; 1904. — W. Jones und Winternitz, H. 44, 1; 1905). Schittenhelm hat dann gezeigt, dass die Unterschiede häufig nur quantitative sind...“

Jedenfalls wurde die Desamidierung der Guanase mit vielerlei Material beobachtet und durch Organbreie viel häufiger nachgewiesen als diejenige der Adenase.

¹ Siehe Hahn und Lintzel, Zs Biol. 79, 179; 1923.

Vorkommen		Autor und Schriftstelle
Guanase	Adenase	
Nicht oder wenig in Leber und Milz des Schweines	—	Jones, H. 45, 85; 1905. — 48, 110 1906. — Biol. Chem. 3, 227; 1907. — Schittenhelm u. Schmidt, Zs exp. Path. 4, 432; 1907.
Nachgewiesen in menschl. Leber, Muskel, Lunge	Wenig in menschl. Organen. Fehlt in Milz	Schittenhelm u. Schmidt, Zs exp. Path. 4, 424; 1907 u. H. 63, 248; 1909.
—	Fehlt in menschl. Organen	Jones u. Winternitz, H. 60, 180; 1909.
—	Fehlt in menschl. Organen	E. R. Long, Biol. Chem. 15, 449; 1913.
Menschl. Tumoren	Fehlt in menschl. Tumoren	Wells u. E. R. Long, Zs Krebsf. 12, 1913.
Fehlt in Schweine-Embryo	Gefunden in Leber vom Schweine-Embryo	Mendel, Am. Jl Physiol. 20, 97; 1907.
—	Hund, versch. Organe, fehlt	Amberg u. Jones H. 73, 407, 1911.
—	Hund, Leber u. Darm wenig	Frätznick, Diss. Erlangen 1912.
Lupinen-Keimlinge	—	Schittenhelm, H. 63, 289; 1909.
Hefe	Fehlt in Hefe	Straughn u. Jones Biol. Chem. 6, 245, 1909.
Nicht in Hefepulver	—	Amberg u. Jones, Biol. Chem. 13, 441. 1912.

Wegen der Frage nach der Existenz spezifischer Nucleosid-Aminasen und betr. ihres Vorkommens muss auf die Original-Arbeiten von Schittenhelm¹, Jones² und ihrer Mitarbeiter verwiesen werden.

Methodik: Unter Hinweis auf die eben zitierten Arbeiten sowie auf Mendel und Mitchel (Am. Jl Physiol. 20, 97, und zwar 101) muss auf die langen Versuchszeiten (bis zwei Monate) hingewiesen werden, welche oft zur Anwendung kamen.

D. Die biologische Spaltung der Aminosäuren.

Der einfachsten chemischen Formulierung nach würde beim Übergang einer Aminosäure in die entsprechende Oxysäure eine eigentliche Hydrolyse vorliegen.



Tatsächlich ist eine enzymatische Katalyse in diesem Sinne auch angenommen worden, und zwar von Ahlgren³, welcher mit Versuchen über die Desaminierung der Asparaginsäure durch Froschmuskulatur an diese Frage

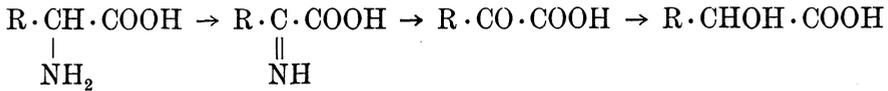
¹ Schittenhelm und Wiener, H. 77, 77; 1912.

² V. N. Leonard und Jones, Biol. Chem. 6, 453; 1909. — Jones, H. 65, 383; 1910. Vögtlin und Jones, H. 66, 250; 1910. — Jones, Biol. Chem. 9, 129 u. 169; 1911.

³ Ahlgren, C. r. Soc. Biol. 90, 1187; 1924.

herangetreten ist. Wieland¹ hebt aber hervor, dass der Nachweis der Apfelsäure bei dieser Reaktion nicht erbracht ist.

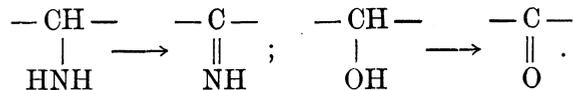
Wieland¹ hat der Desaminierung der Aminosäuren eine eingehende Untersuchung gewidmet: „Die zuerst von O. Neubauer² im Zellvorgang aufgeklärte Reaktion der Desaminierung der Aminosäuren, der Ersatz der NH₂-Gruppe durch OH, gekennzeichnet durch das Schema



macht die direkte hydrolytische Ablösung der NH₂-Gruppe vom Kohlenstoff — es sei denn bei den Amidn oder allgemein bei dem Typ $-\text{C}=\text{R}-\overset{\cdot}{\text{N}}\text{H}_2$

unwahrscheinlich. Die feste Haftung des basischen Stickstoffs am Kohlenstoff bildet vielmehr eine Grundregel der organischen Chemie.“

Diesen letzteren Satz möchte der Verfasser auch den folgenden Betrachtungen voranstellen³. Nach eigenen Versuchen, welche parallel mit enzymatischen Untersuchungen ausgeführt wurden, kann behauptet werden, dass eine reine Hydrolyse des Glykokolls und Alanins durch verdünnte Säuren oder Basen als Katalysatoren nicht eintritt; auch kann Verfasser der Deutung, welche E. Baur⁴ und sein Schüler K. Wunderly⁵ ihren Versuchen geben, nicht beistimmen. Den Arbeiten von Neubauer, Knoop und Dakin zufolge beginnt der Angriff auf die Aminosäuren mit einer Dehydrierung, die unter Abspaltung zweier Wasserstoffatome entsprechend verläuft, wie bei primären und sekundären Alkoholen



„Hier und auch für die Aldehydgruppe ist die Möglichkeit der vitalen Dehydrierung experimentell festgelegt, indem z. B. die Essigsäuregärung auch unter Ausschluss von Sauerstoff zustande kommt, wenn man diesen normalen Wasserstoffacceptor durch Chinon oder Methylenblau ersetzt. Ebenso ist die sauerstofflose Dehydrierung der gesättigten Kohlenstoffkette im Übergang von Bernsteinsäure zu Fumarsäure einwandfrei erwiesen (Thunberg). . . Ob sich auch das dritte wichtige Grundsystem in der Zelle zum Abbau gelangender Stoffe, das der Aminosäuren, dieser Vorstellung einfügt, ist bisher experimentell nicht festgestellt.“

¹ Wieland und Bergel, Lieb. Ann. 439, 196; 1924.

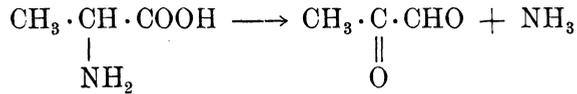
² O. Neubauer und Hans Fischer, H. 67, 230; 1910. — Neubauer und Fromherz, H. 70, 326; 1911.

³ Siehe über die Stabilität der Aminosäuren gegen Säuren und Alkalien auch Abderhalden und E. Schwab, H. 136, 219; 1924, Nachtrag 137.

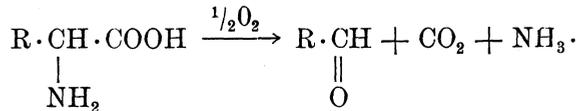
⁴ E. Baur, Helv. Chim. Acta 5, 825; 1922.

⁵ Wunderly, Zs physik. Chem. 112, 175; 1924.

Der wichtige experimentelle Beitrag zur Kenntnis der Desaminierung von Dakin und Dudley¹ besteht im Nachweis, dass Alanin unter NH_3 -Abspaltung in Methylglyoxal übergeht:

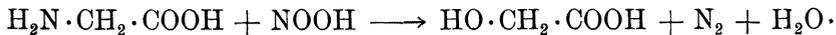


Für die enzymchemische Aufklärung der Desaminierung ist die Einsicht erforderlich, auf welchem Wege nicht-enzymatische Katalysatoren die Abspaltung von NH_3 aus den Aminosäuren bewirken. Durch Wieland und Bergel (l. c.) ist nachgewiesen worden, dass (bei Anwendung von Adsorptionskohle und Palladiumschwarz als Katalysator) aus verschiedenen Aminosäuren NH_3 und CO_2 in äquivalenten Mengen auftreten, daneben der um 1 C-Atom ärmere Aldehyd. Dementsprechend kann dieser Vorgang nach Wieland formuliert werden:



Auf die Frage ob und in welchem Grade die Warburgsche eisenhaltige Blutkohle tatsächlich ein Analogon zu den am Aminosäuren-Abbau beteiligten Enzymen darstellt² brauchen wir hier nicht einzugehen.

Unter den biochemisch in Betracht kommenden Reaktionen, welche zur Abspaltung des Ammoniaks aus Aminosäuren führen, kann schliesslich auch die Reaktion mit salpetriger Säure angeführt werden³:



Die Reduktion der Nitrats zu Nitriten wird bekanntlich in vielen pflanzlichen und tierischen Geweben durch Reduktionsenzyme bewirkt. Es hängt von der Konzentration der beteiligten Stoffe und von der Acidität des Mediums ab, in welchem Grad sich diese Reaktion geltend machen kann.

Die Frage nach den bei der Desaminierung der Aminosäuren beteiligten Enzymen hat man oft versucht mit Hilfe von Dauerpräparaten, Autolysaten oder Organextrakten zu beantworten. Die zuverlässigen unter den Versuchen⁴ haben jedenfalls gezeigt, dass ein die Aminosäuren desaminierendes Enzym aus keinem Material in Lösung gebracht werden kann.

¹ Dakin und Dudley, *Jl Biol. Chem.* 14, 555; 1913.

² Vgl. Warburg und Negelein, *Biochem. Zs* 113, 257; 1921.

³ Und die gleichzeitige Bildung von $\text{OCH} \cdot \text{COOH}$.

⁴ Einige gegenteilige Angaben seien der Vollständigkeit wegen zitiert:

Material:	Substrat:	Autor und Schriftstelle:
Organbrei	Glykokoll, Leucin	Lang, Hofm. Beitr. 5, 321; 1904.
Placenta	Glykokoll	Savarè Hofm. Beitr. 9, 141; 1907.
Leber u. Darm	Glykokoll, Leucin	Bostock, <i>Biochem. Jl</i> 6, 48 u. 388; 1912.
Hefenemulsion		Effront, <i>C. r.</i> 146, 779 u. 151, 1007; 1910.

Über die Desaminierung von Aminosäuren durch Mikroorganismen verdankt man H. Pringsheim¹ eine eingehende Studie. Dieser Forscher zieht aus seinen Versuchen folgenden Schluss:

Verschiedenen Pilzen wie der Hefe und *Aspergillus niger* kommt die Fähigkeit zu, aus stickstoffhaltigen Substanzen vor allem auch aus Aminosäuren, in denen die Aminogruppe festgebunden ist, Ammoniak abzuspalten. Diese Abspaltung ist enzymatischer Natur. Das desamidierende Enzym behält seine Wirksamkeit jedoch beim Behandeln der Pilze mit Aceton und Äther, d. h. bei der Darstellung der Acetondauerpräparate, nur in ganz geringem Masse bei. Auch Pilzpresssäfte haben keine Kraft mehr, um Aminosäuren zu desamidieren. Die weitere Umwandlung des desamidierten Restes in Alkohole durch Kohlensäureabspaltung wird bei der Hefe durch ein Enzym bewirkt, dessen Wirkung an die durch die Gegenwart von Zucker gebundene Entfaltung der Zuckervergärung gebunden ist und das seine Kraft durch die Abtötung mittels Acetons und Äthers verliert.

Besonders durch die klassische Untersuchung von Felix Ehrlich² über alkoholische Gärung der Aminosäuren ist das Ergebnis festgelegt, dass die dabei beteiligten Katalysatoren nicht von der Zelle abgetrennt werden können.

Bei einer tertiären α -Aminosäure ist der oxydative Abbau über die α -Ketosäure nicht möglich; nach K. Kurono³ trat bei Gärversuchen mit d,l-Methyl-n-propyl- α -amino-Essigsäure eine optisch aktive Form dieser Säure auf und andererseits ein drehender Amylalkohol; dies macht es wahrscheinlich, dass die alkoholische Spaltung der tertiären Aminosäure über das Keton geht; ob dabei auch die Ketosäure durchlaufen wird, ist noch fraglich.

Zu entsprechenden Resultaten waren betr. tierischer Gewebe schon Abderhalden und Schittenhelm⁴ gekommen und Levene⁵ konstatierte das gleiche bezüglich der Leukocyten und der Nieren, Butkewitsch⁶ bezüglich höherer Pflanzen.

Auf die bemerkenswerte Studie Fearons⁷ über den Chemismus der Desaminierung der Aminosäuren kommen wir im III. Teil des Buches zurück.

Bei dieser Gelegenheit mag darauf hingewiesen werden, dass — vielleicht unter dem Eindruck E. Buchnerscher Arbeiten über Zymase — lange ein grosses Gewicht auf den Umstand gelegt wurde, ob eine katalysierte biochemische Reaktion von der Zelle abgetrennt werden kann oder nicht, und man findet besonders in der Literatur der neunziger Jahre und zu Anfang dieses Jahrhunderts Unterschiede zwischen Plasmareaktionen und enzymatischen Reaktionen betont, je nachdem es gelungen war oder nicht, die Katalyse von den frischen Zellen unabhängig zu machen. Gegenwärtig hat eine solche Unterscheidung wohl keine reelle Unterlage mehr. Zahlreiche Enzyme entstehen am Plasma und wir wissen, dass hinsichtlich ihrer Abtrennbarkeit und Löslichkeit grosse Unterschiede vorkommen.

¹ Pringsheim, *Biochem. Zs* 12, 15; 1918.

² F. Ehrlich, *Biochem. Zs* 2, 52; 1906. — 18, 391.

³ K. Kurono, *Biochem. Zs* 134, 424; 1922.

⁴ Abderhalden und Schittenhelm, *H.* 49, 26; 1906.

⁵ Levene und G. M. Meyer, *Jl Biol. Chem.* 15, 475; 1913. — 16, 555; 1914.

⁶ Butkewitsch, *Biochem. Zs* 16, 410; 1909.

⁷ Fearon, *Biochem. Jl* 18, 576; 1924. — Siehe auch A. Hahn und Lintzel, *Zs f. Biol.* 79, 179; 1923.

Von hydrolytisch wirkenden Desamidasen der Aminosäuren kann also bis jetzt nur im hypothetischem Sinne gesprochen werden. Auch die Desaminierung der α -Aminosäuren durch niedere Pilze (vgl. z. B. Emmerling, Zbt. f. Bakt. 1903) ist eine oxydative, keine hydrolytische. Demgemäss werden wir auch keine synthetische enzymatische Wirkung im Sinne der Gleichung $\text{NH}_3 + \text{HO} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{R} \cdot \text{COOH}$ annehmen können.

Von grossem Interesse ist Knoop's Hinweis auf die reversible Bildung von Aminosäuren aus α -Ketosäuren (Klin. Woch. 5; 1926).

Desaminierung des Tyrosins.

Einen besonderen Fall stellt die Desaminierung des Tyrosins insofern dar, als dieselbe in Gegenwart von Sauerstoff oder Oxydationsmitteln sehr leicht eintritt; man verdankt Chodat¹ und Bach² eingehende Untersuchungen über diese Reaktion³. Denselben zufolge wird Oxyphenylacetaldehyd gebildet, worauf dann die für die „Tyrosinase“-Wirkung charakteristischen roten und schwarzen Kondensationsprodukte und Melanine auftreten. Eine primäre hydrolytische Desaminierung des Tyrosins zu Oxyphenylmilchsäure ist zwar in einem Fall, und zwar mit *Oidium lactis* von Felix Ehrlich⁴ gefunden worden, allgemein ist das primäre Eingreifen einer Desaminase am oxydativen Abbau des Tyrosins nicht erwiesen⁵.

Auf die Tyrosinase und die Purin-Oxydasen kommen wir im letzten Abschnitt dieses Buches bei den „Oxydo-Reduktions-Enzymen“ eingehender zurück⁶.

¹ Chodat und Schweizer, Biochem. Zs 57, 430; 1913. — Arch. Sc. phys. et nat. 35; 140; 1913. Schweizer, Biochem. Zs 78, 37; 1916.

² Bach, Biochem. Zs 60, 226; 1914.

³ Siehe hierzu auch M. E. Robinson und McCance, Biochem. Jl 19, 251; 1925. — Siehe auch Folpners, Biochem. Zs 78, 180; 1916. — Haehn, Biochem. Zs 105, 169; 1920.

⁴ F. Ehrlich und K. A. Jacobsen, Chem. Ber. 44, 888; 1911. — Siehe auch Y. Kotake, H. 143, 240; 1925.

⁵ H. S. Raper und Wormald, Biochem. Jl 19, 84; 1925.

⁶ Siehe hierzu M. Dixon und Thurlow, Biochem. Jl 18, 971; 1924.

16. Kapitel.

Di-Peptidasen.

Dieses Kapitel, das den enzymatischen Aufbau und Abbau der niederen Peptide (Di-Peptide) behandelt, bildet die Einleitung zur Beschreibung der eigentlichen Proteolyse, welche durch die Enzyme vom Typus des Pepsins, Trypsins und Papains bewirkt wird.

Die an Di-Peptiden geprüften Enzyme können und müssen in einem besonderen Kapitel behandelt werden; sie spalten zwar auch einen Teil des Substratgemisches, das als Pepton bezeichnet wird, aber nicht nur, dass die Hydrolyse der reinen Di-Peptide sich weitaus exakter und vollständiger behandeln lässt als diejenige der anderen Protein-Derivate und Protein-Abbauprodukte, sondern es scheint nach den Versuchen von Waldschmidt-Leitz der enzymatische Abbau der höher-molekularen Bestandteile des Peptons von demjenigen der niedrigen Peptide wesentlich verschieden zu sein.

Die Di- und Poly-Peptidasen bieten der Erforschung weit geringere Schwierigkeiten als die eigentlichen Proteasen, da die typischen Polypeptide ihrem chemischen Bau und ihrem Dispersitätsgrad nach bereits bekannt sind; der Chemismus der Spaltung tritt dadurch eindeutig hervor und ist quantitativen Messungen und Besprechungen zugänglich.

Trotzdem finden wir auch bezüglich der Peptidbildung und Peptidspaltung viele wesentliche Fragen noch unaufgeklärt, Fragen, deren Beantwortung für das Studium der ganzen Proteolyse und der Eiweisschemie überhaupt von grundlegender Bedeutung ist.

Bevor wir auf die Einzelheiten unseres Themas eingehen, müssen wir versuchen, eine natürliche Abgrenzung gegen die eigentlichen enzymatischen Proteolysen zu finden.

Was die Substrate betrifft, so können wir hier diejenigen Stoffe zusammenfassen, in welchen die Komponenten, die Aminosäuren, ausschliesslich durch die Carbamid-Bindung $-\text{CO}\cdot\text{NH}-$ in bekannter Weise verkettet sind. Wir behandeln also hier die ihrem Bau nach bekannten Polypeptide und ihre nächsten höheren Homologen, in denen wir eine analoge Verkettung der Aminosäuren mit grosser Wahrscheinlichkeit annehmen können.

Schwieriger ist es, eine Grenze hinsichtlich des Enzymmaterials zu ziehen, über welches ja bisher noch wenig Exaktes bekannt ist. Wir werden also in dieses Kapitel alle solchen natürlichen Säfte, Extrakte und Präparate einbeziehen, durch welche überhaupt die Bildung oder Spaltung

eines Repräsentanten der hier in Betracht kommenden Substratgruppe gelungen ist, unabhängig davon, welche Wirkungen das Enzymmaterial ausserdem an stickstoffhaltigen Stoffen ausübt.

In den Darstellungen des Enzymgebietes sind bisher aus leicht ersichtlichen Gründen die abbauenden Wirkungen, die Hydrolysen, zugrunde gelegt worden. In der Überzeugung, dass das eingehende Studium der enzymatischen Synthesen berufen ist, wesentlich zu der Entwicklung der Biochemie und der Physiologie beizutragen, will der Verfasser in diesem Werke versuchen, diejenigen Tatsachen hervorzuheben, welche über die Synthesen im Proteingebiet bekannt geworden sind. Von diesem Gesichtspunkt aus haben wir als Substrate in erster Linie die Aminosäuren zu betrachten.

A. Die am Aufbau der Proteine beteiligten Aminosäuren.

Alle als Eiweissbausteine bekannt gewordenen Aminosäuren enthalten die Aminogruppe in α -Stellung zum Carboxyl, was darauf hindeutet, dass ihre Bildung auf den gleichen Reaktionstypus zurückzuführen ist. In der Tat liegt es nahe, anzunehmen, dass die meisten von ihnen nach der Strecker'schen Reaktion entstehen, also aus dem um 1 C-Atom ärmeren Aldehyd durch Anlagerung von NH_3 und HCN . Durch Verseifung des gebildeten Amino-Nitriles entsteht dann die entsprechende Aminosäure



Das Aminonitril enthält ein „asymmetrisches Kohlenstoffatom“ und wenn die Verseifung unter geeigneten Bedingungen durch eine optisch aktive Base bewirkt wird, so kann sie asymmetrisch geführt werden.

Abgesehen vom Glykokoll sind alle natürlichen α -Aminosäuren asymmetrisch gebaut und treten überwiegend oder ausschliesslich in einer rechts- oder linksdrehenden Form auf, welche sich genetisch mit der allgemeinen d- oder l-Reihe verknüpfen lässt (Karrer¹ und Mitarb.).

Hinsichtlich der Bezeichnung der sterischen Reihen schliessen wir uns im folgenden den Vorschlägen von Freudenberg bzw. Wohl und Freudenberg² an, welche sich auf die von E. Fischer geschaffenen Grundlagen stützen.

Soll ausgedrückt werden, dass eine Verbindung nach rechts oder links dreht, so wird vor ihren Namen das Zeichen (+) oder (−) gesetzt.

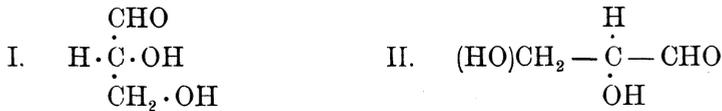
Diese Unterscheidung nach der beobachteten Drehung ist in vielen Fällen kennzeichnend, wie bei (+)-Glucose (Rechtsglucose) oder (−)-Weinsäure (Rechtswinsäure) und vielfach die einzig mögliche. . . . In anderen Fällen aber ist diese Benennung nicht eindeutig oder

¹ Karrer und Mitarb, Helv. 6, 411 u. 957; 1923. — 8, 360; 1925.

² A. Wohl und K. Freudenberg, Chem. Ber. 56, 309; 1923.

wenig bezeichnend, so bei der Äpfelsäure, wo die Drehung mit der Änderung der Konzentration ihr Zeichen wechselt, oder bei der Glycerinsäure, wo ein Zeichenwechsel beim Übergang von der Säure zu ihren Salzen eintritt. . . . Im Gebiet der Zuckerarten und Oxyssäuren ist für die eindeutige Unterscheidung der Antipoden die genetische Beziehung zu den beiden Formen des Glycerinaldehyds zweckmässig, als den gemeinsamen Ausgangspunkten eines hier eindeutig durchführbaren stereochemischen Systems.

Wird in Übereinstimmung mit der ursprünglich von E. Fischer bei den Zuckern getroffenen Wahl dem rechtsdrehenden (+)-Glycerinaldehyd die Formel I oder, wagerecht geschrieben, II und die Bezeichnung d-Glycerinaldehyd zuerteilt, so ist damit festgelegt, dass bei der üblichen Schreibweise mit der Carbonylgruppe oben bzw. rechts durch den Buchstaben d die Lage der Hydroxylgruppe rechts bzw. unten bezeichnet wird.



Dann ergibt sich aus experimentellen Feststellungen, dass die (–)-Glycerinsäure die Formel III hat, also d-Glycerinsäure ist und die (+)-Äpfelsäure (IV) d-Äpfelsäure usf. Alle Verbindungen mit einem asymmetrischen C-Atom, die sich genetisch vom d-Glycerinaldehyd ableiten lassen, in denen also am α -C-Atom (OH) rechts bzw. unten steht, gehören der d-Reihe an.



Sollen die Aminosäuren zum Aufbau von höheren Eiweiss-Spaltprodukten verwendet werden, so müssen zunächst die in der Natur vorkommenden optisch aktiven Formen dargestellt werden. Eine sehr brauchbare von E. Fischer ausgearbeitete Spaltungsmethode beruht auf der Darstellung der Benzoylverbindungen, welche als starke Säuren mit optisch aktiven Basen die beiden isomeren Salze bilden, welche durch Kristallisation getrennt werden können. Auf diese Weise hat Fischer die Spaltungen zahlreicher Aminosäuren durchgeführt¹. Formylverbindungen² haben den Vorteil, dass die Acylgruppe sich leicht wieder entfernen lässt.

Eine sehr brauchbare Methode von O. Warburg beruht auf der asymmetrischen enzymatischen Hydrolyse der Ester der Aminosäuren durch Lipasen³ des Pankreassaftes.

Weitere Methoden zur Spaltung racemischer Verbindungen hat H. Scheibler in Houbens bekannten „Methoden der organischen Chemie“ zusammengestellt (2. Aufl. 1922).

In der folgenden Tabelle sind diejenigen Aminosäuren, welche als Spaltprodukte der Proteine erkannt sind, aufgeführt.

¹ E. Fischer, Chem. Ber. 32–34; 1899–1901.

² E. Fischer und O. Warburg, Chem. Ber. 38, 3997; 1905.

³ O. Warburg, Chem. Ber. 38, 187; 1905. — Bezüglich Anwendungen siehe z. B. Abderhalden, Sickel und H. Ueda, H. 131, 277; 1923. — Fermentf. 7, 91; 1923.

Name der α -Verbindung	Formel	$[\alpha]_D^{20}$ in wässer. Lös.	Literatur über Drehung, Vorkommen, Darstellung
Glykokoll	$\text{H}_2\text{N} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{COOH}$		In Proteinen: Osborne und Mitarbeiter, JI Biol. Chem. 3; Am. JI Physiol. 17–20.—Abderhalden und Mitarbeiter, H. 45 bis 48.
d-Alanin	$\text{CH}_3 \cdot \underset{\text{NH}_2}{\text{CH}} \cdot \text{COOH}$	+ 2,7°	E. F., Ber. 32 (Darst.) und 40 (Drehung).
d- α -Aminobutter- säure	$\text{CH}_3 \cdot \text{CH}_2 \cdot \underset{\text{NH}_2}{\text{CH}} \cdot \text{COOH}$	+ 8,0°	E. F. und Mouneyrat, Ber. 33.
d-Amino-isovalerian- säure (d-Valin) .	$\text{CH}_3 \cdot \underset{\text{CH}_3}{\text{CH}} \cdot \underset{\text{NH}_2}{\text{CH}} \cdot \text{COOH}$		E. F., H. 33, 151. — Slimmer, Ber. 35. — Schulze, H. 17, 193. — Levene, H. 35.
l-Leucin	$\text{CH}_3 \cdot \underset{\text{CH}_3}{\text{CH}} \cdot \text{CH}_2 \cdot \underset{\text{NH}_2}{\text{CH}} \cdot \text{COOH}$	– 10,4°	Ehrlich und Wendel, Biochem. Zs 8. — Zuge- hörigkeit zur l-Reihe: Karrer, Jäggi, Taka- hashi, Helv. 8.
d-Isoleucin	$\text{CH}_3 \cdot \text{CH} \cdot \underset{\text{C}_2\text{H}_5}{\text{CH}} \cdot \text{COOH}$ NH_2	+ 9,74°	Ehrlich, Ber. 37, 1809.
d-Norleucin	$\text{CH}_3 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \underset{\text{NH}_2}{\text{CH}} \cdot \text{COOH}$	+ 6,53°	Heckel, Sameč, Monats- hefte 28 u. 29; 1907/08.
l-Serin	$\text{CH}_2 \cdot \underset{\text{OH}}{\text{CH}} \cdot \underset{\text{NH}_2}{\text{COOH}}$	– 6,83°	E. F., Ber. 40, 1501. — E. F. u. Leuchs, Ber. 35.
l-Cystin	$\text{S} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}(\text{NH}_2) \cdot \text{COOH}$ $\text{S} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}(\text{NH}_2) \cdot \text{COOH}$		Neuberg, Ber. 35, 3161.
Cystein	$\text{CH}_2 \cdot \underset{\text{SH}}{\text{CH}} \cdot \underset{\text{NH}_2}{\text{COOH}}$		Sekundäres Spaltprodukt.
l-Phenylalanin . . .	$\text{C}_6\text{H}_5 \cdot \text{CH}_2 \cdot \underset{\text{NH}_2}{\text{CH}} \cdot \text{COOH}$	– 35,1°	Schulze, H. 9 und 12. — E. F., H. 33, 151 und 412.
l-Tyrosin	$\text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{CH}_2 \cdot \underset{\text{OH}}{\text{CH}} \cdot \underset{\text{NH}_2}{\text{COOH}}$	– 12,56 (4% HCl)	
l-Prolin	$\begin{array}{c} \text{CH}_2 - \text{CH}_2 \\ \quad \\ \text{CH}_2 \quad \text{CH} \cdot \text{COOH} \\ \diagdown \quad / \\ \text{NH} \end{array}$	– 77,40°	
l-Oxyprolin	$\begin{array}{c} \text{HO} \cdot \text{CH} \cdot \text{CH}_2 \\ \quad \\ \text{CH}_2 \quad \text{CH} \cdot \text{COOH} \\ \diagdown \quad / \\ \text{NH} \end{array}$	– 76°	E. F., Ber. 35, 2660.

Tierische Eiweissstoffe.

α -Aminosäuren	Eier-Albumin	Serum-Albumin	Serum-Globulin	Casein	Fibrin	Vitellin
Glykokoll	0,0	0,0	3,5	0,0	3,0	1,0
Alanin	2,5	2,7	2,2	1,3	3,6	0,7
Leucin	10,7	20,0	18,7	9,35	15,0	11,0
Isoleucin	—	—	—	1,43	—	—
Valin	2,5	—	—	7,2	1,0	2,4
Serin	—	0,6	—	0,5	0,8	—
Cystin	0,3	4,2	2,25	1,5	1,2	—
Phenylalanin . . .	5,2	3,1	3,8	3,2	2,5	2,8
Tyrosin	1,8	2,1	2,5	4,5	3,5	3,4
Prolin	3,6	1,0	2,8	6,7	3,6	4,2
Oxyprolin	—	—	—	0,2	—	—
Tryptophan ¹	—	—	—	1,5	—	—
Histidin	1,7	3,4	2,8	3,8	6,4	1,9
Arginin	4,9	4,9	3,95	4,5	7,4	7,5
Lysin	3,8	13,2	9,0	7,7	11,1	4,8
Asparaginsäure . .	2,2	3,1	2,5	1,4	2,0	2,1
Glutaminsäure . .	9,1	7,7	8,5	15,5	10,4	1,3

Pflanzliche Eiweissstoffe.

α -Aminosäuren	Edestin aus		Erbsen Legumin	Zein	Hordein	Gliadin	Hefen- zymo- casein ³
	Hanf- samen ²	Baumwoll- samen					
Glykokoll	3,8	1,2	0,4	0	0,0	0,7	7,4
Alanin	3,6	4,5	2,1	9,8	0,4	2,0	1,7
Leucin	20,9	15,5	8,0	20,0	5,7	6,6	3,2
Valin	+	+	1,0	1,9	0,1	3,3	—
Serin	0,3	0,4	0,5	1,0	—	0,1	—
Cystin	0,2	—	—	—	1,2	1,2	0,7
Phenylalanin . . .	2,4	3,9	3,7	6,6	5,0	2,3	0,9
Tyrosin	2,1	2,3	1,6	4—10	1,7	1,2	2,4
Prolin	1,7	2,3	3,2	9	13,7	13,2	4,2
Oxyprolin	2,0	—	—	—	—	—	—
Tryptophan	+	+	—	—	—	1,0	1,5
Histidin	1,1; 2,2	—	2,4	0,8	2,3	2,2	3,5
Arginin	11,7; 14,2	—	11,0	1,5	2,8	3,0	8,4
Lysin	1,0; 1,6	—	4,5	0,0	0,9	1,2	11,5
Asparaginsäure . .	4,5	2,9	5,3	1,7	—	0,6	+
Glutaminsäure . .	6,3	17,2	17,0	26	43	44	20
Ammoniak			2,1				9,3
			63,1				77,1

¹ Casein enthält nach Hopkins und Cole 1,5% Tryptophan, nach Holm und Greenbank (Jl Am. Chem. Soc. 45, 1788; 1923) 2,2%.

² Die linksstehenden Werte sind von Abderhalden angegeben, die rechtsstehenden für Histidin, Arginin und Lysin von Kossel und Patten.

³ Lüers und Nowak, Biochem. Zs 154, 310; 1924.

eine Dezimalstelle abgerundet wiedergegeben; eine grössere Genauigkeit ist nämlich in der Regel nicht erreicht worden, im Gegenteil ist vielfach mit sehr grossen Versuchsfehlern zu rechnen; auch ist die Konstanz des Materials kaum sichergestellt.

Histone und Protamine weichen in ihrer Zusammensetzung stark von den eigentlichen Eiweissstoffen ab.

Die Histone, welche wohl als Zwischenglieder zwischen eigentlichen Eiweissstoffen und Protaminen aufzufassen sind, enthalten neben reichlichen Mengen Arginin¹ noch die meisten Monoaminosäuren. So fanden Abderhalden und Rona im Thymushiston folgende prozentische Mengen:

Glycin	0,5	Prolin	1,5
Alanin	3,5	Phenylalanin	2,2
Leucin	11,8	Tyrosin	5,2
Glutaminsäure 0,5.			

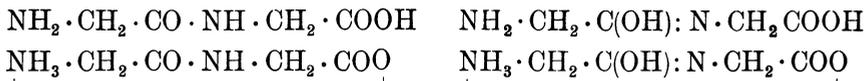
Die Protamine entstehen nach Kossel und Weiss² aus abgebautem Muskelweiess. Die Protamine finden sich nach den Studien von Miescher und besonders von Kossel im Sperma vieler Fische, und aus ihnen wurden die verschiedenen Stoffe wie Salmin, Clupein, Sturin usw. isoliert.

In den echten Protaminen beträgt der Basen-Stickstoff rund 90% des Gesamtstickstoffes. Es enthalten:

Salmin ³ (aus Rheinlachs)	Sturin ⁴
87% Arginin	58,7% Arginin
	12,9% Histidin
	12,0% Lysin
	ausserdem Alanin und Leucin.

B. Die Polypeptide.

Die Polypeptide sind gekennzeichnet durch die zwischen je zwei Aminosäureresten bestehende Bindung $\cdot\text{CO}\cdot\text{HN}$. Fischer⁵ hat auf die 4 Strukturisomeren hingewiesen, welche bereits beim einfachsten Dipeptid, dem Glycylglycin möglich sind (l. c. S. 568):



Hierzu ist noch zu bemerken, dass Bjerrum⁶ in neuerer Zeit wahrscheinlich gemacht hat dass bei den α -Aminosäuren die Zwitterionen in

¹ Kossel und Pringle, H. 49, 302; 1906. — Kossel, H. 22 u. 25; 1897/98.

² F. Weiss, H. 52, 108; 1907.

³ Vgl. Kossel, H. 88, 163; 1913.

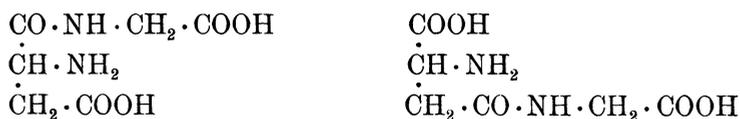
⁴ Kossel und Dakin, H. 44, 342; 1905.

⁵ Siehe E. Fischers zusammenfassenden Vortrag Chem. Ber. 39, 530; 1906.

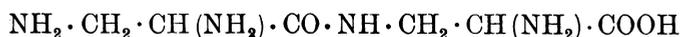
⁶ Bjerrum, Zs f. physik. Chem. 104, 147; 1923.

erheblichem Grad auftreten; das gleiche ist von den Polypeptiden zu vermuten, wobei der Abstand zwischen der freien Amino- und Hydroxylgruppe eine wesentliche Rolle spielt.

„Eine weitere Komplikation erfährt die Frage nach der Struktur der Polypeptide, wenn sie Aminodicarbonsäure oder Diaminosäure enthalten. So musste für das Asparagylmonoglycin die Wahl zwischen den beiden Formeln



offen bleiben¹. Ebenso wenig konnte für das Dipeptid der Diaminopropionsäure eine Entscheidung zwischen den Formeln



oder $\text{NH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}(\text{NH}_2) \cdot \text{CO} \cdot \text{NH} \cdot \text{CH} \cdot \text{COOH}$
 $\dot{\text{C}}\text{H}_2 \cdot \text{NH}_2$

getroffen werden².“

Eine ausserordentlich grosse Zahl von Isomeriefällen ergibt sich durch Konfigurationsunterschiede der α -Aminosäuren, welche — mit Ausnahme des Glykokolls — ein asymmetrisches C Atom enthalten.

„Bei den Polypeptiden berechnet sich die Zahl der selbständigen optischen Isomeren nach der bekannten van't Hoff'schen Formel zu 2^n . Z. B. ein Dipeptid von der allgemeinen Formel



muss wegen der beiden durch Sternchen markierten, asymmetrischen Kohlenstoffatome in vier aktiven Formen existieren, von denen je zwei eine racemische Verbindung bilden können. Bei Benutzung von racemischem Rohmaterial ist also a priori die Bildung von zwei isomeren inaktiven Substanzen zu erwarten, und diese müssen schon auftreten bei den halogenhaltigen Zwischenprodukten



Derselbe Schluss gilt natürlich auch für die Umwandlung eines Dipeptids in ein Tripeptid, mit anderen Worten, für die Ankuppelung jeder weiteren Aminosäure mit einem asymmetrischen Kohlenstoffatom. Diese Isomerie ist zuerst bei dem Leucylphenylalanin³ beschrieben worden.“

Hinsichtlich des Aufbaues der optisch aktiven Polypeptide sind zwei Fälle zu unterscheiden: „Sind beide Komponenten einheitlich aktive Stoffe, so kann nur ein einziges Produkt entstehen; z. B. muss das Alanylalanin

¹ E. Fischer, Chem. Ber. 37, 4594; 1904.

² E. Fischer, Chem. Ber. 38, 4173; 1905.

³ Leuchs und Suzuki, Chem. Ber. 37, 3306; 1904.

aus d-Alanylchlorid und d-Alaninester ein einheitliches optisch aktives Di-peptid sein. Ist dagegen die eine der Komponenten aktiv und die andere racemisch, dann ist die Entstehung von zwei optisch aktiven Substanzen zu erwarten, die aber keine optischen Antipoden sind. Dahin gehören die zahlreichen Kombinationen des aktiven Tryosins, Asparagins und der Asparaginsäure mit Alanyl, Leucyl, Phenylglycyl. Da die Isomeren hier keine optischen Antipoden sind, so ist die Möglichkeit vorhanden, sie durch blosse Kristallisation zu trennen.“

Was die allgemeinen Eigenschaften der Polypeptide betrifft, so muss hinsichtlich Löslichkeit, Drehung, Fällbarkeit usw. auf die von ihrem Entdecker gegebene Zusammenfassung verwiesen werden (l. c. S. 575).

Ihre elektrolytischen Dissoziationskonstanten spielen bei der im folgenden notwendigen Betrachtung des Aciditäts-Optimums der enzymatischen Spaltung eine Rolle und verdienen deshalb hier besondere Erwähnung.

Wie ihre Komponenten, sind die Polypeptide Ampholyte, und das Verhältnis ihrer sauren Dissoziationskonstanten K_a und ihrer basischen Dissoziationskonstanten K_b ist von dem entsprechenden Verhältnis bei den Aminosäuren, wie nachfolgende Beispiele zeigen, nicht sehr verschieden. (K_a , K_b ist für die untersuchten Dipeptide rund tausendmal grösser als für die entsprechenden Aminosäuren).

Die Zahlenwerte gelten für 25°¹.

Ampholyt	K_a (25°)	K_b (25°)	Autor	Schriftstelle
Glykokoll	$1,8 \cdot 10^{-10}$	$2,7 \cdot 10^{-12}$	Winkelblech	Zs physik. Chem. 36, 546; 1901.
Alanin	$1,9 \cdot 10^{-10}$	$5,1 \cdot 10^{-12}$		
Leucin	$1,8 \cdot 10^{-10}$	$2,3 \cdot 10^{-12}$		
Phenylalanin . . .	$2,5 \cdot 10^{-9}$	$1,3 \cdot 10^{-12}$	Kanitz	Pflüg. Arch. 118, 589; 1907.
Tyrosin K_{a1}	$4 \cdot 10^{-9}$	$2,6 \cdot 10^{-12}$		
K_{a2}	$4 \cdot 10^{-10}$		Harris	Proc. R. Soc. B. 95, 440; 1923.
Tyrosin K_{a1}	$4 \cdot 10^{-10}$			
K_{a2}	$4 \cdot 10^{-11}$			
Valin	ca. $2 \cdot 10^{-10}$	$2,0 \cdot 10^{-12}$	Euler	H. 51, 219; 1907.
Glycylglycin . . .	$1,8 \cdot 10^{-8}$	$2 \cdot 10^{-11}$		
"	$0,5 \cdot 10^{-8}$		Harris	Proc. R. Soc. B. 95, 440; 1923.
Alanylglycin	$1,8 \cdot 10^{-8}$	$2 \cdot 10^{-11}$	Euler	H. 51, 219; 1907.
"	$0,66 \cdot 10^{-8}$		Harris	Proc. R. Soc. B. 95, 440; 1923.
Leucylglycin	$1,5 \cdot 10^{-8}$	$3 \cdot 10^{-11}$	Euler	H. 51, 219; 1907.

Hinsichtlich der chemischen Reaktionsfähigkeit der Aminosäuren sei nur folgendes hervorgehoben:

Wegen der grossen Festigkeit, mit welcher die Aminogruppe an das

¹ Für die Temperatur 18° liegen Messungen von Derby vor. Biochem. Zs 81, 107; 1917.

Kohlenstoffatom gebunden ist, kommt bei den Polypeptiden ebensowenig wie bei den Aminosäuren (vgl. Kap. 15, S. 387) ein eigentlicher hydrolytischer Ersatz von NH_2 gegen OH in Betracht.

Die für unsere folgenden Betrachtungen wesentlichste Reaktion, $\text{R}\cdot\text{COOH} + \text{H}_2\text{N}\cdot\text{R}_1 \rightleftharpoons \text{R}\cdot\text{CO}\cdot\text{NH}\cdot\text{R}_1 + \text{H}_2\text{O}$ lässt sich bekanntlich ohne enzymatischen Katalysator in der Richtung der Peptidbildung schwer durchführen. Bei dieser Reaktion ist nämlich nicht $\text{R}\cdot\text{COO}^-$ die reagierende Molekülart, sondern $\text{R}\cdot\text{CO}^+$. Lässt man das Radikal CO^+ hervortreten, etwa durch Verwendung des Esters $\text{H}_2\text{N}\cdot\text{R}\cdot\text{CO}\cdot\text{OC}_2\text{H}_5$ oder des Säurechlorides $\text{H}_2\text{N}\cdot\text{R}\cdot\text{CO}\cdot\text{Cl}$, so geht die Synthese nach Fischers Vorschrift leicht vonstatten. Andererseits reagiert nicht der Ammoniumrest $^+\text{H}_3\text{N}\cdot\text{R}$, sondern der Aminrest, so dass auch für die nicht-enzymatische Synthese das Aciditäts-Optimum in der Nähe des Neutralpunktes liegen dürfte.

Die enzymatische Polypeptidspaltung wurde seit Abderhaldens Versuchen im allgemeinen als stark spezifisch angesehen, insofern als die in der Natur vorkommenden Aminosäuren enzymatisch angegriffen werden, während optischen Antipoden unangegriffen bleiben. Ferner schien aber nach Fischer und Abderhalden¹ die enzymatische Spaltbarkeit auch der natürlich vorkommenden Peptide von der Art und Anzahl der einzelnen Aminosäurekomponenten und ihrer Struktur abzuhängen. Erst durch die neuesten Untersuchungen von Waldschmidt-Leitz mit reiner Peptidase hat sich das Spezifitäts-Problem zu klären begonnen. Wir kommen hierauf im Abschnitt E dieses Kapitels zurück.

In diesem Kapitel kommen die einfachen Peptide (Dipeptide) als Substrate fast ausschliesslich in Betracht.

C. Vorkommen der Peptidasen.

Die ersten Kenntnisse über die Peptidasen erhielt man durch Cohnheims² Entdeckung der peptonspaltenden Wirkung der Darmschleimhaut. Cohnheim schrieb dieselbe einem Enzym zu, das er Erepsin nannte. Einem Vorschlag von Euler und Josephson entsprechend wäre der Name Erepsin für das natürliche Gemisch³ der Carbasen beizubehalten, welches aus der Darmmucosa usw. sezerniert wird, und sich auch in anderen Säften und Geweben findet.

Enzyme, die in ihrer Wirkung sehr ähnlich derjenigen des Darmerepsins sind, wurden später im Pankreassaft, im Speichel und in anderen Sekreten nachgewiesen. Auch in Geweben sind polypeptidspaltende Enzyme vorhanden

¹ Fischer und Abderhalden, H. 46, 52; 1905.

² Otto Cohnheim, H. 33, 451; 1901. — Ferner H. 35–51; 1901/06.

³ Analog den Bezeichnungen Invertin und Emulsin für natürliche Enzymgemische.

und ebenso kennt man, besonders durch die Untersuchungen von Vines, „pflanzliches Erepsin“. Ganz besonderes Interesse verdient die peptidspaltende Komponente des Papains, welche durch Willstätter bekannt geworden ist.

Wie bereits Seite 391 erwähnt, müssen die an definierten Polypeptiden gewonnenen Ergebnisse in der Besprechung von denen gesondert werden, welche an Peptonen, ähnlichen Substratmischungen und an Proteinen gewonnen worden sind. Bei der älteren Versuchsmethodik mit Pepton blieb meist unbekannt, welche Bestandteile des Peptons der Spaltung unterliegen, und so sind die gemachten Beobachtungen nicht scharf genug definiert, um Regelmässigkeiten hervortreten zu lassen. Von entscheidender Bedeutung ist der Nachweis von Waldschmidt-Leitz (H. 147—151), dass Peptidase (Erepsin) und tryptisches Enzym scharf zu trennen sind.

1. Peptidasen in Tieren.

a) Körperflüssigkeiten und Sekrete von Vertebraten.

1. Normales Blut. Während das normale Blutserum frei von Peptidasen ist¹, wurde Spaltung von Peptiden sowohl in Erythrocyten als in Leukocyten von Rind, Pferd, Hammel, Hund und Kaninchen nachgewiesen^{2,3}, und zwar von

Glycyl-l-Tryosin	dl-Alanylglycylglycin
dl-Alanylglycin (z. T.)	Glycyl-dl-Leucin.

Mit Blutplättchen des Rinderblutes erhielten Abderhalden und Manwaring³ in manchen Fällen ebenfalls Spaltung, allerdings unregelmässig; Aktivierung durch Serum und Plasma (?).

J. W. Hall und G. S. Williamson⁴ beobachteten Spaltung von Glycyltryptophan durch Schafsblut.

Unter anormalen Verhältnissen (Verbrühung und photodynamische Schädigung) hat H. Pfeiffer⁵ Glycyltryptophanspaltung im Kaninchenserum und -Harn gefunden. Ferner im Menschen- und Meerschweinchen-Serum.

In diesem Zusammenhang muss schon hier auf die viel besprochenen Beobachtungen von Abderhalden⁶ hingewiesen werden, dass in Serum, in welches blutfremde Peptone eingetreten sind, Enzyme ganz neu oder stark vermehrt auftreten, welche gewisse Peptide spalten.

¹ Siehe hierzu Abderhalden und Oppler, H. 53, 294; 1907. — Abderhalden und McLester, H. 55, 371; 1908.

² Abderhalden und Deetjen, H. 51, 334; 1907 u. 53, 280; 1907.

³ Abderhalden und Manwaring, H. 55, 377; 1908.

⁴ J. W. Hall und G. S. Williamson, JI of Path. Bact. 15, 351; 1911.

⁵ H. Pfeiffer, Zs Immun. 23, 473. — Fermentf. 8, 327; 1925.

⁶ Abderhalden und Mitarbeiter, H. 61, 200. — 62, 120 u. 233; 1909. — 64—71. 1909/11. — Abderhalden, Die Abderhaldensche Reaktion, 5. Aufl. Berlin, 1922.

Es hat sich zunächst um eventuelle Spezifität gegen organfremdes Eiweiss gehandelt. Dann bestand längere Zeit die Möglichkeit¹, auf die Spaltung gewisser Peptide eine Enzymdiagnostik gründen zu können; diese Hoffnung hat sich bisher noch nicht erfüllt. Immerhin sind aus der Diskussion um die Abderhaldenschen „Abwehrfermente“ bzw. um die „Abderhaldensche Reaktion“ zahlreiche Tatsachen hervorgegangen, welche auch vom rein enzymchemischen Gesichtspunkt aus eine eingehende Darstellung rechtfertigen; eine solche wird im III. Teil dieses Werkes gegeben werden.

2. Milch. Frauenmilch spaltet Glycyltryptophan² (Warfield, JI Med. Res. 25, 235; 1911. — Wohlgemuth und Strich, Preuss. Akad. 1910, 520. — H. Koch, Zs f. Kinderh. 10, 1; 1914).

3. Speichel. Glycyltryptophan wird gespalten (Warfield, Bull. J. Hopkins Hosp. 22, 150; 1911). — Koelker fand ausserdem, dass zahlreiche Dipeptide und das untersuchte Tripeptid l-Leucylglycyl-d-alanin angegriffen werden (H. 76, 27; 1911).

4. Magensaft. Im Magensaft findet sich normal keine Peptidase, sondern nur bei Rücktritt des Darminhaltes (Abderhalden und Schittenhelm, H. 59, 230; 1909).

Im carcinomatösen Mageninhalt fanden Neubauer und Hans Fischer ein peptidspaltendes Enzym; Nachweis mit Glycyltryptophan (Deutsch. Arch. f. k. Klin. Med. 97, 499; 1909).

Der Umstand, dass ein solches Enzym auch aus dem Darm oder Speichel in den Mageninhalt gekommen sein kann, hat Bedenken gegen die klinische Verwendbarkeit dieses Enzymnachweises hervorgerufen. Lit.: J. W. Weinstein, JI Amer. Med. Ass. 57, 1420; 1911. — J. W. Hall und G. S. Williamson, JI of. Path. Bact. 15; 1911. — J. C. Friedman und W. W. Hamburger, Arch. of Int. Med. 12, 346; 1913.

5. Pankreassaft. Gegen die meisten Dipeptide unwirksam.

6. Darm. Besonders hervorzuheben ist der wichtige Befund von Waldschmidt-Leitz, dass Peptidase des Pankreas und Darms identisch sind.

7. Harn. Einige Versuche von Abderhalden und Rona¹ an Glycyl-tyrosin ergaben keine Spaltung. Vielleicht nach Verfütterung von Pankreatin. — Eine Angabe von Sagel (Münch. med. Wochenschr. 1914) über organspezifische Peptidasen im Harn bei Paralyse bedarf einer Nachprüfung. — Umfassende Versuche an Glycyl-Tryptophan teilen H. Pfeiffer und Standenaht³ mit.

¹ Siehe z. B. Abderhalden und Rona, H. 53, 308; 1907.

² Auch Brustdrüse der Frau (Tateyama, Biochem. Zs 163, 297; 1925).

³ H. Pfeiffer und Standenaht, Fermentf. 8, 327; 1925.

b) Normale Organbreie und Organpresssäfte von Vertebraten.

Tier	Organ	Untersuchtes Peptid	Bemerkungen	Literatur
Rind	Muskelpresssaft	Glycylglycin, d,l-Leucylglycin, Glycyl-l-alanin u. a.	Spaltung	Abderhalden u. Teruuchi, H. 47, 466; 1906. — H. 49, 1; 1906.
Hund	Muskelpresssaft	Glycylglycin, Glycyl-l-tyrosin	erhebliche Spaltung	
Rind	Kolierter Leberbrei	d,l-Leucylleucin, dl-Leucylglycin, Glycyl d,l-alanin	asymm. Spaltung	
Rind	Lebergewebe	l-Leucyl-l-tryptophan	—	
Hund	Nierenpresssaft	Glycylglycin	Spaltung	
Kaninchen	Muskel, Leber, Niere	d,l-Leucylglycin, Glycyl-d,l-alanin, Glycylglycin	Spaltprodukte: l Leucin, Glycin, akt. Leucylglycinanhydrid	Abderhalden u. Hunter, H. 48, 517; 1906.
Kalb	Augen-Linse, Presssaft	d,l-Alanin, Glycyl-tyrosin, Diglycylglycin	gespalten	Abderhalden u. Lussana, H. 55, 390; 1908.
Kalb	Gehirnsubstanz	d,l-Alanylglycin, Diglycylglycin	Spaltung	
Embryonen von Huhn, Schwein u. a. in verschiedenen Entwicklungsstadien	—	Glycyl-l-tyrosin	nicht gespalten	Abderhalden u. Steinbeck, H. 68, 312; 1910.
Reptilien, Amphibien, Fische	Leber	d,l-Leucylglycin	—	Clementi, Atti Lincei 25 (1916).

c) Pathologische Organe und Gewebe.

Hier beanspruchen die Beobachtungen an Tumoren das grösste Interesse.

Neuberg¹ hat schon 1905 darauf aufmerksam gemacht, dass hinsichtlich der Peptonspaltung eine Organspezifität der Tumorenzyme nicht statthat. Nachdem Leo Hess und P. Saxl zum Schluss gekommen waren, dass die Carcinomzelle in ihren proteolytischen Eigenschaften vollkommen den Zellen der normalen Gewebe gleicht, nahm besonders Abderhalden die Frage unter Verwendung reiner Polypeptide auf.

Am Glycyl-l-Tyrosin zeigten zunächst Abderhalden und Rona², dass diejenigen Carcinome, welche zu der Gruppe der Adenocarcinome gehören, das genannte Dipeptid genau ebenso spalten wie normale Gewebszellen.

¹ Neuberg, Berl. klin. Woch. 1905.

² Abderhalden und Rona, H. 60, 415; 1909.

Abderhalden, Koelker und Medigreceanu¹ fanden auch mit Presssaft von Tumorzellen asymmetrische Spaltung von dl-Leucylglycin; nur das natürlich vorkommende l-Leucylglycin wurde gespalten, nicht die d-Form. Abderhalden und Pincussohn² kamen immerhin zum Schluss, dass der Abbau von Polypeptiden durch Carcinomzellen anders verläuft als der durch normale Zellen; Regelmässigkeiten konnten nicht gefunden werden.

W. W. Hamburger³ konnte in Krebsgeweben keine wesentliche Abweichung von der Peptidspaltung normaler Gewebe nachweisen.

K. Wiener⁴ fand in einem carcinomatösen Exsudat Spaltung von Glycylglycin und Leucylglycin, aber keine Protease.

Nach Phosphorvergiftung fanden Abderhalden und Schittenhelm⁵ den Presssaft einer Hundeleber gegen Glycylglycin und dl-Leucylglycin mindestens ebenso wirksam, eher wirksamer, als den eines normalen Tieres.

Über eine entsprechend gesteigerte Peptonspaltung durch Erepsin bei Phosphorvergiftung siehe Kobzarenko (Biochem. Zs 66), 17. Kap.

Über das Vorkommen von Peptidasen in Erythrocyten vgl. S. 401.

d) Avertebraten.

Jecur spaltet nach Clementi⁶ Leucylglycin.

2. Peptidasen in höheren Pflanzen.

Die enzymatische Polypeptidspaltung haben Abderhalden und der Verf. gleichzeitig und unabhängig voneinander 1906/07 nach zwei verschiedenen Methoden studiert.

Kräftige Glycylglycinspaltung wurde von Euler⁷ mit Presssaft aus keimenden Lupinussamen und mit einem daraus hergestellten Trockenpräparat erzielt; nicht ganz so wirksam waren Präparate aus Raps- und Erbsensamen.

An Leucylglycin wurde von Abderhalden und Schittenhelm⁸ Spaltung der natürlichen l-Form durch Presssaft aus Lupinensamen nachgewiesen. Etwa gleichzeitig wies Verf. nach, dass im racemischen Gemisch auch die d-Form durch das gleiche Enzymmaterial gespalten wird. Auch Dialanylcystin wird nach Abderhalden und Schittenhelm⁹ gespalten.

Der Einfluss der Keimung stellt sich nach den Versuchen des Verf.¹⁰ folgendermassen:

¹ Abderhalden, A. H. Koelker und Medigreceanu, H. 62, 145; 1909.

² Abderhalden und Pincussohn, H. 66, 277; 1910.

³ W. W. Hamburger, Jl Am. Med. Ass. 59, 847; 1912.

⁴ K. Wiener, Biochem. Zs 41, 149; 1912.

⁵ Abderhalden und Schittenhelm, H. 49, 40; 1906.

⁶ Clementi, Acad. dei Lincei (5) 24, 972 u. 25, 183; 1916.

⁷ Euler, Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi 2, 31; 1906.

⁸ Abderhalden und Schittenhelm, H. 49, 26; 1906.

⁹ Siehe auch Abderhalden und Dammhahn, H. 57, 332; 1908.

¹⁰ Euler, Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi 2, 39; 1907.

Ungekeimte (Lupinen-) Samen bzw. ihr Presssaft sind unwirksam. Am 2. Keimungstag (Zimmertemperatur) war schon das Maximum der Peptidasenwirkung gegen Glycylglycin erreicht, wie folgende kleine Tabelle zeigt:

Tage der Keimung . . .	2	4	6	8	10
Reaktionskonstante $k \cdot 10^4$	44	39	42	37	35

In Papain, Enzympräparaten aus dem Milchsaft von *Carica papaya*, fanden Abderhalden und Teruuchi¹ Spaltung von Glycyltyrosin; diese Angabe bestätigt sich nach den Untersuchungen von E. M. Frankel und von Willstätter und Grassmann² nicht. Frankel konnte mit keinem der Dipeptide Glycylglycin, Alanylglycin, Glycylalanin, Alanylalanin und Glycyltyrosin eine Spaltung erzielen, und zwar auch nicht durch HCN-aktiviertes Papain. Willstätter und Grassmann prüften Glycylglycin und dl-Leucylglycin mit negativem Ergebnis; mit letzterem Substrat wurde die Untersuchung bei verschiedener Acidität vorgenommen.

Dagegen wird, wie letztere Forscher zeigten, Leucylglycylleucin durch Papain mit HCN angegriffen, und zwar war ein Drittel in Dipeptid und Aminosäure gespalten.

3. Peptidasen in Pilzen und Bakterien.

Man verdankt die ersten und eingehendsten Versuche mit definierten Substraten (Polypeptiden) Abderhalden und seinen Mitarbeitern. Abderhalden und Rilliet³ fanden im Presssaft von Champignon (*Psalliota campestris*) Spaltung verschiedener Dipeptide. Abderhalden und Pringsheim⁴ sprechen sich über ihre Ergebnisse folgendermassen aus (l. c. S. 254):

„Aus diesen Versuchen geht hervor, dass die verschiedenen Pilze verschiedenartige peptolytische Fermente enthalten. Die Presssäfte aus *Allescheria Gayoni*, *Rhizopus tonkinensis* und *Aspergillus Wentii* spalteten l-Leucyl d-Leucin, während Presssaft aus *Mucor mucedo* dieses Peptid nicht angriff. . . . Wir sehen bei diesen niederen Organismen zum Teil wenigstens Fermente auftreten, die Bindungen lösen, auf welche die entsprechenden Fermente der höheren Organismen keinen Einfluss haben.“

Koelker⁵ hat mit Autolysesaft der Hefe dl-Alanylglycin gespalten.

Die Spaltung des Glycylglycins durch Autolysesaft der Hefe hat Dernby⁶ eingehend untersucht; auf die kinetischen Messungen der beiden Autoren kommen wir im folgenden zurück.

Bakterien. Sasaki wies Spaltung des Glycylglycins und Glycyl-l-tyrosins durch *Bact. coli commune* nach⁷. Die nicht verflüssigenden Bakterien (*Typhus*, *Paratyphus A* und *B*, *Bac. dysenteric. Flexner*, *Microc. tetragenus*)

¹ Abderhalden und Teruuchi, H. 49, 21; 1906.

² Willstätter und Grassmann, H. 138, 184; 1924.

³ Abderhalden und Rilliet, H. 55, 395; 1908.

⁴ Abderhalden und H. Pringsheim, H. 59, 249; 1909. — 65, 180; 1910.

⁵ Koelker, H. 67, 297; 1910.

⁶ Dernby, *Biochem. Zs* 81, 107; 1917. Diss. Stockholm; 1917.

⁷ T. Sasaki, *Biochem. Zs* 41, 174; 1912. — 47, 462; 1912.

hydrolysieren Glycyl-l-tyrosin und Glycylglycin in guter Ausbeute. Nach T. Mito¹ verläuft die Spaltung von racemischem dl-Leucylglycin (Bildung von l-Leucin) und von racemischem Glycyltyrosin durch *Bact. coli* und *Staphylococcus albus* asymmetrisch.

D. Darstellung und Reinigung.

In den meisten Untersuchungen sind Presssäfte direkt verwendet worden. Aus denselben lassen sich durch Fällern mit Alkohol oder Aceton mehr oder weniger wirksame Trockenpräparate in Pulverform herstellen, welche allerdings sehr grosse Mengen von Verunreinigungen enthalten; ihr Anteil wird verringert, wenn man den Presssaft vor der Alkoholfällung dialysiert.

Ob demgegenüber das Eindunsten des dialysierten Saftes im Vakuum nach Koelker² einen Vorteil bietet, erscheint zweifelhaft.

Die Peptidasen der Hefen lassen sich aus dem Autolysesaft gewinnen, die Dialyse unter vermindertem Druck nach Sörensen hat sich dabei als sehr geeignet erwiesen³. Koelker (H. 67) autolysiert 3—4 Tage bei Zimmertemperatur mit Zusatz von Chloroform und Calciumcarbonat (30 g Carbonat auf 500 g Bäckerhefe) und filtriert. Die Angabe von Dernby, dass eine Fortsetzung der Autolyse bei 38° nicht vorteilhaft ist, kann Verf. bestätigen. Durch wiederholte Filtration erhält man einen hellgelben klaren, aber sehr eiweissreichen Saft, den man zunächst durch Dialyse reinigt; dabei kann man die Dialyse unter vermindertem Druck nach Sörensen verwenden.

Handelt es sich um die Darstellung eines Peptidasenpräparates aus tierischem Material, so wird man die Schleimhäute, welche das Enzym sezernieren, waschen, dann von der Unterlage mechanisch ablösen, zerkleinern und extrahieren.

Die Extraktion kann durch Wasser bzw. Salzlösungen, z. B. physiologische Kochsalzlösung geschehen oder, da wässrige Erepsinlösungen wenig haltbar sind, durch Glycerin⁴.

Bei den Versuchen von Josephson wurde abgeschabte Mucosa vom Dünndarm des Schweines 2 Tage mit Glycerin geschüttelt. Filtration durch Faltenfilter liefert einen klaren hellgelben Saft, von welchem 1 ccm zu 25 ccm 0,1 norm. Glycylglycinlösung zugesetzt in 90 Minuten eine Spaltung von 21% bewirkt.

Für die Behandlung der wässrigen Lösung hat Rice⁵ ein Verfahren beschrieben: Der Brei der Dünndarmschleimhaut wird mit 0,1%iger Soda-lösung 10 Tage bei 38° unter Toluolzusatz stehen gelassen. Man filtriert dann durch ein Tuch und säuert mit Essigsäure schwach an. Der sich langsam

¹ Mito, *Acta scholae Med. Univ. Kyoto* 5; 1921. — *Ber. ges. Phys.* 16, 17; 1923.

² A. H. Koelker, *Jl Biol. Chem.* 8, 145; 1910.

³ Dernby, *Biochem. Zs* 81, 107; 1917.

⁴ Euler, *H.* 51, 213; 1907.

⁵ Fr. E. Rice, *Jl Am. Chem. Soc.* 37, 1319; 1915.

abscheidende flockige Niederschlag wird abfiltriert und das Filtrat wird dialysiert. Die Dialyse darf nicht zu lange ausgedehnt werden, sonst wird das Enzym geschwächt.

Untersuchungen von Fodor (Koll. Zs) siehe im 17. Kapitel.

Adsorptionsversuche.

Rice hat auch das Adsorptionsverhalten des Darmerepsins untersucht, aber, wie Waldschmidt-Leitz schreibt, „ohne sichere quantitative Bestimmungen“.

Durch Kaolin wird Erepsin in saurer Lösung gut adsorbiert; Elution in alkalischer Phosphatlösung. Wesentliche Reinigungserfolge sind aber bis jetzt nicht erzielt worden.

Waldschmidt-Leitz hat die Tonerdeadsorption mit A. Harteneck an Pankreaserepsin und mit A. Schöffner an Darmerepsin studiert. Er fand im Gegensatz zu Rice die Tonerdeadsorption des Darmerepsins (wie auch des Pankreaserepsins) stark von h abhängig, und zwar in saurer Reaktion am höchsten, im alkalischen Gebiet sehr gering.

Durch Zusatz von Alkohol wurde die Adsorption bei pH 4,7 deutlich verstärkt, „allein die Empfindlichkeit des Enzyms auch gegen geringere Alkoholkonzentrationen lässt für eine präparative Anwendung dieses Mittels keine Vorteile erwarten“.

Die Elution des Erepsins aus den Tonerdeadsorbaten gelingt in guter Ausbeute durch schwach alkalische Phosphatlösungen.

Waldschmidt-Leitz und Schöffner gelangten durch Tonerdeadsorption zu keiner merklichen Konzentrationssteigerung des Enzyms. „Zwar gelingt es dabei, die tryptische Verunreinigung der Enzymlösungen vollständig abzutrennen, den Erepsinwert der Elutionen findet man indessen, wohl infolge der unvermeidlichen Verluste, die insbesondere die Ausfällung der Phosphorsäure begleiten, nicht höher als vor der Adsorptionsvornahme.“

Adsorptionstrennung der Peptidasen vom Trypsin durch Tonerde.

Sowohl Pankreaspeptidasen wie auch Darmpeptidasen lassen sich von dem sie begleitenden tryptischen Enzym durch Tonerdeadsorption befreien, und zwar auf Grund des Umstandes, dass das tryptische Enzym bei saurer Reaktion von der Tonerde nicht oder nur wenig aufgenommen wird (Waldschmidt-Leitz u. Mitarb.). „Es ist sehr bemerkenswert, dass das verschiedene Adsorptionsverhalten von Pankreaserepsin und Darmerepsin einerseits und von Pankreastrypsin andererseits unabhängig von der Natur der begleitenden Stoffe, in den rohen Auszügen der Pankreasdrüsen wie in denen der Darmschleimhaut, zur Geltung kommt.“ Wegen der Ausführung dieser Trennung sei auf die Originalarbeiten (H. 147, 286 u. zw. 304, sowie 151, 31 u. zw. 51) hingewiesen.

Über die Reinigung bzw. die Herstellung von Peptidasepräparaten von hohem Reinheits- und Wirksamkeitsgrad ist bis jetzt noch sehr wenig bekannt. Nach einer in diesem Laboratorium begonnenen Untersuchung ist die Schleimhaut des Schweinsdarms ein besonders günstiges Ausgangsmaterial.

Josephson¹⁾ trug von dem oben erwähnten Glycerin-Darmextrakt 85 ccm unter Kühlen und bei kräftigem Rühren in 250 ccm absol. Alkohol ein. Die Fällung wurde durch Zentrifugieren von der alkoholischen Flüssigkeit getrennt. Nach Waschen mit absol. Alkohol und Äther wurde das Präparat in einem Vakuum-Exsikkator von den letzten Ätherresten befreit. Ausbeute rund 1 g Trockenpräparat aus 100 ccm Darmextrakt.

Auch Waldschmidt-Leitz²⁾ extrahiert die Darmschleimhaut mit (87%igem) Glycerin, von dem er die fünffache Menge verwendet.

Wirksamkeit und Reinheitsgrad.

Wir legen einstweilen die Spaltungsfähigkeit gegen Glycylglycin³ den Wirksamkeitsangaben zugrunde und bezeichnen sie nach einem Vorschlag von Euler und Josephson¹ mit Gl f, das durch den Quotienten aus Reaktionskonstante und Trockensubstanzgehalt definiert sei, also durch die Gleichung

$$\text{Glycylglycin-Spaltungsfähigkeit Gl f} = \frac{k}{g \text{ Trockensubstanz}}$$

Wir führen die Aktivitätsbestimmung in folgender Weise aus: Zu der Versuchsmischung, enthaltend in 25 ccm Totalvolumen (nach Zugabe des Enzyms) 0,05 n. Glycylglycin + Natronlauge (pH = 7,9–8,0), wird nach dem Erwärmen der Lösung auf 37° (durch Einsenken in einen Thermostaten) die Enzymlösung zugegeben; die erste Probe (5 ccm) wird sofort der Lösung entnommen, in 5 ccm Formolmischung eingetragen und mit 0,2 n. Natronlauge titriert. Die nach verschiedenen Zeiten entnommenen späteren Proben werden dann in gleicher Weise behandelt und titriert. Die angewandte Reaktionsmischung reicht zu drei Bestimmungen (ausser der Nullprobe) des Reaktionskoeffizienten. Die übrigbleibenden 5 ccm sind zur Messung der Acidität bestimmt.

Bis auf weiteres führen wir die Aktivitätsbestimmungen ohne Puffer und ohne Zusatz von Aktivatoren (Ca⁺⁺) aus, da der hemmende Einfluss des ersteren und die Aktivierungserrscheinungen an der Darmpeptidase noch nicht genügend durchforscht sind⁴.

Waldschmidt-Leitz schlägt vor, zur Aktivitätsbestimmung (ebenfalls auf Grund der Glycylglycinspaltung) als Erepsineinheit (Er.E.) das 1000fache derjenigen Enzymmenge anzugeben, für die sich unter festgestellten Bedingungen der Reaktionskoeffizient $k = 0,001$ ergibt; dann gibt dieser Reaktionskoeffizient die Anzahl von Enzymeinheiten in der untersuchten Probe an. Erepsinwert (Er.W.) ist nach Waldschmidt-Leitz die Anzahl von Enzymeinheiten in 1 g Präparat.

Über die entsprechende „Pankreaserepsineinheit“ (P.Er.E.) siehe Waldschmidt-Leitz und Harteneck, H. 147, 286 u. zw. 295; 1925.

¹ Euler und Josephson, Chem. Ber. 59, 226; 1926. — Siehe auch Euler, Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi 9, Nr. 24; 1925.

² Waldschmidt-Leitz und Schöffner, H. 151, 31; 1926.

³ Siehe Euler, Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi 2, 31; 1906.

⁴ Vgl. hierzu auch die Ergebnisse von Willstätter und Grassmann, H. 138, 184; 1924.

E. Wirkungsbedingungen.

1. Acidität.

An reinen Dipeptiden hat Verf.¹ 1906 den Versuch gemacht, die optimale Acidität der enzymatischen Spaltung zu bestimmen, und zwar mit der Methode der Leitfähigkeit, welche gestattet zu ermitteln, welcher Anteil der zugesetzten Natronlauge gebunden wird und wieviel freie Natronlauge (freie Hydroxylionen) sich bei der Reaktion in Lösung befinden. Die optimale Konzentration des freien Alkalis wurde damals zu 0,000010 n bzw. 0,000012 n angegeben, und zwar für die Glycylglycin-Spaltung durch Darmpeptidase bei 37°. Setzt man für diese Temperatur $K_w = 3,1 \cdot 10^{-14}$, so entspricht dies einer Acidität von $\text{pH} = 8,5$ bzw. 8,6. Spätere Versuche, die mit G. Hofrén-Lagerberg, unter Benutzung der einstweilen bekannt gewordenen natürlich viel genaueren und zweckmässigeren Methodik Sörensens ergaben 8,2—8,4, was unter Berücksichtigung der durch die ältere Methodik bedingten Fehler als eine gewisse Bestätigung der ersten Resultate angesehen wurde. An Pepton als Substrat fanden Rona und Arnheim² später als Optimum $\text{pH} = 7,8$ (vgl. 17. Kap.).

Dernby³ gibt in seiner eingehenden Untersuchung an, dass das optimale pH bei Darmerepsin um einige Zehntel höher liegt als bei Hefenerepsin (siehe unten); Dernbys Befund würde also auf etwa 8,0 zu setzen sein. Dasselbe pH-Optimum fanden Euler und Josephson bei ihren neuen Versuchen⁴. Die Peptiden aus Pankreasextrakt⁵ ergaben auf Glycylglycin als Optimum $\text{pH} = 7,9$, also nahe dieselben Werte wie beim Darmerepsin.

Auch Waldschmidt-Leitz⁶ fand das Optimum des Pankreaserepsins, wie später das des Darmerepsins bei etwa $\text{pH} = 7,8$.

Zur Untersuchung des entsprechenden Punktes bei Hefenereptase hat Dernby (Biochem. Zs 81, S. 79) eine Versuchsflüssigkeit folgender Zusammensetzung verwendet:

10 ccm 0,4 n-Glycylglycin + 2 ccm 0,2 n Natronlauge + 5 ccm Enzymlös. + 20 ccm 0,2 mol. Phosphat + aqua ad 100 ccm.

¹ Euler, Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi, 2, Nr. 31; 1906 und Nr. 39; 1907.

² Rona und Arnheim, Biochem. Zs 57, 84; 1913.

³ Dernby, Biochem. Zs 81, 107; 1917. Dissertation Stockh. 1917.

⁴ Euler und Josephson, Chem. Ber. 59, 226; 1926. — Vgl. Waldschmidt-Leitz und Schöffner, H. 151, 31; 1926.

⁵ Dernby, JI Biol. Chem. 35, 179; 1918.

⁶ Waldschmidt-Leitz und Anna Harteneck, H. 147, 286; 1925.

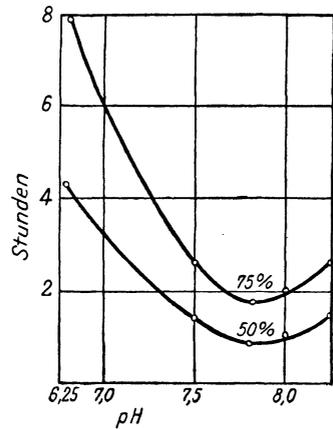


Fig. 47.

In der Figur 47 stellt Dernby die bei verschiedener Acidität zu einer Spaltung von 50 bzw. 75% erforderlichen Zeiten zusammen. Abderhalden und Fodor haben auf Grund ausgedehnter Untersuchungen hervorgehoben, dass die optimale Acidität der Polypeptidspaltung von der Natur des Substrates abhängt. Die genannten Forscher fanden folgende Aciditäts-Optima:

		pH des Optimums
In annähernd äquimolekularen Lösungen gespalten	{	Glycyl-l-leucin 8,41; 8,50
		l-Leucylglycin 7,50; (7,56)
		d-Alanylglycin 7,30; 8,13
		Glycyl-d-alanin 7,30—7,91
		d-Alanyl-l-leucin 6,76; 6,85
		l-Leucyl-d-alanin 6,80—7,89
		l-Leucyl-l-asparaginsäure 2%ig 6,76
		l-Leucyl-l-asparaginsäure 10%ig 6,80
In annähernd äquimolekularen Lösungen gespalten	{	l-Leucylglycin 7,56
		l-Leucylglucylglycin 7,26
		l-Leucyldiglycylglycin 7,29
		l-Leucyldiglycylglycin 7,28
		l-Leucylpentaglycylglycin 6,64

Abderhalden und Fodor¹ entnehmen ihren Messungen folgende Ergebnisse: „Polypeptide, die aus gleichen Bausteinen aufgebaut sind, zeigen in ihrem optimalen Verhalten in den meisten Fällen gewisse Übereinstimmungen, wenn auch diese Erscheinung nicht durchgehends gültig ist.“

„Während Glycyl-l-leucin, l-Leucylglycin, ferner die Polypeptide l-Leucylglycin bis l-Leucyl-pentaglycylglycin sowie auch Leucyl-l-asparaginsäure ein sehr scharfes Optimum besitzen, ist es bei den Polypeptiden, die als Baustein Alanin enthalten (mit Ausnahme von d-Alanyl-l-Leucin) nicht der Fall.“

„Zwei weitere Faktoren beeinflussen ferner des öfteren die Lage des Optimums: die Hefesaftkonzentration und das Alter des Saftes.“

Zweifellos haben Abderhalden und Fodor vollkommen recht, wenn sie betonen, dass man bei denjenigen Enzymen, bei welchen nicht nur ein einziges Substrat in Betracht kommt (wie etwa bei der Saccharase der Rohrzucker, abgesehen von der Raffinose), sondern eine grössere Reihe von Substraten nicht von vornherein ein gemeinsames pH annehmen darf. Es ist ja überhaupt nicht das Enzym an sich, welches ein Aciditätsoptimum besitzt (die Acidität der maximalen Stabilität gehört nicht hierher), sondern die enzymatische Reaktion.

Im grossen ganzen kann gesagt werden, dass die Peptidasen der tierischen Organe nahe bei der natürlichen Acidität derselben ihre grösste Wirksamkeit entfalten, nach Myers und Clendon ist diese vielleicht etwas nach der sauren Seite verschoben.

¹ Abderhalden und Fodor, *Fermentforschung* 1, 533; 1916. — Siehe hierzu auch Fodor, *Das Fermentproblem* (1922) und: *Die Grundlagen der Dispersoidchemie*, Dresden 1925.

Für den Fall, dass die Polypeptide der enzymatischen Spaltung in Form ihrer Alkalisalze (als Anionen) unterliegen, würde — unter sonst übereinstimmenden Umständen — die Acidität um so günstiger sein, je vollständiger die Salzbildung mit dem Peptid, je geringer also der Hydrolysegrad ist. Dementsprechend würden stärker saure Peptide eine geringere Alkalinität erfordern als schwächere Säuren, und man wird dann, wie Verf. getan hat, die Salzbildung des Substrates neben seiner isoelektrischen Form in Betracht ziehen.

Abderhalden und Fodor betrachten ihre Ergebnisse vom kolloidchemischen Standpunkt aus und betonen, dass „auch diese Fragen das Studium der Adsorptionsbedingungen der amphoteren Elektrolyte, vorzüglich der Aminosäuren und Polypeptide in Abhängigkeit von der Acidität dringend erfordern“. — Über den Einfluss der Acidität auf die Kinetik der enzymatischen Peptidspaltung siehe S. 414—415.

Einfluss auf die nicht-enzymatische Hydrolyse: Levene und Mitarb.¹

2. Neutralsalze.

Hier weichen wieder die Angaben über Hefen-Peptidasen und tierische Peptidasen voneinander ab.

Nach Untersuchungen von Koelker² an Hefen-Peptidase und Alanyl-glycin beschleunigt CaCl_2 in 0,1%iger Lösung die Hydrolyse, hemmt aber schon in 1%iger Lösung. Dagegen findet Abderhalden³ auf dl-Leucylglycin und Glycyl-l-tyrosin durchweg „deutlich beschleunigenden Einfluss“, wogegen er mit MgSO_4 und MgCl_2 nur eine schwache Verzögerung², mit SrCl_2 gar keine Wirkung fand. Auch NaCl (physiologische Kochsalzlösung) beeinflusst nach Abderhalden und nach Koelker die Reaktionsgeschwindigkeit nicht. NaF soll nach Abderhalden⁴ an dl-Leucylglycin hemmen, bei Glycyl-l-tyrosin in geringer Konzentration beschleunigen. Bei Abderhaldens Versuchen mit Cyankalium ist die Aciditätsveränderung nicht berücksichtigt; siehe hierzu Dernby, l. c. S. 199.

An Darm-Peptidase fand Dernby (l. c.) durch Na- und K-Salze in 0,4 normaler Konzentration ziemlich starke Hemmung, am meisten mit Nitraten, am wenigsten mit Fluoriden.

Waldschmidt-Leitz und Schöffner (H. 151) konnten dagegen nach Zusatz von Alkalisalzen einwertiger, anorganischer Anionen keine Hemmung beobachten.

Durch Phosphat-Puffermischung schon in 0,04 mol. Konz. wird Darmpeptidase (nicht aber Hefenpeptidase) wesentlich gehemmt (Dernby).

¹ Levene, Simms und Pfaltz, JI Biol. Chem. 61, 445; 1924.

² Koelker, JI Biol. Chem. 8, 145; 1910.

³ Vermutlich tritt hier das bei alkalischer Reaktion gebildete $\text{Mg}(\text{OH})_2$ mit dem Enzym zusammen und fällt teilweise aus.

⁴ Abderhalden, Caemerer und Pincussohn, H. 59, 293; 1909.

- a) 10 ccm 0,4 n-Glycylglycin + 4 ccm $\frac{n}{5}$ -NaOH + 20 ccm Erepsin (d) + Wasser = 100 ccm.
 b) Dasselbe + 18,2 ccm $\frac{m}{5}$ sek. + 1,8 ccm $\frac{m}{5}$ prim. Phosphat = 100 ccm. $t = 38^\circ$.

Verdauungs- zeit in Stunden	a		b		Verdauungs- zeit in Stunden	a		b	
	% N	pH'	% N	pH'		% N	pH'	% N	pH'
0	0	7,8	0	7,8	0	0	7,8	0	7,8
3	12	—	9	—	2	12	—	7	—
8	32	—	14	—	7	32	—	—	—
21	65	8,4	24	7,8	24	76	8,6	26	7,8

Waldschmidt-Leitz und Schöffner bestätigen diesen Befund und finden, dass durch ihre Phosphatpufferkonzentration (bei pH = 7,8) die Enzymwirkung auf etwa ein Drittel herabgesetzt wird (Bindung von Ca).

Bemerkenswert ist der Befund von Abderhalden und Fodor, dass sich das pH-Optimum der Peptidspaltung durch Neutralsalze um eine Einheit verschieben kann.

Abderhalden und Fodor¹ haben dann noch eingehende Versuche angestellt über den Einfluss von Kochsalzzusätzen in verschiedenen Zuständen des Saftes, die je nach dem Alter wechselten sowie über die Anionenwirkung auf Säfte, deren Zustand nahezu gleich war (l. c. S. 94 u. ff.). Verf. möchte um so weniger versäumen, auf diese Untersuchungen² ausdrücklich hinzuweisen, als dieselben von speziellen Gesichtspunkten aus angestellt und bearbeitet worden sind, von deren Fruchtbarkeit sich der Verf. selbst noch nicht hat überzeugen können. Abderhalden und Fodor heben zusammenfassend folgende Resultate hervor (S. 207):

1. „Wie das Optimum selbst, so wird auch der Einfluss von Neutralsalzen in erster Reihe vom kolloiden Zustand des Fermentes bedingt.“
2. Der Endeffekt des Salzzusatzes ist von komplexer Natur und besitzt als Voraussetzung sowohl lyotrope als auch unmittelbar auf das Kolloid einwirkende Faktoren.
3. Bei den verwendeten Mischungen von Substrat + Regulatoren + Hefenauszug ergeben Zusätze von 0,66 äqu. Neutralsalz per Liter in den ersten Zeitintervallen in der Regel eine geringe Förderung, der jedoch alsbald eine Hemmung der Wirkung folgt. Jodkalium sowohl als auch Rhodankalium hemmen bereits in den erwähnten Konzentrationen sehr stark, während die Salze KCl, KBr, KNO₃ und K₂SO₄ erst bei höheren Konzentrationen von 0,66 äqu. L bedeutende Hemmungen aufweisen.“

3. Aktivatoren und Hemmungsstoffe.

Über Aktivatoren der enzymatischen Dipeptidspaltung haben Abderhalden und Wertheimer³ Mitteilungen gemacht, welche, falls sie an anderem Material und unabhängig von der Acidität wiedergefunden werden, von wesentlicher Bedeutung für die Kinetik der Peptidasen wären. Diese

¹ Abderhalden und Fodor, *Fermentf.* 4, 191; 1920.

² Siehe hierzu auch Fodor, *Das Fermentproblem.* Dresden und Leipzig, Steinkopff, 1922.

³ Abderhalden und Wertheimer, *Fermentf.* 6, 1; 1922.

Aktivatoren wurden aus Hefeautolysat und aus alkoholischem Hefeauszug gewonnen.

„Sämtliche nach der Formoltitration und durch Beobachtung der Drehungsänderung ausgeführten Untersuchungen zeigten, dass sowohl Hefeautolysat als auch das alkoholische Extrakt aus Hefe den Abbau der untersuchten Dipeptide (besonders Leucylglycin) unter den gewählten Bedingungen beschleunigten.“ „Durch Kochen wird der Einfluss der die Hefestoffe enthaltenden Lösungen verringert. Wird das Kochen auf eine Stunde ausgedehnt, dann ist jeder günstige Einfluss vernichtet.“ „Besonders interessant ist die Beobachtung, dass Hefeextrakt, das der Dialyse unterworfen wird, unwirksam wird, und zwar war sowohl das Dialysat als der nicht dialysierte Teil ohne jeden Einfluss auf den Verlauf der Hydrolyse des Dipeptids dl-Leucylglycin. Wurden dagegen die beiden Lösungen, d. h. das Dialysat und der nicht dialysierte Teil wieder vereinigt, dann ergab sich eine deutliche Wirkung.“ „Es zeigte sich, dass Schilddrüsen- und Thymusopton die Spaltung (der Dipeptide) deutlich beschleunigen, während die aus Hypophyse, Hoden, Ovarien, Corpus luteum gewonnenen Optone ohne Einfluss sind.“ Ferner beschleunigen nach Abderhalden und Wertheimer Jodothyryn und Glycyl-3,5-l-dijodtyrosin sowie in geringem Grad Plazentaopton“.

„Wurde das Opton aus Thymus und Schilddrüse 20 Minuten lang gekocht, dann wurde es unwirksam.“ „Auch hier zeigte es sich, dass das Dialysat und der nicht dialysierte Teil für sich angewandt, keine Wirkung mehr zeigten. Bei der Vereinigung beider Produkte trat wieder eine deutliche Wirkung hervor.“

Einen kleinen Effekt im gleichen Sinne erhielt kürzlich Josephson bei der Wiederholung des obigen Versuchs mit Autolysesaft von Hefe (H. 161).

Verdünntes Phenol hat auf die Glycylglycinspaltung nach Dernby keinen Einfluss.

F. Kinetik.

Kinetische Untersuchungen der Peptidasen müssen nunmehr an niederen Polypeptiden und besonders an Dipeptiden vorgenommen werden. Ein grosser Vorteil besteht zunächst in der Durchsichtigkeit des chemischen Vorgangs und — was damit in Zusammenhang steht — in der Möglichkeit, den gefundenen Endpunkt mit dem theoretisch berechneten zu vergleichen. Ferner aber ist das Substrat durch seine Konzentration eindeutig definiert, Zustandsverschiedenheiten, die in unkontrollierbarer Weise mit dem Alter, überhaupt der Vorgeschichte zusammenhängen, treten bei den kristallisierbaren Peptiden nicht auf.

Bei meinen ersten kinetischen Messungen an Dipeptiden¹ wurden tierische Enzymlösungen angewandt, und zwar teils reiner Pankreassaft aus dem Laboratorium Pawlows, teils Glycerinextrakt aus Schweinsdarm, ferner bei einigen Versuchen Pankreatin (Rhenania).

Als Messmethode kam Bestimmung der Leitfähigkeit zur Anwendung. Versuchstemperatur war 37°. Ermittlung der optimalen Alkalinität s. S. 409.

1. Zeitlicher Verlauf.

Der zeitliche Verlauf der Glycylglycinspaltung sei durch einige Zahlenbeispiele erläutert:

¹ Euler, Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi 2, 31; 1906.

0,10 n-Glycylglycin, 0,04 n-Alkali (entspricht etwa $\text{pH} = 8$).

5 g Erepsinpräp. in 100 ccm			3 g Erepsinpräparat in 100 ccm		
Minuten	1000 (a-x)	k · 10 ⁴	Minuten	1000 (a-x)	k · 10 ⁴
0	930	—	0	980	—
7	837	65,4	10	915	29,8
13	763	66,0	20	861	28,1
20	690	64,8	32	809	26,0
28	620	63,0	41	760	27,0
36	550	63,3			

Als Ergebnis dieser ersten Untersuchung wurde festgestellt, „dass die Spaltung des Glycylglycins eine Reaktion erster Ordnung ist, und dass die entsprechenden Geschwindigkeitskoeffizienten k unter günstigen Umständen bis zum Ablauf der halben Reaktion wirklich konstant bleiben“. Später trat eine Abnahme der k-Werte ein (beginnende Enzymzerstörung).

Dieses Ergebnis wird von Dernby sowohl mit Darmpeptidase als mit Hefenpeptidase bestätigt. Von seinen Tabellen seien die folgenden angeführt, die sich auf die Hefenpeptidase beziehen:

10 ccm 0,4 n-Glycylglycin + 4 ccm $\frac{n}{5}$ -NaOH
+ 1 ccm Enzym (b) + 20 ccm Phosphat +
Wasser = 100 ccm. $\text{pH}' = 7,8$. $t = 38^\circ$.

Verdauungs- zeit in Stunden	% Amino- stickstoff x	k
0	0	—
1	13,8	0,157
2	25,9	0,150
3	36,2	0,150
4	44,9	0,150
5	55,2	0,157
8	69,0	0,145
10	75,9	0,143
12	82,8	0,147
24	96,6	(0,138)

10 ccm 0,4 n-Glycylglycin + 4 ccm $\frac{n}{5}$ -NaOH
+ 10 ccm Enzym (a) + 20 ccm Phosphat +
Wasser = 100 ccm. $\text{pH}' = 7,8$. $t = 38^\circ$.

Verdauungs- zeit in Stunden	% Amino- stickstoff x	k
0	0	—
3	28,6	0,113
6	50,1	0,115
9	62,0	0,108
21	90,6	0,113
30	93,0	(0,090)

Rechnet man die Konstanten, wie üblich auf Minuten um, so erhält man $k \cdot 10^4 = 26$ bzw. 20.

Abderhalden und Fodor¹ kamen, im Gegensatz zum Verf. und zu Dernby, zum Ergebnis, dass der zeitliche Verlauf der Peptidspaltung durch Hefen-Peptidase von der Acidität stark abhängig sei. Da aber neuerdings die Versuche des Verfassers und diejenigen von Dernby durch die eingehende Untersuchung von Waldschmidt-Leitz durchaus bestätigt wurden, so mag

¹ Abderhalden und Fodor, Fermentforsch. 1, 533; 1916.

ein Hinweis auf die betreffenden Arbeiten von Abderhalden und Fodor genügen.

Von den Versuchen von Waldschmidt-Leitz und Schöffner sei beispielsweise der folgende angeführt (l. c. S. 41).

Reaktionsverlauf bei pH = 7,0.

0,660 g Glycyl-glycin, 15,0 ccm Glycerinauszug, im Gesamtvolumen von 50,0 ccm; pH eingestellt durch 25,0 ccm 0,2 mol.-Phosphatpuffer von pH = 7,8 + 4,5 ccm 0,2 n-NaOH; 30°; zur Analyse entnommen je 10,0 ccm.)

<i>t</i> Min.	Aciditätszunahme ccm 0,2 n-KOH	Spaltung %	$k = \frac{1}{t} \cdot \log_{10} \frac{a}{a-x}$
38	1,28	23	0,00309
60	1,84	36	0,00290
120	3,02	56	0,00296

Waldschmidt-Leitz und A. Harteneck (H. 147, S. 294) fanden für Leucylglycin und Pankreas-Peptidase folgenden Reaktionsverlauf:

1,00 ccm Glycerinauszug aus roher Pankreasdrüse.

Min.	Aciditätszunahme ccm 0,2 n-KOH	$k \cdot 10^4$
15	0,18	9,3
30	0,37	9,7
60	0,72	9,7
120	1,28	9,2
180	1,85	9,5
240	2,29	9,3

Schliesslich sei auch ein Versuch von Willstätter und Grassmann¹ über Hefen-Peptidase hierhergesetzt, pH-Optimum 7,8.

Spaltung von Leucylglycin durch verschiedene Enzymmengen

(Enzym mit 1 ccm m/3-Primärphosphat-Ammoniakmischung von pH = 7,8; 0,225 (6/5 Millimol) Peptid; Enzym und Substrat mit NH₃ vorher auf pH = 7,8 eingestellt. Vol. 10 ccm. — 40°. — Spaltung in ccm n/5 KOH.)

Minuten	Enzymmenge (ccm Autolysat in 10 ccm der Mischung)									
	0,25		0,50		1,0		2,0		4,0	
	gef.	ber.	gef.	ber.	gef.	ber.	gef.	ber.	gef.	ber.
15	—	0,04	—	0,08	0,23	0,17	0,40	0,33	0,49	0,63
30	—	0,08	0,16	0,17	0,43	0,33	0,63	0,63	0,99	1,12
60	0,17	0,17	0,32	0,33	0,63	0,63	1,09	1,12	1,67	1,83
120	0,28	0,33	—	—	—	—	—	—	—	—

¹ Willstätter und Grassmann, H. 153, 250; 1926.

Die Enzymmenge, welche unter den Bedingungen dieses Versuches die vorhandene l-Peptidmenge in 1 Stunde zur Hälfte spaltet, bezeichnet Wilstätter als Erepsineinheit. „Sie ist beispielsweise in 3,4 ccm des hier verwendeten Autolysates (aus 0,4 g Hefetrockengewicht) enthalten. Es handelt sich auch hier um eine scheinbare Enzymmenge, denn die gemessene enzymatische Wirkung ist von Begleitstoffen in wechselndem Masse beeinflusst.“

Zur Wirksamkeitsbestimmung zieht Verf. ein optisch inaktives Dipeptid vor. Bezüglich der Erepsin-Einheit sei auch auf die Arbeiten von Waldschmidt-Leitz¹ verwiesen; vgl. auch S. 408.

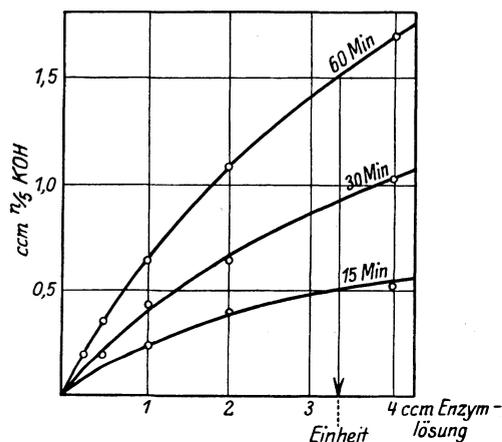


Fig. 48.

Wirkung der Hefenpeptidase auf Leucylglycin.
Enzymmenge und Umsatz.

Waldschmidt-Leitz und Deusch haben die Kinetik der Milzpeptidase untersucht. Dieselbe erinnert an diejenige der Hefenpeptidase: der Reaktionsverlauf zeigt in einem grösseren Bereich Proportionalität zwischen Zeit und Umsatz, abweichend von der Wirkungsweise des Darmerepsins. (Vgl. in der genannten Arbeit die Kritik der Versuche von Hedin, auf die wir im 21. Kapitel zurückkommen.)

Neutralsalzwirkungen (vgl. S. 411): Die älteren Versuche und Angaben von Koelker (Jl Biol. Chem. 8), Abderhalden (H. 59) und Dernby (Biochem. Zs 81) bedürfen im Lichte der neueren Untersuchungen über Peptidasen einer Revision.

Sehr bemerkenswerte Resultate über Gleichgewichte vom Typus Glycylglycin-Glycinanhydrid haben Levene und Simms² erhalten; siehe Nachtrag.

2. Einfluss der Substratkonzentration.

Der Einfluss der Substratkonzentration auf die Geschwindigkeit der Glycylglycin-Spaltung wurde in einer neuen Arbeit von Euler und Josephson³ untersucht. Die Versuchsreihe, mit einem durch Alkohol-fällung eines Glycerinextraktes aus Schweinedarm dargestellten Präparat von $Glf = 0,12$ (über die Bedeutung von Glf siehe S. 408) ausgeführt, wird in der nachstehenden Tabelle wiedergegeben.

¹ Waldschmidt-Leitz und Schöffner, H. 151, 31 und zw. 44; 1926.

² Levene und Simms, Jl Biol. Chem. 62, 711; 1925.

³ Euler und Josephson, Chem. Ber. 59, 226 (1926).

Aktivitäts-[S]-Kurve der Glycylglycin-Spaltung. pH = 8,0. Zu jedem Versuch 2 ccm Enzym-
lösung. Volumen des Reaktionsgemisches = 25 ccm.

Konzentration des Glycylglycins [S]	Min.	ccm $n/5$ -NaOH Diff.	$k \times 10^4$	$k \times 10^4$ [S]
0,025-n.	0	—	(9,6)	0,24
	60	0,07	8,8	
	120	0,12	7,9	
	180	0,16	7,3	
	8	0,61	—	
0,050-n.	0	—	(9,5)	0,47
	60	0,14	8,5	
	120	0,23	7,2	
	180	0,30	6,5	
	∞	1,27	—	
0,10-n.	0	—	(5,6)	0,56
	60	0,17	5,2	
	120	0,30	4,7	
	180	0,41	4,4	
	∞	2,48	—	
0,20-n.	0	—	(3,5)	0,70
	60	0,23	3,4	
	120	0,44	3,3	
	180	0,63	3,2	
	∞	5,00	—	
0,30-n.	0	—	(2,7)	0,81
	60	0,26	2,5	
	120	0,47	2,3	
	180	0,66	2,2	
		7,49		

Die auf Grund dieser Zahlen konstruierte Aktivitäts-[S]-Kurve der Glycylglycin-Spaltung findet man in der Fig. 49. Sucht man aus dem Verlauf dieser Kurve in ähnlicher Weise wie bei anderen Enzymen die Affinitätskonstante der Glycylglycin-Peptidaseverbindung zu schätzen, so findet man für die Schweinsdarmpeptidase den angenäherten Wert $K_M = 15$. Es wird von erheblichem Interesse sein, gerade bei diesem proteolytischen Enzym die Abhängigkeit der Affinität von der Herkunft und Vorgeschichte des Enzyms zu verfolgen.

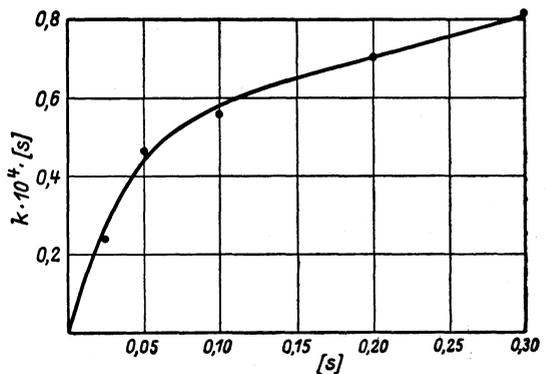


Fig. 49.

Aktivitäts-[S]-Kurve der Glycylglycin-Spaltung
pH = 8,0.

3. Einfluss der Enzymkonzentration.

Orientierende Versuche des Verfassers¹ an Glycylglycin und Pankreaserepsin ergaben eine recht angenäherte Proportionalität zwischen relativer Enzymkonzentration und Reaktionsgeschwindigkeit.

Zum gleichen Ergebnis, Proportionalität zwischen Enzymkonzentration E (in einem gewissen Bereich) und Reaktionskonstante, kam Dernby² unter Verwendung von Darmerepsin, während Abderhalden und Fodor davon abweichende Resultate anführen (Fermentf. 1, 579).

In Übereinstimmung mit Verf. und mit Dernby finden nun Waldschmidt-Leitz und Schöffner³ mit Darmpeptidase in einem gewissen Bereich von E Proportionalität zwischen E und k.

Wir lassen einen zusammenfassenden Auszug aus ihrer Tabelle (l. c. S. 42) folgen:

Enzymmenge E	Reaktionskonstante $k \cdot 10^4$
8 ccm	8,7
4 ccm	4,2
2 ccm	1,6
(1 ccm)	(0,25)

„Nur bei der Wirkung sehr kleiner Enzymmengen wird diese Beziehung (Proportionalität) nicht mehr beobachtet; hier findet man die Enzymwirkung verhältnismässig geringer“. „Diese Abweichungen mögen auf den Einfluss der Enzymzerstörung zurückzuführen sein“.

4. Hemmung der Erepsinwirkung durch Glykokoll und andere Reaktionsprodukte der Peptidspaltungen.

Die älteren Angaben über die Nichtbeeinflussung der Erepsinwirkung durch das Spaltungsprodukt der Glycylglycinspaltung, Glykokoll, konnten Euler und Josephson bei ihren neuen Versuchen⁴ nicht bestätigen. Es hat sich nämlich gezeigt, dass die Hemmung der enzymatischen Glycylglycinspaltung durch die besprochene Aminosäure in hohem Masse von der Acidität bzw. Alkalinität abhängt. Während isoelektrisches Glykokoll keine Wirkung auf die Erepsinwirkung auszuüben scheint, wurde beim optimalen pH der Glycylglycinspaltung (pH = 7,9–8) eine Hemmung beobachtet.

¹ Euler, Sv. Vet. Arkiv f. Kemi 2, Nr. 39, S. 7; 1907.

² Dernby, Biochem. Zs 81, 107 u. zw. 185; 1917.

³ Waldschmidt-Leitz und Schöffner, H. 151, 31; 1925/26.

⁴ Euler und Josephson, Chem. Ber. 59, 226; 1926. — H. 157, 122; 1926.

0,1 m Glycylglycin			0,1 m Glycylglycin + 0,2 n Glykokoll		
Min.	pH	Zunahme des Alkali- verbrauchs. ccm n/5 Ba(OH) ₂	Min.	pH	Zunahme des Alkali- verbrauchs. ccm n/5 Ba(OH) ₂
10	7,9	—	12	7,9	—
50	—	0,50	50	—	0,24
65	—	0,65	65	—	0,29
150	8,45	1,09	150	8,1	0,52

Die Reaktionsgeschwindigkeit war also bei diesem Versuch durch den Zusatz von 0,2 m Glykokoll auf rund die Hälfte der Reaktionsgeschwindigkeit herabgesetzt, die bei Spaltung von 0,1 m Glycylglycin in Abwesenheit von Glykokoll beim Versuchsbeginn eintritt.

Die folgende Versuchsreihe zeigt den Einfluss der Alkalinität.

0,1 m Glycylglycin		0,1 m Glycylglycin + 0,2 m Glykokoll					
pH = 7,84 bei Versuchsbeginn		pH =	7,09	7,61	7,87	8,16	8,44
Min.	Zunahme des Alkaliverbrauchs. ccm n/5 Ba(OH) ₂	Min.	Zunahme des Alkaliverbrauchs ccm n/5 Ba(OH) ₂				
20	0,22	70	0,30	0,25	0,21	0,11	0,0
45	0,36	180	0,63	0,46	0,44	0,25	0,02
60	0,41	280	0,76	0,52	—	—	—

Ähnliche Verhältnisse findet man bei Alanin wieder. Hemmung durch l-Alanin: Abderhalden und Fodor (Fermentf. 1). — Euler und Josephson haben experimentell festzustellen versucht, ob die Hemmung der Peptidase durch die Spaltprodukte der Dipeptide auf eine Affinität zwischen Enzym und Aminosäure zurückgeführt werden kann, welche durch die substratbindende Gruppe des Enzyms vermittelt wird, und eine solche Affinität scheint sich nach unseren Versuchen (H. 157, 122) wirklich geltend zu machen. Glycylanhydrid und Harnstoff hemmen nicht. Acetursäure, Hippursäure und Benzoylglycylglycin wurden durch unser Darmerepsin-Präparat nicht gespalten¹).

„Aus diesen Versuchen ziehen wir den Schluss, dass die Bindung eines Substrates an das Erepsin aus Schweinsdarm wenigstens zum Teil durch eine freie Aminogruppe des Substrates vermittelt wird. Inwiefern auch andere Gruppen im Substrat für die Bindungsfähigkeit an das Enzym mitbestimmend sind, lässt sich noch nicht sagen. Jedenfalls scheinen uns die Ergebnisse über die Spaltbarkeit der Curtiusschen Biuretbase

¹ Dadurch werden frühere Angaben bestätigt, und zwar: bezgl. Hippursäure solche von Clementi, Atti Accad. dei Lincei (5) 32, 172; 1923. Bezgl. Benzoylglycylglycin diejenigen von Toru Imai, H. 136, 205; 1924.



dafür zu sprechen, dass eine freie Carboxylgruppe im Substrat für die Bindung und Spaltung des Substrates nicht notwendig ist.“

G. Spezifität der Peptidasewirkungen.

1. Verschiedene Substrate.

Die Aufklärung der Spezifität der eigentlichen Peptidasen ist einer der wichtigsten Punkte in der gegenwärtigen Proteasenforschung. Erst nachdem die Zahl und die Wirkungsbereiche der am Eiweissabbau beteiligten Komponenten festgelegt sind, können wir uns ein Bild von den proteolytischen Funktionen der einzelnen Organe machen. Es ist ein grosses Verdienst von Willstätter und von Waldschmidt-Leitz, den Grund zu der Scheidung der proteolytischen Enzyme gelegt und bereits wichtige Tatsachen zur Beurteilung der Reichweite der einzelnen Enzyme aufgedeckt zu haben.

Was zunächst die Frage betrifft, ob diejenigen Enzyme, welche Dipeptide in den einzelnen Organen spalten, also besonders Pankreaspeptidase und Darmpeptidase charakteristische Besonderheiten aufweisen oder nicht, so führen wir aus der Arbeit von Waldschmidt-Leitz und Schöffner (H. 151) folgende Tabelle an:

— bedeutet keine nachweisbare Hydrolyse; + bedeutet positive Hydrolyse.

Substrat	Enzym		
	Darmerepsin	Pankreaserepsin	Pankreas-trypsin (akt.)
Alanylglycin	+	+	—
Glycyltyrosin	+	+	—
Glycylglycin	+	+	—
Leucylglycin	+	+	—
Leucylalanin	+	+	—
Pepton (ex. albumine, Merck)	—	—	+
Clupein	—	—	+
Thymushiston	—	—	+
Casein	—	—	+
Fibrin	—	—	+
Gelatine	—	—	+
Gliadin	—	—	+
Zein	—	—	+
Eieralbumin	—	—	+
Ricinus-globulin	—	—	+

„Der qualitative Vergleich der Spezifität des intestinalen und des pankreatischen Erepsins, den die Tabelle wiedergibt, belässt für eine Verschiedenheit der beiden Enzyme, wie sie auf Grund der älteren Angaben von E. Fischer

und E. Abderhalden¹ „Über das Verhalten verschiedener Polypeptide gegen Pankreassaft“ anzunehmen war, keine Stütze; aber auch die quantitativen Belege, die . . . für die Reihenfolge der Spaltbarkeit der verschiedenen Peptide und für das Verhältnis der jeweiligen Reaktionsgeschwindigkeiten angeführt werden, bieten keine Anhaltspunkte für eine solche Annahme Es kommt hinzu, dass sowohl das Adsorptionsverhalten der beiden Enzyme gegen Tonerde wie auch die Abhängigkeit ihrer Aktivität von der Wasserstoffzahl . . . übereinstimmend gefunden wird. Es ist daraus zu folgern, daß für eine Verschiedenheit der beiden Enzyme, des Darmerepsins und des Pankreaserepsins nun keine Anhaltspunkte mehr vorliegen, dass sie vielmehr als identisch zu betrachten sind².

Fischer und Abderhalden³ hatten die Peptide in durch Pankreassaft hydrolysierbare und nicht hydrolysierbare geschieden; ihre seither oft zitierte Tabelle ist auch im ersten Teil dieses Werkes (3. Aufl., S. 347) wiedergegeben.

Die neueren Ergebnisse der Willstätterschen Schule, besonders diejenigen von Waldschmidt-Leitz haben nun die Beurteilung dieser älteren Angaben geändert. Offenbar war das von Fischer und Abderhalden verwendete Enzymmaterial, das von St. Petersburg bezogen war, ereptisch nur noch wenig wirksam und büsste dann im Verlauf der Versuche seine Aktivität noch weiter ein; diese Annahme mag neben der noch unvollkommen entwickelten und ungleichmässigen enzymatischen Methodik die bestehenden Abweichungen erklären.

Mit einem proteolytisch einheitlichen, kräftigen Pankreaserepsin sind von Waldschmidt-Leitz und Harteneck⁴ folgende Zahlen gewonnen worden:

Peptidhydrolyse durch Pankreaserepsin.

Peptid	Spaltung in 2 St. bei 30°. ccm 0,2 n- KOH
Alanylglycin	2,28
Glycyltyrosin	0,39
Glycylglycin	0,15
Glycylalanin	0,45
Leucylglycin	1,07
Leucylalanin	0,12

Einen weiteren Fortschritt bringt die folgende Tabelle von Waldschmidt-Leitz und Schöffner (H. 151, 54) insofern, als sie das Verhältnis der Reaktionsgeschwindigkeiten, welche für die Hydrolyse der einzelnen Peptide gefunden wurde, angeben; das Verhältnis ist, wie die Tabellen zeigen, innerhalb der Fehlergrenzen konstant. „Es ist anzunehmen, dass auch die

¹ Fischer und Abderhalden, H. 46, 52; 1905.

² An diese Schlussfolgerung haben E. Waldschmidt-Leitz und A. Harteneck (H. 147, 286 u. zw. 307, 1925) eine weitergehende physiologische Fragestellung geknüpft und erörtert; es ist nämlich damit zu rechnen, dass die primäre Bildung auch des Darmerepsins sich in der Pankreasdrüse vollzieht und dass seine Absonderung durch die Darmschleimhaut auf eine sekundäre Anhäufung in deren Drüsenzellen zurückzuführen ist. Wir werden auf diese interessante Frage im 3. Teil dieses Buches zurückkommen.

³ Fischer und Abderhalden H. 46, 52. 1905.

⁴ Waldschmidt-Leitz und Harteneck, H. 149, 203 u. zw. 216; 1925.

genauere Bestimmung der Affinitätsverhältnisse bei beiden Enzymen . . . ihre Identität bestätigen und vertiefen wird; damit würde eine exakte Grundlage gegeben sein für eine Identifizierung der für die Mengen der beiden Enzyme gewählten Masse.“

Es scheint somit berechtigt, die in dieser Monographie verwendete Einheit der Wirksamkeit Gl f für die Pankreaspeptidase und für die Darmpeptidase anzunehmen und aus diesen Werten die relativen Mengen der beiden Enzyme (unter Vorbehalt für gleiche Affinität) zu vergleichen.

„Das zu den in der Tabelle mitgeteilten Versuchen angewandte Verhältnis der Enzymmengen betrug, wie der Vergleich der Reaktionsgeschwindigkeiten erkennen lässt, etwa 2:1; man liess 3,00 ccm Elution aus Tonerde-Adsorbat, gewonnen aus Darmschleimhaut bzw. 2,00 ccm Tonerdeelution, bereitet aus frischer Pankreasdrüse 1 bzw. 2 Stunden bei 30° und pH = 7,8 auf 0,001 Mol des Peptids einwirken.“

Peptidhydrolyse durch Darm- und Pankreaserepsin.

Substrat	Darmerepsin		Pankreaserepsin		$k_1 : k_2$
	Aciditäts- zunahme ccm 0,2 n- KOH	k_1 (mono- molek.) ber.	Aciditäts- zunahme ccm 0,2 n- KOH	k_2 (mono- molek.) ber.	
Alanylglycin . . .	2,48	0,0048	2,28	0,00222	2,2 ± 0,07
Leucylglycin . . .	1,12	0,0018	1,07	0,00087	2,1 ± 0,13
Glycyltyrosin . . .	0,41	0,00061	0,39	0,00030	2,0 ± 0,30
Glycylglycin . . .	0,65	0,0010	0,15	0,00011	9,1
" . . .	0,84	0,00133	0,66	0,00051	2,6 ± 0,20
" . . .	0,90	0,00144	0,77	0,00061	2,4 ± 0,16
Leucylalanin . . .	0,15	0,00021	0,12	0,00009	2,3 ± 1,0

Auch insofern wurde von Waldschmidt-Leitz die Identität zwischen Pankreas- und Darmerepsin nachgewiesen, als sich beide übereinstimmend gegen Proteine und deren höhere Spaltprodukte inaktiv erwiesen.

Nicht gespalten werden:	{	Pepton (Merck ex. alb.)	Gliadin
		Clupeinsulfat	Zein
		Thymushiston	Eieralbumin
		Casein; Fibrin	Ricinusglobulin.

2. Trennung von Pankreastrypsin und Pankreaserepsin.

Zu der vorletzten Spalte der obigen Tabelle ist folgendes über die Trennung der Trypsins von Erepsin (der Peptidase) in Ergänzung der kurzen Angaben über die Reinigung der Peptidase hinzuzufügen:

G. Schaeffer und E. Terroine¹ hatten angegeben, durch Dialyse von Pankreassaft gegen destilliertes Wasser eine Trennung der beiden Proteasen erzielt zu haben. Nach Waldschmidt-Leitz lassen sich indessen diese Erscheinungen auf andere Ursachen zurückführen. Sie fanden, dass bei der Dialyse keine Trennung der enzymatischen Komponenten eintritt, „man beobachtet vielmehr eine allmähliche und gleichmässige Zerstörung beider Enzyme.“

Waldschmidt-Leitz und Harteneck haben dann die Trennung der beiden Pankreasproteasen auf Grund ihres verschiedenen Adsorptionsverhaltens gegenüber Tonerde durchgeführt.

Pankreastrepsin wird nach Willstätter und Waldschmidt-Leitz² in den angesäuerten Auszügen der Pankreasdrüse durch Tonerde nur in geringem Masse, bei neutraler Reaktion in viel höherem Grade aufgenommen. Hingegen wird die Adsorption der Peptidase durch die Tonerde in saurer Lösung, beispielsweise bei $\text{pH} = 4,7$, begünstigt, in neutralem Medium aber zurückgedrängt. Diese Unterschiede in den Adsorptionsaffinitäten benutzt das eingeschlagene Verfahren zur Isolierung der enzymatischen Komponenten; sie bewirken, dass nach mehrmaliger, z. B. dreimaliger Wiederholung der Adsorptionsvornahme die Mutterlauge frei von Erepsin gefunden wird, während in den Elutionen der Adsorbate, beispielsweise mit verdünntem Ammoniak oder auch mit Alkaliphosphat das Erepsin angereichert wird, ohne dass sich in ihnen tryptische Wirkung nachweisen liesse.

Auf Grund der neuesten Untersuchungen von Waldschmidt-Leitz³ lassen sich nun Trypsin und Peptidase schärfer voneinander unterscheiden als man vorher angenommen hatte. Die Hinweise, die sich aus der Gegenüberstellung in der obigen Tabelle auf strukturelle Besonderheiten der spezifischen Substrate des Trypsins ergeben, erlauben die Feststellung, dass die beispielsweise in den Peptonen der Pepsinverdauung, in den Protaminen und Histonen oder in anderen geprüften Proteinen vorliegenden strukturellen Gruppierungen vom Typus der für Erepsin spezifischen einfachen Peptidbindungen verschieden sein werden.

Der ganz neuerdings von Waldschmidt-Leitz⁴ erreichte Fortschritt in der Trennung von Trypsin und Peptidase wurde ermöglicht durch die Verwendung besonderer, wohl definierter Tonerdesorten. Frisch bereitetes Aluminiumhydroxyd von der Zusammensetzung $\text{Al}(\text{OH})_3$ (Sorte C) erfährt, wie Willstätter, Kraut und Erbacher⁵ gefunden hatten, bei der Aufbewahrung in wässriger Suspension eine Umwandlung, die auch sein chemisches Verhalten

¹ Schaeffer und Terroine, *Jl de Physiol et Pathol. gén.* 12, 905; 1910. — Siehe auch Zunz, *Arch. int. de Physiol.* 11, 191; 1912.

² Willstätter und Waldschmidt-Leitz, *H.* 125, 132 u. zw. 174; 1922/23.

³ Waldschmidt-Leitz und Schöffner, *H.* 151, 31; 1926.

⁴ Waldschmidt-Leitz, Schöffner und Grassmann, *H.* 156, 68; 1926.

⁵ Willstätter, Kraut und Erbacher, *Chem. Ber.* 58, 2448; 1925.

ändert; es geht nämlich die instabile α -Modifikation über eine Zwischenstufe $C\beta$ in das stabile Gel $C\gamma$ über. Zur Gewinnung der einheitlichen Pankreasproteasen wie des trypsinfreien Darmerepsins wandten Waldschmidt-Leitz und seine Mitarbeiter die Tonerdesorte $C\gamma$ an¹.

Versuch 1. Verhalten gegen Tonerde $C\gamma$. 20 ccm Glycerinauszug aus frisch getrockneter Pankreasdrüse von Schweinen wurden nach dem Verdünnen mit 20 ccm Wasser + 1,50 ccm Acetatpuffer von pH = 3,8 viermal der Adsorption mit je 1,5 ccm Tonerdesuspension $C\gamma$ (= je 52,5 mg Al_2O_3) unterworfen; die vereinigten Adsorbate, die zweimal mit 20 ccm 20%igem Glycerin (durch Acetatpuffer auf pH = 3,8 eingestellt) gewaschen waren, eluierte man mit 40 ccm 0,04 n- NH_3 (20% Glycerin enthaltend), während man die Adsorptionsrestlösung mit n- NH_3 neutralisierte. Die Restlösung enthielt dann 60% vom angewandten Trypsin und 2,5% vom Erepsin und die Elution 25 bzw. 30%; der Erepsingehalt der Elution war infolge Enzymzerstörung zu gering.

Versuch 2. Verhalten gegen Tonerdesorte $AlO \cdot OH$. 20 ccm Glycerinauszug, mit 20 ccm Wasser + 1,5 ccm n-Acetatpuffer von pH = 3,8 verdünnt, wurde viermal mit je 1,0 ccm Tonerdegel von der Zusammensetzung $AlO \cdot OH$ (= je 52,0 mg Al_2O_3) adsorbiert; hierauf wurden die vereinigten, wie in Versuch 1 gewaschenen Adsorbate mit 40 ccm 0,04 n- NH_3 (20% Glycerin enthaltend) eluiert. Der Gehalt der Restlösung belief sich auf 45% vom angewandten Trypsin und auf 77% vom Erepsin, während die Elution 47 bzw. 15% davon enthielt. Vom ereptischen Enzym war in diesem Fall nur wenig, vom tryptischen aber etwas mehr aufgenommen worden, die Adsorbierbarkeit der beiden Enzyme war also vertauscht.

3. Zusammenwirkung proteolytischer Enzyme.

In engster Beziehung zu der Klärung des spezifischen Wirkungsbereiches der einzelnen Komponenten des eiweiss-spaltenden Enzymsystems steht die Erforschung des Zusammenwirkens der drei Grundtypen, Pepsin, Trypsin und Erepsin. Nach den verdienstvollen orientierenden Versuchen von Henriques und Gjaldbaek² über die Einzelleistungen des Pepsins und des Trypsins auf Proteine wie Casein verdankt man Waldschmidt-Leitz und seinen Mitarbeitern bereits wertvolle Beobachtungen, welche, über das enzymchemische Interesse hinausgehend, ein tieferes Eindringen in die Chemie der Proteine ermöglichen werden. Es ist deshalb vielleicht nicht ungeeignet, diesen Abschnitt mit einem Auszug aus der Erörterung abzuschliessen, welche Waldschmidt-Leitz und Simons³ einer ihrer neuesten Arbeiten voranstellen.

„Es hat sich am Beispiel des Caseins erwiesen, dass bei der fraktionierten Hydrolyse durch Pepsin und durch das erepsinfreie Trypsin die Wirkungen der beiden Enzyme, gemessen an dem in alkoholischer Lösung ermittelten Zuwachs an Carboxyl, unabhängig von der Reihenfolge ihrer Einwirkung beobachtet werden. Die quantitative Übereinstimmung der enzymatischen Einzelwirkungen belässt für eine Vertretbarkeit der beiden Enzyme,

¹ Wie die genannten Forscher mit Recht hervorheben, ist es eine schöne Bestätigung für die chemische, nicht für die kolloidchemische Funktion von Adsorbentien, wenn es sich zeigt, dass mit dem Wechsel in der chemischen Zusammensetzung von $Al(OH)_3$ zu $AlO \cdot OH$ eine wesentliche Veränderung der selektiven Adsorptionswirkung verbunden ist.

² Henriques und Gjaldbaek, H. 75, 363; 1911. — 83, 83; 1912/13.

³ Waldschmidt-Leitz und Simons, H. 156, 99; 1926.

von Pepsin und Trypsin, keine Anhaltspunkte. Es ist indessen mit der aufeinanderfolgenden Anwendung der getrennten, einheitlichen Pankreasproteasen, des Trypsins und des Erepsins, möglich gewesen, die schönen Beobachtungen von Henriques und Gjaldbaek in einem anderen Sinne zu bestätigen und zu vertiefen; an dem erschöpfend mit Trypsin und mit Erepsin gespaltenen Substrat findet man für das peptische Enzym keine deutliche Wirkung mehr. Diese Tatsache, dass die spezifische Wirkung des Pepsins nach tryptischer Vorverdauung quantitativ erhalten bleibt, dass sie hingegen nach einer kombinierten Hydrolyse durch Trypsin und Erepsin nicht mehr wahrgenommen wird, weist darauf hin, dass die vorausgehende Einwirkung des Erepsins zu einer Verarmung an Pepsinsubstraten führen und dass die besondere Aufgabe des peptischen Enzyms je nach dem Grade der Vorverdauung durch die Mitwirkung der ereptischen entfallen kann. Diese Feststellung die für die Beurteilung der spezifischen Funktion des Pepsins wie für die Erkenntnis der Proteinstruktur von Bedeutung wäre, wird, wenngleich sie durch die Beobachtungen von Henriques und Gjaldbaek gestützt sein mag, auf breiterer Grundlage zu bestätigen sein; sie liess erkennen, dass . . . auch die spezifische Einstellung des Pepsins mehr durch eine besondere Konfiguration der Proteinbausteine oder durch die Größe des Moleküls als durch eine spezifische Bindungsart bestimmt zu sein scheint“.

In nachstehender Tabelle stellt Waldschmidt-Leitz die Versuchsergebnisse übersichtlich zusammen:

Enzymatische Wirkung und Reihenfolge.
(Die Angaben beziehen sich auf die Hydrolyse von 0,30 g Casein).

Nr.	Reihenfolge der Enzyme	Acid.-Zuwachs ccm 0,2 n. KOH	Nr.	Reihenfolge der Enzyme	Acid.-Zuwachs ccm 0,2 n. KOH
1	Pepsin	2,20	3	Trypsin-Kinase .	4,54
	Trypsin-Kinase .	4,33		Erepsin	4,36
	Erepsin	+		Pepsin	0,22
2	Trypsin-Kinase .	4,54	4	Pepsin	2,20
	Pepsin	2,40		Trypsin	2,02
	Trypsin-Kinase .	2,50		Trypsin-Kinase .	+
	Erepsin	2,22		bzw. Erepsin . .	+

„Es könnte nach den angeführten Beobachtungen scheinen, dass die besonderen Aufgaben der einzelnen Proteasen bei der Hydrolyse der Proteine nicht deutlich genug zu unterscheiden wären; für eine Abgrenzung ihrer besonderen Wirkungen, etwa auf die Spaltung bestimmter Aminosäurekomplexe oder bestimmter Strukturen fehlt uns noch jeder Anhalt. Eine allgemeinere Kennzeichnung der besonderen enzymatischen Funktionen ergibt sich indessen aus wichtigen Erfahrungen der Literatur. Wenn unter der Wirkung des

Pepsins, wie man annimmt, und wie wir bestätigen können, und ähnlich bei der Einwirkung des nichtaktivierten Trypsins¹ das Molekül der Proteine nur in grössere Bruchstücke zerfällt, erkennbar an einem verhältnismässig nicht bedeutenden Zuwachs an Peptidcarboxylen, während andererseits zufolge E. Waldschmidt-Leitz und A. Harteneck die Wirkung des aktivierten erepsinfreien Trypsins überwiegend in der Loslösung freier Aminosäuren zur Geltung kommt und wenn endlich, wie Waldschmidt-Leitz und Harteneck gezeigt haben, der Angriff des Erepsins nur einfache Peptide betrifft, so erlauben diese Tatsachen eine prinzipielle Unterscheidung dieser vier enzymatischen Funktionen, unabhängig von ihrer noch nicht erkannten strukturellen Spezifität. So wird es auch verständlich, dass, wie aus Versuch 2 der Tabelle hervorgeht, die peptische Hydrolyse tryptischer Verdauungsprodukte für die Wirkung des tryptischen Enzyms wiederum Angriffspunkte freizulegen vermag; es mag von der Grösse der noch vorhandenen Komplexe, wenn nicht von einer besonderen strukturellen Anordnung ihrer Bausteine abhängen, ob zu ihrem weiteren Abbau die Mitwirkung des Trypsins erforderlich ist.“

H. Stabilität der Peptidase. — Einfluss der Temperatur auf die Dipeptidspaltung.

Versuche über die Temperatur-Stabilität, also über die Grösse der Konstanten k_c bei verschiedenen Temperaturen (vgl. I. Teil, 3. Auflage, S. 246) liegen noch nicht vor. Siehe auch Euler, H. 51, 213; 1906.

Was die Beständigkeit der Peptidase bei mittlerer Temperatur, etwa 30°, betrifft, so liefern die älteren Versuche² keine zuverlässigen oder eindeutigen Anhaltspunkte. — An frischen Organsäften sind gelegentlich Zunahmen der Wirksamkeit beobachtet worden.

Enzymatische Wirkung und Alter der Drüse.

Substrat	Pankreasprobe. Angaben in cem 0,2 n-KOH			
	2 ¹ / ₂ Jahre alt	frisch best.	XXIV	
			frisch	n. 1 Mon. best.
Gelatine	1,28	1,33	1,40	1,29
Leucylglycin	0,39	1,17	1,06	0,70
Alanylglycin	0,27	0,80	0,77	—
Glycylglycin	0,05	0,30	0,24	0,14
Leucylalanin	0,09	0,21	0,08	—

¹ Siehe dazu Waldschmidt-Leitz, Schöffner und Grassmann, H. 156, 68; 1926.

² Vernon, JI of Physiol. 30, 330; 1903. — K. Mays, H. 49, 124; 1906.

Nach Waldschmidt-Leitz und A. Harteneck¹ lässt sich die Beständigkeit des pankreatischen Erepsins von der des tryptischen Enzyms, z. B. in den rohen Präparaten unterscheiden, und zwar ist sie weniger ausgeprägt. Dies ergibt z. B. der Vergleich von frisch getrocknetem Drüsenmaterial mit gealterter Trockensubstanz oder auch die Verfolgung der speziellen Wirkung bei der Aufbewahrung von Glycerinauszügen der Drüse. Bei verschiedenen Versuchen ergaben sich wechselnde Beständigkeiten; siehe Tabelle auf S. 426.

Den Einfluss der Temperatur auf die Spaltungsgeschwindigkeit von Glycyl-l-tyrosin durch Hefepresssaft und Pankreassaft sowie von dl-Leucylglycin durch Hefepresssaft haben Abderhalden, Caemmerer und Pincussohn² polarimetrisch untersucht. Die Reaktionskonstanten sind daselbst nicht berechnet. Wir führen die Originalzahlen an, welche zeigen, dass sie sich zu einer Berechnung von k_e kaum verwenden lassen. Die neben den Versuchszeiten gegebenen Zahlen sind die abgelesenen Winkel.

Zu allen Versuchen 1 ccm dl-Leucylglycin-Lösung.

Minuten	15°	25°	35°	45°
	1,1 ccm Hefesaft 4,5 ccm Wasser	1,0 ccm Hefesaft 4,5 ccm Wasser	1,0 ccm Hefesaft 4,5 ccm Wasser	1,0 ccm Hefesaft 4,5 ccm Wasser
0	0,00°	0,00°	0,00°	0,00°
15	0,00	-0,03	-0,06	-0,10
30	-0,01	-0,08	-0,13	-0,20
45	-0,02	-0,12	-0,20	-0,26

¹ Waldschmidt-Leitz und Harteneck, H. 147, 286 u. zw. 298; 1925.

² Abderhalden, Caemmerer und Pincussohn, H. 59, 293; 1909.

17. Kapitel.

Beobachtungen über enzymatische Spaltung von Peptonen und höheren Polypeptiden.

Nachdem im 16. Kapitel die Peptidasen behandelt wurden, welche nach den Ergebnissen der Münchener Schule und besonders nach den Arbeiten von Waldschmidt-Leitz durch ihre Wirkung auf Dipeptide — nicht durch ihre Peptonspaltung — zu charakterisieren sind¹, bleiben zahlreiche und teilweise wertvolle Beobachtungen übrig, welche mit Enzym-Material verschiedener Herkunft an Peptonen gewonnen worden sind. Nach unseren gegenwärtigen Kenntnissen dürften diese Enzymlösungen Peptidasen, aktiviertes und nicht aktiviertes Trypsin und vielleicht noch ein Enzym vom Papain-Typus enthalten haben. Das ungleiche Mischungsverhältnis der Komponenten und die zuweilen gänzliche Abwesenheit einer derselben macht mehrere früher auffallende Beobachtungen verständlich². Näher wird sich die Zusammensetzung der in älteren Arbeiten verwendeten Enzymsäfte nicht mehr ermitteln lassen, und manche Frage bedarf somit auf Grund der neu gewonnenen Grundlage einer neuen Bearbeitung. Aber andererseits liegt in diesem hier kurz zu referierenden Material doch viel für die angewandte und für die forschende Enzymchemie Brauchbares, wenn auch die gewonnenen Ergebnisse ihren quantitativen Charakter verloren haben, da es sich stets um

¹ Auch Abderhalden (H. 151, 151; 1926) erkennt die Ergebnisse von Waldschmidt-Leitz als beweisend an, „dass Erepsin alle von ihm untersuchten Dipeptide spaltet, wogegen keines davon von dem tryptischen Ferment angegriffen wird“. Auch ein Tripeptid wurde von letzterem nicht hydrolysiert. Ferner konnte gezeigt werden, dass weder Pepton, das der peptischen Verdauung entstammt, noch Protamin, noch Histon, noch irgend ein anderes Protein durch Erepsin gespalten wird. Alle genannten Produkte werden dagegen von Trypsin hydrolysiert. Es steht somit einwandfrei fest, dass Erepsin und Trypsin zwei ganz verschiedene Fermentkomplexe darstellen. Sie sind auf bestimmte Substrate eingestellt.“

Immerhin scheint Abderhalden insofern von der Auffassung von Waldschmidt-Leitz abzugehen, als er die Spaltung hoher Polypeptide durch Erepsin für nachgewiesen bzw. möglich hält. Er schreibt in der gleichen Mitteilung: „Einfügen möchte ich noch, dass auch aus einer grossen Anzahl von Aminosäuren aufgebaute Polypeptide von Erepsin gespalten werden. Das von Fodor (Abderhalden und Fodor, Chem. Ber. 49, 561; 1916) und mir dargestellte, 19 Aminosäuren enthaltende Polypeptid wird auch zerlegt...“

² Siehe z. B. U. Lombroso und Lattes, Arch. di Fisiol. 10, 462; 1910. — Arch. di Farm. 13, 186.

eine Mehrheit von Substraten und Katalysatoren, also um mehrere neben einander verlaufende Reaktionen handelt.

Ferner sind hier zu behandeln die Beobachtungen und Messungen über die Spaltung von Peptiden mit drei und mehr Aminosäureresten; über die Einheitlichkeit des dabei wirksamen Enzyms lässt sich noch nichts Endgültiges sagen. Die Spezifität der Peptidasen auf Dipeptide möchten Josephson und Verfasser¹ einstweilen als eine relative bzw. graduelle ansehen.

A. Substrate.

Wir haben im 16. Kapitel, der Auffassung von Waldschmidt-Leitz folgend, die Dipeptide als die spezifischen Substrate der Peptidase bzw. der Peptidasen behandelt, dabei allerdings die Möglichkeit betont, dass diese Spezifität relativ ist, dass also wenigstens die Tri- und Tetrapeptide noch vom gleichen Enzym mit einer noch messbaren, freilich viel geringeren Geschwindigkeit angegriffen werden.

Wir ziehen also bis auf weiteres eine Grenze vor den Tripeptiden und behandeln diese als Substrate zusammen mit allen höheren Peptiden und den Peptonen.

1. Peptide.

Wie die Kenntnis der Dipeptide so verdankt man bekanntlich Emil Fischer auch die Kenntnis der meisten höheren Glieder dieser Körperklasse und der zu ihnen führenden Synthesen. Die von E. Fischer eingehend durchgearbeitete und beschriebene Reihe der Polypeptide beginnt mit dem Diglycylglycin² und dem Triglycylglycin, dessen Ester, die sog. Biuretbase, von Curtius³ entdeckt worden war.

Die Reihe von Polypeptiden⁴, welche sich bis auf die Glieder mit 18 Aminosäuren⁵ und mit 19 Aminosäuren⁶ erstreckt, kann hier nicht eingehender beschrieben werden; es sei auf die Originalarbeiten und auf Fischers Zusammenfassung (Chem. Ber. 39) verwiesen.

Was die Struktur der Polypeptide betrifft, so „führen die Resultate der Synthese und alle bisher bekannten Metamorphosen übereinstimmend zum Schluss, dass in ihnen die Aminosäuren amidartig verkuppelt sind“.

Fischer und Abderhalden⁷ verdankt man ferner die ersten Studien über die Spaltung dieser Polypeptide. Diese Arbeiten sind von Abder-

¹ Euler und Josephson: H. 157, 122; 1926.

² Fischer, Chem. Ber. 36, 2982; 1903.

³ Curtius, Chem. Ber. 16, 753; 1883. — 37, 1284; 1904.

⁴ Fischer, Leuchs und Suzuki, Chem. Ber. 37, 3310; 1904 (Tripeptide). — Fischer und Suzuki, Chem. Ber. 37, 4577; 1904 (Tetrapeptide). — Fischer, Chem. Ber. 39, 461; 1906 (Heptapeptide). — Chem. Ber. 40, 1754; 1907 (Oktapeptid).

⁵ Fischer, Chem. Ber. 40, 1754; 1907.

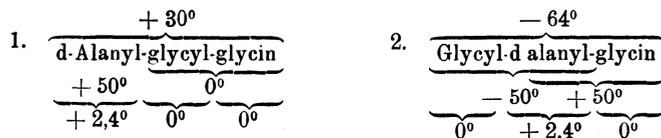
⁶ Abderhalden und Fodor, Chem. Ber. 49, 561; 1916.

⁷ Fischer und Abderhalden, H. 46, 52; 1905.

halden und seinen Mitarbeitern in verschiedenen Richtungen fortgesetzt worden¹.

Tripeptide: Mit Tripeptiden hat Abderhalden² die Frage in Angriff genommen, „ob die in den verschiedensten Geweben des Tier- und Pflanzenreiches vorhandenen peptolytischen Fermente identisch sind oder aber eine ganz verschiedene Wirkung zeigen“³.

„Eine sehr weitgehende Differenzierung der Wirkung verschiedener Fermentlösungen musste sich durch die Verwendung von komplizierter gebauten optisch-aktiven Polypeptiden ermöglichen lassen. Wählen wir als Beispiel das Tripeptid d-Alanyl-glycyl-glycin. Es zeigt in wässriger Lösung $[\alpha]_{20}^D = +30^\circ$. Sein Abbau kann nun in der Weise erfolgen, dass zunächst hauptsächlich d-Alanin abgespalten wird. Es bleibt das Dipeptid Glycyl-glycin übrig. In diesem Fall muss das Drehungsvermögen der Lösung beständig abnehmen, denn Glycyl-glycin ist optisch inaktiv. Findet dagegen eine Abspaltung von Glycin statt, dann muss sich dieser Verlauf der Hydrolyse an einem Ansteigen des Drehungsvermögens kundgeben, denn das entstehende Dipeptid d-Alanyl-glycin besitzt $[\alpha]_{20}^D = +50^\circ$. Verwenden wir die zu vergleichenden, auf ein bestimmtes Dipeptid eingestellten Fermentlösungen, so können wir durch Benützung derartiger Tripeptide prüfen, ob der Abbau in genau der gleichen Weise verläuft oder nicht.“



Aus ihren Versuchen, die wir hier nicht wiedergeben, schliessen Abderhalden und Brahm, dass die beiden Fermentlösungen (Hefesaft und Darmsaft) die beiden Tripeptide in genau der gleichen Weise abgebaut haben.

Aus seinen Versuchen mit optisch-aktiven Polypeptiden (z. B. dem Pentapeptid dl-Leucyl-triglycyl-glycin zieht Abderhalden (Fermentf. 8, 240) den Schluss, „dass auch aus mehreren Aminosäuren bestehende racemische Polypeptide asymmetrisch gespalten werden, und dass es möglich ist, das entstandene optisch-aktive Polypeptid zu isolieren und zu identifizieren.

Neue Versuche über die racemischen Tripeptide: dl-Alanyl-glycyl-glycin, dl-Leucyl-glycyl-glycin, Glycyl-dl-leucyl-glycin und dl-Leucyl-glycyl-dl-alanin und über ihre Spaltung durch Hefemazerationsaft und Pankreatin haben Abderhalden und Singer⁴ angestellt.

Die Spaltung eines Tetrapeptids durch Pankreassaft und durch Hefepresssaft hat G. Caemmerer⁵ studiert, die durch Hefesaft Abderhalden⁶, der auch ein Pentapeptid in den Kreis der Untersuchung zog.

Gelegentlich einer weiteren Fragestellung, „wie sich ein Polypeptid verhält, an dessen Aufbau neben den in der Natur auftretenden Aminosäureformen ein Baustein, der in der betreffenden Konfiguration im Eiweiss nicht

¹ Siehe Abderhalden, Chem. Ber. 39, 2449; 1916.

² Abderhalden und Brahm, H. 57, 342; 1908.

³ Diese Fragestellung ist einstweilen wohl dadurch erledigt, dass in den verschiedenen Geweben des Tier- und Pflanzenreiches die hier wirksamen Enzyme im allgemeinen in verschiedenen relativen Mengen auftreten, wodurch sich ein verschiedener Spaltungsverlauf der Tri- und Polypeptide ergibt.

⁴ Abderhalden und Singer, Fermentf. 8, 187; 1925.

⁵ G. Caemmerer, Diss. Giessen, 1911.

⁶ Abderhalden, Fermentf. 8, 240; 1925.

vorkommt, enthalten ist“, findet man bei Abderhalden und Handovsky¹ wertvolle Beiträge zur Chemie der Polypeptide.

Ferner hat Abderhalden² Aminosäuren synthetisch bereitet, die in der Natur bis jetzt nicht aufgefunden worden sind und deren Vorkommen als Eiweissbausteine sehr unwahrscheinlich ist. So wurden die α -dl-Aminoheptylsäure, α -dl-Aminocaprylsäure und α -dl-Aminomyristinsäure dargestellt. Aus Aminosäuren wurden Polypeptide aufgebaut, wobei als weitere Bausteine in der Natur vorkommende Aminosäuren verwendet wurden. Nach den Angaben von Abderhalden und seinen Mitarbeitern sollen die erwähnten racemischen Aminosäuren von Hefezellen asymmetrisch gespalten werden. Interessant wird eine Untersuchung, wie sich die nach Waldschmidt-Leitz isolierten Proteasen gegen diese Substrate verhalten.

Ob die von Abderhalden und Stix (Fermentf. 8, 179) gefundene Spaltung von Glycyl-3,5-dijod-l-tyrosin von einer eigentlichen Peptidase vermittelt wird, bleibt noch unentschieden. Die Einwirkung von Darmenzymen auf andere Glycinderivate hat Clementi³ untersucht.

Polypeptide sind bekanntlich nunmehr in erheblicher Zahl aus Eiweissstoffen isoliert worden⁴. Zur Struktur-Aufklärung verwendet Abderhalden weitgehend die Drehungsänderungen beim Abbau, daneben rein chemische Methoden, wie Kuppelung mit Naphthalinsulfochlorid usw.

Eine Übersicht über die Eigenschaften der Polypeptide gibt Fischer in seinem schon mehrfach zitierten Vortrag (l. c. S. 575). Als Substrate für Enzymstudien eignen sie sich in erster Linie dadurch, dass sie sich chemisch rein gewinnen lassen und auch durch ihre im Vergleich zu Aminosäuren grössere Löslichkeit und durch ihr relativ hohes Drehungsvermögen. Charakteristische Reaktionen, welche sie einerseits von den Aminosäuren, andererseits von den Peptonen unterscheiden würden, existieren nicht, vielmehr sind die Übergänge, wie auch wohl zu erwarten ist, kontinuierliche.

2. Peptone.

Peptone sind Abbauprodukte der Proteine sowohl bei der Spaltung durch eigentliche Proteasen als bei der Spaltung durch Säuren, und sie werden selbst weiter zu Aminosäuren zerlegt.

Die grosse Ähnlichkeit der Peptone mit den künstlichen Polypeptiden lässt vermuten, dass die charakteristische Peptidbindung in Peptonen vorherrscht. Immerhin ist es noch nicht sicher, dass die Peptone von anderen Bindungen, z. B. solchen, welche durch die Hydroxyle der Oxyaminosäuren vermittelt werden, frei sind.

¹ Abderhalden und Handovsky, Beitrag zur Frage des Einflusses der Struktur und Konfiguration des Substrates (Polypeptide) auf die Fermentwirkung. Fermentf. 4, 316; 1921. — Siehe auch Abderhalden und Buadze, Fermentf. 8, 487; 1925.

² Abderhalden, Glaubach, Goto und Tanaka, Fermentf. 6 und 7; 1922/23. — Abderhalden, H. 130, 205; 1923. — Abderhalden, Pieper und Tateyama, Fermentf. 8, 579; 1926.

³ Clementi, Atti Acad. dei Lincei (5) 29, 327; 1920.

⁴ Fischer und Abderhalden, Chem. Ber. 40, 3553; 1907. — Abderhalden, H. 58, 373; 1908.

Von den chemischen Eiweissreaktionen finden wir die den einzelnen Aminosäuren zukommenden Farbenreaktionen in den Peptonen wieder, die Biuretraktion tritt mit schön roter Farbe auf, wie auch in den höchsten synthetischen Polypeptiden.

Peptonpräparate sind stets Mischungen der verschiedenen polypeptidartigen Abbauprodukte. Charakterisiert sind diese Peptonmischungen durch ihre hohe Löslichkeit in Wasser, sowie gegenüber genuinen Eiweisskörpern dadurch, dass sie weder von Salpetersäure, noch in schwach saurer Lösung von Ammoniumsulfat, von Chlornatrium, Ferrocyankalium, noch von Pikrinsäure oder Trichloressigsäure gefällt werden. Dagegen fallen Sublimat-Natriumchlorid, Phosphorwolframsäure, Phosphormolybdänsäure, sowie hochprozentiger Alkohol.

Aus Peptonpräparaten können die höchstmolekularen Anteile durch Aussalzen, die niedrigsten Peptide durch geeignet geleitete Dialyse entfernt werden. Säuren und Alkalien gegenüber verhalten sich die Peptone wie die Polypeptide; die Bindungen zwischen den verschiedenen Aminosäurepaaren werden verschieden leicht gelöst.

B. Peptonspaltende Säfte und Sekrete.

1. In Tieren.

Schon nach dem im 16. Kapitel Gesagten ist es ohne weiteres ersichtlich, dass sowohl Pankreassaft als Darmsaft höherer Tiere und ferner Autolyse-Saft der Hefe gleichzeitig Trypsin und Peptidase enthalten und also Peptone enzymatisch vollständig abzubauen vermögen. Auf die wichtigen Arbeiten von Otto Cohnheim¹ ist an anderer Stelle hingewiesen. Die ersten Beobachtungen über die Peptonspaltung an der Darmschleimhaut stammen von Salvioli (1880) und von Hofmeister². Die Frage, ob und wo die Komponenten des Darmsaftes secerniert werden — nach Falloise³ wird das Erepsin aus den Lieberkühnschen Drüsen abgeschieden — gehört in den III. Teil dieses Werkes. Nicht uninteressant ist im Licht der neueren Forschung, dass Foa⁴ aus einer monatelang isolierten Vellaschlinge erepsinfreien Darmsaft erhielt, was wohl mit der geringeren Beständigkeit der Peptidase zusammenhängt.

Mit Fistelsaft einer isolierten Darmschlinge erhielten Abderhalden und Teruuchi⁵ Spaltung von Glycyl-glycin.

¹ Cohnheim, H. 33, 451; 1901. — 36, 13; 1902. — 47, 286; 1906. — 49, 64; 1906. — 51, 45; 1907.

² Hofmeister, H. 6, 51; 1881.

³ Falloise, Arch. intern. Physiol. 2, 299; 1904.

⁴ Foa, Arch. di Fisiol. 5, 1; 1908.

⁵ Abderhalden und Teruuchi, H. 49, 1; 1906.

Botazzi¹ fand die peptonspaltende Wirkung des Darmes nach anhaltendem Fasten minimal, was wohl auf einen geringen Trypsingehalt hindeutet.

Weitere Angaben über Peptonspaltung im Darm von Tieren: Vernon², Weinland³, Nakayama⁴, N. Sieber und Simonowski⁵. Eine neuere Untersuchung über die Beziehungen der peptolytischen Wirkung des Darmerepsins zur chemischen Konstitution des Substrates verdankt man Clementi⁶.

Peptonspaltung im Pankreassaft: Schaeffer und Terroine⁷, Zunz⁸, Bayliss und Starling⁹, Wohlgemuth¹⁰ u. a.

Organe: Niere scheint Peptone am kräftigsten zu spalten; Hedin hat diese Wirkung näher untersucht¹¹. Darauf folgen Leber, Lunge, Milz¹², Lymphdrüsen¹³, Muskel. Cohnheim¹⁴, Kobzarenko¹⁵, Bergell¹⁶, Maeda¹⁷.

Peptonspaltung durch Enzyme des Menschenharns haben Hedin und Masai¹⁸ beobachtet und dieselbe näher studiert.

Peptidasen-Haushalt bei Epileptikern: H. Pfeiffer und Mitarb. Klin. Woch. 4, 1122.

In diesem Zusammenhang wären auch die zahlreichen Arbeiten über Autolyse zu nennen, insofern sie den Abbau von zugesetzten Peptonen besonders oder in Zusammenhang mit der gesamten Eiweisspaltung behandeln. Die Literaturzitate können sich auf die grundlegenden Arbeiten von Salkowski¹⁹, Schwiening²⁰, Biondi²¹ und M. Jacoby²² beschränken, unter Hinweis auf die Besprechung der Autolyse in Kap., 21 sowie auf die neueren Arbeiten von Dernby²³, von Bradley²⁴, von Rona und Mislowitzer²⁵.

¹ Botazzi, Arch. di Fisiol. 5, 317; 1908.

² Vernon, JI of Physiol. 32, 33; 1905. — 33, 81; 1905.

³ Weinland, Zs f. Biol. 45, 293; 1904.

⁴ Nakayama, H. 41, 348; 1904.

⁵ Sieber und Simonowski, H. 36, 255; 1902.

⁶ Clementi, Atti Accad dei Lincei 29 (5), 327; 1920.

⁷ Schaeffer und Terroine, JI de Physiol. et Path. 12, 884 und 905; 1910.

⁸ Zunz, Arch. int. Physiol. 11, 191; 1912.

⁹ Bayliss und Starling, JI. of Physiol. 30, 61; 1903.

¹⁰ Wohlgemuth, Biochem. Zs 39, 302; 1912.

¹¹ Hedin, H. 122, 307; 1922.

¹² Hedin, JI Biol. Chem. 54, 177; 1922.

¹³ Hedin, H. 125, 289; 1923.

¹⁴ O. Cohnheim und Pletnew, H. 69, 108; 1910.

¹⁵ Kobzarenko, Biochem. Zs 66, 344; 1914.

¹⁶ Bergell und Liepmann, Münch. med. Woch. 1905. 46.

¹⁷ Maeda, Biochem. Zs 143, 347; 1923.

¹⁸ Hedin und Masai, H. 100, 263; 1917.

¹⁹ Salkowski, Zs klin. Med. 17. Suppl. Bd. 79, 1891.

²⁰ Schwiening, Virch. Archiv 136, 444; 1896.

²¹ Biondi, Virch. Archiv 144, 373; 1896.

²² M. Jacoby, H. 30, 149; 1900.

²³ Dernby, Biochem. Zs 81, 109; 1917. — JI Biol. Chem. 35, 179; 1918.

²⁴ Bradley, Physiol. Reviews 2, 415; 1922. — JI Biol. Chem. 50, 14; 1922. — 52, 467; 1922.

²⁵ Rona und Mislowitzer, Biochem. Zs 140, 517; 1923. — 146, 26; 1924.

2. In Pflanzen.

Höhere Pflanzen. Die ersten Arbeiten, welche Peptonspaltung in pflanzliche Organen bewiesen, verdankt man L. Iwanow¹ (Endosperm-Embryo bei Phaseolus und Cucurbita), Vines² (Samen von Phaseolus, Vicia u. a.) und Dean³.

Weitere Literatur: Court⁴ (keimende Gerste); Adler⁵ (Malz); Deleanu⁶ (Ficus calica); Blood⁷ (Blätter von Brassica oleracea); Blagoveschenski und Bielozerski⁸ (Blätter).

Pilze und Bakterien: Hier sind die Arbeiten von Kutscher⁹ (Hefe) und von Pfaundler¹⁰ (Bakterien) ihres historischen Interesses wegen zu erwähnen. Grundlegende Versuche verdankt man Geret und Hahn¹¹. D. Court hat auch einige Versuche mit Schimmelpilzen ausgeführt.

Auf die neueren Arbeiten von Fodor und seinen Mitarbeitern¹² über die Wirkung von Hefemazeraten und von ungekeimten Erbsen kommen wir S. 435 zurück.

C. Darstellung und Reinigung peptonspaltender Enzympräparate.

Reindarstellungen eines „peptonspaltenden Enzyms“ können insofern nicht in Betracht kommen, als am gesamten Abbau Pepton → Aminosäuren wenigstens zwei Enzyme, eine Tryptase und eine Peptidase beteiligt sind. Es kann sich also nur darum handeln, dieses in einem Ausgangsmaterial vorliegende Gemisch von inaktiven Begleitstoffen zu befreien und anzureichern, so dass der Wirkungsgrad der Gewichtseinheit Trockensubstanz erhöht wird.

Es kann hier zunächst auf die S. 406 gemachten Angaben verwiesen werden. Besonders empfehlenswert ist wohl in den meisten Fällen Herstellung von Glycerinextrakten. Aus diesen lassen sich durch Fällen mit abs. Alkohol oft wirksame und haltbare Trockenpräparate gewinnen. Glycerinextrakte von Darm enthalten allerdings neben eigentlicher Peptidase nur wenig peptonspaltende Enzyme. Für die weitere Behandlung findet man Anhaltspunkte in den Arbeiten von Willstätter und Mitarbeitern und besonders in denen von Waldschmidt-Leitz.

¹ L. Iwanow, Beitr. Bot. Zbt. I 29, 144; 1913.

² Vines, Ann. of Bot 18—14; 1904—1910.

³ Dean, Bot. Gaz. 40, 121; 1905.

⁴ Dorothy Court, Proc. Roy. Soc. Edinburgh 34 (II), 113; 1914.

⁵ Adler, Zs ges. Brauw. 38, 129; 1915.

⁶ Deleanu, Bull. Acad. Roum. 9, 345; zit. nach Chem. Zbt. 1916, II 498.

⁷ Blood, JI Biol. Chem. 8, 215; 1910.

⁸ Blagoveschenski und Bielozerski, Biochem. JI 19, 355; 1925.

⁹ Kutscher, H. 33, 59; 1901.

¹⁰ Pfaundler, Zbt. Bakt. 31, 113, 1902.

¹¹ Geret und Martin Hahn, Chem. Ber. 31, 2335; 1898.

¹² Fodor, Bernfeld und Schönfeld, Koll. Zs 37, 32, 159; 1925. — Fodor und Schönfeld, Koll. Zs 39, 56, 240; 1926. — Fodor, Grundlagen der Dispersoidchemie.

Abderhalden und Fodor¹ stellen Hefesäfte dar durch das Mazerieren der getrockneten Hefe mit einer 0,6—0,7 proz. Kochsalzlösung. Mazerationen aus Erbsenmehl bereiten Fodor und Schönfeld. Enzymatische Rohpräparate für die Peptonspaltung findet man in der Literatur häufig beschrieben. Es muss von vornherein betont werden, dass man bei Verwendung solcher Präparate mit Peptonen (etwa Witte-Pepton) als Substrat auf genau definierte Verhältnisse verzichtet und dass sich diese Arbeitsweise also nur für besondere Fälle eignet.

Unter besonderen Darstellungsversuchen aus neuerer Zeit seien diejenigen von Fodor angeführt. Wenn hier Teile aus Fodors letzten Arbeiten eingehend referiert werden, so geschieht dies besonders, um auch einer Arbeitsrichtung und wissenschaftlichen Anschauungen², welche von den in diesem Buch vertretenen nicht unerheblich abweichen, Raum zu geben, so dass der Leser selbst ein Urteil über Art und Tendenz dieser Richtung gewinnt und evtl. auf die Originalarbeiten zurückzugehen veranlasst wird.

Ein Hinweis auf diese Arbeiten erscheint um so mehr gerechtfertigt, als dieselben für die kolloidchemische Richtung der Enzymforschung, wie sie u. a. besonders in den Arbeiten von Abderhalden und Fodor zum Ausdruck kommt, kennzeichnend sind. „Abderhalden und Fodor³ erbrachten“ — schreibt Fodor⁴ — „mehrfache Beweise dafür, dass wir das Wesen der ersteren (der Fermentwirkungen) hauptsächlich mit Hilfe von kolloidchemischen Betrachtungen und Vorstellungen erklären können.“

Fodor kennzeichnet neuerdings seine Auffassungen durch die Zusammenfassung seiner Ergebnisse⁵ folgendermassen:

1. Die Peptidase ist im Hefemazerat im wesentlichen an Proteine gebunden, unter Umständen ausserdem aber auch an noch unbekannte Stoffe X, die nach aller Wahrscheinlichkeit Abbauprodukte der Proteine darstellen.

2. Solange die Peptidase mit dem Protein — und zwar ist es das Hefephosphorprotein — verbunden ist, sind ihre wesentlichen Merkmale vom Zustand des Proteins abhängig. Als Zustandsvariationen kommen die Veränderungen des Dispersitätsgrades des Proteins von „nativen“ bis zum durch Säure ausgeflockten Koagulum in Betracht, ferner nach dem alkalischen Intervall der (H⁺)-Skala zu, die Verteilung und Solvatationsstufe, die bis zum merkbar hydratisierten Alkaliprotein reicht. Jedwede Variation im Kolloidzustande des Proteinträgers zieht eine Änderung der fermentativen Aktivität nach sich⁶.

3. Die Trennung der Peptidase von der Proteinmasse kann durch Kaolin erfolgen. Beide gehen mit Leichtigkeit in das Kaolinadsorbat über. Nach erfolgter totaler Adsorption des Proteins ergibt sich indessen ein Filtrat, das immer noch merkbar aktiv ist und also die

¹ Abderhalden und Fodor, Fermentf. 1, 532; 1916.

² Siehe Fodors Monographien: Das Fermentproblem, Dresden-Leipzig 1925. — Die Grundlagen der Dispersoidchemie, Dresden-Leipzig 1925.

³ Abderhalden und Fodor, Fermentf. 1, 533; 1616. — 2, 74, 151; 211. 225. 1919.

⁴ Fodor, Fermentf. 3, 193; 1920.

⁵ Fodor und R. Schönfeld, Koll. Zs 39, 240; 1926. — Siehe auch die vorangehenden Arbeiten: Fodor, Bernfeld und Schönfeld, Koll. Zs 37, 32, 159; 1925. — Fodor und Schönfeld, Koll. Zs 39, 56; 1926.

⁶ Fodor, Fermentf. 4, 209; 1920. — Koll. Zs 29, 28; 1921.

Peptidase in irgendeiner Form enthalten muss. Noch mehr Kaolin adsorbiert auch diesen restlichen Teil des Fermentes.

4. — — — — —

5. Die Anwendung einer relativ kleinen Kaolinmenge ergibt ein Adsorbat plus ein Filtrat, deren Aktivität zusammen mehr beträgt, als jene des ursprünglichen Mazerates. Bei gesteigerten Kaolinmengen sinkt diese Summe herab...

6. Es gelingt mit Hilfe von Glykokoll bei nahezu absoluter Neutralität die Peptidase aus diesen Adsorbaten herauszulösen (zu eluieren), wobei sich Eluate ergeben, die mit den empfindlichsten Eiweissfällungsmitteln keine sichtbaren Reaktionen mehr zeigen. Die Glykokoll-eluate sind durch Kaolin erneut adsorptionsfähig, liefern jedoch Adsorbate, die einer zweiten Elution nicht mehr zugänglich sind.

7. 8. — — — — —

9. Die Reaktionskinetik¹ der einzelnen aktiven Lösungen und Adsorbate ist verschieden. Im nativen Mazerat variiert die Zeitkurve je nach der (H⁺)-Konzentration und dem dadurch hervorgerufenen Kolloidzustand des Proteinträgers von der scheinbaren Reaktion 0. Ordnung bis zu parabolischen Formen beträchtlicher Krümmungsverschiedenheit. Dabei rufen grobe Zustandsformen vorzüglich die Reaktionen 0. Ordnung hervor.

Kaolinadsorbate ergeben ebenfalls Zeitkurven, deren Formen eine Reaktion 0. Ordnung verdolmetschen, indes die eiweissfreien Filtrate, die aus dem Mazerate nach erfolgter Adsorption entstehen, parabolisch gekrümmte Zeitkurven aufzuweisen pflegen.

Es ergibt sich daraus, dass die Zeitemsatzkurven nicht nur für das Ferment, sondern auch für den Träger des letzteren charakteristisch sind.

10. Um diesen Erscheinungen einen symbolischen Ausdruck zu verleihen, haben wir ein mehrgliedriges System postuliert, als dessen festes Glied die sogenannte „zymohaptische Substanz ZyS“ in allen Formen der Peptidase bzw. in allen ihren diversen Milieus wiederzufinden ist. Etwas Bestimmtes wurde über diesen Bestandteil dadurch nicht ausgesagt, sein Wesen blieb vielmehr durchaus hypothetisch.

Diese ZyS wird nunmehr im Milieu des Mazerates an das Protein gebunden gefunden, das hier die Rolle eines polydispersen Fermentträgers, eines Fermentkolloids übernimmt. Dieser Bindung gaben wir das Symbol Fk-ZyS. Ausserdem kommt in diesem Milieu noch die Form X-ZyS vor.

Fodor und seine Mitarbeiter benützen in ihren weiteren Ausführungen für den Träger der ZyS den allgemeinen Ausdruck zymophorer Stoff. „Diese beiden, der zymophore Stoff und die ZyS bilden zusammen, im allgemeinen wenigstens, das Fermentsystem oder Enzymsystem.“

„Es gibt — schreiben Fodor und Schönfeld l. c. S. 246 — keine Enzymmoleküle unseres Wissens, es gibt lediglich Enzymsysteme, die aber eine multiple Zusammensetzung besitzen. Die ZyS aktiviert eine zymophore Substanz, die jedoch ihrerseits austauschbar ist. Die Aktivierung ist eine wahre Aktivierung, da das Fermentsystem die physikalischen Eigenschaften der zymophoren Substanz annimmt. Solange diese polydispers ist, ist es auch das Fermentsystem.“

Wie ersichtlich machen die theoretischen Ansätze und Arbeitshypothesen von Fodor einen ganz anderen Gang der Reinigungs- und Trennungsarbeit erforderlich als den bisher eingeschlagenen. Wegen der Einzelheiten muss auf die Mitteilungen dieses Forschers in der Kolloid-Zeitschrift verwiesen werden. Zur Methode von Fodor und R. Schönfeld sei nur noch bemerkt, dass sie die Aktivitätsprüfung ihrer Präparate an Seidenpepton (Farbwerke Höchst) vornehmen.

¹ Fodor und Chasuva Epstein, Koll. Zs 37, 168; 1925.

D. Kinetische Messungen.

Dass mit Peptonen als Substrat keine streng gültigen Gesetzmässigkeiten ermittelt werden können, ist ohne weiteres klar. Aber auch an der Spaltung höherer Peptide durch ungereinigte bzw. enzymatisch nicht einheitliche Lösungen, wie es die Organ- oder Hefenextrakte sind, dürften in noch nicht näher untersuchtem und mit dem Versuchsmaterial variierendem Verhältnis mehrere Enzyme teilnehmen. Was also bisher an Zahlenmaterial über den zeitlichen Verlauf der Tri- und Polypeptidspaltungen und über den Einfluss wechselnder Substrat- und Enzymmengen angegeben wurde, hat nur den Charakter von orientierenden Beobachtungen, welche durch Versuche mit einheitlichen Enzymlösungen zu ergänzen sind. Immerhin können manche der älteren Messungen wertvolle Fingerzeige für die weitere Forschung geben.

Die ältesten Versuche über Tri- und Tetrapeptid-Spaltung sind wohl von Abderhalden und Koelker¹ beschrieben; einige ihrer Versuchsreihen seien angeführt.

Spaltung des d-Alanyl-glycyl-glycins mit Hefepresssaft.

Zeit in Minuten	a)	b)	c)
	1,66 ccm Stamm- lösung = $\frac{1}{1000}$ -mol. 1,0 ccm Hefepresssaft 3,84 ccm H ₂ O	3,32 ccm Stamm- lösung = $\frac{2}{1000}$ -mol. 1,0 ccm Hefepresssaft 2,18 ccm H ₂ O	4,98 ccm Stamm- lösung = $\frac{3}{1000}$ -mol. 1,0 ccm Hefepresssaft 0,52 ccm H ₂ O
	Abgelesener Winkel in Graden		
7	+ 0,75 (+ 0,82)	+ 1,41 (+ 1,48)	+ 2,24 (+ 2,31)
17	+ 0,50 (+ 0,57)	+ 1,13 (+ 1,20)	+ 1,99 (+ 2,06)
25	+ 0,43 (+ 0,50)	+ 0,93 (+ 1,00)	+ 1,63 (+ 1,70)
33	+ 0,33 (+ 0,40)	+ 0,73 (+ 0,80)	+ 1,42 (+ 1,49)
46	+ 0,22 (+ 0,29)	+ 0,57 (+ 0,64)	+ 1,17 (+ 1,24)
54	+ 0,14 (+ 0,21)	+ 0,37 (+ 0,44)	+ 0,89 (+ 0,96)
66	+ 0,07 (+ 0,14)	+ 0,25 (+ 0,32)	+ 0,66 (+ 0,73)
79	+ 0,12 (+ 0,19)	+ 0,15 (+ 0,22)	+ 0,51 (+ 0,58)
88	+ 0,07 (+ 0,14)	+ 0,08 (+ 0,15)	+ 0,33 (+ 0,40)
98	+ 0,07 (+ 0,14)	+ 0,05 (+ 0,12)	+ 0,23 (+ 0,30)
117	+ 0,06 (+ 0,13)	+ 0,02 (+ 0,09)	+ 0,18 (+ 0,25)
202	+ 0,03 (+ 0,10)	+ 0,00 (+ 0,07)	+ 0,06 (+ 0,13)
347	- 0,01 (+ 0,06)	- 0,01 (+ 0,06)	+ 0,05 (+ 0,12)

Spaltung von d-Alanyl-diglycyl-glycin mit Hefepresssaft.

+ 22,4°

d-Alanyl-glycyl-glycyl-glycin

+ 30°

+ 50° 0°

+ 2,40° 0° 0°

0° 0°

¹ Abderhalden und Koelker, H. 55, 416; 1908.

Zeit in Minuten	a)	b)	c)
	0,83 ccm Stamm- lösung = $\frac{1}{2000}$ -mol. 1,0 ccm Hefepresssaft 4,67 ccm Wasser	1,66 ccm Stamm- lösung = $\frac{1}{1000}$ -mol. 1,0 ccm Hefepresssaft 3,84 ccm Wasser	3,33 ccm Stamm- lösung = $\frac{2}{1000}$ -mol. 1,0 ccm Hefepresssaft 2,17 ccm Wasser
	Abgelesener Winkel in Graden		
8	+ 0,42 (+ 0,49)	+ 0,59 (+ 0,66)	+ 1,34 (+ 1,41)
17	+ 0,28 (+ 0,35)	+ 0,36 (+ 0,43)	+ 1,16 (+ 1,23)
23	+ 0,25 (+ 0,32)	+ 0,29 (+ 0,36)	+ 0,90 (+ 0,97)
31	+ 0,20 (+ 0,27)	+ 0,20 (+ 0,27)	+ 0,83 (+ 0,90)
46	+ 0,14 (+ 0,21)	+ 0,05 (+ 0,12)	+ 0,52 (+ 0,59)
56	+ 0,11 (+ 0,18)	+ 0,00 (+ 0,07)	+ 0,43 (+ 0,50)
66	+ 0,13 (+ 0,20)	- 0,01 (+ 0,06)	+ 0,26 (+ 0,33)
78	+ 0,11 (+ 0,18)	- 0,05 (+ 0,02)	+ 0,13 (+ 0,20)

Abderhalden und Koelker schlossen aus diesen Versuchen, dass in beiden Fällen das d-Alanin zuerst frei wurde.

Diese älteren Versuchsreihen wurden dann von der Abderhaldenschen Schule 1916 wieder aufgenommen und zwar in grösserem Umfange von Abderhalden und Fodor. Von den weiteren Arbeiten seien noch die von Abderhalden und Handovsky¹ erwähnt.

Sie fassen ihre Versuche folgendermassen zusammen:

1. Hefemazerationssaft, der imstande war, Glyzyl-l-Leuzin und Glyzyl-l-leuzyl-glyzil-l-leuzin zu spalten, war nicht imstande, Glyzyl-d-leuzyl-l-leuzin zu zerlegen. Das Tetrapeptid, das ausschliesslich aus in der Natur vorkommenden Aminosäuren aufgebaut war, wurde ohne Zweifel an allen drei Stellen gespalten und in seine 4 Bausteine zerlegt. Es ergibt sich aus der Tatsache, dass der Aminostickstoff um mehr als 200 Proz. vermehrt wurde.

2. Es konnte auch hier gezeigt werden, dass die Spaltung um so rascher verläuft, je grösser die Konzentration des Hefemazerationssaftes bei gleicher Peptidkonzentration ist.

3. Aus den Versuchen geht mit grösster Wahrscheinlichkeit hervor, dass auch das nicht spaltbare Tetrapeptid an Fermente gebunden wird. Es ist also nicht die Kombination Substrat und Ferment spezifisch, sondern die Spaltung als solche. Dieser Befund soll weiter verfolgt werden.

Es geht aus den späteren Untersuchungen nicht hervor, ob dieser Schluss bezüglich der nicht-spezifischen Kombination von Enzym und Substrat von der Abderhaldenschen Schule heute noch aufrecht erhalten wird. Der Verfasser vermag ihn auch aus den Zahlen von Handovsky nicht zu entnehmen; bei Kohlehydrat-Hydrolasen ist die Bindung Enzym-Substrat sicher spezifisch.

Kinetische Messungen an Wittepepton hat auch Hed in angestellt (Jl of Physiol 32; 1905).

E. Einfluss der Acidität auf die Polypeptid- und Peptonspaltung.

Da die Enzyme, wie sie in Enzymgemische vom Typus des Pankreatins Rhenania eingehen, eine Peptidase und ein tryptisches Enzym enthalten, welche beide ihr Wirksamkeitsoptimum bei einer Acidität nahe bei $\text{pH} = 8$ besitzen,

¹ Abderhalden und Handovsky, Fermentf. 4, 316; 1921.

so erhält man für die Peptonspaltung im ganzen ebenfalls ein Optimalgebiet bei dieser Acidität. (Michaelis und Davidsohn)¹.

Was die Abhängigkeit dieses Optimalgebietes vom Substrat betrifft, so wurde dieselbe, wie schon früher erwähnt, von Abderhalden und Fodor zunächst an Dipeptiden festgestellt, gilt nach ihren Messungen aber auch bei höheren Peptiden, wie der folgende Auszug aus einer von Abderhalden und Fodor² gegebenen Tabelle zeigt.

Polypeptid und Autor der Darstellung	pH	ccm n/50 NaOH nach			
		10'	20'	30'	40'
l-Leucyl-glycin [α] _D ²⁰ = + 85,5° E. Fischer, Berichte der Deutsch. Chem. Gesellschaft 39, 2893 (1906)	6,64	0,49	0,55	—	0,99
	7,24	—	0,73	—	1,18
	7,56	0,53	1,08	—	1,26
	7,86	0,47	0,84	—	1,01
l-Leucyl-glycyl-glycin [α] _D ²⁰ = + 45,90° E. Abderhalden und A. Fodor, ebenda 49, 561 (1916)	6,22	0,17	0,31	0,47	0,64
	6,66	0,25	0,51	0,68	0,73
	7,26	0,34	0,57	0,76	0,91
	7,80	0,35	0,57	0,69	0,79
	8,29	0,16	0,26	0,35	0,47
l-Leucyl-diglycyl-glycin [α] _D ²⁰ = + 45,8° E. Fischer, ebenda 39, 2893 (1906)	6,74	0,03	0,18	—	0,22
	7,29	0,19	0,32	—	0,45
	7,68	0,18	0,23	—	0,30
l-Leucyl-triglycyl-glycin [α] _D ²⁰ = + 28,14° E. Abderhalden und A. Fodor, loc. cit.	6,89	0,12	0,17	—	0,27
	7,28	0,12	0,18	0,24	0,34
	7,56	0,07	0,19	0,23	0,27
	8,09	0,03	0,08	0,15	—
	8,50	0,04	0,06	—	—
l-Leucyl-pentaglycyl-glycin [α] _D ²⁰ = + 5,94° E. Abderhalden und A. Fodor, loc. cit.	6,16	0,00	—	—	0,16
	6,64	0,23	0,28	—	0,31
	7,33	0,12	0,19	—	0,24

Hier sei auch noch eine der von Hedin und Masai³ mit Harn-Erepsin (H. E.) und Witte-Pepton als Substrat angestellten Versuchsreihen erwähnt. Eine 4⁰/₁₀₀ige Lösung von dem Pepton wurde zwei Tage dialysiert, mit HCl möglichst neutralisiert, filtriert und für die Bereitung folgender Probe verwendet:

1. 25 ccm H. E. + 50 ccm Pepton + 5 ccm H₂O.
2. 25 „ H. E. + 50 „ „ + 2 „ 0,1 n-NaOH + 3 ccm H₂O.
3. 25 „ H. E. + 50 „ „ + 3 „ 0,1 n-NaOH + 2 „ H₂O.
4. 25 „ H. E. + 50 „ „ + 4 „ 0,1 n-NaOH + 1 „ H₂O.
5. 25 „ H. E. + 50 „ „ + 5 „ 0,1 n-NaOH.
6. Kontrolle mit erhitztem H. E.

¹ Michaelis und Davidsohn, Biochem. Zs 36, 280; 1911.

² Abderhalden und Fodor, Fermentf. 1, 533 und zw. 585; 1916.

³ Hedin und Masai, H. 100, 263; 1917.

Nach 4 Tagen bei 37° 40 ccm Gerbsäure; 100 ccm Filtrat.

Nr. 1	48,75 ccm Säure; reduzierter Wert	12,15.
" 2	49,6 " " " "	13,0.
" 3	50,1 " " " "	13,5.
" 4	50,25 " " " "	13,65.
" 5	50,05 " " " "	13,45.
" 6	36,6 " " " "	

Hedin und Masai „finden die beste Wirkung bei schwach alkalischer Reaktion. Die Proben 2—5 reagierten deutlich alkalisch gegen Lackmus“.

F. Einfluss von Salzen und Nichtelektrolyten.

Die von Abderhalden und Fodor¹ untersuchten Salzwirkungen werden von diesen Forschern im kolloid-chemischen Sinne gedeutet.

Nichtelektrolyte. Antiseptische Stoffe, wie Toluol, Chloroform, Thymol, fand Fodor¹ ohne Einfluss.

Äthyl- und Methylalkohol sowie Glycerin hemmen (Blagowestschenski²).

G. Einfluss der Temperatur und Strahlung auf die enzymatische Peptonspaltung.

Nach Cohnheim³ wird das peptonspaltende Enzym der Darmschleimhaut bei 63° vollständig zerstört. Optimum der gleichen Wirkung nach Raubitschek⁴ bei 38°.

Einige weitere Angaben bei Kobzarenko⁵.

Radiumbromid hemmt die Peptonspaltung nach Bergell und Braunstein⁶. Emanation ohne Wirkung (Jansen⁷), ebenso Thorium X (Plesch⁸).

H. Versuche über Synthese von Polypeptiden und Peptonen.

Hinsichtlich der interessanten Studien von Henriques und Gjaldbaek über „Plasteinbildung“ sei teils auf das im I. Teil des Werkes Mitgeteilte hingewiesen, teils auf Kapitel 20.

Einer Mitteilung von Abderhalden⁹ sei folgendes entnommen: Abderhalden hat aus Leber, Niere, Schilddrüse und Lunge mittels Magensaft, Pankreassaft und Darmpresssaft Aminosäuregemische bereitet. Die Verdauung dauerte im ganzen 3 Monate. Jedes einzelne Produkt wurde genau analysiert. In keinem waren nachweisbare Mengen von Polypeptiden vorhanden. Die Biuretprobe fiel negativ aus.

¹ Abderhalden und Fodor, Fermentf. 4, 191; 1920.

² Blagowestschenski, Biochem. Zs 168, 6; 1926.

³ Cohnheim, H. 35, 134; 1902. — Siehe auch Euler, H. 51, 213; 1906.

⁴ Raubitschek, Zs f. exp. Pathol. u. Therap. 4, 674; 1907,

⁵ Kobzarenko, Biochem Zs 66, 344; 1914.

⁶ Bergell und Braunstein, Med. Klin. 1905, 310.

⁷ Jansen, Biochem. Zbt. 8, 759.

⁸ Plesch, Zs f. exp. Pathol. 12, 1; 1912.

⁹ Abderhalden, Fermentf. 1, 47; 1914.

Von jedem dieser Produkte wurde eine ca. 20%ige Lösung in physiologischer Kochsalzlösung bereitet. Verwendet wurden für jeden Versuch davon je 100 ccm. Es wurden dann für jedes Aminosäuregemisch folgende Versuchsreihen angesetzt:

1. 100 ccm der Lösung + 25 ccm physiologische Kochsalzlösung.
2. 100 ccm der Lösung + 25 ccm Organmacerationssaft. Das Gemisch wurde eine Stunde lang energisch gekocht.
3. 100 ccm der Lösung + 25 ccm Organmacerationssaft.

Alle Versuche wurden doppelt angesetzt und jedes Aminosäuregemisch mit Macerations- saft aus Leber, Niere, Schilddrüse und Lunge versetzt. Ferner wurden noch Versuche mit Magensaft, Pankreas- und Darmsaft versetzt. Endlich wurde in einigen Fällen Hefemacerations- saft angewandt.

Alle Proben mit einer 2 cm hohen Toluolschicht versehen, sehr gut verschlossen — mit Paraffin abgedichtet. Nach 4 Wochen im Brutschrank war das Ergebnis negativ. Nach 5 Monaten „zeigte sich, dass auffallenderweise die Biuretreaktion bei den Proben deutlich war, bei denen Organmacerationssaft und Aminosäuregemisch vom gleichen Organ stammten. Bei allen anderen Proben war sie entweder ganz negativ oder doch nur schwach angedeutet“.

„Beiden Proben, bei denen das Aminosäuregemisch und der Macerations- saft dem gleichen Organ entstammten, waren etwa 5–15% weniger Amino- stickstoff als in den anderen Proben nachweisbar.“

Nach Abderhalden „unterliegt es keinem Zweifel, dass eine Synthese stattgefunden hatte. Wenn es auch noch nicht gelungen ist, ein wohl definiertes Produkt abzutrennen, so genügen doch die erfolgten Feststellungen, um den Beweis als erbracht zu betrachten, dass aus Aminosäuren unter der Einwirkung von Fermenten Peptone und Eiweiss entstanden waren.“

Wenn über den Aufbau von Polypeptiden und Peptonen in vitro noch keine weiteren Angaben gemacht werden können, so darf abschliessend viel- leicht hervorgehoben werden, dass das Studium der Peptid-, Pepton- und Eiweiss-Synthesen in der lebenden Zelle und im lebenden Organ vom enzy- matischen Standpunkt aus wesentliche Fortschritte verspricht¹. Hier sind es die pflanzenphysiologischen und pflanzenchemischen Forschungen — es sei nur an die neueren Arbeiten von N. N. Iwanow² und von Prjanischnikow erinnert³ — welche über die Bedingungen, unter welchen die natürliche Synthese stattfindet und über die Reaktionen, welche mit der Peptidbildung aus Amino- säuren gekoppelt sind, Auskunft geben werden.

Auf die Angaben von Levene und Simms (Jl Biol. Chem. 62) über das Gleichgewicht Glycylglycin-Diketopiperazin sei auch hier hingewiesen.

¹ Siehe hierzu Euler und H. Fink, H. 157, 222; 1926.

² N. N. Iwanow, Biochem. Zs 162, 425; 1925.

³ Siehe auch H. Pringsheim, Biochem. Zs 3, 121; 1907 und 8, 119; 1908.

Methoden zur Bestimmung der Peptid- und Peptonspaltung.

Soll die Wirkung der Peptidase (oder der Peptidasen) untersucht werden, so sind Dipeptide als Substrate zu verwenden; gegenüber der älteren Methodik, welche oft mit Peptonen gearbeitet hat, sei hier nochmals besonders betont, dass höhere Polypeptide und Peptone, also der grösste Teil der in Peptonpräparaten vorliegenden Gemische von Peptidasen nicht oder nur langsam und unvollständig angegriffen wird.

Unter den zahlreichen Dipeptiden hat man am öftesten Glycyl-glycin als Substrat gewählt, das sich leicht darstellen lässt; es liegt aber kein Grund vor, andere Dipeptide auszuschliessen; über die relativen Spaltungsgeschwindigkeiten von Dipeptiden liegt eine Tabelle von Waldschmidt-Leitz (H. 151, 54) vor, die eine Umrechnung der enzymatischen Wirksamkeit von einem Dipeptid auf ein anderes gestatten würde.

Substrat	k · 10 ⁴
Alanyl-glycin	48
Leucyl-glycin	18
Glycyl-tyrosin	6.1
Glycyl-glycin (Mittel)	13
Leucyl-alanin	2,1

Die Methoden, welche die Verfolgung einer Dipeptidspaltung gestatten, sind teils physikalische, teils chemische.

A. Physikalische Methoden.

Wir stellen die hier in Betracht kommenden Methoden aus historischen Gründen voraus; sie sind zuerst zur Untersuchung der Dipeptidspaltung angewandt worden und haben gute Dienste getan, solange die unten beschriebenen chemischen Methoden noch nicht ausgearbeitet waren.

a) Polarimetrie. Mit dieser Methode hat Abderhalden, zuerst mit Koelker¹ und dann mit anderen Mitarbeitern, die Spaltung einer Reihe von Dipeptiden messend verfolgt. Als Substrate eignen sich solche, bei welchen die durch die Reaktion hervorgerufene Drehungsänderung gross ist, z. B. d-Alanyl-d-Alanin, das nach Fischer² dargestellt wird.

¹ Abderhalden und Koelker, H. 51, 294; 1907. — 54, 363; 1908.

² E. Fischer und Arnold Schulze, Chem. Ber. 40, 954; 1907.

Über die Ausführung der Messungen ist kaum etwas Besonderes zu bemerken. Man berücksichtige die Eigendrehung der enzymhaltigen Säfte.

Bei der Anwendung der Methode ist zu berücksichtigen, dass sich die spezifische Drehung der Aminosäuren durch Salzbildung, also mit der Acidität der Lösung, oft stark ändert.

b) Messung der Leitfähigkeit. Da bei der Spaltung der Dipeptide saure und basische Gruppen frei werden, so ändert sich die Ionenkonzentration der Lösung und somit ihre Leitfähigkeit. Die Methode hat den Vorteil, dass sie sich auch auf nicht drehende Dipeptide anwenden lässt; mit ihr hat Euler¹ die Glycylglycinspaltung gemessen.

Die ersten Leitfähigkeitsmessungen zur Verfolgung der Pepsinspaltung verdankt man Sjöqvist²; später haben Bayliss und V. Henri, und in neuerer Zeit besonders Northrop³ Leitfähigkeitsmethoden beim Studium der Eiweisspaltung benützt.

Verläuft die Enzymreaktion in Gegenwart von Puffersalzen, so macht die Berechnung der Versuchszahlen Schwierigkeiten und in diesen Fällen ist die Methode kaum zu empfehlen.

Der Brechungsindex ändert sich bei der hydrolytischen Spaltung der Gruppe $\cdot\text{CO}\cdot\text{NH}\cdot$ in der Regel nur wenig; auch das empfindliche Interferometer wird man mit Vorteil nur in besonderen Fällen anwenden⁴.

B. Chemische Methoden.

Ungleich wichtiger als die physikalischen Methoden sind die in den letzten Dezennien ausgearbeiteten chemischen Verfahren, welche gestatten, die bei der Dipeptidspaltung frei werdenden sauren und basischen Gruppen genau und leicht zu bestimmen.

Für die kinetischen Messungen an Peptidasen, also für die Bestimmung der Dipeptide und Aminosäuren kommen in erster Linie in Betracht:

1. Die Formoltitration nach Sørensen,
2. die alkalimetrische Titration in alkoholischer Lösung nach Willstätter und Waldschmidt-Leitz,
3. die Messung des Aminostickstoffs mit salpetriger Säure nach van Slyke, die auch als Mikromethode sehr gute Resultate liefert.

Vielfache Anwendung findet sowohl bei der Messung der Peptidasen als bei der Untersuchung der eigentlichen Proteasen die Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl, besonders in ihrer Ausführungsform als

¹ Euler, Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi 2, Nr. 31; 1906.

² Sjöqvist, Skand. Archiv f. Physiol. 5, 277; 1893.

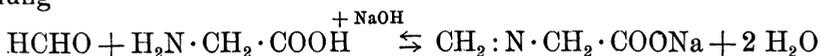
³ Northrop, Jl gen. Physiol. 4, 227; 1921/22.

⁴ Siehe Hirsch, Klin. Woch. 1925. Nr. 28 u. 29.

Mikroverfahren¹. Die Mikro-Kjeldahl-Methode, welche den Gesamtstickstoff der zu untersuchenden Lösung ergibt, wird dann geeignet mit einer der oben genannten Methoden kombiniert.

1. Formoltitration nach Sørensen und Jessen-Hansen².

Das Prinzip dieser Methode beruht bekanntlich darauf, dass nach der Gleichung



die freien Aminogruppen verbraucht werden, wodurch die Carboxylgruppen alkalimetrisch titriert werden können.

Wird die Spaltung eines Dipeptides verfolgt, indem man der Reaktionslösung von Zeit zu Zeit Proben entnimmt und diese mit Formol titriert, so entspricht einem neugebildeten titrierbaren Carboxyl eine äquivalente Menge Dipeptid.

Folgende Lösungen werden gebraucht:

1. 0,5 n-Lösung von NaOH,
2. 0,5 n-Lösung von HCl,
3. Lösung von 0,5 g Thymolphthalein in 1 l 93%igem Alkohol.
4. Formolmischung, frisch bereitet. Zu 50 ccm käuffl. Formol werden 25 ccm absoluten Alkohols, 5 ccm Thymolphthaleinlösung und 0,5 n-Natronlauge bis zum schwachgrünlichen oder bläulichen Farbton zugesetzt.

Um den Endpunkt der Titration richtig zu finden, stellt man sich eine Kontrolllösung her: Sie wird bereitet mit 20 ccm ausgekochten Wassers, zu welchem 15 ccm der Formolmischung und die halbe Menge Barytlauge wie bei den Analysen zugesetzt wird, worauf man zurücktitiert, bis die Lösung bläulich opalesziert. Dann werden 2 Tropfen Barytlauge zugegeben (deutlich blaue Farbe) und schliesslich noch 2 Tropfen derselben Lauge, wodurch die Lösung eine stark blaue Farbe erhält (pH = 9,7) (vgl. Sørensen, l. c. S. 54).

Ausführung.

Nach Sørensens Vorschrift titriert man die Analysen bis zu letzterer Farbenstärke, indem man zu 20 ccm der zu untersuchenden Lösung zuerst 15 ccm Formolmischung und darauf einen kleinen Überschuss von Barytlauge zusetzt. Man titriert mit Salzsäure zurück, bis die Farbe schwächer als die der Kontrolllösung ist, und gibt tropfenweise Lauge zu, bis die Farbe der Kontrolllösung genau erreicht ist.

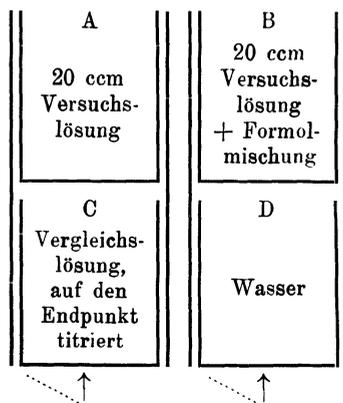
Hat man gefärbte Lösungen zu untersuchen, so bedient man sich — sofern

¹ Siehe z. B. die Untersuchungen über Autolyse von Rona und Mislowitzer, *Biochem. Zs* 140—146; 1923/24.

² Sørensen, *Biochem. Zs* 7, 43; 1907. — 25, 1; 1910. (Verwendung von Baryt oder Natronlauge.)

man nicht entfärbt¹ — am einfachsten des von Walpole² angegebenen Komparators.

Der Walpolesche Komparator besteht aus zwei Paaren von Glaszylindern mit ebenem Boden, die in einem Gestell paarweise übereinander angeordnet sind, wie aus folgender schematischen Darstellung ersichtlich wird:



Die Lösung B wird unmittelbar, nachdem die Formolmischung zu den 20 ccm Versuchslösung zugesetzt ist, im Komparator fertig titriert, bis in B der gleiche Farbenton erreicht ist wie in A.

Fehlerquellen bei der Formoltitration: Grössere Mengen von α -Prolin und Tyrosin stören, nicht aber Eiweisskörper.

Kleinere Mengen von Ammoniak stören nicht, grössere müssen vor der Formoltitration aus der Lösung durch Destillation mit Baryt unter vermindertem Druck entfernt werden.

Harnstoff und Guanidin sowie Arginin verhalten sich wie neutrale Stoffe.

Zum Verfolgen der Dipeptidspaltung, wo es sich um relative Bestimmungen in der gleichen Reaktionslösung handelt, sind zur Ausführung der Formoltitration keine weiteren Vorbereitungen nötig. Sollen dagegen die Mengen des formoltitrierbaren Stickstoffes absolut bestimmt werden, so muss evtl. anwesende Kohlensäure oder Phosphorsäure zuerst entfernt werden, was nach der von Sörensen gegebenen Vorschrift durch festes Baryumchlorid geschieht.

Clementi³ hat die Formoltitration als Mikromethode verwendet.

Sörensen hat seine Methode auch zur Verfolgung der enzymatischen Spaltung eigentlicher Proteine verwendet. — Zum Studium der Peptonspaltung haben sich z. B. Rona und Arnheim (Biochem. Zs 57, 84; 1913) dieser Methode bedient.

¹ Sörensen und Jessen-Hansen, Biochem. Zs 7, 407; 1907.

² Walpole, Biochem. JI 5, 212; 1910.

³ Clementi, Atti Acad. dei Lincei (5) 24, II; 1915 und 26, I; 1916. — 29, 327; 1920.

2. Alkalimetrische Titration der Aminosäuren und Peptide nach Willstätter und Waldschmidt-Leitz¹.

Die Methodik gründet sich darauf, dass das Salz $\text{NH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CO}_2\text{K}$ in wässriger Lösung eine Base ist (wie Methylamin), in alkoholischer Lösung aber, gleichwie Ammoniak, keine Hydroxyl-Ionen abgibt².

Ausführung der Bestimmung: 0,1320 g Glycylglycin = 0,001 Mol. löst man in 5,00 ccm 0,2 Mol. Phosphatpuffer von pH = 7,8 auf und bringt die Lösung durch Zugabe von 0,2 n-Natronlauge, deren Menge (gewöhnlich 1,80 ccm) in einem Vorversuch nach Zugabe des Enzyms ermittelt wird, auf das gewünschte pH von 7,8. Nun setzt man die zu prüfende Enzymlösung hinzu und belässt das auf 10,0 ccm mit Wasser verdünnte Reaktionsgemisch im Thermostaten von 30°. Nach Ablauf der Versuchsdauer unterbricht man die Enzymwirkung durch Eintragen in 130 ccm Methylalkohol und titriert das Verdauungsgemisch nach dem Zusatz von 1,0 ccm 0,5%igem Thymolphthalein + 20 ccm H_2O , also bei einem Methylalkoholgehalt von 85%, mit 0,2 n-90%iger alkoholischer Kalilauge bis zum Auftreten der ersten schwachblauen Indikatorfärbung; bei dieser Reaktion liegt das Phosphat der Pufferlösung als sekundäres Salz vor. Man hat zu jeder Bestimmung eine Leeranalyse auszuführen, deren Alkaliverbrauch von dem des Hauptversuches in Abrechnung zu bringen ist; der verbleibende Aciditätszuwachs entspricht dann der entstandenen Menge Glykokoll.

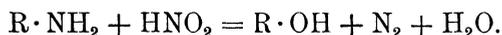
Störungen der Bestimmungen durch die Anwesenheit anorganischer Salze kommen nach Waldschmidt-Leitz nicht in Betracht.

Die Enzymmenge ist so zu wählen, dass die gemessene Reaktionskonstante zwischen 0,005 und 0,0005 liegt, und die Messung soll nicht über eine 60%ige Hydrolyse des Peptids ausgedehnt werden; für höhere Spaltungsgrade erweist sich nämlich der angewandte Puffer als unzureichend.

Bei der Anwendung dieser Methode auf Peptone ist noch folgendes zu berücksichtigen: Die Polypeptide verhalten sich schon in 40%igem Alkohol wie gewöhnliche Carbonsäuren. Für die Peptone und Proteide gilt gleichfalls, dass schon in sehr verdünntem Alkohol die Endwerte erreicht werden. Die höchsten Alkoholkonzentrationen erfordern die Aminosäuren der aliphatischen Reihe.

3. Bestimmung der Aminogruppen nach van Slyke.

Der Methode liegt bekanntlich die Reaktion zugrunde:



Der dabei gebildete Stickstoff wird volumetrisch gemessen.

¹ Willstätter und Waldschmidt-Leitz, Chem. Ber. 54, 2988; 1921. — Waldschmidt-Leitz und Schäffner, H. 151, 31 u. zw. 43; 1925.

² Zur Titration der Aminosäuren und Polypeptide siehe auch eine gründliche Untersuchung von Harris, Proc. Roy. Soc. B. 95, 440 u. 500; 1923.

Der zur Ausführung der Methode erforderliche Apparat ist in der Fig. 50 schematisch dargestellt. Der Apparat ist zu beiden Seiten des Dreiweghahnes *c* beweglich aufgehängt. Mit einer Triebwelle kann man abwechselnd sowohl das Desaminierungsgefäß *D* (in der Nähe des Hahnes *d*) als auch die Hempelsche Bürette schütteln. Die Triebwelle soll 300—500 Umdrehungen in der Minute machen und wird am besten durch einen kleinen Elektromotor in Gang gesetzt.

Ausführung.

a) Vertreibung der Luft durch Stickoxyd. — Man füllt sowohl die Kapillare *g* als die Kapillare *c* von *F* aus mit Wasser. Den Eisessig lässt man durch *a* bei offenem Hahn *c* in *D* einfließen, damit die Luft aus *D*

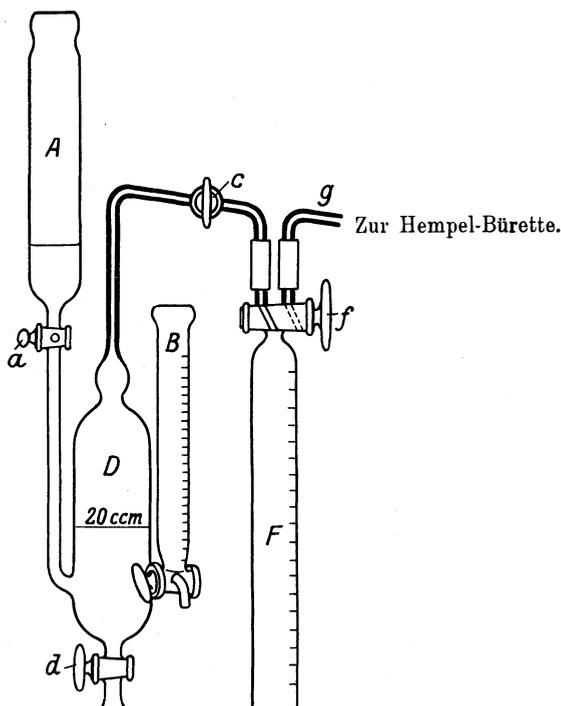


Fig. 50. Apparat nach van Slyke.

entweichen kann. Man füllt dann in *A* so viel Natriumnitritlösung (30 g Natriumnitrit in 100 ccm Wasser) ein, dass das Gefäß *D* vollständig und über den Hahn *a* hinaus gefüllt wird. Das in *D* entwickelte Gas wird dabei (bei *c*) eingeschlossen. Während *a* geöffnet, *c* geschlossen ist, schüttelt man nun *D* einige Sekunden lang; dabei sammelt sich sofort Stickoxyd an, das man dann bei *c* austreten lässt. Hierauf wird das Schütteln wiederholt. Die dabei neu entstandene Menge Stickoxyd, die ebenfalls durch *c* entweicht, vertreibt die letzten Spuren von Luft. Man schliesst *c* wieder und schüttelt so lange, bis nur noch 20 ccm Lösung in *D* zurückbleiben. Dieses Volumen ist durch eine

an D angebrachte Marke angezeigt. Dann schliesst man den Hahn a und stellt bei c und f die Verbindung zwischen D und F her.

b) Einwirkung der salpetrigen Säure auf die Aminosäuren. — Man misst nun etwa 10 ccm der zu analysierenden Lösung im Gefäss B genau ab. Die gewünschte Menge Lösung lässt man dann in das Gefäss D einfließen, das mit dem Motor in Verbindung steht, und beginnt das Schütteln. Die Reaktion ist meist in 5 Minuten beendet. Nur wenn native Eiweisskörper vorliegen, welche koagulieren, kann es erforderlich sein, länger zu schütteln. Schäumen der Lösung kann durch Octylalkohol gemässigt werden.

c) Absorption des Stickoxyds; Messen des Stickstoffes. — Nach Beendigung der Reaktion werden die Gase in D durch die von A aus eintretende Flüssigkeit nach F getrieben und das Gemisch von Stickstoff und Stickoxyd dann aus F in die Absorptionsbürette übergeführt. Nun wird die Bürette 1 Minute geschüttelt, wobei das Stickoxyd vollständig absorbiert wird. Der reine Stickstoff wird dann in F gemessen. Dabei ist der Hahn a geöffnet, damit während der Bildung von Stickoxyd in D Flüssigkeit aus D entweichen kann.

Prüfung auf Vollständigkeit der Reaktion.

Man treibt den Stickstoff aus F durch c aus; a wird geschlossen und D mit F verbunden. Das Gas, welches in D während der Absorption des Stickoxyds in der salpetrig-sauren Lösung entwickelt wurde, wird ausgeschüttelt, zuerst nach F und dann in die Hempelsche Bürette übergetrieben. Nach Absorption des Stickoxydes sollte das Gasvolumen jetzt nicht mehr als bei einem blinden Versuch, nämlich etwa 0,1 ccm, betragen.

Wenn das Gas vollständig aus D nach F übergetrieben worden ist, lässt man die Lösung der salpetrigen Säure aus D durch den geöffneten Hahn d durch ein Ausflussrohr abfließen. B wird dann ausgespült und getrocknet.

Bei Verwendung frisch bereiteter Nitritlösungen muss ein Blindversuch gemacht werden, bei welchem man statt der Lösung der Aminosäuren 10 ccm destilliertes Wasser verwendet.

Grössere Mengen Ammoniak stören die Bestimmung; kleinere Mengen sind zulässig. Für genauere Bestimmungen des Aminostickstoffes soll das Ammoniak vorher entfernt werden, was am besten durch Abdestillieren unter Zusatz von Kalk unter vermindertem Druck geschieht.

Bei der Bestimmung von Aminosäuren ist folgendes zu merken:

Wie theoretisch zu erwarten, reagiert der NH_2 -Stickstoff der Aminosäuren und Peptide, nicht aber der cyclische Stickstoff; demgemäss liefert Tryptophan die Hälfte, Histidin ein Drittel und Arginin ein Viertel des Stickstoffes.

Komplikationen treten bei den Glycyl-Polypeptiden ein, welche statt 1 Mol. 1,25 Mol. N abgeben.

Zur Berechnung der erhaltenen Volumina hat van Slyke¹ eine Tabelle angegeben, welche am Schlusse dieses Buches mitgeteilt ist.

Mikro-Methode.

Zu Serienbestimmungen ist die Verwendung des van Slykeschen Mikroapparates sehr zweckmässig. Es ist dann nur 1 ccm der zu untersuchenden Lösung erforderlich. Im Mikroapparat fasst die Gasbürette 3 ccm. Der Nullpunkt der Bürette ist statt am Boden des Hahnes in einem Kapillarrohr angebracht und befindet sich einige Millimeter unter dem Hahn.

Andere Methoden als die obigen haben zur Bestimmung des Aminosäuren-Stickstoffes für enzymatische Untersuchungen an Peptiden und Peptonen nicht die gleiche Bedeutung erlangt. Erwähnt sei diejenige von Folin (Jl Biol. Chem. 51, 377; 1922. Reaktion mit α -Naphthochinonmonosulfosäure), die in neuerer Zeit von mehreren Forschern² mit Erfolg angewandt wurde.

Früher wurde oft die Zunahme des durch gewisse Reagenzien nicht fällbaren Stickstoffs gemessen.

In diesem Zusammenhang sei auch auf die Enteiweissungs-Methode von Folin und Wu hingewiesen (Jl Biol. Chem. 38, 90; 1919. — 41, 367; 1920).

4. Mikro-Kjeldahl-Methode.

Das Prinzip des Verfahrens besteht darin, dass das nach der Behandlung der stickstoffhaltigen Lösung mit konz. Schwefelsäure + Katalysator gebildete Ammoniak nach dem Alkalisieren durch heissen Wasserdampf in die Vorlage übergeführt und dann jodometrisch bestimmt wird.

Ivar Bang³, dem man die Ausarbeitung dieser Mikromethode verdankt, hat als ihre besonderen Vorteile hervorgehoben:

1. Die Schnelligkeit der Destillation. 2. Die Reduktion der Fehlerquellen auf ein so geringes, praktisch nicht in Betracht kommendes Mass. 3. Die geringen Korrekturen für den Ammoniakgehalt der Lösung. 4. Nach dem jodometrischen Verfahren können äusserst geringe Mengen Stickstoff mit grosser Genauigkeit bestimmt werden, was auf acidimetrischem Wege nicht in demselben Grade möglich ist.

Ausführung.

Die Lösung des zu analysierenden Stoffes darf etwa 0,02—0,04 mg N enthalten. Man gibt dieselbe in einen etwa 50 ccm fassenden langhalsigen

¹ D. D. van Slyke, Jl Biol. Chem. 12, 275; 1912. — Eine Erweiterung auf die Gasdrucke 530—780 hat Sharp berechnet (Jl Biol. Chem. 60, 77; 1924).

² Ellinghaus, H. 145, 40; 1925. — Steudel, Ellinghaus und Gottschalk, H. 154, 21; 1926.

³ Siehe Bang, Mikromethoden zur Blutuntersuchung, 2. Aufl. 1920.

Kjeldahlkolben aus Jenaer Glas und setzt 1 ccm reine konz. Schwefelsäure und ausserdem einige Tropfen 10%iger Kupfersulfatlösung (oder Hg oder stickstofffreies Perhydrol) zu. Man erhitzt über kleiner offener Flamme oder auf dem Drahtnetz anfangs vorsichtig, bis alles Wasser verdampft ist, und dann etwas stärker, bis die Lösung farblos oder (bei Verwendung von Kupfer) rein grün erscheint. Dann lässt man erkalten, setzt etwa 10 ccm Wasser zu, schüttelt etwas um, bis sich eine evtl. gebildete Ausscheidung wieder gelöst hat.

Inzwischen wird der Destillationsapparat durch einen Wasserdampfstrom gereinigt. Dann wird ein kleines Spitzglas von etwa 20 ccm Inhalt mit der erforderlichen Menge (1—5 ccm) 0,005 n-Schwefelsäure unter das Abflussrohr des Apparates gestellt, so dass die Spitze des Rohres in die Schwefelsäure eintaucht.

Der Kjeldahlkolben wird, nachdem er vollständig erkaltet ist, mit dem Destillationsapparat verbunden und durch die bewegliche Stativplatte gestützt. Nun lässt man etwa 3 ccm Natronlauge durch den Trichter einlaufen und stellt die Verbindung zwischen dem Kjeldahlkolben und dem vorher erhitzten Kochkolben her, dessen Wasserinhalt angesäuert ist. (Siedesteine zum Vermeiden des Stossens.) In dem kleinen Silberkühler hat man schon vorher für reichliche Durchströmung mit kaltem Wasser gesorgt. Nun kann der Kochkolben zum lebhaften Sieden gebracht werden. Nach 2—4 Minuten langem Sieden senkt man das Spitzglas, spült das Ende des Abflussrohres mit der Spritzflasche ab und prüft mit Lackmuspapier ob noch Ammoniak übergeht. Ist dies nicht mehr der Fall, so spritzt man das Lackmuspapier in das Spritzglas ab, lässt noch 10 Tropfen übergehen, entfernt den Brenner und unterbricht die Verbindung zwischen Destillationsapparat und Kochkolben.

Das Destillat versetzt man mit 2 ccm 5%iger Jodkaliumlösung (und 2 Tropfen 4%iger Kaliumjodatlösung) und nach einigen Minuten mit 2—3 Tropfen der Stärkelösung. Schliesslich titriert man mit Thiosulfatlösung auf Entfärbung und ergänzt die Titration, wenn im Laufe von 5—10 Minuten ein Nachbläuen eintritt.

Die eigentlichen Proteasen.

Bearbeitet von

Karl Myrbäck.

Einleitung.

Die eigentlichen Proteasen, d. h. die eiweisspaltenden Enzyme sind in der Hinsicht von derselben Wirkung wie die Peptidasen, dass sie Peptidbindungen, — CO — NH —, lösen können. Von den Peptidasen unterscheiden sie sich indessen scharf durch die spezifisch angreifbaren Substrate. Wie nunmehr durch neuere Untersuchungen besonders von Willstätter und Waldschmidt-Leitz gezeigt worden ist, können die Peptidasen (die sog. ereptischen Enzyme) nur einfache Peptide spalten, und umgekehrt gilt, dass die eigentlichen Proteasen in keinem Falle diese einfachen Peptide hydrolysieren können. Die Proteasen greifen dagegen die natürlichen hochmolekularen Eiweissstoffe an, lösen und spalten sie. Dass dabei Aminostickstoff durch Lösung von Peptidbindungen freigemacht wird, ist eine bekannte Tatsache. Möglicherweise werden daneben auch andere Bindungen durch die Proteasen gelöst.

Die Behandlung der proteolytischen Enzyme wird natürlich in höchstem Grade durch die Mannigfaltigkeit und komplizierte Struktur der Substrate erschwert. Bei keinem der angreifbaren Substrate ist der Bau der Moleküle vollständig bekannt, und dazu kommen unter den Substraten die grössten Verschiedenheiten vor, wie z. B. ein Vergleich von Eieralbumin, Gelatine und Casein zeigt. Da indessen diese Substrate und eine Menge anderer von denselben Proteasen mehr oder weniger leicht gespalten werden, müssen wir annehmen, dass die meisten der Bindungen zwischen den verschiedenen Bausteinen ähnlich sind. Zu diesem Resultat ist man ja auch auf rein chemischem Wege schon viel früher gelangt. Die klassischen Untersuchungen Emil Fischers und anderer über die Struktur der Eiweissstoffe gipfelten in der Anschauung, dass die Eiweissstoffe im wesentlichen hochmolekulare Polypeptide sind. Indessen muss daran erinnert werden, dass Emil Fischer in seinem bekannten Vortrag (Chem. Ber. 39) schon 1906 schrieb: „Ich möchte aber hier darauf aufmerksam machen, dass die einfache Amidbildung nicht die einzige

Möglichkeit der Verknüpfung im Proteinmolekül ist. Im Gegenteil, ich halte es sogar für recht wahrscheinlich, dass einerseits Piperazinringe dort vorkommen, deren leichte Sprengung durch Alkali und Rückbildung aus den Dipeptiden oder ihrer Estern ich so häufig bei den künstlichen Produkten beobachtet habe, und dass andererseits die zahlreichen Hydroxyle der Oxyaminosäuren keineswegs indifferente Gruppen im Proteinmolekül sind.“ Der Hauptsache nach wäre aber, wie gesagt, das Eiweissmolekül eine offene Kette von peptidartig verknüpften Aminosäuren. Auf Grund dieser Anschauung ist es durchaus verständlich, dass dieselben Enzyme die Spaltung von mehreren scheinbar ganz verschiedenartigen Eiweissstoffen durchführen können. Dagegen ist es wohl schwerer zu verstehen, dass nur die Länge der Kette die absolute Spezifität der Proteasen und der Peptidasen bedingen sollte.

In der letzten Zeit ist indessen von verschiedenen Seiten die Auffassung über den Bau der Eiweisskörper wieder modifiziert worden. Man ist darüber einig, dass im grossen und ganzen das Eiweiss aus Aminosäuren aufgebaut ist. Über die Art der Verknüpfung dieser Bausteine bestehen dagegen verschiedene Meinungen. Während man früher annahm, dass alle Aminosäuren in derselben Weise durch einfache Peptidbindungen vereinigt seien, muss man wohl heute gestehen, dass sich die experimentellen Stützen für das Vorkommen anderer Bindungsarten gemehrt haben. Schon im 16. Kapitel wurde die Existenz von aus Aminosäuren aufgebauten Ringgebilden im Eiweiss erwähnt. So wurde in einer Reihe von Untersuchungen, neuerdings besonders von Abderhalden und Mitarbeitern, wieder an die von E. Fischer in Betracht gezogenen Diketopiperazinringe erinnert, und weiterhin wahrscheinlich gemacht, dass in einigen Eiweissstoffen Diketopiperazinringe vorkommen. Bei der Hydrolyse mit Säure oder Alkali werden diese Ringe aufgespalten und die Bausteine als Aminosäuren wiedergefunden. Durch Fermente hat man bisher keine Diketopiperazine spalten können. Da solche Ringe nur in einigen Eiweissen vorzukommen scheinen, ist es wohl denkbar, dass sie zu der grossen Resistenz einiger Eiweisskörper gegen Enzymangriff beitragen können. Da es auch in keinem Falle gelungen ist, die enzymatischen Hydrolyseprodukte eines Eiweisses in annähernd theoretischer Ausbeute zu isolieren, ist es wohl möglich, dass unter diesen in einigen Fällen Spaltstücke vorkommen, welche Diketopiperazinringe besitzen.

Dass also wenigstens in einigen Proteinen vereinzelte Anhydridkomplexe vorkommen, ist sicher, und das Verhalten dieser Körper bei der Säure-, Alkali- oder Enzymhydrolyse zu erklären, bietet keine Schwierigkeiten. Indessen sind in den letzten Jahren ganz neuartige Vermutungen über die Struktur der Eiweisskörper von verschiedenen Seiten ausgesprochen worden. In diesen Theorien sind die Ringgebilde in den Eiweissen die wesentlichen Struktureinheiten. Die Richtigkeit der alten Anschauung, dass die natür-

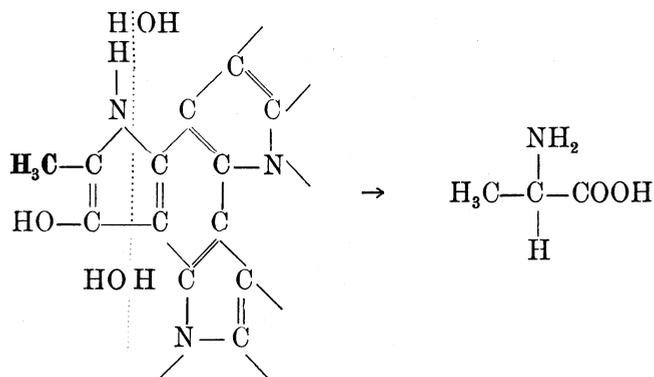
lichen Eiweissstoffe enorme, von peptidartig zusammenhängenden Aminosäuren gebildete Ketten haben, ist durch einige neue Untersuchungen in Frage gestellt worden. Wie Troensegaard und Schmidt¹ fanden, erhält man für die Molekulargewichte, wenn sie durch die Gefrierpunkterniedrigung in Phenol bestimmt sind, ganz kleine Werte². Für Gelatine und Phenol fanden sie das Molekulargewicht 350 und für Gliadin 440. Durch seine Untersuchungen über die Proteine wird Troensegaard zu einer neuen Auffassung von deren Konstitution geführt. Er hebt hervor, dass sich die klassische Auffassung ausschliesslich auf die Untersuchungen der hydrolytischen Spaltprodukte gründet, und zwar hat es besonders die Aufmerksamkeit erregt, dass die Aminosäuren, die man bei der Säurehydrolyse erhält, auch nach der enzymatischen Hydrolyse isoliert werden können. Die Ausbeuten an definierten Hydrolyseprodukten sind in beiden Fällen recht schlecht. Troensegaard meint, dass wenn man nicht mehr als etwa 30% des Stickstoffes bei Hydrolyse von Serumprotein in Gestalt von definierten Abbauprodukten hat fassen können, so ist dies nicht eine genügende Basis für die Behauptung, dass dieses Protein aus α -Aminosäuren aufgebaut ist. Weiter ist nach Troensegaard noch nicht genügend untersucht, ob die Proteasen, die nach der klassischen Auffassung ausschliesslich Peptidbindungen lösen sollen, nicht auch andere NH-CO-Konstellationen zu spalten vermögen. Man muss Troensegaard darin beistimmen, dass es zu einseitig ist, nur die verschiedenen Hydrolysen der Eiweissstoffe zu studieren. Auf Grund von Versuchen, bei denen ganz neue Spaltungsmethoden geprüft wurden, kam Troensegaard zu der Auffassung, dass die Proteine in der Hauptsache aus heterocyklischen Ringen aufgebaut sind, welche durch Säuren, Laugen und Proteasen leicht aufgespalten werden können, und zwar nimmt er an, dass der Sauerstoff der Proteine zum grössten Teil in den heterocyklischen Ringen als Hydroxyl vorkommt. Solcher Sauerstoff verursacht eine leichte Aufspaltung der Ringe.

Heterocyklische Ringe in Eiweiss hat man schon früher gefunden. Kossel fand Histidin, Fischer fand Prolin und Oxyprolin, Hopkins fand Tryptophan.

Mit dem Umstande, dass doch in der Mehrzahl der Fälle die aliphatischen Aminosäuren die Hauptmenge der Spaltprodukte ausmachen, kommt Troensegaard zurecht, indem er annimmt, dass in den Eiweissen zwischen den Pyrrolringen eine Bildung von anderen cyklischen oder heterocyklischen Ringen vorkommt. Als Beispiel führt er eine Formel an:

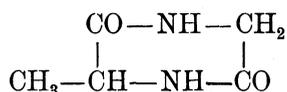
¹ Siehe Troensegaard, H. 112, 86; 1920; 127, 137; 1923; 130, 84; 1923; 133, 116; 1924.

² Die Deutung dieser Werte ist noch unsicher. Bemerkenswerte Beiträge zur Frage nach dem Molekulargewicht von Proteinen haben neuerdings E. J. Cohn und Mitarbeiter geliefert. Siehe Cohn, Hendry und Prentiss, JI Biol. Chem. 63, 721; 1925. — Cohn, JI Gen. Physiol. 4 u. 5. — Cohn und Conant, H. 159, 93; 1926. — Über Molekulargewichtsbestimmungen durch Zentrifugierung siehe The Svedberg, Zs f. physikal. Chem. 121, 65; 1926.



Aus diesem Ringsystem kann man sich, wie in der Figur angedeutet, Alanin abgespalten denken. „Ist der Komplex an der hervorgehobenen Methylgruppe durch eine aliphatische Kette mit einem anderen Komplex verbunden, so kann man sich hieraus die Bildung anderer homologer Aminosäuren denken. Ebenso kann man sich die Bildung von Tryptophan und der Aminosäuren Phenyl- und Oxyphenylalanin durch die Annahme ähnlicher hypothetischer Formeln erklären.“

Ungefähr gleichzeitig mit Troensegaard hat Herzog¹ gezeigt, dass man bei der Molekulargewichtsbestimmung von Seidenfibroin in Resorcin sehr niedrige Werte erhält. Weiter haben Herzog und Mitarbeiter durch Aufnahme von Röntgenspektrogrammen bei einigen Eiweissstoffen Gitterstrukturen festgestellt, die nicht gut mit der Annahme von Riesenmolekylen zu vereinen sind. So konnte Brill² im Falle von Seidenfibroin wahrscheinlich machen, dass das „Molekül“ aus periodisch wiederkehrenden Grundkörpern aufgebaut ist, und zwar sollen diese Grundkörper in diesem Falle aus Glycyl-d-Alaninanhydrid:



bestehen.

Diese Anschauung, dass die Eiweissstoffe aus mehr gleichartigen „Elementarkomplexen“ aufgebaut sind, tritt in der letzten Zeit in den Vordergrund. Die Vereinigung dieser Elementarkomplexe soll von sehr loser Art sein. Entweder nimmt man eine „rein physikalische Aggregation“ an, wobei der Mechanismus der Bindung durchaus unklar bleibt, oder man sucht die Ursache zu dem Zusammenhalten in Nebenvalenzen.

Wenn die Diketopiperazine, die nach Abderhalden tatsächlich in den Proteinen vorkommen, das typische Strukturelement derselben bilden, und also besonders im Seidenfibroin ausschliesslich die Struktur bedingen sollen, so kann es auffallen, dass Fischer und Abderhalden aus diesem Protein

¹ Herzog und Kobel, H. 134, 296; 1924.

² Brill, Liebigs Annalen, 434, 204, 1923. Siehe auch Herzog, Naturw. 11, 180; 1923.

ein Tetrapeptid isolieren konnten, in dem auch Tyrosin vorkam. Abderhalden nimmt nun, um dies und ähnliche Verhältnisse zu erklären, an, dass die Elementarkörper des Eiweisses Diketopiperazine sind, die mit Aminosäuren und vielleicht auch mit Peptiden verbunden sein können.

Gegen alles dies spricht indessen der Umstand, dass Diketopiperazine sowohl gegen Enzyme wie gegen die im Verdauungskanal vorkommenden Aciditäten vollkommen widerstandsfähig sind. Neue Versuche hierüber liegen von Waldschmidt-Leitz und Schöffner¹ vor. Ferner muss man gestehen, dass die bekannten Diketopiperazine in keinen Eigenschaften den Eiweissstoffen ähnlich sind. Auch zeigen sie keine Neigung zur Polymerisation. Hier sind nun die Untersuchungen von M. Bergmann von grösstem Interesse². Er konnte zuerst zeigen, dass man durch Umlagerung Piperazine erhalten kann, die in der Zusammensetzung usw. nicht von den gewöhnlichen abweichen, die aber eine ausgesprochene Neigung zur Polymerisation haben. Weiter konnte er zeigen, dass man durch gewisse Operationen aus diesen polymeren Körpern Tetrapeptide erhalten kann. Somit kann der Umstand, dass Tetrapeptide als Spaltprodukte der Proteine auftreten, nicht als ein Beweis gegen die Piperazinstruktur des Eiweisses angeführt werden. Die polymeren Produkte Bergmanns waren in manchen Hinsichten den natürlichen Proteinen ähnlich. Über das Verhalten dieser Theorie zu den Ergebnissen der Enzymforschung sagt Bergmann: „Auch der Einwand, dass Diketopiperazine gegen alle proteolytischen Fermente indifferent sind, wird entkräftet; denn es kommt nun ein Aufbau der Proteine aus Isomeren der echten Diketopiperazine in Frage, deren Abbau durchaus nicht über die echten Diketopiperazine zu gehen braucht. Man könnte sich sehr wohl vorstellen, dass auch bei der Fermentwirkung zunächst, ganz wie bei unseren Salzsäurehydrolysen, wenigstens teilweise ein Zerschlagen des übermolekularen Gebildes in Polypeptide erfolgt, die dann durch einen anderen Fermentkomplex zu den einzelnen Aminosäuren aufgeteilt werden. So würde das ganz verschiedene Verhalten unserer Kunstprodukte in saurer und alkalischer Lösung auch einen Fingerzeig für die verschiedene Wirkungsweise saurer und alkalischer proteolytischer Fermente abgeben.“

Wohl sind die bisher angewandten Methoden der Eiweisshydrolyse zu einseitig gerichtet gewesen; andererseits geht aber Troensegaard zu weit, wenn er schreibt³: „Wir schliessen, dass die alte Methode der Spaltung der Proteine mit starker, kochender Salzsäure und auch mit Fermenten zu gewaltsam ist, um die wirklichen Bausteine derselben zu

¹ Waldschmidt-Leitz und Schöffner, Ber. d. D. chem. Ges. 58, 1356; 1925.

² Max Bergmann, Lieb. Ann. 445, 1, 1925. — Siehe auch Naturwiss. 12, 1155; 1924. — Zur Literatur und zu den divergierenden Prioritätsansprüchen siehe ferner: Abderhalden, Naturwiss. 12, 716; 1924 u. H. 142, 311; 1925. — M. Bergmann, H. 144, 276; 1925. — R. O. Herzog, H. 141, 158; 1924.

³ Troensegaard, H. 133, 117; 1924.

liefern.“ Vielmehr geht aus den Untersuchungen der letzten Zeit über die Enzymproteolyse hervor, dass gerade die Proteasen für die allerfeinsten Strukturunterschiede empfindlich sind, und dass die Untersuchung der enzymatischen Eiweisspaltung durch einheitliche und hochwirksame Enzympräparate geeignet ist, zur Aufklärung der Konstitution der Proteine beizutragen.

Die Auffassung, dass die sogenannten Elementarkomplexe des Eiweisses nur durch physikalische Kräfte oder Nebenvalenze zusammengehalten werden, und dass also die Wirkung der Proteasen nur in einer Lösung der Aggregation bestehen sollte, wird von verschiedenen Seiten ausgesprochen. Damit ist indessen der Befund absolut unvereinbar, dass bei der Wirkung aller Proteasen, auch der enzymatisch einheitlichen Stoffe, welche einfache Peptide nicht spalten, eine Zunahme von Carboxyl- und Aminogruppen stattfindet¹. Eine Lösung von Bindungen — CO—NH — tritt also bei der enzymatischen Proteolyse unmittelbar ein, und zwar auch bei Enzymen, die nach der obengeschilderten Auffassung nur desaggregierend wirken sollen. Oppenheimer z. B. sieht in dem echten Pepsin ein Enzym, das nur die losen Bindungen zwischen den Elementarkörpern lösen soll. Wie sich diese Auffassung mit dem Umstand vereinbaren lässt, dass bei der Pepsinwirkung nach Henriquez und Gjaldbæk bis zu 39% vom Totalstickstoff als Aminostickstoff freigesetzt wird, ist schwer zu verstehen.

In seinen letzten Arbeiten hebt auch Willstätter² hervor, dass nach seinen Versuchen über die Enzymproteolyse die Messung des Carboxylzuwachses ein richtiges Mass für den wesentlichen Vorgang der Proteolyse ist. Seine Erfahrungen stehen mit der älteren Anschauung in Einklang, der zufolge der Abbau der Eiweisskörper im wesentlichen in der Auflösung von Peptidbindungen besteht, und sie sprechen gegen die seit kurzem in den Vordergrund getretene neue Annahme, wonach die Proteolyse in einem wesentlichen Teile ein Vorgang der Desaggregation polymerer Komplexe sein soll. Sicher ist, dass man durch Messung des Zuwachses an Carboxyl- bzw. Aminogruppen die proteolytische Wirkung der Enzyme exakt bestimmen kann. Da wir nunmehr, besonders durch die Arbeiten von Willstätter und seinen Mitarbeitern in der Lage sind, die Spaltung der Proteine durch einheitliche Enzyme zu studieren, können wir hoffen, durch Untersuchungen über die enzymatische Spaltung, deren Verlauf und Produkte, entscheidende Ergebnisse über die Konstitution des Eiweisses zu erhalten. Denn sicher ist, dass wir in den Enzymen Reagenzien haben, die gegen feine Konstitutionsunterschiede so empfindlich sind wie keine anderen.

Äusserst interessant ist in dieser Hinsicht eine neu erschienene Arbeit

¹ Siehe Waldschmidt-Leitz und Schöffner, H. 151, 31; 1926.

² Willstätter, Grassmann und Ambros, H. 152, 157; 1926. — Siehe auch Waldschmidt-Leitz und Harteneck, H. 149, 203; 1925.

von Waldschmidt-Leitz, Schöffner und Grassmann¹. Die Verfasser haben die enzymatische Spaltung des Clupeins, dessen Zusammensetzung dank Kossels Arbeiten recht gut bekannt ist, untersucht. Ihre Versuche mit den einheitlichen Enzymen Trypsin, Trypsin-Kinase und Darmerepsin, die in Kombinationen wechselnder Reihenfolge vorgenommen wurden, geben nicht nur ein anschauliches Bild von den Spezifitätsveränderungen der Enzyme, sondern auch Einblicke in die Konstitution der Substrates. Beispiel:

Reihenfolge der Enzyme	Zuwachs (ccm 0,2 n-Lauge)		Leistung	Leistungs- verhältnis
	COOH	NH ₂		
Trypsin	0,90	0,90	1,0	1 : 3 : 1
Trypsin-Kinase	2,67	2,36	3,0	
Darmerepsin	0,94	0,96	1,0	
	4,51	4,22	5,0	
Trypsin	0,92	0,92	1,0	1 : 1 : 1 : 2
Darmerepsin	0,93	0,98	1,0	
Trypsin-Kinase	0,89	0,83	1,0	
Darmerepsin	1,70	1,58	1,9	
	4,44	4,31	4,9	
Trypsin-Kinase	3,13	3,15	3,5	2 : 1
Darmerepsin	1,53	1,72	1,7	
	4,66	4,87	5,2	
Trypsin	0,92	0,96	1,0	
Hefeerepsin	0,08	0,12	—	

In dieser Tabelle kommt die bedeutsame Tatsache zum Ausdruck, dass die Wirkungen der einzelnen Enzyme nach einer jeweils bestimmten Leistung zum Stillstand kommt und dass die Leistungen, durch die Bildung chemisch fassbarer Gruppen gekennzeichnet, in einfachen ganzzahligen Verhältnissen zueinander stehen. Unter den enzymatisch löslichen Bindungen des Clupeinmoleküls kann man Gruppen unterscheiden, die sich mit Bruchteilen von Fünfteln und Dritteln des hydrolytischen Gesamtvorganges beteiligen. Dieselben Resultate wurden auch mit Papain und Papain-HCN erhalten. Wichtig ist, dass der Gesamtbetrag der freigesetzten sauren und basischen Gruppen identisch ist und mit dem von Rogozinski bei der Säurehydrolyse des Clupeins erhaltenen Wert übereinstimmt. Die ganze enzymatische Hydrolyse des Clupeins besteht in der Lösung von Peptidbindungen. Die Annahmen von Troensegaard über die sekundäre Bildung der Aminosäuren findet in diesen Versuchen im Fall von Clupein keine Stützen, ebensowenig die Theorien über den Aufbau der Proteine aus Diketopiperazinringen.

¹ Waldschmidt-Leitz, Schöffner und Grassmann, H. 156, 68; 1926. — Siehe auch Waldschmidt-Leitz und Simons, Über die enzymatische Hydrolyse des Caseins. H. 156, 99; 1926.

Einteilung der eigentlichen Proteasen.

Nachdem in den Kapiteln 16 und 17 diejenigen Enzymwirkungen behandelt worden sind, welche sich auf niedere Peptide und Peptone beziehen, bleibt nun für die folgende Darstellung eine Systematik zu wählen. Erst in allerletzter Zeit sind durch die Arbeiten der Schule Willstätters¹, besonders durch die Veröffentlichungen von Waldschmidt-Leitz, Tatsachen und Beziehungen bekannt geworden, welche geeignet sind, den Grund zu einer solchen Systematik zu legen. Zur endgültigen Ausarbeitung einer Einteilung der Proteasen reicht aber das bekannt gewordene Versuchsmaterial noch nicht hin, und wir haben deshalb in den zahlreichen Fällen, in denen über Zusammengehörigkeit von Enzymen noch keine ausreichenden experimentellen Unterlagen vorhanden waren, Abgrenzungen überhaupt nicht vorgenommen, um nicht der Forschung vorzugreifen.

Fest steht auch nach den neuesten Ergebnissen die alte Einteilung zwischen

1. Trypsin und
2. Pepsin.

Was die tryptischen Enzyme betrifft, so sprach vieles dafür, dieselben im Anschluss an Waldschmidt-Leitz² in zwei Gruppen zusammenzufassen und

die Enzyme vom Typus des nicht aktivierten Trypsins
dem System Trypsin + Co-Trypsin (Enterokinase)
gegenüberzustellen.

Wir halten es gegenwärtig sogar für wahrscheinlich, dass eine solche Einteilung sich in einiger Zeit als sehr zweckmässig erweisen wird. Gegenwärtig erschien es uns noch zu schwierig zu entscheiden, welche Enzymwirkungen der einen oder der anderen Gruppe angehören, und wir haben uns also damit begnügen müssen, die an verschiedenem Enzymmaterial gewonnenen Tatsachen nebeneinander zu ordnen.

¹ Siehe Willstätter, Deutsche Med. Woch. 1926, Nr. 1.

² Waldschmidt-Leitz und A. Harteneck, H. 149, 203 u. zw. 211; 1925.

18. Kapitel.

Tryptase.

Die eiweissverdauende Wirkung des von der Pankreasdrüse absonderten Saftes wurde schon vor etwa hundert Jahren entdeckt (Purkinje; Pappenheim, 1836). Eine wesentliche Förderung erfuhr das Studium des proteolytischen Pankreasenzymes, als die Gewinnung von Pankreassaft durch Fisteln möglich wurde.

Kühne¹ stellte fest, dass bei der Einwirkung des Pankreasferments, des Trypsins, auf Eiweiss nicht nur Peptone und Albumosen entstehen. Er konnte nämlich die Anwesenheit von Leucin und Tyrosin im Gemisch der Verdauungsprodukte zeigen. Diesen Versuchen, die seitdem in mannigfaltigen Richtungen bestätigt und erweitert worden sind, entstammt die bis in die letzte Zeit oft vertretene Ansicht, das Pankreastrypsin sei ein Enzym, das die vollständige Spaltung des Eiweisses in Aminosäuren bewerkstelligen kann. Die andere mögliche Annahme, dass das Pankreasenzym wenigstens zwei Enzyme, eine Protease und eine Peptidase, enthält, hat sich in der letzten Zeit durch die bedeutungsvollen Untersuchungen von Willstätter und von Waldschmidt-Leitz als die richtige erwiesen². Es gibt in dem Pankreas ein proteolytisches Enzym, das die genuinen Eiweissstoffe angreift und wie das Pepsin sie in niedrige Peptide überführt. Dieses Enzym kann wie das Pepsin unter keinen Umständen die Spaltung der Peptide beschleunigen, vielmehr greift hier das andere Enzym, die Peptidase ein, durch deren Wirkung die Hauptmenge der Aminosäuren entsteht. Bei der Eiweisspaltung durch erepsinfreies Trypsin entstehen auch kleine Mengen Aminosäuren, die indessen, nicht durch Peptidspaltung gebildet worden sind. Das erstgenannte Enzym die eigentliche Protease, nennen wir Tryptase. (Derselben Nomenklatur hat sich auch Oppenheimer angeschlossen.) Der alte Name Trypsin soll dagegen auch künftig das aus dem Pankreas erhaltene natürliche Enzymgemisch bezeichnen. Dieser Vorschlag ist den früher bei Invertin, Emulsin usw. gemachten³ analog.

Durch die Arbeiten von Waldschmidt-Leitz ist gezeigt worden, dass durch die Wirkung auch der, soweit wir wissen, enzymatisch einheitlichen Tryptase (peptidasenfrei) aus den Proteinen Aminosäuren entstehen. Diese stammen aber nicht aus Peptiden, sondern werden in einer noch nicht klargelegten Weise direkt abgespalten (vor allem durch kinaseaktivierte Tryptase).

¹ Kühne, Virchows Archiv 39, 130; 1867.

² Siehe z. B. Waldschmidt-Leitz und Harteneck, H. 149, 203; 1925.

³ Euler und Josephson, Chem. Ber. 56, 453; 1923.

Ist nun die Tryptase als einfaches Enzym von den übrigen im Pankreassaft vorkommenden abgegrenzt worden, und keine zuverlässigen Versuche sprechen dafür, dass daselbst mehrere proteolytische Enzyme zu finden sind, so erhebt sich die Frage, inwieweit die bei verschiedenen Tieren wirksamen Tryptasen identisch sind. Werden schon hier die Verhältnisse recht kompliziert, so werden sie dadurch nicht einfacher, dass die Pankreastryptase im frisch abgesonderten Zustande wenigstens gegenüber gewissen Substraten inaktiv ist und erst durch die Einwirkung eines Aktivators, der Enterokinase oder Co-Tryptase, wirksam wird. Noch merkwürdiger ist, wie die letzten Untersuchungen von Waldschmidt-Leitz gezeigt haben, dass der Aktivator in diesem Falle nicht nur wie gewöhnlich die Spaltungsgeschwindigkeit der durch das nichtaktivierte Enzym spaltbaren Substrate erhöht, sondern dass er auch den Wirkungsbereich des Enzyms in der Hinsicht erweitert, dass das aktivierte Enzym auch Substrate spaltet, die durch das nicht aktivierte Enzym gar nicht angegriffen werden. Durch die letzten Untersuchungen über die Pankreasenzyme wird ein ganz neues Licht über viele ältere Untersuchungen geworfen; wie wir nunmehr erkennen, ist die Mehrzahl der alten Arbeiten so angestellt, dass aus ihnen Schlüsse nur mit der grössten Vorsicht gezogen werden dürfen.

Die Tryptase ist also das eigentliche proteolytische Enzym, das im Pankreas der Tiere und vielleicht auch in anderen Organen vorkommt, und das seine optimale Wirkung in schwach alkalischer Lösung entfaltet. Obgleich auch hier wie beim Pepsin das pH-Optimum bei Anwendung verschiedener Substrate wohl nicht ganz dasselbe ist, so dürfte als ein Mittelwert $\text{pH} = 8$ angegeben werden können.

Bei allen Tieren, wo pankreatisches Gewebe, sei es in Form einer wahren Drüse sei es in anderen Geweben oder Organen eingelagert, vorkommt, ist die Tryptase beobachtet worden. Versuche, welche die Annahme von mehreren Tryptasen scheinbar stützen, sind entweder mit einer nicht einwandfreien Methodik ausgeführt oder es sind Enzympräparate zur Anwendung gekommen, die z. B. durch Gewebspepsinasen verunreinigt sind; pH war nicht gemessen worden, und die verschiedenen Wirkungen auf verschiedene Substrate sind nicht berücksichtigt, da sie nicht bekannt waren. So dürfte die von Pollak¹ angenommene Glutininase zu erklären sein², ebenso die sehr umstrittene Casease. Möglicherweise spielt hier die verschiedene Angreifbarkeit der Substrate durch mehr oder weniger aktiviertes Enzym mit.

A. Substrate.

Die aktivierte Tryptase greift die meisten Eiweissstoffe an, einige jedenfalls sehr langsam. Casein, Fibrin und Glutin werden besonders leicht ge-

¹ Pollak, Hofm. Beitr. 6, 95; 1905.

² Ehrenreich (1905). — Ascoli und Neppi, H. 56, 135; 1908.

spalten¹, Kollagen und Elastin² dagegen nur schwer. Besonders bemerkenswert ist die Resistenz des Serumalbumins, wenn sie auch nicht vollständig ist³. Über die Hemmung durch Serumalbumin bzw. über dessen antitryptische Wirkung hat Hedin mehrere Untersuchungen veröffentlicht. Die antitryptische Wirkung soll auf einer irreversibeln Verfestigung des Enzyms am Albumin beruhen. Dagegen wurde die Hemmung z. B. der Caseinverdauung durch zugesetzte grössere Mengen von Serumalbumin auf eine reversible „Ablenkung“ des Enzyms zurückgeführt. Diese Ablenkung tritt auch z. B. durch die Verdauungsprodukte ein⁴, und nach Hussey und Northrop ist die Hemmung unter Anwendung der gewöhnlichen Gleichgewichtsgleichungen berechenbar⁵. Siehe weiter unter „Antitrypsin“.

Da über die Konstitution der Proteine nur wenig Sicheres bekannt ist, kann man zur Zeit nicht näher angeben, welche Bindungen durch Trypsin gelöst werden. Interessant ist, dass eine sehr leichte Vorverdauung der von Trypsinase nur schwer angreifbaren Eiweissstoffe mit Pepsin eine sehr glatte Trypsinverdauung bedingt. Man dürfte der Auffassung beipflichten können, dass für die Aufspaltung des höher molekularen Eiweisses in die Aminosäuren alle drei in dem Verdauungskanal vorkommenden proteolytischen Enzyme absolut notwendig sind:

Das Pepsin teilt die Proteine leicht aber nicht weitgehend auf. Dabei entstehen recht hochmolekulare Produkte, die Peptone im weiteren Sinne.

Die Trypsinase spaltet leicht die Peptone, kann auch gewisse Eiweissstoffe angreifen und wenigstens teilweise spalten. Reaktionsprodukte sind Peptide und kleinere Mengen von Aminosäuren. Das Erepsin enthält im wesentlichen Peptidase, welche nur Peptide angreift und sie in Aminosäuren spaltet.

Die strenge Spezifität der Proteasen zwingt, wie Waldschmidt-Leitz hervorhebt, zu einer rein chemischen Auffassung der Struktur der Proteine. Die Wirkung der eigentlichen Proteasen kann nicht als eine „Desaggregation“ aufgefasst werden. Richtig bleibt natürlich, dass die durch diese Enzyme bedingte chemische Veränderung der Substrate von sehr leicht wahrnehmbaren physikalischen Veränderungen begleitet ist (Viscosität, Oberflächenspannung usw.).

Wie nun die neuen Auffassungen über die Struktur der Proteine, die auf präparativ-chemischem Wege gewonnen sind, mit den Ergebnissen der Enzymchemie in Übereinstimmung zu bringen sind, darüber kann vorläufig nur wenig gesagt werden. Die von Troensegaard, Abderhalden,

¹ Daraus die Angaben, dass Casein von Peptidasen spaltbar sein sollte. Vgl. Levene, H. 41, 8, 99; 1904.

² Abderhalden, H. 71, 315.

³ Oppenheimer und Aron, Hofm. Beitr. 4, 279; 1904. — Oppenheimer, ebenda 4, 259; 1904.

⁴ Hedin, H. 52. 412; 1907.

⁵ Hussey und Northrop, Jl of gen. Physiol. 5, 335; 1923.

Herzog, Bergmann u. a. begründeten Annahmen über das Vorkommen von Ringstrukturen (heterocyclischen Ringen, Diketopiperazinen) in Eiweiss kann möglicherweise die verschiedene Spaltbarkeit der Proteine insofern erklären, als nach allen einschlägigen Arbeiten diese Ringe von den proteolytischen Enzymen nicht gelöst werden. Da die Diketopiperazine nach Abderhalden eigentlich nur in gewissen Eiweissstoffen vorkommen sollen, kann dies die auffallende Resistenz dieser Stoffe, man denke z. B. an das Seidenfibroin, vielleicht erklären.

Augenblicklich liegt kein Anlass vor, die Proteasen wegen der Besonderheiten ihrer Substrate als in ihrer Wirkung von den anderen Enzymen wesensverschieden anzusehen. Vielmehr wird auch hier immer deutlicher, dass sich die Reaktionen nach den bekannten chemischen Gesetzen beschreiben lassen, und dass mit den bei anderen Enzymreaktionen schon geläufigen Begriffen und Konstanten (Affinitätskonstanten der Verbindungen Enzym-Substrat und Enzym-Reaktionsprodukten usw.) auch hier gearbeitet werden kann.

B. Ausgangsmaterial und dessen Behandlung (Reinigung).

Als Ausgangsmaterial für Reinigungsversuche im grösseren Masstabe kann der Fistelsaft nicht dienen, da dessen Gewinnung in grösseren Mengen mit allzu grossen Schwierigkeiten verbunden ist. Statt dessen wird nunmehr direkt von der Drüse ausgegangen. Aus frischer, von Fett usw. möglichst befreiter Drüsensubstanz kann die Extraktion sowohl mit Glycerin als mit Wasser geschehen. Die Glycerinlösungen sind sehr haltbar. Um ein gleichmässiges haltbares Ausgangsmaterial zu bekommen, das für die Reinigungsarbeiten dienen kann, wird am besten die Drüse getrocknet. Die Methode wird geeignet an einem Beispiel erläutert, das einer Arbeit von Willstätter und Waldschmidt-Leitz¹ entnommen ist:

16,5 kg frische Pankreasdrüsen vom Schwein werden von Fett und Bindegewebe befreit. Gewicht danach 14,9 kg. Nach gründlicher Zerkleinerung in der Fleischhackmaschine wird der Drüsenbrei in kleineren Portionen mit Aceton gut vermischt, in grosse Flaschen übergespült, so dass schliesslich die ganze Drüsenmasse mit 30 Liter Aceton versetzt worden ist. Nach 1–2 stündigem Stehen wird filtriert und die Masse nochmals mit 30 Liter Aceton in derselben Weise behandelt. Danach kommt eine Behandlung mit 15 Liter Aceton + 15 Liter Äther. Schliesslich wird das Drüsenpulver zweimal mit je 30 Liter Äther gewaschen. Das körnige Material wird dünn ausgebreitet auf Filtrierpapier an der Luft getrocknet. Das trockene Pulver wird mehrmals gemahlen und gesiebt. Erhalten wurde 1,65 kg staubfeines Pulver und 0,68 kg grobfaseriger Anteil. Beide sind wirksam.

Längeres Stehen des Drüsenpräparats mit Alkohol ist zu vermeiden.

¹ Willstätter und Waldschmidt-Leitz, H. 125, 132; 1925.

Die Drüse wie das Trockenpräparat enthält ausser Tryptase auch Lipase, Amylase, Peptidase, Kinase und deren Vorstufe. (Möglich ist, dass die Prokinase nichts anderes ist als Kinase + Hemmungskörper.) Die Aufgabe der Reinigungsarbeit ist nun erstens die Abtrennung der enzymatischen Verunreinigungen, zweitens die Steigerung des Reinheitsgrades des enzymatisch einheitlichen Trypsins.

1. Löslichkeit. Ältere Beobachtungen über Sorption.

Das unreine Trypsin ist in Wasser und Glycerin-Wassergemischen löslich. In reinem Glycerin soll es unlöslich sein. In 40 %igem Alkohol ist es nach Dastre¹ löslich. Höhere Alkoholkonzentrationen fällen, wobei je nach der Schnelligkeit der Operation mehr oder weniger Enzym zerstört wird.

Die Fällung mit Safranin² ist wohl hier wie bei Pepsin als eine Sorption zu betrachten.

Die alten Angaben, das Trypsin sei ein Nucleoproteid, sind so zu deuten, dass sich das Enzym in den Drüsenauszügen bzw. in dem Pankreassaft in einer Verbindung mit einem Nucleoproteid bzw. an einem solchen sorbiert vorfindet.

Die Anschauung von Herzfeld und Klinger³, das Trypsin sei nichts anderes als ein durch einen besonderen kolloiden Zustand ausgezeichnetes Gemisch von Eiweissabbauprodukten, entbehrt der soliden Grundlage.

Über Sorption des Trypsins an Filtrierpapier liegen Versuche von Tsou-Hia-Hsü⁴ vor.

Über die Sorption des Trypsins an Kohle und die Elution desselben hat Hedin⁵ Versuche angestellt. Er zeigte zuerst, dass Trypsin von Kohle sehr leicht aufgenommen wurde. Wurde die Kohle abfiltriert, so besass die Flüssigkeit keine tryptische Wirkung. Wurde indessen die Kohle in eine Caseinlösung gebracht, so trat Spaltung ein, was darauf beruhte, dass das Enzym teilweise ausgelöst wurde. Die Elution erfordert eine gewisse Zeit⁶ und der ausgelöste Teil wird mit steigender Temperatur vergrößert. Bei kleinen Caseinmengen steigt die Elutionsausbeute mit der Caseinmenge. Die anwesende Wassermenge ist dagegen ohne Einfluss auf im Ganzen ausgelöste Menge Enzym.

Die Enzymlösungen waren in Hedins Versuchen aus Pankreasdrüse durch Selbstverdauung und Filtrieren erhaltene Lösungen. Hervorgehoben muss also werden, dass die relativ schlechte Elutionsausbeute wie auch gewisse andere Phänomene auf verschiedener Sorption und Elution von Tryptase und Kinase beruhen können. Immerhin machen die Versuche,

¹ Dastre, Arch. de Phys. 1896, 120.

² Robertson, Jl Biol. Chem. 2, 342. — Marston, Transact. Roy. Soc. South Australia, XLVII, 400; 1923.

³ Herzfeld und Klinger, Bioch. Zs 88, 232 u. zw. 264; 1918.

⁴ Tsou-Hia-Hsü, Bioch. Zs 144, 303; 1924.

⁵ Hedin, Bioch. Jl I, 484; 1906. — Erg. d. Physiol. 9, 433; 1910.

⁶ Hedin, Bioch. Jl 2, 81; 1906.

wie Hedin hervorhebt, die Bindung des Trypsins an die Substrate wahrscheinlich. Die Versuche über die hemmende Wirkung des Serums („Antitrypsin“) werden wir weiter unten besprechen.

2. Reinigung der Tryptase durch Sorptionsmethoden.

a) Trennung von Lipase.

Die Pankreaslipase ist sehr leicht sorbierbar. Ihre sauren Eigenschaften sind bedeutend stärker als die der Pankreasamylase und die des Trypsins. Deswegen wird die Lipase von Tonerde leicht aufgenommen, während die Hauptmengen der Amylase und Tryptase in der Lösung bleiben¹. Sowohl Wasser- wie Glycerinextrakte können verarbeitet werden. Als wirksamstes Sorbens erwies sich das Aluminiumhydroxyd B. (Durch Fällung von starker Lösung von Aluminiumsulfat in der Hitze mit etwa 15% NH_3 ohne darauffolgendes Kochen hergestellt.)

Beispiel:

20 ccm Glycerinauszug aus Trockenpankreas wurde mit 1,2 ccm n Essigsäure angesäuert und mit

a) 10 ccm

b) 20 ccm Tonerdesuspension versetzt. Nach Zentrifugieren wurde die Lipase in der Restlösung bestimmt:

a) 0,1095 g Al_2O_3 adsorbierten 54% der Lipase

b) 0,2190 „ „ „ 94% „ „ .

In einem anderen Versuch wurde nach der Tonerdesorption in der Restlösung gefunden:

10% der Lipase

76% der Amylase

Beinahe alles Trypsin.

Die letzten Anteile der Lipase werden durch eine zweite Tonerdesorption entfernt. Dabei gehen nur sehr unbedeutende Mengen Amylase und Trypsin verloren, obgleich für die vollständige Sorption der Lipase verhältnismässig viel Tonerde erforderlich ist. Präparativ wichtig ist weiter, dass bei Verdünnen der Glycerinauszüge mit Wasser ein grosser Niederschlag auftritt, der viel Lipase aber nur wenig Amylase und Trypsin enthält.

b) Trennung von Pankreasamylase.

Die ersten Versuche verdanken wir Danilewsky². Er konnte aus einem lipasefreien künstlichen Pankreassaft durch Sorption an Kollodium das Trypsin frei von Amylase darstellen. Die besten Methoden sind auch hier von Willstätter und Waldschmidt-Leitz ausgearbeitet worden³. Da in den durch Tonerdesorption von Lipase befreiten Lösungen die Amylase und die Tryptase ein sehr ähnliches Verhalten bei weiteren Zusätzen von

¹ Willstätter und Waldschmidt-Leitz, H. 125, 132; 1923.

² Danilewsky, Virchow Arch. pathol. Anat. u. Physiol. 25, 279; 1862.

³ Willstätter, Waldschmidt-Leitz und Hesse, H. 126, 143; 1923.

Tonerde zeigten, wurde die Trennung mit Kaolin versucht. Hier wurde gefunden, dass zwei Kaolinadsorptionen nacheinander für die Trennung notwendig waren. Bei der ersten Sorption bedingen einige Begleitstoffe (die Co-Adsorbentien) eine recht geringe Sorption der Amylase und auch eine bei weitem nicht vollständige der Tryptase. Bei der zweiten dagegen wird, da die Coadsorbentien jetzt beseitigt sind, die Amylase nicht mehr gebunden; die Sorption der Tryptase dagegen wird leicht und vollständig durchgeführt.

Beispiel:

200 ccm einer lipasefreien Lösung wurden mit 2,3 ccm n Essigsäure angesäuert und mit 4,8 g elektrosmotisch gereinigtem Kaolin versetzt. Dabei wurden sorbiert

32% der Amylase
etwa 30% der Tryptase.

200 ccm derselben lipasefreien Lösung wurden nun zweimal mit je 4,8 g Kaolin sorbiert. In der Restlösung fand man etwa 75% der noch übrigen Amylase, aber keine Tryptase. Aus den Kaolinadsorbaten liess sich die Tryptase mit einer 0,6%igen Lösung von $2\frac{1}{2}$ basischem Ammonphosphat eluieren. Die Elution war amylasteifrei.

c) Trennung von Erepsin (Peptidase).

Gewissermassen haben schon Schäffer und Terroine eine Trennung dieser Enzyme erzielt¹. Sie fanden nämlich, dass nach dreitägiger Dialyse frischen Pankreassaftes gegen destilliertes Wasser keine Wirkung gegenüber Eieralbumin wahrzunehmen ist, und dass die Wirkung gegenüber Peptonen usw., die dem Erepsin zugeschrieben wurde, nun durch Entero-kinase keine Steigerung mehr erfährt. Abgesehen davon, dass diese „Trennung“ eigentlich nur eine Zerstörung der Tryptase sein sollte, so sind die Bestimmungsmethoden so wenig günstig, dass den Versuchen nach dem heutigen Stand unserer Kenntnisse kaum eine Beweiskraft zuerkannt werden kann. Die Trennung unter Erhaltung der Wirksamkeit beider Enzyme ist von Waldschmidt-Leitz durchgeführt; sie beruht auf der verschiedenen Sorbierbarkeit der Enzyme durch Tonerde bei pH = etwa 5.

Von der Sorbierbarkeit der Enzyme bei verschiedenen Aciditäten gibt folgende Tabelle ein Beispiel. 3,5 ccm Glycerinauszug aus getrockneter Drüse + 3,5 ccm Wasser + 1 ccm Tonerdesuspension (10,4 mg Al_2O_3) + Puffer (etwa 0,5 ccm)

pH bei der Sorption	% Tryptase sorb.	% Erepsin sorb.
7,0	52	28
5,6	0	50
4,7	0	55
3,8	0	53
$\frac{1}{100}$ Essigs.	13	55

¹ Schäffer und Terroine, *Jl de Physiol. et Pathol. gen.* 12, 905; 1910.

Durch eine dreimal vorgenommene Tonerdesorption gelang die vollständige Entfernung des Erepsins, während der grösste Teil der Tryptase in der Mutterlauge blieb. Die Elution des Erepsins erfolgte mit einer alkalischen glycerinhaltigen Phosphatlösung.

d) Trennung von der Enterokinase.

Waldschmidt-Leitz hat als endgültigen Beweis für die Aktivator-natur der Enterokinase ihre Trennung von der Tryptase durchführen können. Durch Sorption mit Tonerde aus saurer Lösung gelang es nicht nur einer spontan teilweise aktivierten Tryptase ihre Enterokinase zu nehmen, sondern sogar maximal durch Zusetzen von überschüssiger Enterokinase aktivierte Tryptase in aktivierbare Form überzuführen¹. Beispiel:

1,25 g Trockenpankreas in 40 ccm Wasser wurde mit 1,0 ccm Kinaselösung 40 Minuten bei 30° gehalten. Die Tryptase war dann maximal aktiviert. 22 ccm des Extraktes wurden mit 0,3 ccm n Essigsäure und 10 ccm Tonerdesuspension (0,150 g Al₂O₃) behandelt: 3,0 ccm der Restlösung hatte folgende Tryptasewirkung:

	ohne Enterokinase	0,25 ccm KOH	Aciditätszuwachs
mit 0,05 ccm	"	0,55 "	"

Von der Elution des Sorbates mit 20 ccm Ammonphosphatlösung bewirkten 2,0 ccm a) ohne Zusatz von Aktivator, b) nach 1/2-stündiger Einwirkung auf 0,062 g Trockenpankreas eine Aciditätszunahme entsprechend:

a) 0,38 ccm KOH	b) 0,92 ccm KOH
-----------------	-----------------

während die angewandte Menge Trockenpankreas für sich allein nur einen Zuwachs an Acidität von 0,09 ccm KOH ergab.

Die Enterokinase wird also unter den gegebenen Bedingungen stark sorbiert, die Tryptase nur wenig. Aus dem Sorbat kann die Enterokinase in aktiver Form eluiert werden.

Der Effekt der Flaviansäure-Fällung nach Cas. Funk (Zelle u. Gew. 13, 46; 1926) lässt sich erst nach Mitteilung quantitativer Wirksamkeitsangaben beurteilen.

C. Aktivierung der Tryptase.

Kühne² fand, dass in gewissen Fällen Pankreasinfus eine sehr schlechte Trypsinwirkung zeigt, die indessen durch Erwärmen und schwaches Ansäuern beträchtlich zunahm. Heidenhain³ wies später nach, dass dies allgemein in jedem Pankreasextrakt eintritt. Die Annahme von Kühne, dass die Säure aus einer unwirksamen Substanz das Trypsin abspalte, wurde von Heidenhain dahin modifiziert, dass die Säure die Verbindung des Trypsins mit dem Eiweiss der Drüse aufhebt. Der als Spontanaktivierung der Tryptase bezeichnete Vorgang, wo ein inaktives Drüsenmaterial durch Lagern aktiv wird, blieb lange unerklärt. Man nahm eine Wirkung der bei der Autolyse auftretenden Säure oder eine Wirkung von Kalksalzen oder von aktivatorhaltigen Bakterien an.

¹ Waldschmidt-Leitz, H. 132, 181; 1923/24 u. zw. S. 235.

² Kühne, Arch. Anat. Phys. 39, 130; 1867.

³ Heidenhain, Pflüg. Arch. 10, 557; 1875.

Die Entdeckung, dass die Aktivierung durch einen spezifischen Körper hervorgerufen wird, wurde von Pawlow und Schepowalnikow gemacht¹. Sie fanden, dass die Schleimhaut des Dünndarms einen Extrakt lieferte, der das inaktive Trypsin, das Trypsinogen, stark aktivierte. Haben Extrakte aus frischem Pankreas und noch sicherer Pankreasfistelsäfte keine Wirkung auf wahre Proteine, was aus einer Menge von zuverlässigen Arbeiten hervorgeht², so spalten sie nach Einwirkung von einem in dem Darmsaft befindlichen Stoff dieselben Proteine schnell. Der Aktivator wurde von Pawlow Enterokinase genannt. Neue Untersuchungen haben ergeben, dass die Aktivierung des Trypsins ausschliesslich durch Enterokinase geschieht und dass also auch die sog. Spontanaktivierung auf der Entstehung von Enterokinase in der Drüse beruht.

Wirkungsweise der Enterokinase (Co-Tryptase)³.

Über die Art der Wirkung der Enterokinase auf das Trypsin standen sich bis vor kurzem zwei prinzipiell verschiedene Auffassungen gegenüber. Die erste, die von Pawlow und Schepowalnikow zur Deutung der Verhältnisse herangezogen wurde, sagt, dass die Enterokinasewirkung eine Enzymwirkung ist, durch die aus dem Trypsinogen ein neuer Stoff, das Trypsin, gebildet wird. Bei der Proteolyse sollte die Enterokinase also keine Rolle spielen. Vertreten wurde diese Annahme besonders durch Arbeiten von Bayliss und Starling⁴. Sie behaupten, dass eine geringe Spur Enterokinase bei genügender Einwirkungsdauer sehr grosse Mengen von Trypsinogen in Trypsin verwandeln kann. Mellanby und Woolley fanden⁵, dass Temperaturerhöhung die Geschwindigkeit der Kinasewirkung erhöht, und kommen auch zum Schluss, dass die Wirkung enzymatischer Natur ist.

Die zweite Theorie über die Wirkung der Enterokinase stammt von Hamburger und Hekma⁶. Sie fanden in ihren Versuchen, dass eine bestimmte Menge Kinase nur eine begrenzte Menge Trypsinogen aktivieren kann, und schlossen, dass eine Verbindung von Trypsinogen und Kinase die wirksame Molekülart ist. Zu demselben Resultate kamen Dastre und Stassano⁷. Delezenne⁸ nahm zur Erklärung der Notwendigkeit der Kinase für die Trypsinwirkung an, dass die Kinase die Bindung Enzym-Substrat vermittelt. Dieser Schluss ist natürlich nicht notwendig und im Lichte neuerer Forschungen nicht einmal wahrscheinlich. Die Versuche von

¹ Schepowalnikow: *Malys Jahresber.* 29, 378; 1899.

² Delezenne et Frouin: *Soc. Biol.* 54, 691. — *C. r.* 134, 1526; 1902. — Glaessner *H.* 40, 465. — Welsch: *Arch. Internat. Phys.* 7, 247; 1909.

³ Vgl. hiezu I. Teil (3. Aufl.), S. 219 u. ff.

⁴ Bayliss und Starling, *Jl of Phys.* 30, 61; 1904.

⁵ Mellanby und Woolley, *Jl of Phys.* 45, 370; 1912/1913.

⁶ Hamburger und Hekma, *Jl de Physiol. et Pathol. gén.* 4, 805; 1902.

⁷ Dastre und Stassano, *Arch. Internat. de Physiol.* 1, 86; 1904.

⁸ Delezenne, *C. R. Soc. Biol.* 55, 171; 1903.

Hamburger und Hekma waren etwas dürftig und wurden als nicht beweiskräftig angesehen. Erst die moderne Methodik ermöglichte die Entscheidung, und zwar wurde durch die Untersuchungen von Willstätter und Waldschmidt-Leitz gezeigt, dass die Auffassung von Hamburger und Hekma die richtige ist: Trypsinogen und Kinase verbinden sich stöchiometrisch zu dem aktiven Enzym¹.

Wirkungsbereich der Tryptase.

Die schon lange bekannte Tatsache, dass bei der Verdauung der Eiweissstoffe durch natürliches Trypsin die Spaltung sehr weit geht, führte entweder zu der Annahme, dass eine Protease und eine Peptidase dabei wirksam seien², oder zu der, dass das Trypsin + Enterokinase die Proteine angreifen und die Spaltung bis zu den Aminosäuren treiben kann. In den letzten Stufen dieser komplizierten Reaktion sollte dann die Enterokinase entbehrlich sein.

Waldschmidt-Leitz, der sich in seinen ersten Arbeiten der letztgenannten Auffassung¹ anschloss, konnte indessen dann zeigen, dass die gewonnenen Resultate besser mit der Annahme zu vereinbaren sind, dass das Trypsin + Enterokinase die Proteine in Peptide spaltet und dass diese dann durch eine Peptidase weiter in die Aminosäuren zerlegt werden. Seine Untersuchungen gipfeln in dem Nachweis, dass sich Tryptase und Peptidase durch Sorptionsmethoden trennen lassen³. Die Isolierung der einzelnen Enzyme ermöglichte nun die Prüfung der Spezifität derselben und veranlasste genauere Untersuchungen über die Bedeutung der Enterokinase, Untersuchungen, die von Waldschmidt-Leitz ausgeführt wurden und sehr wertvolle Resultate erbracht haben.

Zuerst zeigte sich, dass das Pankreaserepsin alle untersuchten Dipeptide spaltete, dagegen wurden höhere Spaltprodukte (Pepton der Pepsinverdauung) nicht angegriffen, ebensowenig Protamine, Histone, Casein und andere Eiweissstoffe.

Die Tryptase, die nach der Abtrennung des Pankreaserepsins in inaktiver Form gewonnen wird und auch nicht mehr eine Selbstaktivierung erleidet, konnte nun ebenfalls näher untersucht werden. Es wurde nun die sehr interessante Entdeckung gemacht, dass die Tryptase in ihrer z. B. gegen Gelatine inaktiven Form noch gegen gewisse Substrate Aktivität besitzt, und zwar konnte gezeigt werden, dass dies nicht etwa auf Spuren von Kinase beruht. Wir führen nach Waldschmidt-Leitz⁴ folgende Tabelle an:

¹ Waldschmidt-Leitz, H. 132, 181; 1923/24.

² Siehe z. B. Schaeffer und Terroine. *Jl de Physiol. et Pathol. gén.* 12, 884 und 905; 1910.

³ Waldschmidt-Leitz und Harteneck, H. 149, 203; 1925.

⁴ Waldschmidt-Leitz und Harteneck, H. 149, 214; 1925.

Substrat	Enzym		
	Erepsin	Trypsin	Trypsin + Kinase
Alle untersuchten Dipeptide	+	—	—
Leucyl-glycyl-glycin	+	—	—
Pepton ex Albumine (Merck)	—	+	++
Clupein	—	+	++
Thymushiston	—	+	++
Casein	—	—	+
Fibrin	—	—	+
Gelatine	—	—	+
Gliadin	—	—	+
Zein	—	—	+

Aus den Untersuchungen über das Verhalten des enzymatisch einheitlichen Trypsins geht nun weiter hervor, dass dessen Wirkung mehr als eine rein „desaggregierende“ ist, wie wir auch später im Falle von der Pepsinverdauung sehen werden. Carboxyl- und Aminogruppen werden freigemacht, und nicht unbeträchtliche Mengen freier Aminosäuren entstehen, deren Ursprung noch nicht klar ist.

D. Wirksamkeit und Reinheitsgrad.

Wie schon oben erwähnt wurde, ist die Tryptase an sich unwirksam. Dies gilt wenigstens für die Spaltung der meisten und gewöhnlichsten der Substrate, z. B. der Gelatine, die von Willstätter und Mitarbeitern bei ihren Versuchen angewandt wurde. In Verbindung mit der Enterokinase (Co-Tryptase) ist sie wirksam. Wie später im Zusammenhang mit unseren übrigen Kenntnissen über die Enterokinase berichtet werden soll, fordert die Aktivierung der Tryptase durch diesen Stoff eine gewisse Zeit. Es fordert also die Bestimmung der Tryptase, sofern es auf eine Messung ihrer Menge ankommt, dass die Aktivierung maximal ist oder wenigstens eine bekannte Grösse hat. Dies ist natürlich bei allen Arbeiten über Vorkommen und Reinigung des Enzyms zu beachten.

Bei der Reinigungsarbeit ist nun weiter von Bedeutung, dass das schon aktivierte Enzym z. B. durch Sorptionsmittel wieder in unwirksames Enzym und Aktivator zerlegt werden kann. Die Reinigungsarbeit an Enzym und Aktivator kann also getrennt fortgeführt werden.

Die oben besprochenen Umstände sind, soweit möglich, in den neuen, in Willstätters Laboratorium ausgeführten Arbeiten über Tryptase berücksichtigt¹: Durch Einwirkung von überschüssiger Kinaselösung wird jede Trypsinprobe maximal aktiviert. Die stark hemmende Wirkung der Reaktionsprodukte wird durch eine sehr kurze Versuchsdauer möglichst ausgeschaltet.

¹ Siehe z. B. Willstätter und Persiel, Trypsinbestimmung, H. 142, 245; 1924/25.

Die wenigstens in rohen Tryptaselösungen, ähnlich wie in Pepsinlösungen, vorkommenden Hemmungskörper bewirken eine verhältnismässig kleinere Wirkung von grossen Enzymmengen, und deren Wirkung wird dadurch auf ein Minimum reduziert, dass teils nur kleine Enzymmengen zur Anwendung kommen, teils die Substratkonzentration recht hoch gewählt wird. Dadurch wird die Bildung der Verbindung Enzym-Substrat auf Kosten der Verbindung Enzym-Hemmungskörper begünstigt.

Etwa 10 mg Drüsenpulver oder eine entsprechende Enzymmenge wird während 30 Minuten der Wirkung von 0,3 ccm Kinaselösung bei 37° ausgesetzt (Kinaselösung = Auszug $\frac{1}{50}$ aus trockener Dünndarmschleimhaut). Danach wird mit Wasser auf 5,0 ccm aufgefüllt (37°). Dazu kommt eine auf 37° vorgewärmte Mischung von 2,0 ccm Puffer ($n \cdot \text{NH}_3 - \text{NH}_4 \text{Cl} 1 : 2$) und 5,0 ccm 15%ige Gelatinelösung. Nach einer Verdauungszeit von 20 Minuten bei 37° wird die Aciditätszunahme durch Titrieren in alkoholischer Lösung nach Willstätter und Waldschmidt-Leitz bestimmt.

Folgende Tabelle zeigt, inwieweit die Reaktionsgeschwindigkeit, d. h. die Aciditätszunahme, nach 20 Minuten der Enzymmenge proportional ist.

f = 0,25	0,50	0,50	1,00	1,00	2,00	3,00	4,00 ccm Enzymlösung
x = 0,33	0,58	0,58	1,19	1,15	2,04	2,67	2,91 ccm 0,2 n KOH
x/f = 1,3	1,2	1,2	1,2	1,15	1,0	(0,9)	(0,7)

Die Enzymlösung war hier frisch hergestellt. Folgende Tabelle gilt für einen gealterten Pankreasauszug, wo also mehr Hemmungskörper vorhanden sind.

f = 0,50	1,00	2,00	4,00 ccm Enzymlösung
x = (0,27)	0,40	0,73	1,35 ccm 0,2 n KOH
x/f = (0,54)	0,40	0,37	0,34

Die Kurve (Fig. 51), welche den Umsatz x als Funktion der Enzym-

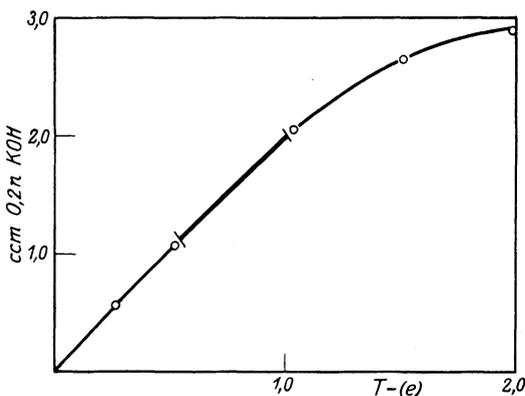


Fig. 51.

menge f darstellt, ist anfangs eine Gerade. Bei zu kleinen Enzymmengen (= Umsätzen) sind die Titrationsfehler relativ grösser, und für die Bestimmung der Tryptasemenge wird der in der Figur dick ausgezogene Teil der Kurve verwendet. (Die Figur muss in der Originalarbeit verkehrt gedruckt sein.)

Als vorläufige Einheit der Tryptasemenge T-(e) bezeichnen die Verfasser die tryptische Lei-

stung, die unter folgenden Bedingungen einen Aciditätszuwachs von 2,00 ccm 0,200 n KOH erzeugt:

Vorbehandlung der Enzymlösung mit 0,3 ccm Enterokinase-Auszug $1/50$ aus trockener Dünndarmschleimhaut.

Substrat : 0,75 g Gelatine.

Totalvolumen : 12,0 ccm, enthaltend 2,0 ccm Ammoniak-Salmiakmischung; 20 Min. bei 37°.

Eine T-(e) ist enthalten ungefähr in 10 mg Pankreaspulver oder in 0,2 ccm Glycerinauszug 1:16 oder 2,0 ccm Wasserauszug 1:100.

Zum Abbrechen der Reaktion wird in heissen absoluten Alkohol eingegossen und mit absolutem Alkohol nachgespült. Totalvolumen des Alkohols 110 ccm, zuvor mit einigen Tropfen KOH gegen Tymolphthalein (0,5 ccm 0,5%ige Lösung) neutralisiert. Man titriert nun schnell mit KOH zum schwach graublauen Farbton. Der Leerverbrauch an KOH der ungespaltenen Lösung wird abgezogen. Bei Eingiessen des Reaktionsgemisches in den Alkohol muss man darauf achten, dass keine Gelatineklumpen entstehen.

Beispiel:	2,00	5,00	10,00 mg Pankreaspräparat
	0,54	1,14	2,20 ccm 0,2 n KOH
	0,24	0,52	1,14 T-(e) aus der Kurve
	0,23	0,57	1,14 T-(e) berechnet.
	0,10	0,20	0,40 ccm Glycerinauszug
	1,14	2,15	2,52 ccm KOH
	0,52	1,10	1,38 T-(e) aus der Kurve
	0,55	1,10	2,20 T-(e) berechnet.

Einfluss des Dispersitätsgrades des Substrats.

Ogleich niemand bezweifeln dürfte, dass zwischen den Spaltungsgeschwindigkeiten eines festen Substrates und seiner Lösung Unterschiede bestehen, so muss man gestehen, dass auch hier der physikalische Zustand des Substrates eine sehr untergeordnete Rolle spielt. Zu erwähnen sind zuerst einige Versuche von Northrop¹, wo die Spaltung von Gelatinelösungen verschiedener Viscosität untersucht wurde. Eine 2%ige Gelatinelösung wurde bei 50° bereitet und auf 25° abgekühlt. Beim Aufbewahren bei dieser Temperatur steigt die Viscosität langsam. Nach verschiedenen Zeiten wurden Proben ausgenommen und die Viscosität und Trypsinspaltung untersucht (Leitfähigkeitsmessung und Formoltitration).

Viscosität (H ₂ O = 1)		Zeit zum Erreichen eines best. Umsatzes St × 10 ²	Formoltitration ccm n/50 Lauge
Versuchsbeginn	Nach der Verdauung		
2,45	1,4	70	2,90
2,90		68	2,90
3,8	1,55	70	2,90
3,9	1,5	69	2,95
4,6	1,6	64	2,95
		76	2,97
7,3	1,7	80	2,95
		80	2,90
11,3	1,8	62	—
		70	2,95

¹ Northrop, JI of. gen. Physiol 6, 337; 1924.

Eine Änderung der Viscosität von 2,45 auf 11,7 hat also auf die Spaltungsgeschwindigkeit durch Trypsin keinen Einfluss.

In Zusammenhang mit den öfters angeführten Theorien über die Bedeutung der Lauge (bzw. der Säure im Falle von Pepsin) für die Quellung

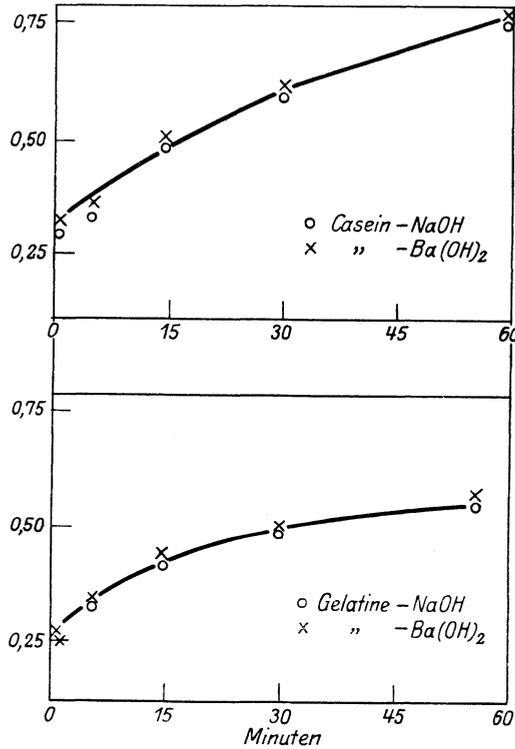


Fig. 52.

der Proteine, wodurch erst die Spaltung ermöglicht werden sollte, sind auch einige Versuche von Northrop erwähnenswert¹. Er untersuchte die Spaltung einiger Eiweisse unter Anwendung von NaOH und Ba(OH)₂. Der physikalische Zustand des Substrats ist in diesen Fällen ganz verschieden. Figur 52 gibt über die Resultate Aufschluss.

Die Spaltungsgeschwindigkeit ist identisch in beiden Fällen.

E. Kinetik.

1. Einfluss der Enzymmenge.

Dass wenigstens bei kleinen Enzymmengen und im Anfang der Spaltung eine direkte Proportionalität zwischen Enzymmenge und Reaktionsgeschwindigkeit herrscht, ist eine alte Erfahrung. Der Arbeit von Bayliss über die Kinetik der Trypsinspaltung entnehmen wir folgende Tabelle. Die T-Werte bedeuten Zeiten gleichen Umsatzes.

¹ Northrop, *Jl of. gen. Physiol* 6, 487; 1922.

Enzymmenge E.	T	TE	T	TE	T	TE	T	TE
4	4,5	18	13	52	54	216	266	1064
2,5	7,5	18,8	19	47,5	58	145	245	615
2	10	20	24	48	79	158	274	548
1	19	19	45	45	126	126	480	480
0,5	37	18,5	89	44,5	233	116	720	360

In Übereinstimmung mit dem Befund von Bayliss stehen Versuche von Hedin u. a., ebenso die schon früher zitierte Untersuchung von Willstätter und Persiel¹. Aus allen diesen Untersuchungen ist zu sehen, dass die Bestimmung der Tryptasemenge mit kleinen Enzymmengen ausgeführt werden muss. Dass bei grösseren Enzymmengen Proportionalität zwischen Enzymmenge und Reaktionsgeschwindigkeit nicht statthat, muss auch hier auf den in der unreinen Enzymlösung vorkommenden Hemmungskörpern beruhen. Diese stammen sicherlich aus den durch die Tryptase spaltbaren Eiweissstoffen, und die Erscheinung ist also in ihrem Wesen nur eine Hemmung durch die Reaktionsprodukte der enzymatischen Tätigkeit, wie sie wohl bei allen Enzymreaktionen vorkommt.

2. Hemmung durch die Reaktionsprodukte.

Nimmt man die moderne Anschauung über die Verbindung Enzym-Substrat an, und sieht man in dem Enzym einen Katalysator, der die Geschwindigkeit einer umkehrbaren Reaktion in beiden Richtungen vergrössert, so folgt daraus, dass das Enzym zu den primären Reaktionsprodukten eine Affinität haben muss. (Sekundäre spontan verlaufende Umwandlungen dieser Stoffe können natürlich Stoffe entstehen lassen, zu welchen das Enzym keine Affinität hat.) Besonders gut wird der Zusammenhang zwischen den Affinitäten des Enzyms zu Substrat und zu Reaktionsprodukten erklärt, wenn man annimmt, dass dieselben Affinitätsstellen wirksam sind, und dass also die Affinität des Enzyms zum Substrat durch zwei Bindungen vermittelt wird². Eingehendere Versuche mit den nach den Sorptionsmethoden gewonnenen einheitlichen Enzymlösungen sind noch nicht ausgeführt worden und eine Prüfung der „Zwei-affinitätstheorie“ an der Tryptase ist deshalb noch nicht möglich.

Dass die Spaltungskurve der tryptischen Verdauung von der logarithmischen Kurve abweicht, und dass diese Abweichung der hemmenden Wirkung gewisser Reaktionsprodukte zuzuschreiben ist, hat schon Bayliss klar ausgesprochen³.

¹ Willstätter und Persiel, H. 142, 245; 1924/25.

² Euler, Sv. Vet. Akad. Archiv f. Kemi, 9, Nr. 13; 1924.

³ Bayliss, Arch. des sciences biol. St. Petersburg 1904.

Nach Bayliss sollen auch gewisse Aminosäuren hemmen, was indessen durch neuere Untersuchungen nicht bestätigt wird.

Zu 6 ccm Caseinogen-Trypsingemisch (4% Caseinogen) wurden 4 ccm der 5%igen Lösung der zu untersuchenden Körper gegeben. Die Änderung der Leitfähigkeit in einer Stunde wurde gemessen.

Zugesetzter Stoff	Rel. Änderung der Leitfähigk.
Rohrzucker (Kontrolle)	100
Albumosen von Trypsinverdauung, durch $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gefällt. . .	52,5
Biuretgebende Produkte von einer Caseinogenverdauung . . .	53,2
Abiurete Produkte von derselben	44,4
Deuteroalbumose (Grübler)	87
Amphopepton (Grübler)	67
Leucin (Merck)	38,6
Glykokoll (Merck)	29,3

In einer zweiten Versuchsreihe untersuchte Bayliss die Einwirkung verschiedener Substratkonzentrationen auf die Hemmung. Die Versuche seien in folgender Tabelle zusammengefasst:

Zu den Versuchen mit Hemmung wurden 5 ccm einer 5%igen Lösung von Verdauungsprodukten gesetzt. Alle Versuche in demselben Volumen ausgeführt: Zeit 2,5 Stunden.

ccm 5% Caseinlösung	Rel. Änderung der Leitf.		% Hemmung
	ohne Hemmung	mit Hemmung	
4	100	36,2	63,8
2	69	27,7	60,0
1	39	15,6	60,1

Nach diesem Versuche wäre die Hemmung der Reaktionsprodukte von der Substratkonzentration unabhängig. Nun sind diese Versuche zwar ohne Rücksicht auf pH-Verschiebungen und ohne Messung des pH angestellt; sie sind aber in neuerer Zeit von Northrop wiederholt worden und zwar mit demselben Ergebnis¹. Dies führt Northrop zu der Annahme, dass nie grössere Mengen der Tryptase an das Substrat gebunden sind. Die weitere Annahme von Northrop, dass die Reaktionsgeschwindigkeit der Trypsinspaltung mehr von der Bildungsgeschwindigkeit einer Enzym-Gelatineverbindung abhängt, bringt möglicherweise einige Klarheit; weitere Versuche müssen die Entscheidung bringen. Hier sei jedoch angeführt, dass sowohl die Spaltprodukte, als das Substrat gegen Hitzezersetzung des Enzymes schützen, und dass dadurch eine Bindung des Enzymes an das Substrat wahrscheinlich ist. Auch kommt Bayliss zum Schluss, dass die Enzymwirkung am besten unter der Annahme einer Enzym-Substratverbindung zu verstehen ist².

Wie wir unten sehen werden, beruhen die Ergebnisse, die gegen die gewöhnliche Auffassung von Enzym-Substratverbindungen usw. zu sprechen

¹ Northrop, JI of. gen. Physiol. IV, 245; 1922.

² Bayliss, Arch. d. sc. Biol. XI. suppl. 261; 1904.

scheinen, wahrscheinlich darauf, dass die angewandten Bestimmungsmethoden untereinander nicht vergleichbar sind. Bestimmt man das unveränderte Substrat, so erhält man ganz andere Gesetzmässigkeiten, als wenn man z. B. die freigemachten Aminogruppen nach irgendeiner Methode ermittelt.

In seiner Arbeit über die Hemmung der Trypsinwirkung durch die Reaktionsprodukte teilt Northrop¹ auch einige andere bemerkenswerte Resultate mit: Er findet, dass die prozentische Hemmung in dem Aciditätsgebiete pH 6,3–10 von der Acidität unabhängig ist. Dies kann etwas eigentümlich erscheinen, da die hemmenden Reaktionsprodukte wohl als Peptide aufzufassen sind, und man hätte erwarten können, dass auch ihre Bindung an dem Enzym von der Acidität abhängen, ähnlich wie es Northrop selbst für die verschiedenen Substrate gefunden hat.

Die Hemmungskörper konnte Northrop weder durch Hydrolyse von Eiweiss mit Säure noch durch Hydrolyse mit Lauge erhalten. Sie sind dialysierbar.

Glykokoll, Alanin, Tryptophan, Leucin, Tyrosin, Arginin, Prolin, Histidin hemmen nicht, wenn pH-Verschiebungen nicht eintreten. Das Gleichgewicht Enzym-Hemmungskörper stellt sich momentan ein.

Dass nach zuverlässigen Versuchen die Hemmung wenigstens durch gewisse Hemmungskörper von der Substratkonzentration unabhängig ist, kann so gedeutet werden, dass Substrat und Hemmungskörper verschiedene „Affinitätsstellen“ des Enzymmoleküls angreifen.

Die Fragen über Hemmungen und über Verbindung Enzym-Substrat usw. sind natürlich wie in allen älteren Arbeiten von der Nichteinheitlichkeit des Enzymmaterials beeinflusst worden. Auch hier spielt die Bestimmungsmethode eine grosse Rolle.

Die wichtigsten Versuche Northrops, die gegen die Annahme einer Enzym-Substratverbindung sprechen konnten, sind die Versuche über die Verdauung eines Gemisches von Casein und Gelatine². Versuche über den Einfluss der Gelatinekonzentration auf die Verdauungsgeschwindigkeit ergaben, dass die Verdauungsgeschwindigkeit bei Konzentrationen höher als 2% konstant ist. Dies wäre so zu deuten, dass hier alles Trypsin an Gelatine gebunden ist. Es wurden nun zwei Parallelversuche ausgeführt. Substrat war in dem einen Versuche 2,5% Casein, in dem zweiten 2,5% Casein + 3% Gelatine. Die Verdauung des Caseins wurde durch Bestimmung des in Trichloressigsäure unlöslichen Restes gemessen (Gelatine ist darin löslich). Figur 53 zeigt das Resultat.

Die Versuche zeigen also, dass die Verdauung des Caseins von der Anwesenheit der Gelatine kaum abhängig ist, was nach Northrop damit nicht in Einklang sein kann, dass alles Trypsin bei der angewandten Gelatinemenge daran gebunden sein sollte. Wie wir unten sehen werden, beruhen diese

¹ Northrop, *Jl of gen. Physiol.* IV, 245; 1922.

² Northrop, *Jl of gen. Physiol.* VI, 239; 1924.

Resultate darauf, dass die angewandten Bestimmungsmethoden nur eine Reaktionsstufe betreffen, und, da die Resultate unberechtigt als Mass der ganzen Reaktion benutzt werden, zu einer fehlerhaften Auffassung geführt haben. Nun

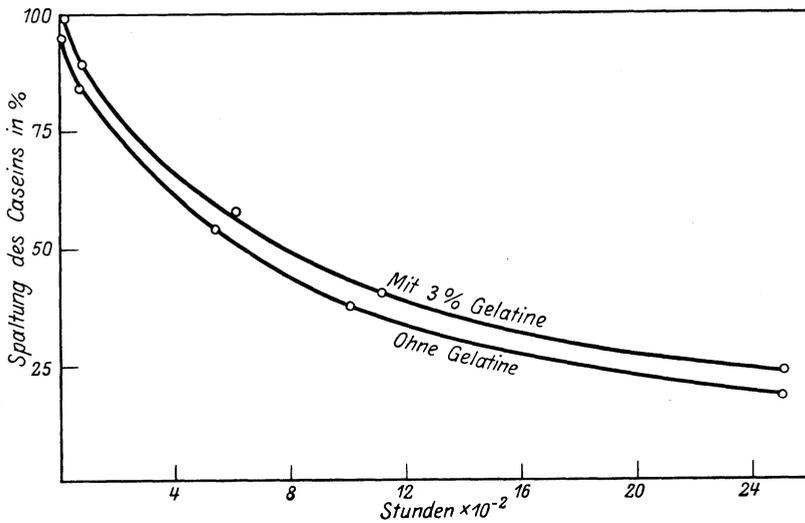


Fig. 53.

ist auch a priori nicht sicher, dass die Bindung an die beiden Substrate durch dieselbe Gruppen des Enzyms vermittelt wird. Eine Annahme, dass die Substrate unabhängig von einander gebunden werden, erklärt die obigen Versuche, macht aber das Problem der proteolytischen Enzyme noch komplizierter. Ähnliche Versuche haben schon früher Henri und Larguier des Banceis ausgeführt.

3. Zeitlicher Verlauf der Tryptasespaltung.

Der zeitliche Verlauf wird durch die Hemmung der Reaktionsprodukte bedingt. Da diese nicht einmal bekannt sind, noch weniger ihre Wirkung klar ist, kann zur Zeit keine theoretische Behandlung des Reaktionsverlaufes vorgenommen werden. So viel scheint doch aus den vorliegenden Versuchen hervorzugehen, dass die Hemmung nach der allgemeinen Gleichung

$$\frac{[\text{Enzym}] \times [\text{hemmender Stoff}]}{[\text{Verb. Enzym-Hemmungsstoff}]} = K$$

berechenbar ist.

Hier sei eine Versuchsreihe von Northrop angeführt: 2% Gelatine-lösung mit verschiedenen Mengen einer eingedampften Lösung von tryptischen Verdauungsprodukten.

ccm hemmender Lösung	Reaktionsgeschwindigkeit	ccm hemmender Lösung	Reaktionsgeschwindigkeit
—	2,3	0,50	1,10
0,125	1,9	1,0	0,65
0,25	1,56	2,0	0,33

Die in der Fig. 54 gezeichnete Kurve hat die Form einer Dissoziationskurve.

Alte Versuche über den Reaktionsverlauf finden sich in grosser Menge. Im allgemeinen sind sie nur von geringem Wert. Öfters wurden die Versuche angestellt, um die Übereinstimmung mit irgendeiner Formel (der Schütz-schen Regel u. dgl.) zu finden. Bedenkt man nun, dass ähnliche Formeln ohne die geringste innere Bedeutung sind, so ist leicht zu ersehen, dass die Versuche wenig zur Klarlegung des Reaktionsverlaufes beigetragen haben.

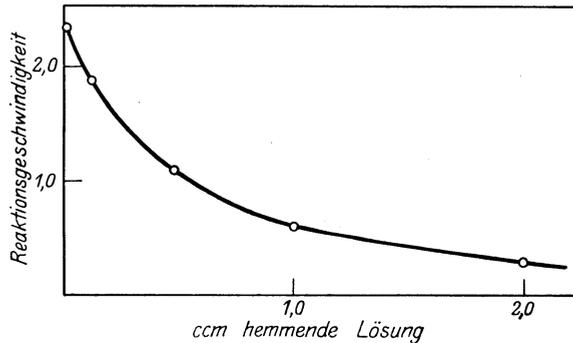


Fig. 54.

Von den ältesten Versuchen sind zu erwähnen die von Henri und Languier des Bancels¹, die hier die Leitfähigkeitsmessung als Bestimmungsmethode angewendet haben. Sie fanden, dass sich die Anfangsgeschwindigkeit nach der Formel für monomolekulare Reaktion berechnen lässt. Dann werden die Konstanten kleiner. Nach Arrhenius soll sich ein relativ guter Anschluss an die Schütz-sche Regel bei einer Berechnung der Zahlen von Henri und Languier des Bancels ergeben². Da indessen keinerlei Anhaltspunkte darüber vorliegen, ob die Acidität konstant gehalten war, können diese Resultate über die Kinetik der Trypsawirkung wenig aussagen.

Stark fallende Reaktionskonstanten erster Ordnung fand auch Bayliss³: 4% Lösung von Casein. Schwach alkalische Reaktion durch verdünntes Ammoniak hergestellt. Messung der Leitfähigkeit. Angenommen wird, dass die Änderung der Leitfähigkeit der Änderung in der Substratkonzentration während der Spaltung proportional ist, was nicht ganz unbedenklich erscheint. Aus einem Versuche wurden nach der Formel

$$k = \frac{1}{t_2 - t_1} \log. \text{ nat.} \left(\frac{C_1}{C_2} \right)$$

die Konstanten k berechnet. (C = die zur Zeit t ungespaltete Substratmenge.)

Während der ersten	10 Minuten	$k = 0,0079$
„ „ zweiten	10 „	0,0046
„ „ dritten	10 „	0,0032
„ „ vierten	10 „	0,0022
„ „ fünften	10 „	0,0016
„ „ siebenten	10 „	0,0009
„ „ neunten	10 „	0,00065 usw.

Rechnet man die Konstanten nach der gewöhnlichen monomolekularen Formel aus, so erhält man natürlich Werte, die noch stärker abfallen. Arrhenius hat die Werte von Bayliss nach der Formel

¹ Henri und Languier des Bancels, Soc. Biol. 55, 787 und 866; 1903.

² Arrhenius, Immunochemie, Leipzig 1907.

³ Bayliss, Arch. des sciences biol. St. Petersburg 1904. S. 4 ff.

$$k = \frac{a}{t} \log \frac{a}{x} - \frac{a-x}{t} \quad \begin{array}{l} x = \text{beobachtete Leitfähigkeit} \\ a = \text{Entwert der } \end{array}$$

berechnet und eine gute Übereinstimmung gefunden¹.

Auch diese Versuche sind durch die auftretenden Aciditätsänderungen entstellt.

Da die Reaktionen, welche die Hemmung der Trypsinwirkung bedingen, noch nicht genau bekannt sind, so sind natürlich alle Formeln, die der Wirkung von den Hemmungskörpern Rechnung tragen sollen, eigentlich noch recht wertlos, obgleich es nicht bezweifelt werden soll, dass die Hemmungen dem Gesetz der Massenwirkung folgen.

Unter Verhältnissen, bei denen die Wirkung der Hemmungskörper möglichst ausgeschaltet wurde, fand Northrop² eine gute Konstanz der nach der monomolekularen Formel berechneten Koeffizienten. Teils wurde bei 0° gearbeitet, um eine Enzymzerstörung zu vermeiden, teils wurde die Menge nicht zersetzten Substrates bestimmt, um den Verlauf der ersten Reaktionsstufe kennenzulernen. In diesem Falle wurde, wie die folgenden Tabellen zeigen, eine gute Übereinstimmung mit der Formel

$$\frac{dx}{dt} = k \cdot (A - x)$$

gefunden.

A = die ursprüngliche Substratkonzentration,
x = die zur Zeit verschwundene Substratmenge.

Zeit in Stunden	Substratmenge 1% Casein	$k = \frac{1}{t} \log \frac{A}{A-x}$
0,00	(100)	—
0,01	99,5	—
0,11	94,4	0,235
0,215	89,0	0,236
0,53	74,5	0,242
1,0	55,4	0,255
2,51	25,2	0,238
4,00	10,8	0,238

Bei konstanter Substratkonzentration war die Geschwindigkeit der Enzymmenge proportional.

Relative Trypsinmenge	1	2	4	8
Geschwindigkeit k · E	0,057	0,11	0,24	0,50
Korr. Geschwindigkeit k	0,057	0,055	0,060	0,062

Versuche von Northrop³ bei hoher Temperatur und mit grossen Substratkonzentrationen zeigten dagegen, dass hier die Zerstörung des Enzyms der bestimmende Faktor ist. Da die Substratkonzentration so gross ist, dass sie während der Verdauung als konstant angesehen werden kann, so wird hier die totale Hydrolyse der zugesetzten Enzymmenge proportional, und die

¹ Arrhenius, *Immunochemie*, Leipzig 1907.

² Northrop, *Jl of gen. Physiol.* 6, 417; 1924.

³ Northrop, *Jl of gen. Physiol.* 6, 429; 1924.

Geschwindigkeitskonstante, aus der für jede Enzymmenge erreichten Umsetzung berechnet, wird von der Enzymmenge unabhängig und ist als die Inaktivierungskonstante des Enzyms (oder vielleicht richtiger der Enzymsubstratverbindung) anzusehen.

In neuester Zeit haben Willstätter und Persiel¹ einige Versuche über den zeitlichen Verlauf der Tryptasewirkung veröffentlicht. Sie finden auch, dass sich bei grossen Enzymmengen und sehr grossen Umsätzen die Hemmung der Spaltprodukte geltend macht. Bei der von ihnen gewählten

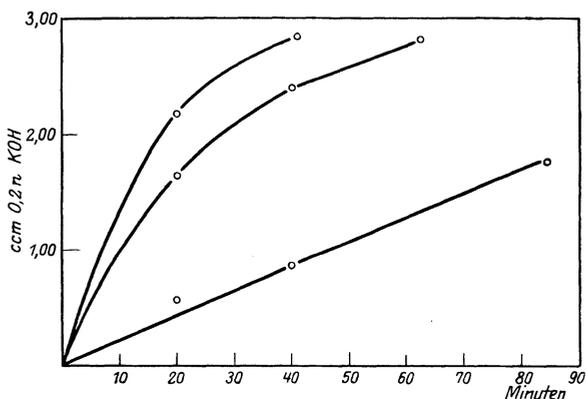


Fig. 55.

Temperatur 37° ist eine Enzymzerstörung nicht ausgeschlossen. Die für eine glatte Titration der Carboxyle nach Willstätter und Waldschmidt-Leitz notwendige Kleinheit der Puffermenge ist auch für die Einhaltung der optimalen Acidität vielleicht nicht ausreichend. Eine Kurve sei angeführt (Fig. 55). Die Enzymmengen waren 0,23, 0,79 und 1,10 T-(e).

4. Einfluss der Substratkonzentration.

Dass die Spaltungsgeschwindigkeit bei einer konstanten Enzymmenge und variabler Substratkonzentration mit der letzteren steigt, aber nicht proportional, wiesen schon Henri und des Bancels nach. Bayliss bestimmte dann mit der Leitfähigkeitsmethode die Anfangsgeschwindigkeit der Spaltung von Casein.

% Casein	Änderung der Leitfähigkeit Recip. Megohm.
4	385
3,2	395
2	200
1,6	182
0,8	110
0,4	10

¹ Willstätter und Persiel, H. 142, 245; 1924/25.

Aus den Versuchen ist ersichtlich, dass die Geschwindigkeit anfangs mit der Substratkonzentration steigt, aber bei Konzentrationen grösser als etwa 3% einen konstanten Wert annimmt. In einem zweiten Versuche fand Bayliss dieselbe Geschwindigkeit in 4,5 und 8% Caseinlösungen, etwas kleiner in 10%. Die verminderte Geschwindigkeit in konzentrierteren Lösungen ist nach Bayliss bei der Gelatinespaltung noch mehr ausgeprägt. Er führt diese Erscheinung auf die vergrösserte innere Reibung zurück.

Neue Versuche verdankt man Northrop. Es muss indessen schon jetzt hervorgehoben werden, dass wir manchen Schlüssen, die Northrop aus seinen Versuchen zieht, nicht beipflichten können. Wenn er aus seinen Versuchen über Hemmung durch Verdauungsprodukte, wo gefunden wurde, dass die prozentische Hemmung von der Substratkonzentration unabhängig ist, den Schluss zieht, dass das Enzym mit dem Substrat keine Verbindung eingehe, so zieht er die Möglichkeit nicht in Betracht, dass Substrat und Hemmungskörper sich gar nicht notwendig gegenseitig verdrängen müssen. Aus modernen Versuchen mit anderen Enzymen ist leicht zu sehen, dass oft Hemmungen von der Substratkonzentration unabhängig sind und dass dies in vorzüglichster Übereinstimmung mit den Annahmen der Enzym-Substratverbindung ist. Die Hemmungsstoffe können ganz andere Gruppen besetzen als das Substrat und ihre Bindungen sind voneinander ganz unabhängig¹⁾: Die Hemmungskörper verhindern den Zerfall der Enzym-Substratverbindung²⁾.

Von Northrops Versuchen über den Einfluss der Substratkonzentration sei folgende Tabelle angeführt:

Leitfähigkeitsmessung. Relative Geschwindigkeit, $C = \frac{100}{t}$; t ist die zum Erreichen einer kleinen Änderung der Leitfähigkeit erforderliche Zeit. E ist die relative Enzymmenge.

Wenn wir auf das Gleichgewicht Tryptase-Gelatine das Gesetz der Massenwirkung anwenden, finden wir leicht

$$C = \frac{ES}{Q + S}$$

Hier ist S die Substratmenge, C die relative Menge an das Substrat gebundenes Enzym = die relative Reaktionsgeschwindigkeit; Q eine von der Gleichgewichtskonstante Enzym-Substrat und von den angewandten Einheiten abhängige Konstante. Setzen wir $Q = 0,5$, so erhalten wir die Werte „C berechnet“.

Gelatine- menge S	C					
	E = 30		E = 5,0		E = 3,0	
	gef.	ber.	gef.	ber.	gef.	ber.
0,38	13,1	12,0	2,4	2,0	1,3	1,3
0,75	17,5	18,0	3,3	3,0	1,8	1,8
1,5	25,6	22,5	4,0	3,7	2,2	2,2
3,0	28,4	25,7	4,6	4,3	2,4	2,6
6,0	27,3	27,7	4,9	4,6	2,7	2,7

¹ Siehe z. B. Euler und Svanberg, Fermentforschung, 4, 142; 1921.

² Myrbäck, Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi 8, Nr. 29 u. 32; 1923, H. 158, 160; 1926.

Wir sehen, dass die Reaktionsgeschwindigkeit in Gelatinelösungen, konzentrierter als 3%, beinahe konstant ist. Dies dürfte also bedeuten, dass hier alle Tryptase an das Substrat gebunden ist. Nach Northrop ist indessen diese Annahme nicht richtig, da in einem Gemisch von 4% Casein und 3% Gelatine eine Reaktionsgeschwindigkeit gefunden wurde, die bedeutend grösser war als die in einer Lösung von 4% Casein gemessene, trotzdem Gelatine bedeutend langsamer verdaut wird als Casein. Offenbar ist es verfrüht, aus diesem Grunde die Annahme von der Verbindung Tryptase-Substrat zu verwerfen.

In einer anderen Versuchsreihe untersucht Northrop die Substratkurve mit Casein:

% Casein	0,5	1,0	2,0	3,0	5,0
Zunahme des Amino-Stickstoffs: ccm Lauge . .	0,20	0,33	0,45	0,54	0,55

Auch hier ist in etwa 3%iger Lösung die maximale Geschwindigkeit erreicht.

Diese Resultate gelten nun, wie Northrop hervorhebt, für die Bestimmungsmethoden, wo die Reaktionsprodukte ermittelt werden (Leitfähigkeitsmessung, Formoltitration, wahrscheinlich auch die alkalimetrische Titration in Alkohollösung). Bestimmt man dagegen das unveränderte Substrat (Fällungsreaktionen, Viscositätsmessung usw.), so erhält man ganz andere Resultate. Wir lassen einen Versuch über die Caseinverdauung bei verschiedenen Substratkonzentrationen folgen:

Casein wurde in einem m/20 Phosphat-Borat-Citrat-Puffer gelöst: pH = 8,0 Trypsinspaltung bei 34°. Casein gefällt und gewogen.

		Min. Verdauung			
		0	15	30	60
g Casein in 100 ccm	}	1,5	0,8	0,5	0,2
		3,1	1,9	1,2	0,8
		5,0	3,1	2,6	2,3

Wird hier als Anfangsgeschwindigkeit der reziproke Wert der Zeit zur Spaltung von 0,2 g Casein angesehen, so erhalten wir folgende Zusammenstellung:

Caseinkonzentration	Anfangsgeschwindigkeit
1,5 %	12,5
3 "	22,2
5 "	40,0

Dasselbe Resultat wurde in mehreren Versuchen, auch wo Viscositätsmessungen zur Anwendung kamen, erhalten. Man findet also, wenn man die

erste Stufe der Tryptasewirkung misst, Proportionalität zwischen Geschwindigkeit und Substratmenge bei weit höheren Konzentrationen, als wenn man die Reaktionsgeschwindigkeit durch Bestimmung der Reaktionsprodukte ermittelt. Die Affinität zwischen Enzym und Casein ist also weit geringer, als aus den Seite 481 angeführten Versuchen mit variierender Gelatine- und Caseinkonzentration hervorzugehen scheint. In dieser Weise dürften sich Northrops Versuche über gleichzeitige Verdauung von Gelatine und Casein erklären.

Dass die mit verschiedenen Bestimmungsmethoden gewonnenen Resultate zur Zeit nur schwer vergleichbar sind, geht auch aus einer Zusammenstellung von Edlbacher¹ hervor.

Casein als Substrat.

Stunden Verdauung	% Formol-N vom Gesamt-N	CH ₃ -Gruppen auf 100 N-Atome	$\frac{\text{N-Methylzahl}}{\text{Formolzahl}}$
0	5	17	3,4
0,5	35,4	31,8	0,9
1	41,6	37,5	0,9
8	54,4	45,7	0,84
16	59,9	51,8	0,86
72	66,0	54,6	0,83

Anfangs ändert sich also die Menge des formoltitrierbaren Stickstoffes ausserordentlich schnell im Verhältnis zu der N-Methylzahl.

Es ist zu hoffen, dass die nunmehr gelungene Trennung der tryptischen Enzyme die genaue Kenntnis der Spaltungsprodukte ermöglichen und dadurch eine rationelle Untersuchung der Kinetik der Eiweisspaltung erlauben wird.

5. Reversion der Trypsinspaltung.

Wie mit anderen proteolytischen Enzymen tritt auch durch Trypsinpräparate in Gemischen von Eiweisspaltprodukten eine sog. Plasteinbildung ein. Ob man diesen Vorgang als eine Reversion der Trypsineinwirkung anzusehen hat, ist wohl sehr zweifelhaft. Wichtig ist, dass auch hier nach Henriques und Gjaldbak² der Aminostickstoff abnimmt, dass also wirklich eine Synthese eintritt. Indem wir übrigens auf das beim Pepsin Gesagte verweisen, sei nur hier eine Zusammenstellung von Henriques angeführt:

¹ Edlbacher, H. 167, 52; 1919 und H. 108, 287; 1919/20.

² Henriques und Gjaldbak, H. 71, 485; 1911 und H. 81, 439; 1912. — Wasteneys und Borsook, JI Biol. Chem. 63, 15 u. 633; 1925.

	Pepsin-HCl	Trypsin
Peptische Spaltprodukte	Typische Plasteinbildung mit oder ohne Gelatinierung. Deutlicher Ausschlag für Synthese. Der Prozess geht beim Verdünnen zurück.	Typische Plasteinbildung ohne Gelatinierung. Von einer Proteolyse und wahrscheinlich gleichzeitig von einer Synthese begleitet. Tyrosinausscheidung.
Tryptische Spaltprodukte (stark gespalten). . .	Keine Plasteinbildung. Proteolytische Spaltung.	Keine Plasteinbildung. Proteolytische Spaltung.
Säurespaltungsprodukte .	Typische Plasteinbildung ohne Gelatinierung. Wahrscheinliche Synthese.	Typische Plasteinbildung ohne Gelatinierung. Proteolytische Spaltung. Tyrosinausscheidung.
Alkalispaltprodukte. . .	Typische Plasteinbildung ohne Gelatinierung. Proteolytische Spaltung.	Keine Plasteinbildung. Proteolytische Spaltung. Tyrosinausscheidung.

Zu bemerken ist, dass das „Trypsin“ hier Erepsin enthalten hat.

F. Die Aktivitäts-pH-Kurve.

Die ersten genauen Versuche über die Bedeutung der Acidität für die Geschwindigkeit der Tryptasewirkung verdanken wir Sørensen¹. Seine Versuche wurden mit Pancreatin Rhenania ausgeführt. Da dieses Präparat mehrere Enzyme zu enthalten schien und die von Sørensen angewandten Puffermischungen eine Verschiebung der Acidität während der Verdauung nicht verhindern konnten, gibt er keine pH-Kurve an. Danach haben Michaelis und Davidsohn² die Kurve unter Anwendung der Gaskettenmethode zur Messung der Acidität ermittelt.

Enzym: Pancreatinum puriss. absol. Rhenania.

Substrat: Peptonum siccum Riedel.

Methode: Formoltitration nach Sørensen.

Puffer: Phosphat- oder Acetatgemische.

Die Figur 56 zeigt den seitlichen Verlauf der Spaltung bei verschiedenen Aciditäten.

Es scheint hervorzugehen, dass die Kinetik mit der Acidität wechselt. Möglicherweise kann auch in einzelnen Fällen eine Enzymzerstörung mitspielen. In der Fig. 57 sind die relativen Reaktionsgeschwindigkeiten bei verschiedenen Aciditäten durch eine Kurve veranschaulicht. Bei pH = 7,8 — 8,5 liegt die optimale Wirkung. (Die durch die OH- bzw. H-Ionen allein bewirkte Spaltung ist berücksichtigt worden.)

Zur Deutung der pH-Kurve werden nun die früheren Versuche über die

¹ Sørensen, Enzymstudien II, Bioch. Zs 21, 300; 1909.

² Michaelis und Davidsohn, Bioch. Zs 36, 280; 1911.

elektrochemische Natur des Trypsins von Michaelis und Davidsohn¹ herangezogen. Sie hatten durch Überführungsversuche gefunden, dass der isoelektrische Punkt des Trypsins bei $\text{pH} = \text{etwa } 1,4 \cdot 10^{-4}$ liegt. Ungefähr

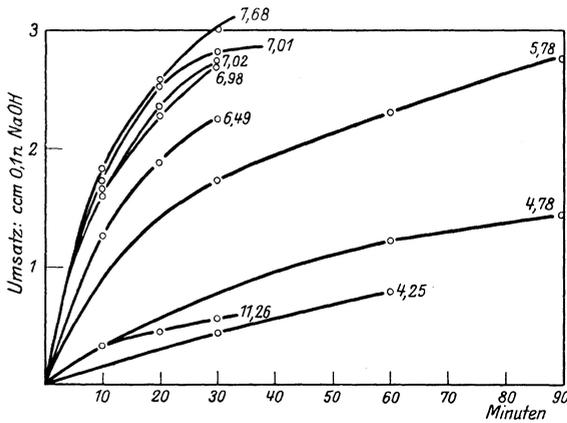


Fig. 56.

bei derselben Acidität fanden sie das Flockungsoptimum der angewandten Trypsinlösung. Ausgefällt wurde das „Nucleoprotein“ des Pankreas. In dem Niederschlag befand sich die grösste Menge des Trypsins wahrscheinlich neben anderen Körpern. Michaelis und Davidsohn schliessen, dass zwar das Trypsin mit dem Nucleoprotein nicht identisch ist (dagegen spricht, dass man das Protein ohne Trypsin in derselben Weise fällen kann), aber eine „leichte chemische Modifikation“ desselben darstellt². Nach den neuen Erfahrungen über die Überführung der Enzyme im elektrischen Felde dürften die Versuche so zu deuten sein, dass der ausgefällte Körper eine Verbindung vom

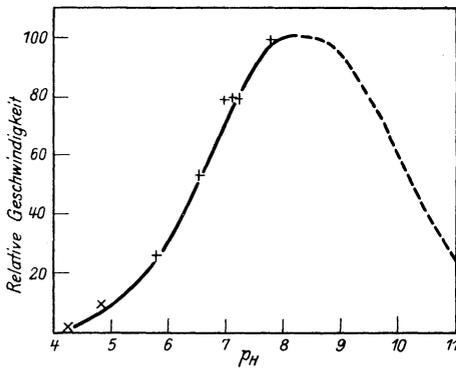


Fig. 57.

Enzym und Nucleoprotein ist, welche Verbindung auch die Lage des gefundenen isoelektrischen Punktes bestimmt hat. Über die elektrochemische Natur der Tryptase geben die Versuche keine Auskunft. Wenn also Michaelis den Schluss zieht, dass die pH-Kurve der Trypsinspaltung durch die elektrochemischen Eigenschaften des Enzyms bestimmt ist, so kann dies teilweise zutreffen; dass dagegen die Kurve ganz einfach die

Dissoziationskurve des Enzyms ist, können die Versuche nicht beweisen.

Wie bei Pepsin, hat es sich nämlich auch hier gezeigt, dass die pH-Kurve nicht dieselbe bei verschiedenen Substraten ist. Nachdem Euler³ die Möglichkeit hervorgehoben hatte, dass der Dissoziationszustand der Proteine die Aciditätskurven der proteolytischen Enzyme teilweise bestimmen könnte, wies Northrop⁴ nach, dass die Kurven tatsächlich je nach dem Substrat

¹ Michaelis und Davidsohn, *Bioch. Zs* 30, 481, 1911.

² Siehe hierzu auch Fodor, *Fermentf.* 4, 209; 1921.

³ Euler, *H.* 51, 213; 1907.

⁴ Northrop, *Jl of gen. Physiol.* V, 263; 1922.

verschieden waren und dass ein unverkennbarer Zusammenhang zwischen enzymatischer Wirkung und Grad der Salzbildung der Substrate existiert.

Durch pH-Bestimmungen in Mischungen von Protein und Lauge wurden die Ionisationskurven einiger Eiweissstoffe bestimmt. Mit denselben Stoffen als Substrat wurden dann die Geschwindigkeiten der Trypsinverdauung gemessen. So wurden z. B. folgende Kurven erhalten (Fig. 58). Die ausgezogenen Kurven sind die Ionisationskurven. Die Punkte sind die gefundenen Trypsinwirkungen. Eine sehr nahe Übereinstimmung der Punkte mit den Kurven ist bei mehreren Eiweissstoffen zu beobachten. In anderen Fällen ist die Übereinstimmung weniger gut.

Nun kann es, wie Northrop selbst hervorhebt, oft schwer sein, die von einem Eiweissstoff maximal gebundene Alkalimenge zu berechnen. Die Eiweisse sind natürlich sehr oft mehrsäurig und die Dissoziationskonstanten können so nahe gleich sein, dass es schwer zu sagen ist, wo die erste Salzbildung vollständig ist. Dies kann in einigen Fällen die Übereinstimmung ungünstiger gemacht haben. Aus seinen

Versuchen schliesst nun Northrop, dass die Substrate allein die pH-Kurven bestimmen, indem nur die Anionen derselben enzymatisch gespalten werden. Obgleich es ziemlich sicher sein dürfte, dass die Eiweissstoffe bei den in

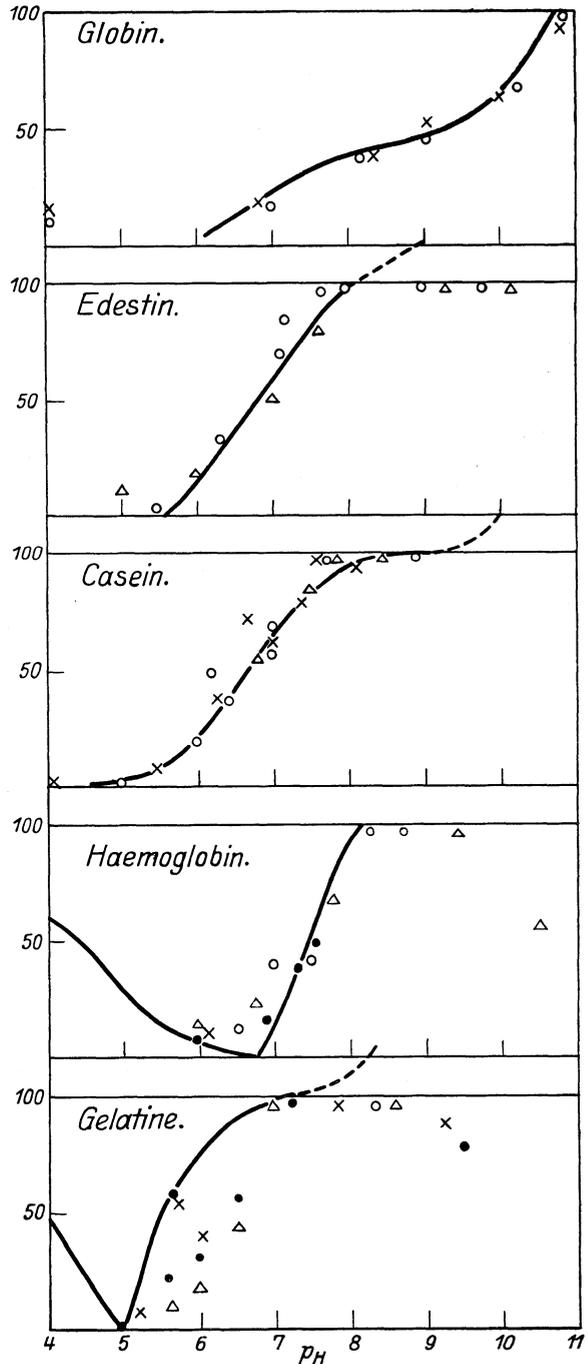


Fig. 58.

Frage kommenden Aciditäten recht vollständig in Ionenform vorhanden sind, dürfte man schwerlich behaupten können, dass die Ionisation der einzige bestimmende Faktor ist. Wir müssen beachten, dass in jedem Falle eine Enzym-Substratverbindung die zerfallende Molekularart ist und dass deren Eigenschaften vor allem die pH-Kurve bestimmen. Dagegen ist es richtig, dass die Salzbildung des Substrates für die Bildung der Enzym-Substratverbindung von ausschlaggebender Bedeutung sein kann. Nimmt man mit Northrop an, dass nur die Eiweissanionen gespalten werden, so ist zu schliessen, dass nur diese das Enzym binden. Wie bei Pepsin die Annahme mit den gefundenen Tatsachen in guter Übereinstimmung ist, dass sich die Säure Pepsin mit den Eiweisskationen verbindet (vgl. Kap. 20), so ist hier anzunehmen, dass sich die Base Trypsinase mit den Eiweissanionen verbindet. Dadurch werden die verschiedenen pH-Kurven der Substrate erklärt, und die nach der zu einfachen Northropschen Annahme nicht verständlichen Abweichungen (u. a. der Abfall der Kurven in stärker alkalischer Lösung) werden den Eigenschaften des Enzyms bzw. der Enzym-Substratverbindung zugeschrieben.

Besonders hervorzuheben ist, dass in den Northropschen Versuchen für die Bestimmung der Spaltung der verschiedenen Substrate mehrere Methoden angewandt worden sind, die in manchen Fällen untereinander nicht vergleichbar sind, ein Umstand, der den Wert der Untersuchungen einigermassen beeinträchtigt. Mit einer einwandfreien Methodik hat Waldschmidt-Leitz neuerdings die Aciditätskurve der Gelatinespaltung ermittelt¹. Er hat hier auch die Eigenwirkung des Puffers berücksichtigt, deren Vernachlässigung in früheren Arbeiten grosse Fehler bedingt hat². Gemessen wurde die Wirkung von 0,125 g Trockenpankreas, durch Darmwandauszug maximal aktiviert, auf 10 ccm einer 3%igen Lösung von Gelatine bei 30°. Gemischter Phosphat-Borat-Citratpuffer nach Northrop. Angaben der Spaltung in ccm 0,2 n KOH (Fig. 59).

pH	Gesamthydrolyse	Pufferwirkung	Enzymwirkung
5,5	0,40	0,15	0,25
6,0	0,93	0,15	0,78
6,5	1,15	—	1,15
6,8	1,21	—	1,21
7,2	1,27	—	1,27
7,7	1,38	—	1,38
8,2	1,49	0,06	1,43
8,7	1,55	0,11	1,44
9,1	1,85	0,50	1,35
9,4	2,19	0,91	1,28
9,7	2,38	1,18	1,20

¹ Waldschmidt-Leitz, H. 132, 198; 1923/24.

² Siehe z. B. Ringer, H. 116, 107; 1921 und 124, 187; 1922/23.

Eine originelle Methode, die elektrochemische Natur der Tryptase kennenzulernen, hat Northrop in der letzten Zeit verwendet¹. Sie gründet sich auf das sog. Donnan-Gleichgewicht, das Membrangleichgewicht von diffusiblen und nichtdiffusiblen Ionen. Um die Ionennatur eines Stoffes zu bestimmen, wird er in ein Donnan-System eingeführt und das Verhältnis seiner Konzentrationen zu beiden Seiten der Membran mit dem Verhältnis derselben Konzentrationen irgendeines bekannten Ions verglichen. Diese Methode hat nun Northrop im Falle von Trypsin geprüft, indem er die relative Konzentration in und ausser der in der Flüssigkeit aufgeschwämmten Gelatine mass. Er zieht aus seinen Versuchen den Schluss, dass Trypsin in Lösung zwischen

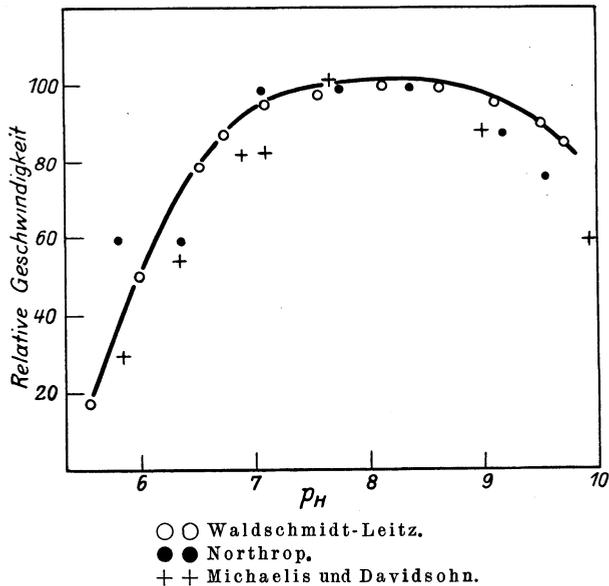


Fig. 59.

pH 2,0 und 10,2 als monovalentes positives Ion zugegen ist. Bei pH = 10,2 ist es wahrscheinlich isoelektrisch, und in noch stärker alkalischer Lösung geht es in ein monovalentes negatives Ion über. Obgleich die Versuche an mehreren Schwächen leiden, ist unverkennbar, dass die Resultate in recht guter Übereinstimmung mit den Tatsachen stehen, auf die die Form der Aktivitäts-pH-Kurven hindeutet. Unregelmässigkeiten in den Versuchen von Northrop sind durchaus erklärlich, da die angenommenen Verhältnisse sicher allzu einfach sind und z. B. eine Bindung des Enzyms an das Substrat nicht angenommen wird.

Das pH-Optimum der Reversion, also der sog. Plasteinbildung haben neuerdings Wasteneys und Borsook² untersucht.

¹ Northrop, JI of gen. Physiol. 6, 337; 1924.

² Wasteneys und Borsook, JI Biol. Chem. 62, 15, 633 u. 675; 1925.

G. Einwirkung von Neutralsalzen.

Zwei Arten der Einwirkung sind denkbar:

1. Aktivierung des Trypsinogens,
2. Einwirkung auf das aktivierte Enzym.

1. Was den ersten Punkt betrifft, so hat die Theorie von der aktivierenden Wirkung der Kalksalze eine grosse Rolle gespielt. Delezenne fand, dass Erdalkalisalze in geringen Mengen den inaktiven Pankreassaft in eine aktive Form überführen können¹. Zunz² bestätigte seine Angaben und sah in dem Vorgang einen katalytischen Prozess. Eine ganz andere Erklärung der Calciumwirkung geben Mellanby und Woolley³. Sie fanden, dass die Wirkung von Ca-Salz nur in einer Herabsetzung der Alkalität des Pankreassaftes durch Bildung von unlöslichen Carbonaten bestand. Dadurch wird die durch anwesende Enterokinase mögliche Aktivierung ausgelöst. Auch ohne Kalksalz geschah die Aktivierung, aber viel langsamer. Dies ist in sehr guter Übereinstimmung mit den neuen Befunden von Waldschmidt-Leitz, der gezeigt hat, dass die Kinasewirkung am besten in neutraler Lösung stattfindet⁴. In typisch unwirksamem Drüsenmaterial konnte er niemals eine Aktivierung durch Kalksalz beobachten. Überhaupt ist die Enterokinase durch keine bekannten Stoffe ersetzbar.

2. Zahllose Versuche über den Einfluss von Salzen auf die tryptische Verdauung sind nunmehr wertlos, da keine Rücksicht auf Aciditätsänderungen genommen wurde. Von Versuchen, wo wirklich eine Neutralsalzwirkung festgestellt wurde, seien die von Weiss⁵ erwähnt. Er fand, dass NaCl in sehr kleinen Konzentrationen ein wenig förderte, in grösseren dagegen hemmte. So bewirkten 10% NaCl eine Hemmung von 13%. Eine ähnliche aber schwächere Wirkung haben die Bromide und Jodide von Kalium und Natrium. Stärker wirken dagegen die Oxalate und Sulfate. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen stehen die von Kudo⁶. Nach ihm hemmen die Nitrate noch weniger als die Chloride.

Ca-Salze hemmen die aktivierte Tryptase⁴. Ein Versuch von Waldschmidt-Leitz sei angeführt.

Verschiedene Tryptasepräparate, 3 % Gelatine, Puffer.

Zusatz	Aciditätszuwachs in ccm KOH	pH
{ 2 ccm Wasser	0,35	} 5,5
{ 2 ccm Wasser + 40 mg CaCl ₂ . . .	0,14	
{ 1 ccm Kinase + 1 ccm Wasser . . .	0,71	} 8,7
{ 1 ccm Kinase + 1 ccm CaCl ₂ = 20 mg	0,55	

¹ Delezenne, Soc. Biol. 59, 476, 523, 614; 60, 1070; 63, 274 (1907).

² Zunz, Bioch. Zbl. 5, 184, 599 und 6, 2154.

³ Mellanby und Woolley, Jl of Physiol. 45, 370 und 46, 159; 1913.

⁴ Waldschmidt-Leitz, H. 132, 200; 1923/24.

⁵ Weiss, H. 40, 480; 1904.

⁶ Kudo, Bioch. Zs 15, 473; 1909,

H. Reversible und irreversible Hemmungen (Giftwirkungen).

1. Anorganische Stoffe.

NaF ist auch hier mehrmals untersucht worden. Nach neueren Angaben von Vandavelde ist es ohne Einfluss¹. Ältere Versuche sind durch Aciditätsänderungen zu erklären.

Kolloide Metalle hat Pincussohn studiert². Sie sollen in verschiedener Weise einwirken, je nachdem sie Eiweiss als Schutzkolloid enthalten. Hier wäre wohl die Eigenwirkung der zugesetzten Eiweissstoffe zu berücksichtigen.

Interessant sind seine neuen Versuche³ über die Einwirkung von kolloidalem Eisenhydroxyd auf Tryptase (Handelspräparat, Trypsin Rhenania.) Er fand, dass es je nach der Acidität der Lösung sowohl hemmend wie fördernd wirken konnte. In Lösungen saurer als pH = 6,3 förderte es, bei pH = 6,5—6,7 war es unwirksam, in alkalischerer Lösung hemmte es. Dies ist wohl mit den amphoterer Eigenschaften des Enzyms in Verbindung zu setzen. Der Zusammenhang ist doch, wie Pincussen hervorhebt, gar nicht klar.

H₂O₂ soll günstig wirken⁴. Dies gilt natürlich von mässigen Mengen und ist vielleicht als eine Wirkung auf das Substrat aufzufassen.

1 g Dinatriumsulfit in 100 ccm Verdauungsgemisch hemmt die Tryptase nicht wesentlich⁵.

Dasselbe gilt von einem Zusatz von 1 g Cyankalium, 2 g KCN hemmen deutlich. Auch nach Hata⁶ sind kleine Mengen von KCN unschädlich.

Wichtig sind die allerdings mit einer recht groben Methodik angestellten Versuche von Hata über die Quecksilbervergiftung der Tryptase (Grüblers Trypsin sicc.). Schon sehr kleine Mengen HgCl₂ haben eine deutliche hemmende Wirkung. Etwas grössere Mengen vergiften vollständig. So heben 2 mg HgCl₂ die Wirkung von 1 mg Trypsin Grübler recht vollständig auf. Sehr interessant ist nun, dass es Hata gelang, die Hg-vergiftete Tryptase durch KCN zu regenerieren. Zu einer Lösung von 1 mg Trypsin wurden 20 mg HgCl₂ gegeben. Die Vergiftung ist hier vollständig, wie auch besondere Versuche zeigten. Nach einer Stunde setzte man 9,7 mg KCN dazu. Es zeigte sich, dass beinahe die ganze enzymatische Wirkung zurückgewonnen wurde.

Weitere Versuche über Schwermetallhemmung bei Chittenden⁷.

2. Organische Verbindungen.

Mit sog. Protoplasmagiften hat Kaufmann⁸ eine Untersuchung ausgeführt. Er fand, allerdings nach einer groben Methode, dass stärkere Trypsinlösungen (0,2% Grüblers

¹ Vandavelde und Poppe, Bioch. Zs 28, 134; 1910.

² Pincussohn, Bioch. Zs 40, 307; 1912.

³ Pincussen, Bioch. Zs 142, 212; 1923.

⁴ Vandavelde, Hofm. Beitr. 5, 558.

⁵ Elisabeth Rona, Bioch. Zs 109, 284; 1920.

⁶ Hata, Bioch. Zs 17, 156; 1909.

⁷ Chittenden und Cummius: Trans. Conn. Akad. 7; Malys Jahresber. 1885, 304.

⁸ Kaufmann, H. 39, 434; 1903.

Trypsin) durch 24stündige Einwirkung von Toluol, Chloroform und Thymol nicht merkbar geschädigt wurden. Schwächere Lösungen wurden dagegen deutlich beeinflusst. Ausser dieser Schädigung, die wohl als ein beschleunigter Zerfall des Enzyms zu betrachten ist, ist auch nach Kaufmann die Anwesenheit antiseptischer Stoffe während der Verdauung schädlich, doch nicht in hohem Grade.

Über den Einfluss von Alkohol auf die Trypsinverdauung von Casein und Fibrin hat Edie¹ eine Untersuchung veröffentlicht. Er findet, dass Äthylalkohol in Konzentrationen grösser als 3% die Fibrinverdauung stark hemmt, während die Wirkung des Trypsins auf Casein erst bei 10% Alkohol deutlich beeinflusst wird. Die Alkoholwirkung besteht nicht in einer irreversiblen Zerstörung des Enzyms. Edie schliesst, dass, wenn die Tryptase ein einheitliches Enzym ist, die Wirkungen auf Casein und Fibrin von verschiedenen „Seitenketten“ ausgeübt wird. Nun ist indessen zu bemerken, dass die Spaltung einerseits gelöstes Casein andererseits festes Fibrin betraf. Obgleich der Verfasser zeigen konnte, dass das Fibrin durch die angewandten Alkoholkonzentrationen nicht dauernd verändert wurde, ist es wohl sehr möglich, dass die verschiedene Wirkung des Alkohols einer Wirkung auf das feste Fibrin zuzuschreiben ist.

Johannessohn² hat die Einwirkung von Formaldehyd untersucht, und zwar die Einwirkung auf Enzym und auf Substrat getrennt. Er fand, dass verschiedene Trypsinpräparate von Formaldehyd ungleich stark beeinflusst wurden, was wohl mit dem verschiedenen Gehalt an Verunreinigungen zusammenhängt. So wurde beispielsweise Trypsin Merck durch 20stündige Behandlung mit 1% Formaldehyd unwirksam, ein anderes Präparat, „Trypsinogenum activatum Pharmacon“, wurde schon von 1/20% inaktiviert. Die Verdauung von mit Formaldehyd behandeltem Eiweiss („Methyleneiweiss“) mit Trypsin war nicht erheblich kleiner als die des unvorbehandelten Eiweisses. Die Versuche von Johannessohn sind in Übereinstimmung mit älteren von Loew³ und von Bliss und Novy⁴. Über die Verdauung von Formol-eiweiss findet man auch Versuche bei Sahli und Rumpel⁵.

Von anderen untersuchten Aldehyden wirkt Paraldehyd nach Chittenden und Stewart⁶ stark schädigend. Bei denselben Verfassern findet man Untersuchungen über die Giftwirkungen von einer Menge von Arzneimitteln usw. auf die Tryptase.

Über Einwirkung von Kolloiden siehe Versuche von Simoneli⁷. Die

¹ Edie, *Bioch. Jl* 13, 219; 1919.

² Johannessohn, *Bioch. Zs* 83, 28; 1917.

³ Loew, *Malys Jahresber.* 1888, 272.

⁴ Bliss und Novy, *Jl of exp. med.* 4, 47.

⁵ Sahli, *Deutsche med. Wochenschrift* 1897, 7. — Rumpel, *Therap. Monatsh.* 1906, 369.

⁶ Chittenden und Stewart, *Malys Jahresber.* 20, 248; 1890.

⁷ Simoneli, *Arch. di Fis.* 8, 17; 1910.

hier gefundenen Aktivierungen dürften auf Schutzwirkung gegen Zerstörung des Enzyms beruhen.

Bezüglich der sehr umstrittenen Wirkung der Galle auf die Tryptase hat neuerdings Waldschmidt-Leitz festgestellt, dass in dem Aciditätsgebiet optimaler Wirkung die Glykocholate wirkungslos sind¹. Bei saurer Reaktion hemmen sie dagegen.

		Aciditätszunahme
pH = 5,5	{ Ohne Gallensalz	0,35 ccm 0,2 n KOH
	{ 40 mg Na glycocholicum	0,05 „ 0,2 „
pH = 8,7	{ Ohne Gallensalz	1,55 „ 0,2 „
	{ 40 mg „	1,58 „ 0,2 „

Die älteren Arbeiten, wo oft eine spezifische Aktivierung der Tryptase durch Galle gefunden wurde, sind ohne Berücksichtigung der Acidität ausgeführt. Die Aktivierungen dürften ausschliesslich auf der günstigen Wirkung der alkalischen Reaktion der Galle beruhen. Dies geht aus den Versuchen von Fürth² hervor, wie auch aus den oben angeführten von Waldschmidt-Leitz.

Ca-Oleat ist nach Willstätter und Persiel wirkungslos³.

3. Antitrypsin.

Die Existenz der Antitrypsine ist sehr zweifelhaft. Sicher ist dagegen, dass es z. B. im Blutserum Stoffe gibt, welche die Trypsinwirkung und vielleicht auch die Wirkung anderer Proteasen hemmen. Nichts spricht indessen dafür, dass die Wirkung dieser Stoffe sich prinzipiell von den Hemmungen durch Spaltprodukte usw. unterscheidet. Ist es somit wahrscheinlich, dass diese „normalen“ Antitrypsine keine Sonderstellung einnehmen; so kommt die zweite Frage, ob es möglich ist, ein Immun-Antitrypsin hervorzurufen.

„Normale Antitrypsine“.

Dass das normale Blutserum eine starke Hemmung der Trypsinverdauung bedingt, ist lange bekannt. Gezeigt wurde, dass die Hemmung der Albuminfraktion des Serums folgt⁴. Obgleich es, wie Hedin hervorhebt, möglich ist, dass Stoffe, welche dem Serumalbumin anhaften, für die Hemmung verantwortlich sind, so dürfte nunmehr sicher sein, dass die hemmende Wirkung von dem Serumalbumin selbst ausgeübt wird. Studien über diese Hemmung verdanken wir besonders Hedin⁵. Im Anschluss an die damals herrschenden Ideen über die Bedeutung der Sorption für die enzymatischen Wirkungen nimmt Hedin an, dass die Hemmung des Serumalbumins auf sorptiver Bindung des Enzyms beruhe. Wenn man Enzym und Antienzym zuerst

¹ Waldschmidt-Leitz, H. 132, 201; 1923/24.

² Fürth, Hofm. Beitr. 9, 28; 1907.

³ Willstätter und Persiel, H. 142, 253; 1924/25.

⁴ Landsteiner, Zbl f. Bakt. 27, 357; 1900. — Cathcart, JI of Physiol. 31, 495; 1904.

⁵ Hedin, JI of Physiol. 32, 390; 1905; Bioch. JI. 1, 474; 1906, H. 52, 412; 1907 und 57, 468; 1908.

mischt und dann das Substrat zusetzt, so zeigt sich die Hemmung von der Zeit der Aufbewahrung des Enzym-Antienzymgemisches abhängig. Die Hemmung ist grösser, wenn man die Mischung bei einer höheren Temperatur vornimmt usw. Hedin fand, dass die Sorption des Trypsins an Kohle mit der Hemmung des Serumalbumin so viele Ähnlichkeiten aufweist, dass nach seiner Ansicht auch diese Hemmung wahrscheinlich auf Sorption beruht.

Eine neue Untersuchung, bei der eine recht gute Methode zur Messung der Trypsinwirkung angewandt wurde, verdankt man Hussey und Northrop¹. Sie fanden, dass die Hemmung durch Serum mit ihrer Methode quantitativ gemessen werden konnte. Durch eine grosse Anzahl Versuche stellten sie fest, dass das Gleichgewicht Enzym-Hemmungskörper praktisch momentan erreicht wurde und vollkommen reversibel ist. Durch Versuche mit variierenden Konzentrationen von Enzym und Antienzym fanden sie dass die Hemmung sich aus der Gleichung

$$\frac{[\text{Trypsin}] \times [\text{Antitrypsin}]}{[\text{Verbindung}]} = K$$

berechnen lässt und sich also prinzipiell in keiner Hinsicht von der Hemmung durch Spaltungsprodukte usw. unterscheidet.

Zur Erklärung zahlreicher Widersprüche in älteren Untersuchungen ist eine Arbeit von Young² von grossem Interesse. Er zeigt, dass dasselbe Serum auf verschiedene Trypsinlösungen von derselben enzymatischen Wirkung eine sehr verschiedene Hemmung ausüben kann. Dies beruht wohl auf gewissen, in den Enzymlösungen anwesenden enzym- oder albuminbindenden Verunreinigungen. Um darum die antitryptische Wirkung verschiedener Sera vergleichen zu können, muss man dieselbe Trypsinlösung anwenden und die Bestimmungen möglichst gleichzeitig ausführen, damit sich die Enzymlösung durch Selbstverdauung nicht ändern kann.

Die Hemmungen durch Sera und andere „antitryptisch“ wirksame Präparate dürften folgendermassen beschrieben werden können:

1. Es gibt Stoffe, die in keiner Weise spezifisch wirken und sich nicht einmal an das Enzym binden, welche aber für die Enzymwirkung ungünstige Bedingungen schaffen. Hier sind also die Versuche zu nennen, in denen antitryptische Wirkungen solchen Stoffen zugeschrieben wurden, deren einzige Wirkung eine Aciditätsverschiebung ist.

2. Das Enzym bindet sich wie an die spaltbaren Substrate so auch an andere mehr oder weniger eiweissähnliche Stoffe, die nicht oder nur sehr langsam gespalten werden. Dadurch wird ein Teil des Enzyms dem Substrat entzogen und die Trypsinwirkung wird so gehemmt.

3. Es gibt Stoffe, die sich wie die Co-Tryptase an das Enzym anlagern und dadurch die Co-Tryptase verdrängen.

¹ Hussey und Northrop, *Jl of gen. Physiol.* 5, 335; 1923.

² Young, *Jl Biochem.* 12, 499; 1918.

Das Immun-Antitrypsin.

Die Existenz eines Immun-Antitrypsins ist sehr zweifelhaft.

Achalme¹ fand nach Injektion von Pankreatin die Hemmung durch Meerschweinchenserum bedeutend verstärkt. Diese Versuche wurden u. a. von Jochmann und Kantorowicz² und von Meyer³ bestätigt. Dagegen konnten Landsteiner⁴, Doblin⁵, Rosenthal⁶ und andere keine Vergrößerung der antitryptischen Wirkung nach Injektion beobachten. Aus einer neuen Untersuchung von Young⁷ seien einige Resultate mitgeteilt. Er hat die antitryptische Wirkung des Serums gewisser Tiere vor und nach Injektion von Pankreastrypsin gegen dieselbe Trypsinlösung geprüft. Dies wurde dadurch ermöglicht, dass die Sera eingetrocknet wurden und also beliebig lange aufbewahrt werden konnten. Durch besondere Versuche wurde festgestellt, dass hierbei keine Veränderung der antitryptischen Eigenschaften eintrat. Vor der Einspritzung wurden mit einer Zwischenzeit von einer Woche zwei Serumproben entnommen. In einem Versuch wurden an drei aufeinander folgenden Tagen 20 ccm Trypsinlösung einer Ziege intraperitoneal eingespritzt. Nach sieben Tagen wurde eine Serumprobe genommen, welche wie die vor der Einspritzung genommenen Proben untersucht wurde.

Caseinspaltung bei 37° 16 Stunden. Fällung des unveränderten Caseins durch Gerbsäure nach Hedin. Bestimmung von N im Filtrat. Die Angaben sind ccm 0,10 n-Säure bei der Titration des NH₃ nach Kjeldahl.

ccm Serum	Tryptische Wirkung		
	vor der Injektion		nach der Injektion
	Probe 1	Probe 2	
—	18,9	18,9	18,9
0,01	18,4	18,1	18,2
0,05	16,8	16,4	17,5
0,10	15,9	15,2	16,3
0,25	10,6	11,0	13,0
0,50	6,5	6,2	6,2
1,00	5,0	4,8	4,5
2,50	4,7	4,6	4,1
5,00	3,9	3,1	3,4

Die antitryptischen Wirkungen sind gar nicht vergrößert worden. Dasselbe Ergebnis gaben Versuche mit intravenösen Injektionen. Versuche, bei

¹ Achalme, Ann. Inst. Pasteur. 15, 737; 1901.

² Jochmann und Kantorowicz, Münch. med. Wochenschr. 45, 1348; 1908.

³ Meyer, Berl. klin. Wochenschr. 23; 1909. — Biochem. Zs 23, 62; 1909. — Folia Serolog. 7, 472; 1911.

⁴ Landsteiner, Zentralbl. Bakt. 27, I, 357; 1907.

⁵ Doblin, Zs Immunitätsforsch. 1, 650; 1909.

⁶ Rosenthal, Folia Serolog. 6, 285; 1910.

⁷ Young, Biochem. JI 12, 499; 1918.

denen die Bedingungen variiert wurden (eingespritzte Menge, Anzahl Einspritzungen, Zeit zwischen den Einspritzungen usw.) mit Ziegen und Schafen konnten auch in keinem Falle Anhaltspunkte für die Bildung eines Antikörpers liefern.

Dagegen zeigte es sich, dass die Sera, welche vor der Einspritzung mit der Enzymlösung keinen Niederschlag gaben, nach der Einspritzung regelmässig beim Vermischen mit der Pankreatinlösung einen deutlichen Niederschlag auftreten liessen. Eine Präcipitinbildung ist also eingetreten. Dabei sind nur die Verunreinigungen der eingespritzten Enzymlösung wirksam gewesen.

J. Stabilität der Tryptase.

Tryptaselösungen, vor allem wenn sie gereinigt sind, besitzen nur eine relativ geringe Stabilität. Dies zeigt sich schon beim Aufbewahren der Lösungen bei Zimmertemperatur. Unreine Lösungen sind mehr stabil. Vollkommen stabil sind die Pankreastrockenpräparate. Die Instabilität der Tryptase zeigt sich augenfällig bei der Dialyse.

Bezüglich der Dialyse kann man zuerst feststellen, dass sehr leicht eine Inaktivierung eintritt, sei es durch Zerstörung in Lösung oder durch Sorption an der angewandten Membran. Eine zweite Frage ist, ob die Tryptase die gewöhnlichen Membranen passieren kann. Hier sind die Versuche einander recht widersprechend. Strada¹ filtrierte Pankreatinlösungen durch Kollodium und fand die grösste Menge der Tryptase im Filtrat, während die Kinase bisweilen zurückgehalten wurde. Aus neueren Untersuchungen geht hervor, dass für das Zurückhalten der Tryptase die Dicke der Kolloidummembran wesentlich ist². Durch dünne Häute passiert das Enzym recht schnell. Durch Dialyse in dicken Schläuchen kann eine gewisse Reinigung des Enzyms erzielt werden. So fand beispielsweise Northrop, dass recht viele Verunreinigungen durch Dialyse entfernt werden konnten.

Die verhältnismässig schnelle Inaktivierung der Tryptase in Lösung auch bei niederen Temperaturen beobachtete Bayliss. Er fand Zerstörung sogar bei 0°. Bei Anwesenheit von Proteinen dagegen waren die Lösungen nach 7 oder 8 Stunden bei 38° unverändert. Eine starke Schutzwirkung ist also hier zu beobachten, sei es, dass sie von dem Substrat ausgeübt wird oder von den natürlich sehr schnell durch die Tätigkeit des Enzyms entstehenden Spaltprodukten.

Den zeitlichen Verlauf der Inaktivierung des Trypsins hat Vernon³ untersucht. Er fand, dass die Reaktion nicht monomolekular verläuft, sondern sich mit der Zeit zu stark verlangsamt. Er nahm an, dass dies auf der Anwesenheit von verschiedenen Tryptasen mit verschiedenen Stabilitäten beruhe. Er fand indessen auch, dass die Verunreinigungen einen starken

¹ Strada, *Annales de l'Inst. Pasteur* 22, 981; 1908.

² Fricke, Fischer und Borchers, *Kolloidzeitschr.* 39, 152; 1926. — Dasselbst auch Versuche über Elektrodialyse des Trypsins.

³ Vernon, *Jl of Physiol.* 30, 330; 1904.

Einfluss auf die Zerstörungsgeschwindigkeit ausübte, und, wie neuere Untersuchungen zeigen, erklärt dieser Umstand die Vernonschen Versuche vollständig, wodurch die Annahme von verschiedenen Tryptasen überflüssig wird.

Northrop¹ zeigte, dass die Schwächung der Trypsaselösungen wirklich eine Inaktivierung des Enzyms ist und nicht eine Sorption an den Wänden des Gefäßes. Er wies nach, dass die Inaktivierung unter übrigens denselben Verhältnissen gleich gross war, gleichgültig, ob man Gefässe aus Glas, Quarz, Paraffin oder Platin verwendet.

Die Hitze-Inaktivierung verläuft in reineren Enzymlösungen approximativ nach der monomolekularen Formel (38°). Durch Zusatz von tryptischen Abbauprodukten, welche die Trypsinverdauung hemmen, wird die Zersetzungsgeschwindigkeit herabgesetzt. Dies ist in Übereinstimmung mit der Annahme einer Verbindung Enzym-Hemmungskörper. Dass ein Zusatz von Hitze-inaktivierter Enzymlösung auch schützend wirkt, ist auch in Übereinstimmung damit,

dass man hemmende Körper in rohen Enzymlösungen angenommen hat. Wir führen eine Figur aus der Northropschen Arbeit an (Fig. 60).

Bei der dialysierten Enzymlösung geht der Zerfall monomolekular. Lösungen von nicht dialysiertem Enzym und solche mit Zusatz von Gelatine werden anfangs schnell zerstört; die Geschwindigkeit wird indessen mit der Zeit stark verkleinert. Trypsinlösungen, die einen Zusatz von inaktiviertem Enzym oder von „Hemmungskörpern“ erhalten haben, sind viel stabiler. Glykokoll ist ohne Einfluss. Bei Anwesenheit von Überschuss von Hemmungskörpern ist das Trypsin so stabil, dass die Zerfallsgeschwindigkeit des freien Enzyms bei 38° erst oberhalb 60° erreicht wird.

Northrop hat schliesslich die Abhängigkeit der Hitzeinaktivierung von der Acidität untersucht. Einstündige Erhitzung auf 38°; Fig. 61. Das Trypsin,

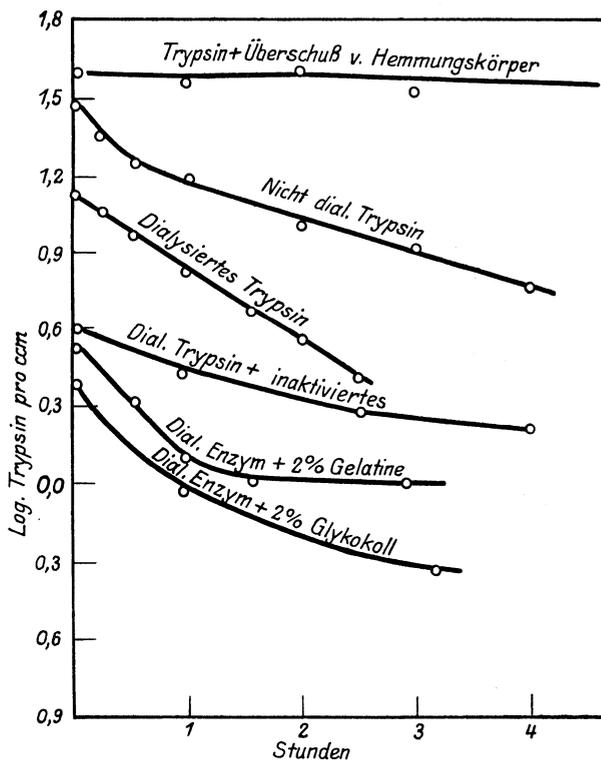


Fig. 60.

¹ Northrop, JI of Physiol. 4, 261; 1922.

oder vielleicht richtiger eine Trypsinverbindung mit einem unbekanntem Begleitstoff, ist bei $\text{pH} = 5$ am stabilsten. Die Verbindung von Trypsin mit dem zugesetzten Hemmkörper hat ihr Stabilitätsoptimum bei $\text{pH} =$ etwa 6. Wahrscheinlich hat jede diesbezügliche Verbindung je nach ihren elektrochemischen Eigenschaften ihr Stabilitäts-pH-Optimum.

Dass Trypsin bei auffallend niedrigen Temperaturen zerstört wird, geht übrigens aus vielen Untersuchungen hervor. So fand Heidenhain¹ schon

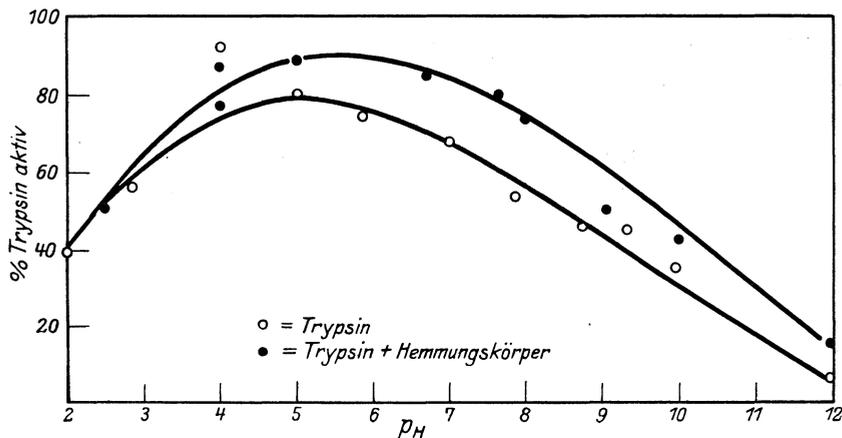


Fig. 61.

bei 35° Zerstörung. Bei 37° fand Pfeiffer² vollständige Zerstörung in 24 Stunden, in 6 Stunden bei 56° .

Die sog. Optimaltemperatur beruht hier wie überall auf dem Verhältnis zwischen Reaktionsgeschwindigkeit und Zerstörungsgeschwindigkeit (vgl. Teil I, 3. Aufl., S. 280). Im pH-Optimum liegt sie oberhalb 55° , z. B. in alkalischen Lösungen liegt sie niedriger.

Strahlenwirkungen.

Ultraviolettes Licht schädigt (Delezenne³).

Radioaktive Strahlung schädigt nach Hussey und Thompson⁴. Eine recht schwache Wirkung von weichen Röntgenstrahlen haben Clark und Northrop untersucht⁵. Sie setzen die Wirkung auf das Enzym mit der ionisierenden Wirkung der Strahlung in Zusammenhang.

¹ Heidenhain, Pflügers Arch. 10, 557; 1875.

² Pfeiffer und Standenath, Fermentf. 7, 14; 1924.

³ Delezenne und Lisbonne, C. r. 155, 788; 1912.

⁴ Hussey und Thompson, JI of gen. Physiol. 5, 647 und 6, 7; 1923.

⁵ Clark und Northrop, JI of gen. Physiol. 9, 87; 1925.

19. Kapitel.

Die Co-Tryptase (Enterokinase).

Der spezifische Aktivator der Tryptase, die Enterokinase oder, wie man ihn in Analogie mit den übrigen Co-Enzymen nennen sollte, die Co-Tryptase, ist nunmehr, besonders durch die Untersuchungen von Waldschmidt-Leitz gut bekannt geworden. Im folgenden wird auf Grund der Arbeiten dieses Forschers über die wichtigsten Ergebnisse berichtet.

A. Vorkommen der Co-Tryptase (Enterokinase).

Ausser in der Dünndarmschleimhaut, wo die Enterokinase zuerst entdeckt wurde, kommt sie auch in der Pankreasdrüse selbst vor und bewirkt die sog. Spontanaktivierung der Tryptase. Aus anderen Organen, wie Milz, Leber und Niere, gelang es Waldschmidt-Leitz nicht, nach der Autolyse aktivierende Lösungen zu erhalten. Das Vorkommen der Co-Tryptase ist also, soweit wir wissen, auf die Pankreasdrüse und die Darmschleimhaut beschränkt. In der Drüse kommt die Co-Tryptase in einer unfertigen Form (Prokinase) vor. Daher kommt es, dass sezernierter Pankreassaft und frische Drüsenextrakte fast inaktiv sind. Beim Aufbewahren der Trypsinogenlösung treten autolytische Prozesse ein, wodurch die Prokinase in die aktivierende Form, die Co-Tryptase übergeführt wird. Ob hierbei das Erepsin eine Rolle spielt, ist unsicher, aber wohl möglich. Die Pankreaskinase und die Darmkinase stimmen in ihren Eigenschaften weitgehend überein und sind aller Wahrscheinlichkeit nach identisch.

Wie in älteren Arbeiten¹ u. a. gezeigt worden war, findet man keine Kinase in der Darmschleimhaut mehr, wenn man den Eintritt des Pankreassekretes in den Darm verhindert. Auf Grund dieses Befundes stellt nun Waldschmidt-Leitz die Arbeitshypothese auf, dass die Kinase in unfertiger Form von der Pankreasdrüse abgesondert, dann aber im Darm von der Schleimhaut aufgenommen wird, und dass sie hier durch die Tätigkeit eines Enzyms, möglicherweise des Darmerepsins, in wirksame Co-Tryptase übergeführt wird.

B. Bestimmung der Co-Tryptase.

„Die stöchiometrischen Beziehungen zwischen Enterokinase und Trypsin führen zu einer einfachen Bestimmungsmethode für den Aktivator: man ver-

¹ Siehe z. B. Sawitsch, Soc. des Med. russes. St. Petersburg 1900/01. — Foà, Biochem. Zbl. 7, 2332.

gleich die einer bestimmten Menge inaktiven Trypsins erteilten proteolytischen Wirkungen, z. B. gegenüber Gelatine.“ Nun wird indessen diese einfache Methodik dadurch ungenau, dass die Pankreaspräparate (Trypsin) Co-Tryptase enthalten oder wenigstens mit der Zeit bilden. Es ist also für die Bestimmung der Co-Tryptase notwendig, zuerst nicht nur ein Co-Tryptase-freies, sondern auch ein Prokinase-freies Trypsinpräparat herzustellen. Noch schwieriger wird die Bestimmung dadurch, dass sich in den Drüsenauszügen auch Stoffe finden, welche die Kinasewirkung hemmen. Versuche, die Einwirkung dieser Stoffe durch Einführung einer ausgleichenden Hemmung auszuschalten, haben noch nicht zum Ziele geführt. Dagegen ist es Waldschmidt-Leitz gelungen, die Tryptase und die Prokinase zu trennen, und zwar durch mehrmalige Sorption mit Tonerde (Sorte C, aus $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ durch Fällen ohne längeres Erhitzen mit der vierfachen Menge 4% NH_3), wobei die Tryptase in der Restlösung bleibt.

Beispiel: Spontanaktivierung und Tonerdesorption (Angaben bedeuten die Wirkung aliquoter Teile, in ccm 0,2 n KOH ausgedrückt).

Enzymlösung	Beobachtete Wirkung nach		
	0 Tagen	2 Tagen	3 Tagen
Verdünnter Glycerinauszug	0,03	0,19	0,27
Adsorptionsrestlösung	0,00	0,02	0,01
Adsorptionsrestlösung + Elution	0,02	—	0,41

Die Abtrennung der Prokinase bringt auch mit sich, dass die Tryptase sehr viel beständiger wird, als wenn sie die Selbstaktivierung durchmacht.

C. Co-Tryptase-Präparate.

Ausgangsmaterial.

In den älteren Arbeiten über Enterokinase wurden einfach Wasser- oder Glycerinextrakte der Darmschleimhaut verwendet¹. Um ein haltbares Ausgangsmaterial zu erhalten, stellt man sich am besten ein Trockenpräparat nach Waldschmidt-Leitz her (H. 132, 204):

„Aus 685 m Schweinedarm, vom obersten Abschnitt des Dünndarms ebensovieler Tiere, schabte man die innerste weiche Schleimhaut mit dem Messer so vorsichtig ab, dass sie möglichst frei von Bindegewebe und Muskelfaser war, und erhielt so insgesamt 7,16 kg; diese wurden darauf in 5 Flaschen mit im ganzen 21 Liter Aceton gut durchgeschüttelt und nach 2 stündigem Stehen filtriert. Der Filtrerrückstand wurde dann weiter durch Anschütteln in den Flaschen und Filtrieren wie zuvor mit 21 Liter Aceton, darauf mit 10,5 Liter Aceton + 10,5 Liter Äther und zuletzt 2 mal mit je

¹ Vernon, JI of Physiol. 28, 375; 1902. — Bayliss und Starling, ebenda 30, 61; 1903.

21 Liter Äther gewaschen und auf Filtrierpapier an der Luft getrocknet. Man erhielt so 1,05 kg eines feinen farblosen Pulvers, das sich nach dem Mahlen in einer Schlagmühle mittels eines engmaschigen Siebes noch von geringen Mengen beigemischter Fasersubstanz befreien liess; die Ausbeute bestand in 950 g staubfeinen Materials.“

Dieses Pulver enthält viel Enterokinase, aber nur wenig Erepsin. Reinigung nach Waldschmidt-Leitz: Aus dem Trockenpräparat wird die Co-Tryptase leicht durch alkalisches Wasser extrahiert. Laugt man dagegen mit schwacher Säure aus, so geht wenig Co-Tryptase aber viel Erepsin in Lösung. Beim Behandeln des Rückstandes mit verdünntem Ammoniak erhielt man die Co-Tryptase in guter Ausbeute in Lösung, frei von Erepsin. Aus der ammoniakalischen Lösung kann viel Eiweiss usw. mit verdünnter Essigsäure entfernt werden ohne wesentlichen Verlust an Co-Tryptase. Weitere, obgleich nicht grosse Mengen von Begleitstoffen, lassen sich durch Fällung mit Sublimat entfernen. Bei Fällung mit Blei- oder Eisensalzen dagegen wird recht viel Co-Tryptase mitgerissen.

Durch Uranylacetat wird die ganze Menge Co-Tryptase mit einem grossen Niederschlage gefällt. In guter Ausbeute kann man sie aus dem Uranniederschlag durch glycerinhaltige alkalische Phosphatlösung eluieren.

Aus dem Rohauszug kann die Gesamtmenge der Co-Tryptase mit Tannin gefällt werden (schwachsaurer Reaktion). Die Lösung des Tanninniederschlages in verdünntem Ammoniak enthält beinahe allen Aktivator. Auch reinere Lösungen werden von Tannin mehr oder weniger vollständig gefällt. Gegenwart von grösseren Mengen Glycerin verhindert die Fällung:

Enzym	Glyceringehalt %				
	0	10	20	30	40
Essigsäuremutterlauge	100	100	70	33	4
Uranelution	100	55	15	10	0

} % gefällt

Durch Alkohol zu 90% kann die Gesamtmenge der Co-Tryptase gefällt werden und wird im Wasserextrakt des Niederschlages gefunden. Sie ist gegen Alkohol recht beständig. Die Reinigung durch Alkohol fällung ist beträchtlich. Bei einigen Versuchen von Waldschmidt-Leitz wurde ein etwa 7 mal grösserer Reinheitsgrad durch diese Operation erreicht.

Die Fällbarkeit der Co-Tryptase durch Uransalze und Tannin beobachtet man auf allen untersuchten Stufen der Reinigung, „auch bei dem reinsten erhaltenen Präparate, das durch aufeinanderfolgende Anwendung der Fällung mit Essigsäure, mit Alkohol und mit Tannin und weiter durch Absorption mit Tonerde und mit Kaolin gewonnen war, liess sich mit diesen Mitteln der grösste Teil der Kinase niederschlagen“.

Sorption.

Mit Tonerde wird die Co-Tryptase glatt sorbiert und kann auf diese Weise von Tryptase getrennt werden. Aus dem durch Essigsäurefällung vorbehandelten Rohauszug geschieht die Sorption am besten bei saurer Reaktion. Zusatz von Alkohol ist günstig. Für die Sorption der mit Alkohol- oder Tanninfällung gereinigten Präparate ist dagegen die neutrale Reaktion am besten. Auch fehlt hier der günstige Einfluss des Alkohols. Die Elution aus den Tonerdesorbaten geschieht mit verdünntem Ammoniak oder mit neutralem oder schwachalkalischem Phosphatgemisch. Die Steigerung des Reinheitsgrades durch die Tonerdesorption ist nicht beträchtlich. Sie ist geringer als die durch Alkoholfällung bewirkte.

Mit Kaolin wird die Co-Tryptase, auch die gereinigte, aus saurer Lösung sorbiert. Alkohol hat keine Wirkung. Elution mit Ammoniak oder glycerinhaltiger alkalischer Phosphatlösung. Steigerung des Reinheitsgrades grösser als mit Tonerde, nicht so gross als mit Alkoholfällung.

Beispiel für die Reinigung.

Aus 250 ccm von überschüssigem Ammoniak befreitem Rohauszug fällt man durch Zusatz von verdünnter Essigsäure Eiweiss usw. möglichst aus. Durch Zusatz von Alkohol zu etwa 90% wurde dann die Kinase gefällt und dem Niederschlag durch 45%iges Glycerin entzogen. Nach Verdünnen und Ansäuern mit Essigsäure fällt man mit 2%iger Tanninlösung einige Begleitstoffe aus, wobei allerdings auch Co-Tryptase mitgefällt wird. So wurden 450 ccm Lösung erhalten (Ausbeute 73%), die man nach Neutralisieren mit Tonerde sorbierte. Das Sorbat wurde mit Phosphatlösung (pH = 7; 43% Glycerin) eluiert. (Ausbeute: 62% von der ursprünglichen Menge.) Die mit Essigsäure angesäuerte Elution behandelte man mit elektroosmotisch gereinigtem Kaolin. Elution mit glycerinhaltigem Ammoniak. Ausbeute 50% von der in der Ausgangslösung vorhandenen Co-Tryptasemenge. Nach 6¹/₂-tägiger Dialyse hatten 182 ccm der Elution ein Trockengewicht von 18,9 mg. Der Reinheitsgrad ist etwa 30 mal grösser als derjenige der Rohlösung.

D. Eigenschaften der Co-Tryptase-Präparate.

Beständigkeit. Durch Erhitzen verliert die Co-Tryptase ihre Wirkung. Neueren Versuchen von Waldschmidt-Leitz ist zu entnehmen, dass bei einstündiger Erhitzung die Zerstörung schon bei 50° recht gross ist, bei 60° verläuft die Inaktivierung sehr schnell. In glycerinhaltiger Lösung ist die Stabilität grösser; bei 60° fand er in einem Versuche eine Zerstörung von 40% in 50-prozentigem Glycerin.

Die Beständigkeit der Co-Tryptase ist am grössten in etwa neutraler Lösung. Die Zerstörung durch Säure und Alkali nimmt mit steigendem

Reinheitsgrade zu. In folgender Tabelle findet man einen Versuch mit rohem Wasserauszug bei 30°.

Reaktion	Relative Kinase menge nach Tagen				
	0	1	2	3	4
n/2 essigsauer	100	25	27	6	—
n/5 „	100	19	23	18	—
n/10 „	100	85	53	28	—
n/20 „	100	102	97	75	—
Neutral	100	—	—	99	100
n/20 ammoniakalisch	100	100	88	83	79
n/10 „	100	91	69	59	52
n/5 „	100	37	11	—	—
n/2 „	100	18	—	—	—
n „	100	11	—	—	—

Glycerinhaltige Lösungen sind bei gewöhnlicher Temperatur monatelang haltbar¹. Auch wässrige Lösungen sind bei neutraler Reaktion sehr haltbar.

Durch Fischblasemembran dialysiert die Co-Tryptase nicht². Nach 8tägiger Dialyse gegen destilliertes Wasser fand man noch die ganze Menge Aktivator in dem Schlauch, während das Dialysat unwirksam war.

Die reinsten bisher erhaltenen Präparate enthalten noch Eiweiss. Die Millonreaktion und die Ninhydrinprobe fallen positiv aus, die Kohlehydratprobe nach Molisch dagegen negativ. Mit Pikrinsäure in saurer Lösung wurde keine Trübung beobachtet.

E. Wirkung der Co-Tryptase. Kinetik.

Wie wir oben im Zusammenhang mit der Tryptasewirkung berichtet haben, wissen wir nunmehr nach den Untersuchungen von Willstätter und Waldschmidt-Leitz, dass die Wirkung der Enterokinase (Co-Tryptase) die eines Aktivators ist. Tryptase und Co-Tryptase verbinden sich nach stöchiometrischen Gesetzen zu einem gegen Proteine aktiven Enzymsystem. Auf andere Enzyme als Tryptase hat die Co-Tryptase keine Wirkung. Die Einwirkung der Co-Tryptase zeigt mehrere Besonderheiten und verdient eine eingehendere Beschreibung³.

1. Zeitlicher Verlauf.

Die Aktivierung des Trypsinogens durch Co-Tryptase erfordert eine gewisse Zeit. Dies wurde schon in den Arbeiten der Pawlowschen Schule⁴ gefunden und seitdem durch alle zuverlässigen Untersuchungen bestätigt. Nach Waldschmidt-Leitz⁵ führen wir eine Tabelle an:

¹ Vernon, JI of Physiol. 28, 375; 1902.

² Waldschmidt-Leitz, H. 132, 229; 1923/24.

³ Siehe auch Waldschmidt-Leitz und Harteneck, H. 149, 203; 1925. — Terroine und Kahn-Masino, Arch. Int. Physiol. 26, 69; 1926.

⁴ Pawlow, Die Arbeit der Verdauungsdrüsen. Wiesbaden 1900.

⁵ Waldschmidt-Leitz, H. 132, 207; 1923/24.

Einwirkungszeit Min.	Angewandte Co-Tryptasemenge in ccm				
	0,00	0,02	0,06	0,10	0,20
0	0,11	0,26	0,69	—	1,27
10	—	0,45	0,94	1,03	1,58
30	—	0,56	1,00	1,36	1,69
60	—	0,58	1,01	1,40	1,65
120	0,08	—	1,03	—	—

Nach einer Einwirkungsdauer von etwa 30 Minuten bei 30° ist die Aktivierung beinahe vollständig. Es ist leicht zu sehen, dass die in der Tabelle zum Ausdruck kommende Wirkung unmöglich eine Enzymwirkung sein kann: vielmehr geht hervor, dass jede Menge Co-Tryptase eine bestimmte Menge Tryptase aktivieren kann. Diese von Hamburger und Hekma zuerst, allerdings durch nicht einwandfreie Versuche gefundene Tatsache beweist, dass die Einwirkung der Co-Tryptase in einer Bindung an das inaktive Enzym besteht. Aus den sehr genauen Versuchen von Waldschmidt-Leitz sei noch eine Tabelle angeführt:

Höchstaktivierung bei einer Pankreasprobe.

Kinaselösung ccm	g Trockendrüse		
	0,062	0,125	0,250
0,00	0,42	0,86	1,78
0,01	0,91	1,11	1,92
0,02	1,05	1,32	2,16
0,03	—	1,46	—
0,04	1,02	1,55	2,38
0,05	—	1,56	—
0,06	—	—	2,49
0,08	—	—	2,64
0,10	—	1,55	2,63
0,20	—	1,54	2,66

Die zur Höchstaktivierung eben ausreichende Menge Co-Tryptase ist der Tryptasemenge genau proportional. Aktiviert man eine bestimmte Menge Tryptase mit steigenden Mengen Co-Tryptase, so ist bei nicht allzu grossen Mengen die maximale Aktivierung der Co-Tryptasemenge proportional. Nimmt man sehr grosse Mengen Co-Tryptase, so kann natürlich die enzymatische Tätigkeit schliesslich nicht mehr steigen, wenn alle Tryptase aktiviert ist. Eine Figur aus Waldschmidt-Leitz' Arbeit sei angeführt (Fig. 62).

Einerseits ist nun gezeigt worden, dass die Aktivierung wenigstens bei kleinen Co-Tryptasemengen diesen proportional ansteigt. Daraus will man schliessen, dass die Bindung Enzym Co-Enzym recht vollständig ist. Andererseits hat Waldschmidt-Leitz selbst gezeigt, dass die Verbindung sehr leicht z. B. von Sorptionsmitteln zerlegt werden kann. Es spricht dies dafür,

dass die Dissoziation dieser Verbindung nicht besonders klein ist. Dies stimmt übrigens mit der oben gegebenen Kurve (Fig. 62). Vielleicht sind die Verhältnisse denen ähnlich, die man bei anderen Co-Enzymen, z. B. der

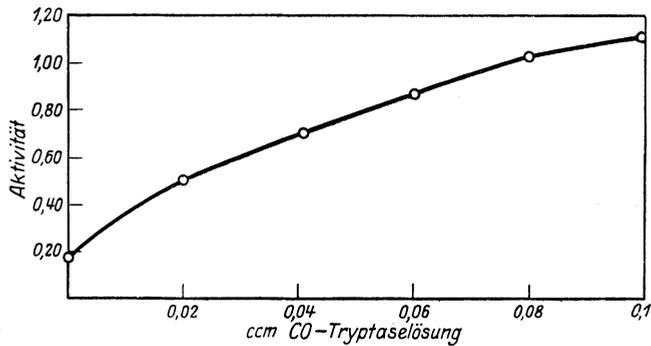


Fig. 62.

Co-Zymase gefunden hat¹. Dass wirklich eine chemische Bindung und nicht nur etwa eine Sorption zwischen Tryptase und Co-Tryptase eintritt, zeigt u. a. nach Waldschmidt-Leitz der zeitliche Verlauf der Aktivierung. Sorptionen pflegen dagegen momentan zu verlaufen.

2. Aktivierung bei verschiedener Acidität.

Nach Schepowalnikow² verläuft die Co-Tryptaseaktivierung am besten in neutraler Lösung, langsamer in saurer oder alkalischer. Diese Angaben sind später von mehreren Autoren bestätigt worden³. Eine Tabelle von Waldschmidt-Leitz führen wir an: Wirksamkeit in ccm Lauge angegeben

Einwirkungszeit Min.	pH der Einwirkung		
	5,3	7	8,9
30	0,78	0,96	0,68
60	1,02	0,98	0,69
90	0,98	0,97	0,60

Die Aktivierung verläuft also in saurer Lösung langsamer als in neutraler, erreicht aber denselben Grenzwert. In alkalischer Lösung ist der Grenzwert niedriger, weil hier die Zerstörung der aktivierten Tryptase gross ist.

3. Hemmung der Co-Tryptasewirkung.

Hekma fand, dass Glycerin die Selbstaktivierung der Tryptase verhindert. Über Hemmungen durch andere Stoffe haben Delezenne⁴ sowie

¹ Vgl. Teil I (3. Aufl.), S. 222. — Euler und Myrbäck, H. 136, 109; 1924. — Euler und Nilsson, H. 148, 23; 1925.

² Schepowalnikow, *Malys Jahresber.* 29, 378; 1899.

³ Vernon, *Jl of Physiol.* 28, 375; 1902. — Hekma, *Jl de Physiol. et Pathol. gén.* 6, 25; 1904.

⁴ Delezenne, *C. R. Soc. Biol.* 55, 132; 1903.

Bayliss und Starling¹ berichtet. Starke Hemmung durch Glycerin und noch mehr durch Äthylenglykol fand Waldschmidt-Leitz². Äthylalkohol und Mannit sind dagegen wirkungslos. Die durch Glycerin bedingte Hemmung lässt sich durch eine grössere Co-Tryptasemenge überwinden. Daraus schliesst Waldschmidt-Leitz, dass die Hemmungserscheinungen auf der Bildung von Additionsverbindungen der Kinase mit Alkohol beruhen.

Unbekannte Stoffe in der Drüse hemmen oft die Co-Tryptasewirkung. Daher kommt es, dass die durch eine gewisse Co-Tryptasemenge erhaltene maximale Aktivierung bei verschiedenen Pankreaspräparaten nicht gleich gross ist.

Beispiel³: 0,062 g Pankreaspulver, Kinaseauszug mit Wasser auf 2 ccm gebracht.

Aktivitätsangaben in ccm 0,2 n KOH.

Co-Tryptase ccm	Pankreasprobe Nr.		
	VIII	X	XI
0,00	0,00	0,11	0,19
0,02	0,91	0,78	0,78
0,10	1,10 1,13	1,12	1,09

¹ Bayliss und Starling, JI of Physiol. 32, 129; 1905.

² Waldschmidt-Leitz, H. 132, 213; 1923/24.

³ Waldschmidt-Leitz, ebenda S. 214.

20. Kapitel.

Pepsin.

Das bei stark saurer Reaktion wirksame proteolytische Enzym des Magens ist lange bekannt. Nachdem bewiesen worden war, dass die Verdauungsarbeit des Magens nicht als eine mechanische Wirkung anzusehen ist (Réaumur 1752) und auch nicht einfach auf den Einfluss der Salzsäure zurückgeführt werden kann, wurde erkannt (Spallanzani 1785), dass die durch den Magensaft bewirkte Eiweisspaltung ein Vorgang ist, den wir nunmehr als enzymatisch bezeichnen. Schwann¹ nannte den dabei wirksamen Stoff Pepsin.

Der Magensaft enthält ausser dem Pepsin das sog. Labferment (Chymosin) und eine Lipase. Die sonst im Magensaft gefundenen Enzyme stammen aus verschlucktem Speichel oder zurückgetretenem Darminhalt. Andere proteolytische Wirkungen des Mageninhaltes als die reine Pepsinwirkung sind also entweder der schwachen Wirkung des Labs zuzuschreiben oder evtl. Enzymen, die aus der verletzten Magenwand stammen. In der Magenwand kommen nämlich, wie in allen tierischen Organen, andere Proteasen vor, die z. B. bei der Autolyse deutlich in Wirksamkeit treten.

Das Studium des Pepsins begann eigentlich erst, als die Gewinnung von reinem Magensaft möglich wurde. Die Anlegung einer Dauerfistel an einen Hund gelang Basedow 1842. Verneuil führte die gleiche Operation 1876 am Menschen aus. Verbesserungen in der Operationstechnik und ein genaues Studium des Magensaftes und dessen Absonderung verdanken wir besonders Pawlow und seiner Schule. Vermutlich identisch mit dem Pepsin des Magensaftes ist das Enzym der Brunnerschen Drüsen².

Der Magensaft ist eine fast klare, saure Flüssigkeit. Die freie Säure dürfte ausschliesslich Salzsäure sein. Ihre Menge beträgt 4—6% des Magensaftes. Es sei gleich hier dringend davor gewarnt, einen gewissen Prozentgehalt von Säure als für die Pepsinwirkung optimal anzusehen. In jedem Versuch kann, je nach Art und Menge zugesetzter Stoffe, die Säuremenge verschieden sein, während die Wasserstoffionen-Konzentration optimal ist (siehe weiter S. 513 ff.).

¹ Schwann, Über das Wesen der Verdauungsprozesse. Müllers Archiv 1836, 90.

² Ponomarew, Zur Physiol. d. Brunnerschen Abt. d. Duodenums. Biochem. Zbl. 1, 351. — Pawlow und Parastschuk, H. 42, 415; 1901.

A. Substrate.

Das Pepsin greift unter keinen Umständen Polypeptide an, auch nicht die sog. Peptone.

Diketopiperazine werden vom Pepsin nicht gespalten¹. In welchem Grade die bei der Pepsinwirkung anwesende Salzsäure allein eine Veränderung der Diketopiperazine bewirkt, geht aus der von Euler und Pettersson² ausgearbeiteten pH-Stabilitätskurve dieser Stoffe hervor.

Die Protamine werden nicht hydrolysiert. So wurde Salmin von Kossel und Mathews³ untersucht. Die eigentümlichen Resultate von Takemura⁴ über die Spaltung von Clupein beruhen auf ungeeigneter Methodik und sind von Ruzozinsky⁵ mit dem Befund wiederholt worden, dass auch Clupein gegen Pepsin-HCl völlig resistent ist.

Die einfachsten durch Pepsin spaltbaren Stoffe sind Histone (Kossel⁶). Speziell wurden dabei auftretende Spaltprodukte von Felix⁷ untersucht (Histopepton, keine Aminosäuren).

Leicht gespalten werden viele der gewöhnlichsten Eiweissstoffe: Casein, Fibrin, Gelatine, Eieralbumin u. dgl.

Hämoglobin wird in Hämatin und Eiweiss zerlegt, das Globin wird dann weiter gespalten.

Aus den leimgebenden Geweben wird der Leim ausgelöst und in Gelatose und Peptone übergeführt.

Echtes Mucin aus der Submaxillardrüse liefert bei der Spaltung Peptone und eine reduzierende Substanz. Andere Mucine werden nicht angegriffen.

Elastin wird langsam gelöst. Aus diesem Grunde ist es als Substrat weniger geeignet.

Nucleoproteide werden äusserst langsam angegriffen⁸.

Haarkeratin und Seide werden nicht verändert.

Über Spaltung von phosphorylierten Proteinen haben Neuberg und Oertel Versuche angestellt⁹.

Von einer Übersicht über die Chemie der Substrate, wie sie bei der Behandlung anderer Enzyme gegeben wurde, muss hier abgesehen werden, da über diejenigen Gruppen dieser hochmolekularen Stoffe, welche die Angreifbarkeit durch Pepsin bedingen, noch gar keine festen Resultate vorliegen.

Hier sei nun weiter angeführt, dass Pepsin gerade diejenigen Bindungen

¹ Abderhalden und Goto, *Fermentf.* 7, 169; 1923.

² Euler und Erik Pettersson, *H.* 158, 7; 1926. Levene und Simms, *Jl Biol. Chem.* 61, 711; 1925.

³ Kossel und Mathews, *H.* 25, 190; 1898.

⁴ Takemura, *H.* 63, 201; 1909.

⁵ Ruzozinsky, *H.* 79, 398; 1912.

⁶ Kossel und Pringle, *H.* 49, 301; 1906.

⁷ Felix, *H.* 119, 66 u. 120, 94; 1922.

⁸ Schittenhelm, *Zbl. phys.-path. Stoffw.* 5, 49; 1910.

⁹ Neuberg und Oertel, *Biochem. Zs* 60, 506; 1914.

im Eiweissmolekül zu lösen scheint, die nur schwer von den anderen proteolytischen Enzymen angegriffen werden (Trypsin). So macht eine sehr kurze Vorverdauung mit Pepsin viele Eiweissstoffe der Einwirkung des Trypsins sehr viel leichter zugänglich.

Die Wirkung des Pepsins soll die noch nicht genau bekannten Bindungen zwischen den „Grundkörpern“ des Eiweisses treffen. So viel ist indessen bekannt, dass durch die Pepsinwirkung Aminostickstoff freigesetzt wird, und zwar bei verschiedenen Substraten etwa dieselbe Menge, 27—39% vom Totalstickstoff¹. Auf ungelöste Eiweissstoffe hat das Pepsin eine starke Wirkung, die natürlich unmittelbar ins Auge fällt. Dass nach Abderhalden Pepsin auf gelöste Eiweissstoffe anscheinend keine Wirkung hat, beruht auf dem Umstand, dass der Brechungsexponent der Lösung und die optische Aktivität derselben sich während der Pepsinverdauung nicht oder wenig ändern.

Ob bei der Pepsinverdauung keine strukturell chemischen Änderungen des Substrates bewirkt werden, wie viele Autoren es glauben, ist wohl zum wenigsten zweifelhaft. Es hängt dies mit der Auffassung zusammen, dass die Grundkörper des Eiweisses durch Nebervalenzen oder sogar nur durch eine physikalische Aggregation zusammenhängen. Abgesehen davon, dass die Einführung von unklaren kolloidchemischen Begriffen, die zu blossen Schlagworten werden, die Enzymchemie kaum gefördert hat, wird durch moderne Untersuchungen immer klarer, dass auch jene Bindungen, ebenso wie die Bindung des Enzyms an Substrat und Reaktionsprodukte, rein chemisch aufzufassen sind.

Auf den Einfluss des physikalischen Zustandes (Aggregatzustandes, Dispersitätsgrades) des Substrates kommen wir unten zurück.

B. Vorkommen des echten Pepsins.

Pepsin kommt im Magen aller untersuchten Vertebraten vor mit Ausnahme von einigen Fischen. Am reichsten an Pepsin ist der Fundusteil des Magens. Das proteolytische Enzym der Brunnerschen Drüsen im Duodenum dürfte echtes Pepsin sein². Wenigstens kommt keine Peptidase vor³.

(Es ist keine leichte Aufgabe, auf Grund des vorliegenden Tatsachenmaterials eine Entscheidung zu treffen, ob verschiedene, bei saurer Reaktion wirksame Enzyme Pepsine sind. Obgleich durch moderne Untersuchungen klar geworden ist, dass die pH-Kurve nicht ohne weiteres als ein Identitätsmerkmal angesehen werden darf, so soll doch hier bis auf weiteres nur dasjenige proteolytische Enzym Pepsin genannt werden, welches das pH-Optimum bei 1,6—2 hat.)

¹ Henriques und Gjaldbæk, H. 75, 362 und 83, 83; 1913.

² R. Schmidt, Weitere Untersuchungen über Fermente im Darminhalt. Dissertation München, 1914.

³ Abderhalden und Rona, H. 47, 359; 1906.

Bei einigen Tieren kommt das Pepsin schon in den Föten vor, bei anderen fehlt es bei der Geburt. Vom Magen aus kann das Pepsin in verschiedene Körperteile gelangen. Mit dem Mageninhalt wird es in den Darm geführt und findet sich in kleinen Mengen in beinahe dessen ganzer Länge¹, auch bei Föten und Neugeborenen². Da das Pepsin gegen eine selbst sehr schwach alkalische Reaktion sehr empfindlich ist, muss das Vorkommen im Darm dem Umstande zugeschrieben werden, dass es, an Eiweiss gebunden oder sorbiert, eine viel grössere Stabilität besitzt³. In den Fäces dürfte es normalerweise nicht vorkommen. In der Milz und den Nieren findet sich kein Pepsin⁴, auch nicht in der Leber⁵. Es kommt in sehr geringer Menge im Blut vor, in grösserer Menge im Harn, und zwar sowohl im normalen wie im pathologischen⁶. Das Harnpepsin stammt aus dem Magen, denn bei Hunden tritt es nach Totalexstirpation des Magens nicht auf⁷.

Identität der Pepsine verschiedener Tiere.

Die Versuche über diese Frage sind miteinander stark im Widerspruch, in vielen Fällen wegen ungeeigneter Methodik. Besonders ist die Art des Fischpepsins nicht ganz klar. Eine Untersuchung von Rakoczy⁸ ergab mehrere Unterschiede zwischen Pepsin vom Hunde und vom Hecht. Das letztere soll einige Eiweissstoffe nur schwer angreifen, die vom Hundepepsin glatt gespalten werden. Weiter soll es ein anderes Aciditätsoptimum und eine geringere Hitzestabilität besitzen. Ähnliche Verhältnisse fanden Oshima und Sasaki⁹ bei einer Untersuchung des Pepsins vom Silberlachs (*Oncorhynchus kisutch*, Walbaum). Sie fanden das Aciditätsoptimum $\text{pH} = 3,0$ (1,6 bei Schweinepepsin). Immerhin besitzen die Fischpepsine ein bedeutend saureres pH-Optimum als die Gewebspepsinasen.

C. Darstellung und Reinigung von Pepsinpräparaten.

Als Ausgangsmaterial nimmt man entweder den Pawlowschen Saft oder Extrakte aus der Magenschleimhaut. Im letzteren Falle kann das Pepsin durch Gewebspepsinasen verunreinigt sein.

Aus Magensaft sind die besten Präparate nach Pikelharing hergestellt

¹ Abderhalden und Meyer, H. 74, 67; 1911.

² R. Schmidt, Weitere Untersuchungen über Fermente im Darminhalt. Dissertation München, 1914.

³ Siehe weiter unten die Versuche von Ege.

⁴ Hedin, JI of Biol. Chem. 54, 177; 1922. — H. 122, 307; 1922.

⁵ Zachrisson, Upsala läkarefören. förh. 28, 333; 1923.

⁶ Hedin, H. 112, 202; 1920.

⁷ Matthes, Arch. exp. Path. 49, 107; 1903.

⁸ Rakoczy, H. 85, 349; 1913.

⁹ Oshima und Sasaki, JI of the Univ. of Agrik. and Forestry, Sapporo, Japan 16. 307; 1925.

worden¹. Klarer Magensaft eines Hundes wurde bei 0° dialysiert. Der dabei entstandene Niederschlag wurde abzentrifugiert und im Exsiccator getrocknet. In anderen Fällen wurde die Dialyse mehrmals nach Lösen des Niederschlages in verdünnter Salzsäure vorgenommen. Für die nach dieser Methode gewonnenen Präparate geben Nencki und Sieber² eine sehr komplizierte Zusammensetzung an; sie halten die Präparate jedoch für das reine Pepsin, was sicher bei weitem nicht zutrifft.

Aus Schleimhautextrakten erhielt Pekelharing nach etwa derselben Methode ungefähr gleich wirksame Präparate wie aus Fistelsaft. Nach Schrumpf kann nach der Buchnerschen Presssaftmethode aus der Schleimhaut ein sehr wirksamer Saft gewonnen werden. Durch Sorption an Cholesterin (siehe weiter unten) erhielt Schrumpf verhältnismässig gute Präparate³. Sehr wirksames Pepsin, das in vielen Fällen die Pekelharingschen Präparate übertrifft, gewann Hammarsten⁴ durch Fällen mit NaCl von Extrakt aus Schleimhaut.

Die Pepsinpräparate sind in Glycerin löslich. Das rohe Enzym kann auch mit diesem Lösungsmittel aus der Magenwand extrahiert werden. Die Glycerinlösungen des Enzyms, die wie gewöhnlich sehr haltbar sind, können mit Alkohol gefällt werden, wobei das Pepsin in den Niederschlag geht.

Die analytische Zusammensetzung der besten bisher gewonnenen Präparate ist natürlich durch die sicher in grossen Mengen anwesenden Verunreinigungen völlig entstellt. Die Präparate von Nencki und Sieber enthalten ein Nucleoprotein, ausserdem Fe und Cl. Indessen können nach den Pekelharingschen Methoden Präparate gewonnen werden, die frei von P und Cl sind und einen sehr geringen Aschengehalt aufweisen⁵. Eiweissfreie Pepsinpräparate sind von Sundberg⁶ und Schrumpf hergestellt worden. Die Pekelharingschen Präparate haben einen relativ hohen Schwefelgehalt (über 1,5%).

Pepsin dialysiert nicht durch gewöhnliche Membrane⁷.

Sorption.

Wie bei vielen anderen Enzymen dürfte auch hier zu erwarten sein, dass die Sorptionsmethoden bei der Pepsinreinigung gute Dienste leisten werden. Noch ist darüber recht wenig gearbeitet.

¹ Pekelharing, H. 22, 233; 1896/97. — Ringer, H. 75, 282; 1911.

² Nencki und Sieber, H. 32, 291; 1901.

³ Schrumpf, Hofm. Beitr. 6, 396; 1905.

⁴ O. Hammarsten, H. 108, 243; 1919 und 121, 240 und 261; 1922.

⁵ Pekelharing, H. 35, 8; 1902 und 75, 282; 1911. — Ringer, H. 95, 195; 1915. — Dezani, Arch. Ital. Biol. 54, 15; 1911.

⁶ Sundberg, H. 9, 319; 1865.

⁷ Hammarsten, Malys Jahrb. 3, 160.

Pepsin wird sehr leicht von verschiedenen Stoffen sorbiert¹. Nimmt man an, dass die pH-Kurve des Enzyms durch die elektrochemischen Eigenschaften desselben wenigstens teilweise bestimmt wird, so ist es erklärlich, dass das Enzym am leichtesten von basischen Sorbentien aufgenommen wird. Schon Brücke² fand, dass Pepsin leicht von allerhand ausfallenden Niederschlägen mitgerissen wird. Die Sorption an Cholesterin ist zur Reinigung des Pepsins angewandt worden. Dabei wird die rohe Enzymlösung mit kleinen Mengen einer ätherischen Lösung von Cholesterin geschüttelt; die ausgefallenen Cholesterinflocken werden abfiltriert und das Sorbat mit Äther zersetzt. Das Sorbat ist selbst wenig wirksam³, d. h. Gruppen, die für die enzymatische Spaltung notwendig sind, werden bei der Sorption beansprucht.

An Fibrinflocken wird in schwach saurer Lösung das Pepsin gebunden und kann wieder durch verdünnte Sodalösung abgelöst werden⁴. Auch an andere feste Eiweissstoffe wird es leicht gebunden (Elastin: Abderhalden⁵). Möglicherweise kann diese Sorption in der Reinigungsarbeit Verwendung finden. Eine Sorption an einem ausfallenden Niederschlag ist wohl auch die Fällung des Pepsins aus roher Lösung mit Safranin (Marston⁶).

Tierkohle sorbiert bei pH = 1—2, Phosphate und Citrate eluieren bei pH = 6,8 bzw. 5,0 (K. Kikawa).

Eine nicht erwünschte Sorption des Pepsins an Stoffen des Mageninhaltes tritt oft, besonders bei abnorm kleinem Säuregehalt des Magensaftes, ein. Eine gründliche Untersuchung über diesbezügliche Bindung des Enzyms ist von Ege⁷ ausgeführt. Er zeigt, dass die Sorption stark von der Acidität abhängig und vollkommen reversibel ist. (In dieser Untersuchung auch interessante Notizen über Pepsin- und Salzsäuretherapie.)

Pepsin wird von Tonerde leicht gebunden. Die Angabe von Rakusin⁸, dass die Bindung irreversibel ist, verdient wohl Nachprüfung.

D. Kinetik.

1. Einfluss der Enzymmenge.

Die zur Erklärung der enzymatischen Wirksamkeit nunmehr allgemein angenommene Theorie über die Bindung zwischen Enzym und Substrat wird in diesem Falle durch folgende Formel ausgedrückt:

$$\frac{[\text{freies Pepsin}] \times [\text{Substrat}]}{[\text{Enzym-Substratverbindung}]} = K.$$

¹ Michaelis und Ehrenreich, *Biochem. Zs* 10, 292, 1908.

² Vorlesg. über *Physiol.* 1, 291; 1874.

³ Dörle, *Zs exp. Med.* 34, 406; 1923.

⁴ Jacoby, *Arch. exp. Path.* 2, 247; 1906.

⁵ Abderhalden und Strauch, *H.* 71, 315; 1911. — Abderhalden und Friedel, *H.* 71, 449; 1911.

⁶ Marston, *Biochem. Jl* 17, 851; 1923.

⁷ Ege, *Ugeskrift for Laeger*, Nr. 38, 1922.

⁸ Rakusin, *Jl russ. phys.-chem. Ges.* 47, 141; 1915 und 47, 1055; 1915 nach *Chem. Zbl.*

Die Konzentration der Moleküle der Enzym-Substratverbindung bestimmt die Geschwindigkeit der Reaktion. Da nun sicher hier wie bei allen Enzymreaktionen die Konzentration des Enzyms gegen die des Substrates zu vernachlässigen ist, so folgt, dass bei gleichbleibender Substratkonzentration die Reaktionsgeschwindigkeit der Enzymmenge direkt proportional sein muss. Es wird betont, dass man beim Studium dieser Frage von der obigen Grundgleichung ausgehen soll und nicht umgekehrt auf den Resultaten von Versuchen mit unreinem Enzym, unreinem Substrat und mangelhafter Methodik komplizierte Theorien aufbauen. Zeigt es sich, dass trotz sorgfältiger Ausführung der Versuche nach einer einwandfreien Methodik Abweichungen von dem Proportionalitätsgesetz vorhanden sind, so ist dies auf äussere Einflüsse zurückzuführen, auf Enzymzerstörung, auf Einwirkung von unbekanntem Hemmungskörpern, Giften u. dgl. Hier bietet gerade die Pepsinwirkung ein lehrreiches Beispiel:

Durch Studium der Pepsinverdauung wurde nämlich E. Schütz¹ zu seiner bekannten Regel geführt, die seitdem der Anlass zu einer enormen Menge Arbeiten auf allen Gebieten der Enzymchemie gewesen ist, die aber sehr wenig zu einer klaren Auffassung der wirklichen Verhältnisse beigetragen hat.

Nach Schütz ist, wenn F die Enzymmenge und x die nach einer bestimmten Zeit umgesetzte Menge bedeutet,

$$x = k \sqrt{F}.$$

Diese Gleichung sagt also, dass die Reaktionsgeschwindigkeit (anfangs) der Quadratwurzel aus der Enzymmenge direkt proportional ist.

Eine grosse Zahl von Versuchen, welche die Schützsche Regel scheinbar stützen, sind mit einer solchen Methodik angestellt worden, dass man überhaupt keine Schlüsse ziehen darf.

Aber neben diesen trifft man auch solche Untersuchungen, in denen nach einwandfreier Methode eine annähernde Übereinstimmung gefunden wurde. Bemerkenswert sind die grundlegenden Untersuchungen von Sjöqvist². Methodisch sind sie deshalb wichtig, weil hier zum erstenmal die Leitfähigkeit als Mass der Geschwindigkeit gewählt wurde. Als Substrat nahm Sjöqvist salzfreies Ovalbumin.

Eine gewisse Klärung der Verhältnisse verdanken wir Northrop. Er konnte erstens zeigen, dass für einige, besonders reine Pepsinlösungen eine völlige Proportionalität zwischen Reaktionsgeschwindigkeit und Enzymmenge herrschte³.

Die Methode gründete sich auf die Bestimmung der elektrischen Leitfähigkeit nach Sjöqvist⁴. Es wurde im Beginn der Reaktion, wo die

¹ E. Schütz, H. 9, 577; 1885. — J. H. Schütz, H. 30, 1; 1900.

² Sjöqvist, Skand. Arch. Physiol. 5, 317; 1895.

³ Northrop, JI of Gen. Physiol. 2, 113; 1919.

⁴ Sjöqvist, Skand. Arch. Physiol. 5, 277; 1895.

Spaltung der Zeit proportional ist, die Zeit bestimmt, die bei verschiedenen Pepsinmengen zu einer bestimmten kleinen Umsetzung nötig war. Wir führen folgende Tabelle an¹:

Zugesetzte Enzymmenge	Beobachtete Zeit (Min.)		Berechnete relative Enzymmenge (Mittel)
	Vers. 1	Vers. 2	
100	6,0	8,1	(100)
50	11,8	14,4	53
25	22,4	32,0	26
12,5	44,0	—	13,6

Weiter fand nun Northrop bei anderen Pepsinpräparaten keine Proportionalität, sondern die relative Aktivität war bei grösseren Enzymmengen kleiner². In der Fig. 63 sind zwei Versuchsreihen veranschaulicht.

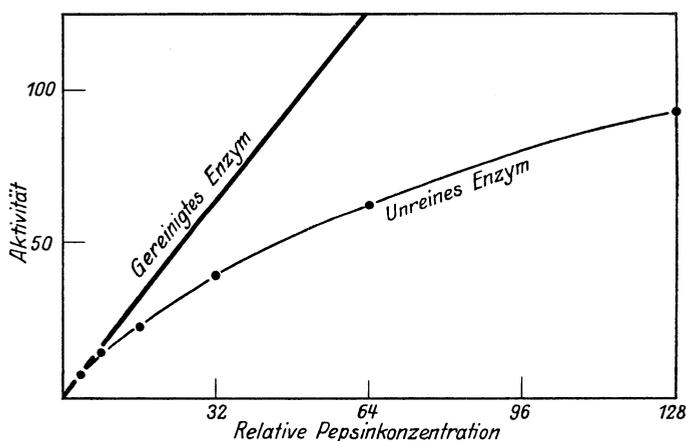


Fig. 63.

Dieses Verhalten der unreineren Enzymlösung führt Northrop auf die Anwesenheit eines Stoffes zurück, der mit dem Pepsin eine dissoziierende Verbindung bildet. In undissoziiertem Zustande ist diese Verbindung enzymatisch inaktiv. Dieser hypothetische Stoff wäre den bei anderen Enzymen bekannten Hemmungskörpern analog. Die einfache Erklärung Northrops wurde durch eine mathematische Behandlung gestützt, und dadurch bewiesen, dass es gelang, durch Zusätze von bestimmten Stoffen (von Northrop Peptone genannt) zu der reinen Pepsinlösung ein gleichartiges Verhalten hervorzurufen. Die Hemmungsstoffe werden wahrscheinlich durch das Enzym aus den in der unreinen Lösung vorkommenden Eiweissstoffen gebildet, und die ganze Erscheinung wird also auf die bekannte Hemmung durch die Reaktionsprodukte zurückgeführt.

Eine endgültige Aufklärung der Kinetik der Pepsinwirkung setzt natürlich

¹ Zu genau demselben Resultat kamen später Rona und Kleinmann, Biochem. Zs 140, 478; 1923.

² Northrop, JI Gen. Physiol. II, 471; 1920.

die Einsicht in die Natur des vom Pepsin ausgelösten chemischen Vorganges voraus, über den bis jetzt noch die verschiedensten Ansichten bestehen (vgl. hierzu auch das 16. Kapitel). Es ist zu hoffen, dass die Untersuchung der Spaltung der einfachsten, von Pepsin angreifbaren Stoffe hier wichtige Schlüsse erlauben wird. Wie bei der Tryptase- und Erepsinspaltung des Clupeins hat Waldschmidt-Leitz in neuester Zeit bei der Spaltung der Histone durch Pepsin und andere Proteasen die Verteilung der enzymatisch lösbaren Bindungen auf die einzelnen Enzyme untersucht, was natürlich in hohem Grade zur Klärung sowohl der Konstitution der spaltbaren Stoffe wie der Wirkungsweise der Enzyme beitragen wird.

Temperaturkoeffizient der Pepsinspaltung. Herzog¹ hat nach der Mettschen Methode die Konstante Q der Formel

$$k_2 = k_1 \cdot e^{\frac{Q(T_2 - T_1)}{R \cdot T_1 \cdot T_2}}$$

bestimmt. In folgender Tabelle bedeutet k die Reaktionskonstante.

t	14°	19,4°	25,2°	28,9°	35,8°
k gef.	0,95	(2,14)	3,67	(4,9)	7,7
k ber.	1,35	2,14	3,42	4,9	7,70

Aus den eingeklammerten Werten findet man Q = 15 000.

Im Temperaturintervall 30° bis 40° fanden Rona und Kleinmann² den Temperaturkoeffizienten 1,9.

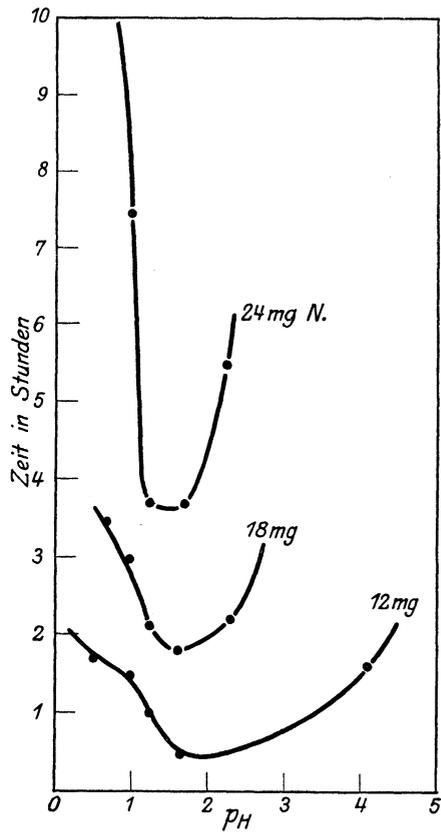


Fig. 64.

2. Aktivitäts-pH-Kurve.

Sehr früh wurde die Bedeutung der sauren Reaktion für die Pepsinwirkung erkannt. Man nahm eine Verbindung Pepsin-HCl an oder glaubte wenigstens, dass die Anionen für die Säurewirkung massgebend seien. Durch die klassischen Untersuchungen von Sørensen über die Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration für die Geschwindigkeit der Fermentreaktionen erschien auch die Pepsinwirkung im neuen Lichte. Die erste pH-Kurve stammt von Sørensen³. Seine Methode war die Bestimmung der

¹ Herzog, Zs f. allg. Physiol. 4, 163; 1904.

² Rona und Kleinmann, Biochem. Zs 159, 146; 1925.

³ Sørensen, Biochem. Zs 21, 288; 1909.

nach verschiedenen Zeiten durch Gerbsäure bzw. Stannochlorid fällbaren Menge Stickstoff. In Fig. 64 fasst Sørensen seine Resultate zusammen. Bei längeren Versuchszeiten verschiebt sich das Optimum gegen die saure Seite. Dies dürfte auf der bei wechselnden Aciditäten verschiedenen Kinetik beruhen, nicht auf Enzymzerstörung, wie Sørensen annahm.

Weitere Versuche über den Einfluss von verschiedenen Säuren und Salzen haben Michaelis und Mendelsohn¹ ausgeführt: Substrate waren Edestin und Casein. Salzsäure, Salpetersäure, Weinsäure und Oxalsäure gaben dasselbe Optimum bei $\text{pH} = 1,7$. Salze, die die Acidität nicht ändern, verschieben das Optimum nur sehr unbedeutend gegen die weniger saure Seite².

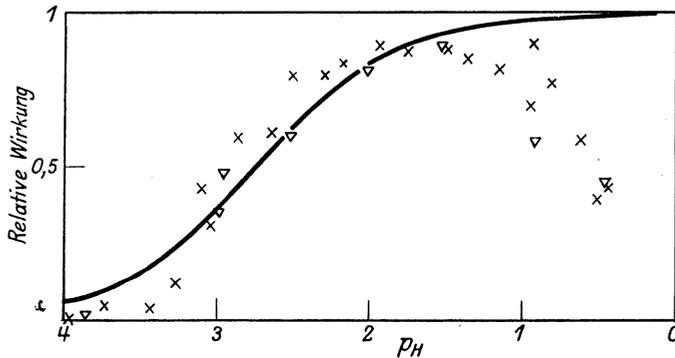


Fig. 65.

× Versuche mit Edestin. Δ Versuche mit Casein. Ausgezogene Kurve = theoretische Dissoziationskurve.

Michaelis führt nach dem Vorgange von J. Loeb³ die Kurve auf eine Dissoziationskurve zurück, und zwar nimmt er auf Grund von Überführungsversuchen⁴ an, dass die Kationen des Pepsins wirksam sind⁵. Nunmehr wissen wir, dass Überführungsversuche an unreinen Enzymlösungen oft gar nichts über den wahren elektrochemischen Charakter des Enzyms aussagen; da es ferner nach dem Folgenden vermutlich gerade die Eiweisskationen sind, die vom Enzym gebunden und gespalten werden, so ist es, wenn man überhaupt eine Bindung des Enzyms an das Substrat annimmt, wahrscheinlicher, dass die Anionen des Pepsins wirksam sind. Dies ist in guter Übereinstimmung mit den Überführungsversuchen von Pekelharing und Ringer⁶, die fanden, dass gereinigtes Pepsin in saurer Lösung immer als Anion vorhanden ist.

¹ Michaelis und Mendelsohn, *Biochem. Zs* 65, 1; 1914.

² Über die Puffer bei pH-Bestimmungen in Pepsinlösungen siehe Smorodinzew und Adolf, *Bull. Soc. Chim. Biol.* 7, 1060; 1925.

³ J. Loeb, *Biochem. Zs* 19, 534; 1909.

⁴ Michaelis und Davidsohn, *Biochem. Zs* 28, 1; 1910.

⁵ Michaelis und Mendelsohn, *Biochem. Zs* 65, 1; 1914.

⁶ Pekelharing und Ringer, *H.* 75, 282; 1911.

Es sei hervorgehoben, dass die pH-Kurve gewiss auch durch andere Theorien gedeutet werden kann. Es ist natürlich überhaupt nicht notwendig, sich die Bindung Enzym-Substrat als eine Salzbildung vorzustellen. Bei manchen Enzymreaktionen ist dies sicher gar nicht der Fall und auch hier sind andere Bindungsarten denkbar. Auch bei den proteolytischen Enzymen wird sich wahrscheinlich die Annahme von der mehrfachen Bindung des Substrates ans Enzym¹ für das Verständnis der enzymatischen Wirkung als nützlich erweisen.

In den oben zitierten Versuchen von Michaelis fällt es auf, dass das pH-Optimum für die beiden Substrate dasselbe ist. Dies ist auffallend, da

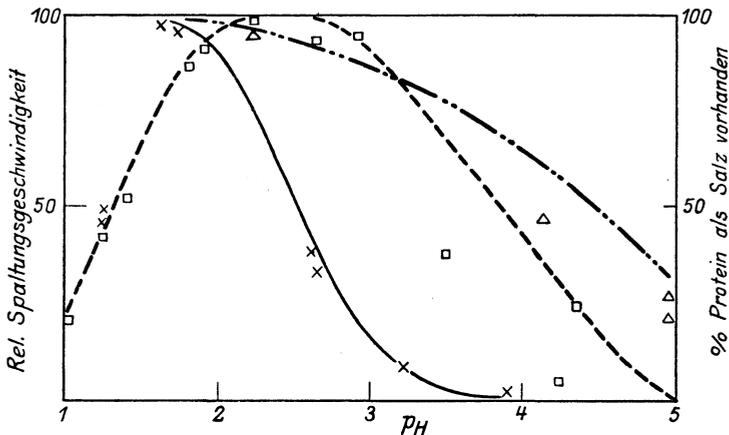


Fig. 66.

Casein ——— x x x Gelatin — — — □ □ □ Hämoglobin — · · · · · △ △ △

nach Northrop die pH-Kurve mit dem Substrat variiert². Die verschiedenen Befunde hängen wahrscheinlich mit den angewendeten Bestimmungsmethoden zusammen. Nachdem Euler³ und später Arrhenius⁴ in mehreren Arbeiten den Gedanken zum Ausdruck gebracht hatten, dass die Einwirkung der Acidität auf die enzymatische Proteolyse mehr als eine Wirkung auf das Substrat als auf das Enzym aufzufassen sei, konnte Northrop in mehreren Arbeiten zeigen, dass die pH-Kurven der Pepsinverdauung der verschiedenen Substrate recht gut mit den Ionisationskurven derselben zusammenfallen. Die Spaltung wurde nach der Sørensenschen Formolmethode und van Slykes HNO₂-Methode verfolgt und die Ionisation durch Leitfähigkeitsmessungen bestimmt. In Fig. 66 stellen die Kurven die Ionisation der Proteine dar. Die Punkte geben die relativen Spaltungsgeschwindigkeiten an.

Bei Casein ist die Übereinstimmung sehr gut, weniger bei Hämoglobin, schlecht bei Gelatine. Immerhin ist es, auch wenn die Northropsche

¹ Euler, H. 143, 79; 1925.

² Northrop, JI Gen. Physiol. 5, 263; 1922.

³ Euler, H. 51, 213; 1907.

⁴ Quantitative laws in biological chemistry, London 1915.

Theorie eine zu einfache Verallgemeinerung ist, klar, dass die Aciditätskurve des Pepsins mit den elektrochemischen Eigenschaften des Substrates variiert. Als sicher dürften wir annehmen können, dass die pH-Kurve nicht wie in der ursprünglichen Theorie von Michaelis nur von dem Dissoziationszustand des Enzyms abhängt. Am wahrscheinlichsten ist wohl der schon in der Literatur zum Ausdruck gekommene Gedanke, dass sowohl die Salzbildung des Substrates wie die des Enzyms (und möglicherweise noch andere Faktoren) die Aktivitätskurve des Pepsins bestimmen. Besondere Beachtung fordern die Eigenschaften der Enzymsubstratverbindung, denn obgleich die Salzbildung von Enzym und Substrat wahrscheinlich die Bildung der Enzymsubstratverbindung beeinflussen, so sind doch die Eigenschaften dieser Verbindung für deren Zerfallsgeschwindigkeit bestimmend. (Northrop hat seine Annahme, dass sich das Pepsin nicht mit dem Substrat kombiniere, wieder verlassen.)

Aus der nach Drucklegung dieser Darstellung erschienenen wichtigen Arbeit von Waldschmidt-Leitz und E. Simons (H. 156, 114) können wir nurmehr kurz erwähnen, dass das Verhältnis $\text{NH}_2 : \text{COOH}$ bei der Pepsinspaltung nahe konstant = 1 gefunden wurde.

3. Physikalischer Zustand des Substrates.

Eine Streitfrage ist, wie der physikalische Zustand des Substrates die Enzymwirkung beeinflusst. Nach der alten Theorie zur Erklärung des Einflusses der Säure auf die Pepsinwirkung sollte die Säure die Eiweissstoffe durch Quellung vorbereiten und dadurch erst die Spaltung ermöglichen. Diese Ansicht geht sogar auf Brücke¹ zurück, und wurde in neuerer Zeit wieder von Wo. Ostwald aufgenommen². Nur schwer lassen sich indessen Tatsachen ausfindig machen, die dafür sprechen, dass die „Hydratation“ oder „Quellung“ bei der enzymatischen Eiweisspaltung von Wichtigkeit ist³. Vielmehr sprechen auch hier die modernen Untersuchungen eher gegen als für eine wesentliche Bedeutung des sog. kolloiden Zustandes auf die Reaktionsfähigkeit von eiweissartigen Substraten. So ist z. B. durch die Untersuchungen von Loeb⁴ bekannt, dass die Quellung, der osmotische Druck, die Viscosität usw. in hohem Grade davon abhängt, ob die zur Einstellung der Acidität zugesetzte Säure oder Base monovalent oder bivalent ist. Dagegen ist der chemische Effekt (die Salzbildung) der verschiedenen Säuren derselbe. Aus schon zitierten Untersuchungen⁵ folgt indessen, dass bei der Pepsinspaltung die Natur der zugesetzten Säure belanglos ist. Speziell hat

¹ Brücke, Sitzungsber. Akad. Wissensch. Math.-naturw. 36, 131; 1859.

² Wo. Ostwald, Koll. Zs 30, 243; 1922.

³ Interessant wäre in dieser Hinsicht eine nähere Untersuchung der von Felix beschriebenen Histonspaltung durch Pepsin (Verh. Deutsch. Physiol. Ges. Rostock 1925).

⁴ J. Loeb, Proteins and the theory of colloidal behavior. New York 1922.

⁵ Michaelis und Mendelsohn, l. c.

Northrop¹ nun, wie folgende Figur veranschaulicht, gezeigt, dass Salzsäure und Schwefelsäure bei derselben Acidität genau dieselbe Pepsinspaltung bewirken, obgleich der physikalische Zustand des Substrates in diesen beiden Fällen höchst verschieden ist.

Nunmehr ist festgestellt worden, dass alle Säuren (möglicherweise Essigsäure ausgenommen²) dasselbe pH-Optimum geben. Besonders interessant ist hier die Untersuchung von Guyemant³ über das diesbezügliche Verhalten der Sulfosalicylsäure. Diese Säure kann unter keinen Umständen das Eiweiss durch Quellung vorbereiten. Vielmehr ist es eines der besten Fällungsmittel für Eiweiss. Versuche mit Sulfosalicylsäure, bei denen das Substrat also

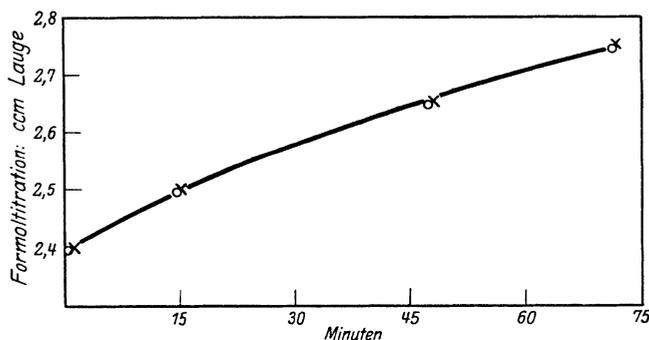


Fig. 67.

so gut wie vollständig ausgefällt war, ergaben genau dasselbe Optimum wie Salzsäure. Dagegen ist in diesem Falle, wie leicht zu verstehen, die absolute Geschwindigkeit etwas herabgesetzt, wenn die ganze Substratmenge in fester Form vorhanden ist.

Die Frage, wie sich das Pepsin zu festen Substraten verhält, verdient noch einige Worte: Es ist bekannt, dass feste Eiweissstoffe (koaguliertes Albumin u. dergl.), die von der Salzsäure allein nicht angegriffen werden, von Pepsin-Salzsäure leicht gelöst werden. Es ist sogar oft beobachtet worden, dass die Spaltungsgeschwindigkeit eines festen Substrates beinahe ebenso gross ist wie die desselben Substrates in gelöstem Zustande. Auf der Verwendung von festem Substrat beruhen viele der älteren Methoden zur Pepsinbestimmung (Mettsche Probe u. a.). Immerhin muss man beachten, dass die Verwendung eines festen Substrates die schon ohnedies genügend unklaren Verhältnisse bei der Eiweissverdauung noch verwickelter macht und deren Zurückführung auf bekannte chemische Gesetze erschwert. Damit ist natürlich nicht gesagt, dass das Studium der Lösung der festen Eiweissstoffe nicht, z. B. für die Physiologie, von grosser Bedeutung sein kann.

¹ Northrop, JI Gen. Physiol. 5, 263; 1922.

² Northrop, JI Gen. Physiol. 1, 607; 1919.

³ Guyemant, Biochem. Zs 20, 105, 155; 1920.

Möglicherweise können solche Versuche auch dazu beitragen, die unbekanntenen Veränderungen der Eiweissstoffe, z. B. bei der Hitzeoagulation, zu klären.

4. Einfluss der Konzentration des gelösten Substrates.

Zuerst seien einige Versuchsreihen von Northrop angeführt¹: Substrat: Eieralbumin. Die Anfangsgeschwindigkeit durch Leitfähigkeitsmessungen ermittelt. Zwei Versuchsreihen mit verschiedenen Enzympräparaten. Kurve I: pH = 1,80, Kurve II: pH = 1,60.

Wir sehen aus der Figur 68, dass die Geschwindigkeit anfangs etwa proportional der Substratkonzentration ansteigt, um später relativ kleiner zu

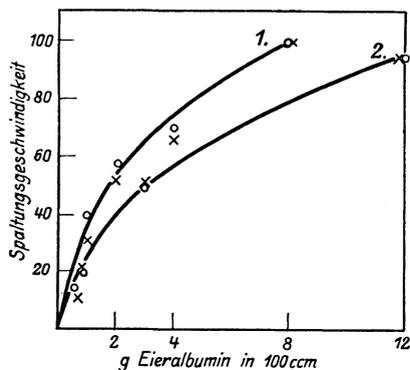


Fig. 68.

werden. Schliesslich wird ein Maximum erreicht, was der vollständigen Bindung des Enzyms entspricht. (In sehr konzentrierten, viscösen Lösungen fällt die Reaktionsgeschwindigkeit wieder ab, was vermutlich mit der verringerten Diffusionsgeschwindigkeit zusammenhängt.)

In recht guter Übereinstimmung mit diesen Versuchen stehen diejenigen von Rona und Kleinmann². Hier wurde das unveränderte Substrat bestimmt (nephelometrische Methode). Leider geben die Verfasser nur die relativen Substratkonzentrationen an. Aus vielen Versuchsreihen sieht man indessen, dass die Spaltungsgeschwindigkeiten, die anfangs der Substratkonzentration annähernd proportional sind, mit steigender Substratmenge immer langsamer zunehmen, um einem Maximum zuzustreben.

Scheinbar in völligem Widerspruch damit stehen dagegen die Versuche von Herzog und Margolis³. Substrat war auch hier Ovalbumin. Die Spaltung wurde durch Wägen des nach verschiedenen Zeiten noch hitzeoagulierbaren Eiweisses bestimmt. Wir führen eine Tabelle an:

Scheinbar in völligem Widerspruch damit stehen dagegen die Versuche von Herzog und Margolis³. Substrat war auch hier Ovalbumin. Die Spaltung wurde durch Wägen des nach verschiedenen Zeiten noch hitzeoagulierbaren Eiweisses bestimmt. Wir führen eine Tabelle an:

Substrat-konzentration g Ovalbumin in 100 ccm	g Ovalbumin fällbar	Nicht fällbar = Umgesetzte Menge	Reaktions- geschwindigkeit Monomol. Konstante
0,092	0,051	0,041	0,256
0,185	0,147	0,038	0,100
0,277	0,236	0,041	0,070
0,370	0,332	0,038	0,047
0,462	0,432	0,030	0,029

¹ Northrop, JI of gen. Physiol. 2, 595; 1920.

² Rona und Kleinmann, Biochem. Zs 140, 461, 478; 150, 444; 155, 39; 1924. — 159, 146; 1925.

³ R. O. Herzog und Margolis, H. 60, 298; 1909.

Nach diesen Versuchen wären im Anfang der Reaktion die umgesetzten Mengen etwa gleich. Dies entspricht in der Figur einer wagerechten Geraden. Versuchen wir nun die Ursache dieser schlechten Übereinstimmung zwischen den Northropschen Versuchen und denen von Herzog und Margolis zu finden, so ist zu bemerken, dass die Bestimmungsmethoden ganz verschieden sind. Abgesehen davon, dass die Methoden mehr oder weniger genau arbeiten können, so bestimmt man im einen Falle die Reaktionsprodukte, im zweiten das unveränderte Substrat. In diesem Fall betrifft die Messung also die erste Phase des Pepsinabbaues, der, wie wohl anzunehmen ist, in mehreren Stufen verläuft. Die Geschwindigkeit jeder Reaktionsstufe wird unter anderem von der Affinität des Enzymes zu dem zu spaltenden Stoffe bestimmt. Ist die Affinität des Pepsins zum Ovalbumin, wie auch aus anderen Gründen wahrscheinlich ist, sehr hoch, so erklärt dies die Resultate von Herzog und Margolis. Ist dagegen die Affinität des Enzyms zu einem der ersten Abbauprodukte verhältnismässig klein, so wird die Spaltungsgeschwindigkeit dieses Stoffes mit der Substratkonzentration rasch ansteigen, wie Northrop in seinen Versuchen fand. Wie dem auch sei, so dürften die verschiedenen Bestimmungsmethoden nach dem oben Gesagten eine einigermaßen getrennte Untersuchung einiger Reaktionsstufen des Pepsinabbaues erlauben.

Ein interessantes Beispiel für die ausschlaggebende Bedeutung der Bestimmungsmethode bieten einige Versuchsreihen von Rona und Kleinmann¹. Sie untersuchten die Eiweisspaltung nephelometrisch und fanden mit dieser Methode keine Hemmung durch Eiweisspaltprodukte, sei es, dass diese enzymatisch oder durch Säurehydrolyse gewonnen waren.

5. Salzwirkungen.

Von den älteren Arbeiten sind nur wenige von Wert, da der Einfluss der Salze von dem der Acidität nicht getrennt wurde. In den meisten Fällen, auch in neueren Arbeiten, ist die behauptete Wirkung der sog. Neutralsalze nichts als eine Verschiebung der Acidität zu einem nicht optimalen, und was schlimmer ist, nicht gemessenen Wert.

In grossen Konzentrationen hemmen wie gewöhnlich alle Salze. Dagegen ist, wo eine einwandfreie Methodik zur Anwendung gekommen ist, nie eine Aktivierung beobachtet worden, welche über den bei optimaler Acidität ohne Salz gefundenen Wert hinausging. Dagegen können bei nicht optimaler Acidität geringe Aktivierungen durch Salze eintreten. (Die Abhängigkeit der Aktivierung eines Enzyms durch ein Salz von der Acidität tritt in neueren Untersuchungen über tierische Amylasen deutlich hervor.) Nach Michaelis und Mendelsohn² und besonders nach einer späteren

¹ Rona und Kleinmann, *Biochem. Zs* 159, 146; 1925.

² Michaelis und Mendelsohn, *Biochem. Zs* 65, 1; 1914.

Untersuchung von Rona und Kleinmann¹ bewirken die Neutralsalze eine kleine Verschiebung der pH-Kurve gegen die weniger saure Seite. Untersucht wurden die gewöhnlichen Ionen K, Na, Ca, Al, Cl, NO₃, SO₄.

6. Zeitlicher Verlauf.

Die Mehrzahl der alten Versuche sind wie gewöhnlich nach einer solchen Methodik angestellt, dass sie nur wenig über den wahren Verlauf der Pepsinspaltung aussagen.

In neueren Arbeiten ist oft ein angenäherter Anschluss an die Schütz'sche Regel gefunden worden:

$$x = k \cdot \sqrt{t}$$

(x = die zur Zeit t umgesetzte Menge des Substrates; k eine Konstante).

Wichtige Arbeiten verdanken wir hier Sjöqvist², die von Arrhenius später rechnerisch behandelt wurden. Hier kam die Leitfähigkeitsbestimmung zur Anwendung; nach Northrop liefert diese Methode Resultate, welche den nach der Formelmethode gewonnenen nicht parallel sind, für vergleichende Versuche ist sie aber doch gut geeignet.

Zu beachten ist, dass jede Bestimmungsmethode, auch wenn sie analytisch einwandfrei ist, einen ganz verschiedenen Reaktionsverlauf geben kann, je nachdem man das unangegriffene Eiweiss oder eines der Reaktionsprodukte bestimmt. Ehe wir über die allgemeine Wirkung der proteolytischen Enzyme besser unterrichtet sind, ist die Aufstellung komplizierter Formeln für den Reaktionsverlauf ohne Wert. So viel dürften wir indessen sagen können: Die in jedem Zeitmoment der enzymatischen Reaktion beobachtete Geschwindigkeit $\left(\frac{dx}{dt}\right)$ ist proportional mit der zu dieser Zeit anwesenden Menge der Enzymsubstratverbindung. Diese Grösse hängt nun ausser von der Wasserstoffionenkonzentration auch von der Anwesenheit enzymbindender, aber nicht spaltbarer Körper ab. Schon in rohen Pepsinlösungen kommen solche Stoffe vor, und durch die enzymatische Wirkung entstehen sie in grossen Konzentrationen. Mit verschiedenen Substraten wird man daher verschiedenen Reaktionsverlauf beobachten.

Die mit der nephelometrischen Methode von Rona und Kleinmann³ ausgeführte Untersuchung über die Pepsinspaltung des Serumalbumins ergab z. B. dass der Verlauf der Reaktion sich befriedigend durch die Formel der bimolekularen Reaktion darstellen liess.

Zeitlicher Verlauf der Sekretion des Pepsins. Durch eine grosse Reihe ausserordentlich wichtiger und interessanter Versuche aus dem

¹ Rona und Kleinmann, *Biochem. Zs* 150, 444; 1924.

² Sjöqvist, *Skand. Arch. Physiol.* 5, 317; 1895.

³ Rona und Kleinmann, *Biochem. Zs* 159, 146; 1925.

Institut für experimentelle Medizin in Petersburg, besonders von London¹, wurde festgestellt, wie sich der zeitliche Verlauf der Sekretion des Pepsins im Magensaft nach Reiz durch die per fistulam eingeführte Eiweissnahrung (Fleisch usw.) gestaltet. Diese grundlegenden Versuche erfordern eine eingehende Besprechung und werden — da sie ein besonderes biologisches Kapitel bilden — im III. Teil dieses Werkes behandelt.

E. Hemmungserscheinungen.

Anorganische Stoffe.

Tsuchihashi² untersuchte die Wirkung von Metallpulvern auf rohe Pepsinlösung. Nach einer bestimmten Einwirkungszeit wurde das Metallpulver abzentrifugiert und die Lösung geprüft. Bei diesen Versuchen kann die Wirkung der Metalle ausser auf Komplex- bzw. Salzbildung des Enzyms mit in Lösung gegangenen Metall auch auf einer Sorption des Enzyms an der Metalloberfläche beruhen. Kupfer und Zink schädigten stark, Kobalt und Eisen schwächer, Nickel gar nicht. Eine Regeneration des Kupfer-vergifteten Enzyms mit Glykokoll gelang nicht. Dies ist nichts Eigentümliches, wenn man bedenkt, dass eine Bildung von Glykokollkupfer bei $\text{pH} = \text{etwa } 1,5$ wenig wahrscheinlich ist.

Versucht man, solche Hemmungen durch Metallionen nach modernen Gesichtspunkten zu bearbeiten, so wird dies dadurch erschwert, dass sowohl Substrat als Reaktionsprodukte Metalle stark binden. Dass indessen auch sehr kleine Mengen Metallsalz inaktivieren können, hat Hata gezeigt³. Eine Regeneration nach Quecksilbervergiftung gelang ihm nicht, was auch er auf die stark saure Reaktion zurückführt.

Auch von Arbeiten über sog. Vergiftungen mit anorganischen Stoffen ist eine grosse Anzahl theoretisch nicht benutzbar, da die Acidität nicht berücksichtigt worden ist. Die älteren Resultate von Smorodinzew und Riabouschinsky⁴ über die Einwirkung von Arseniat, Tartrat usw. (Anwendung des alkalischen Salzes Na_2HAsO_4 !) haben diese Forscher durch Aciditätsmessungen ergänzt.

Fluoride, deren Wirkung physiologisch von Interesse sein kann, hemmen in mässigen Konzentrationen nicht (Vandeveld und Poppe⁵).

NaHSO_3 hemmt nicht, was nach einer Mitteilung von Elisabeth Rona, die in mancher Hinsicht die Kritik herausfordert, darauf hindeuten soll, dass im Pepsinmolekül keine Aldehydgruppe vorhanden ist⁶. Die Entscheidung

¹ E. S. London, H. 45, 381; 1905. — 49, 359; 1906. — 56, 394; 1908. — 60, 194; 1909.

² Tsuchihashi, Biochem. Zs 140, 149; 1923.

³ Hata, Biochem. Zs 17, 159; 1909.

⁴ Smorodinzew und Riabouschinsky, Biochem. Zs 144, 26; 1923. — 168, 73; 1925.

⁵ Vandeveld und Poppe, Biochem. Zs 28, 134; 1910.

⁶ Elisabeth Rona, Biochem. Zs 109, 282; 1920. — Es sei hierzu bemerkt, dass nicht alle Arten von Aldehyden Sulfit addieren. Auch Elisabeth Ronas Versuche mit Hydroxylamin dürften bis jetzt die Abwesenheit einer Aldehydgruppe nicht beweisen.

über die Gegenwart dieser und anderer Gruppen in einem Enzymmolekül auf Grund von Giftwirkungen verlangt allerdings noch weitere, vielseitigere Untersuchungen unter Variation der Versuchsbedingungen.

Organische Stoffe.

Kleine Mengen Toluol und Chloroform sind unschädlich; grössere sollen hemmen (Astruc und Renaud¹, Grober²). Wo ungelöstes Toluol usw. vorkommt, kann eine Hemmung durch Sorption an der Grenzfläche eintreten.

Äthylalkohol hemmt stark in grösseren Mengen (20% Haneborg³). Höhere aliphatische Alkohole sind wirkungslos. Benzylalkohol hemmt stark⁴.

Formaldehyd wirkt ungewöhnlich schwach: 24 stündige Einwirkung von 10% Formaldehyd schädigt nicht (Johannessohn⁵). Allerdings kann hier eine Schutzwirkung von Verunreinigungen der Enzymlösung vorhanden sein.

In den meisten Fällen kann auch hier eine Aciditätsänderung beim Zusatz des Giftes die Ursache der beobachteten Hemmung sein. In den sehr vielen Versuchen, wo sowohl Aktivierungen wie Hemmungen durch denselben Stoff beobachtet worden sind, ist dies im allgemeinen der Fall. Für die Chemie des Pepsins sind solche Untersuchungen wertlos, dagegen können sie für die Physiologie vielleicht von Bedeutung sein, da es ja hier gleichgültig ist, ob eine schädliche Verzögerung der Pepsinverdauung auf Aciditätsänderung oder auf spezifische Giftwirkung eines Stoffes beruht.

Über die Wirksamkeit des Pepsins in adsorbiertem Zustand siehe S. 510; ferner Kikawa (Jl of Biochem. 6, 275; 1926).

F. Bestimmung der Wirksamkeit.

Es ist zuerst notwendig, ein Substrat zu finden, das leicht rein und in grossen Mengen gewonnen werden kann, und das eine genaue Bestimmung der Spaltung erlaubt. In diesen Hinsichten dürfte Gelatine anwendbar sein wie es Willstätter bei Arbeiten über Trypsin fand⁶. Die Bestimmung der Spaltung dürfte in diesem Falle am besten nach einer Methode geschehen, durch welche der Zuwachs des freien Aminostickstoffs oder Carboxyls gemessen wird. Die Bestimmung der Spaltung wird im Anfang der Reaktion vorgenommen, um die Einwirkung der Spaltprodukte möglichst auszuschalten, und die Anfangsgeschwindigkeit wird durch eine (wenigstens für den ersten Teil der Reaktion) gültige Reaktionskonstante ausgedrückt. Mit hinreichender Genauigkeit dürfte man mit der monomolekularen Konstante rechnen können.

¹ Astruc und Renaud, Jl de Pharm. et de Chim. 25, 81; 1922.

² Grober, Pflüg. Arch. 104, 109; 1904.

³ Haneborg, Acta med. Scand. Suppl. 1, 1; 1921.

⁴ Jacobson, Soc. Biol. 83, 1054; 1919.

⁵ Johannessohn, Biochem. Zs 83, 23; 1917.

⁶ Siehe z. B. Willstätter und Persiel, H. 142, 245; 1925.

Nun ist nach Northrop bei kleinen Substratkonzentrationen die Geschwindigkeit (umgesetzte Menge pro Zeiteinheit) der Substratkonzentration annähernd proportional. In diesem Gebiete ist also die monomolekulare Konstante von der Substratkonzentration unabhängig und kann als Mass der Enzymmenge dienen. Als Ausdruck für den Reinheitsgrad finden wir dann:

$$Pf_{\text{Gel.}} = \frac{k}{g \text{ Präparat}}$$

Eine passende Temperatur ist dann festzulegen. Die Messung von k geschieht bei optimaler Wasserstoffionenkonzentration und, falls die Enzymlösung unrein ist und Hemmungskörper enthält, bei einer so kleinen Enzymkonzentration, dass Proportionalität zwischen derselben und k herrscht.

Die oben definierte Grösse $\bar{P}f$ ist (als Spezialfall von Xf) nach dem Vorbilde von den schon lange angewendeten Ausdrücken If , Sf usw. gebildet¹; nur muss hier, wie bei allen Enzymen, die mehrere Substrate spalten, auch das Substrat mit in die Definition einbezogen werden.

G. Die Stabilität des Pepsins.

Zur Erklärung der pH-Kurve des Pepsins ist oft die Möglichkeit erwogen worden, dass eine geringe Stabilität des Enzyms eine verringerte Reaktionsgeschwindigkeit vortäuschen kann. Sørensen glaubte z. B., dass dies die

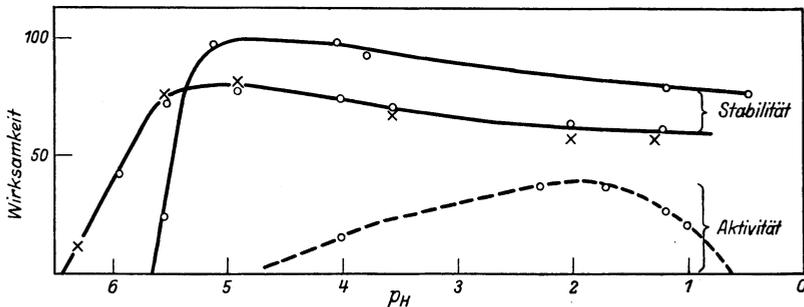


Fig. 69.

Ursache der Verschiebung des Optimums während der Reaktionszeit sei². (Diese Verschiebung kann wohl eher durch die wechselnde Kinetik bei verschiedenen Aciditäten erklärt werden.) Die Abnahme der Spaltungsgeschwindigkeit in stark saurer Lösung führt Arrhenius auch auf eine Zerstörung des Enzymes zurück³. Unter den Versuchen, die Stabilität des Enzymes zu bestimmen, leiden die älteren wie gewöhnlich an der Nichtberücksichtigung der Acidität. Untersuchungen mit moderner Methodik haben Northrop

¹ Vgl. I. Teil (3. Aufl.), S. 17.

² Sørensen, Bioch. Zs 21, 288; 1909.

³ Quantitative laws in biological chemistry, London 44, 1915.

sowie Michaelis und Rothstein¹ ausgeführt. Northrop stellte folgendes fest:

Verschiedene Säuren (HCl, H₂SO₄, HNO₃, H₃PO₄, H₂C₂O₄) haben denselben Einfluss auf die Stabilität des Pepsins.

Die Reinheit der Enzymlösung war von keiner Bedeutung. Dies gilt vielleicht nur für Lösungen mit geringem Reinheitsgrad.

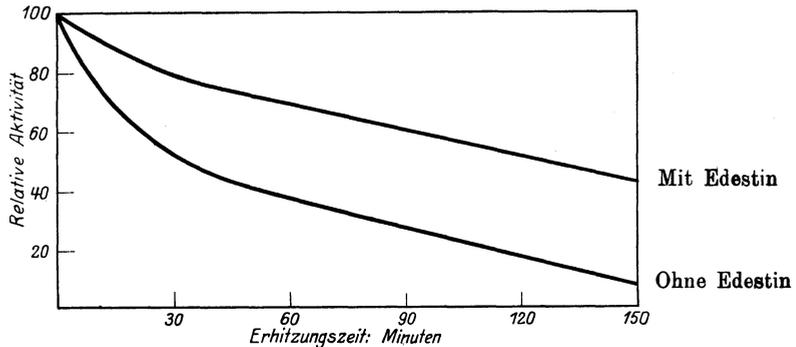


Fig. 70.

Die Enzymzerstörung kann die pH-Kurve nicht erklären.

Die Stabilitäts-pH-Kurve zeigt keine Ähnlichkeit mit der Aktivitäts-pH-Kurve. Einige Versuche sind in Fig. 69 zusammengefasst, gültig für 38°.

Pepsin und Lab werden durch OH' parallel zerstört (Michaelis und Rothstein¹).

Neue Versuche von Ege² haben viele interessante Ergebnisse erbracht: Erstens ist eine deutliche schützende Wirkung des Substrates vorhanden. In

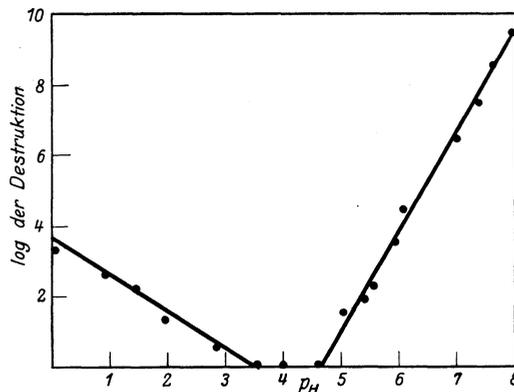


Fig. 71.

Figur 70 sind die Inaktivierungskurven des Pepsins mit und ohne 0,2% Edestin bei pH 1,6 (Weinsäure) und 55° gezeichnet.

¹ Northrop, JI Gen. Physiol. 2, 465; 1920. — Michaelis und Rothstein, Biochem. Zs 105, 60; 1920.

² Ege, H. 143, 159; 1925.

Ege stellt weiter fest, dass der zeitliche Verlauf der Zerstörung anfangs geradlinig ist. Bestimmt man in diesem Teil der Kurve die Zerstörungsgeschwindigkeit bei verschiedener Acidität, so erhält man die Kurve in Fig. 71: $\text{Destruktion} = \text{Anzahl g} \cdot 10^{-6} \text{ Armour-Pepsin während einer Stunde zerstört, bei einer Anfangskonzentration von etwa } 0,1\% \text{ A.-P.}$

Was die Deutung der Kurve betrifft, so betont Ege zunächst, dass die Annahme von Michaelis und Rothstein über den Einfluss der Hydroxylionen nicht zutrifft. Diese Autoren hatten angenommen, dass die Zerstörung im neutralen und alkalischen Gebiete mit steigender Temperatur nur durch die Vergrößerung der OH-Ionenkonzentration mit der Temperatur bedingt sei. Ege weist darauf hin, dass das Stabilitätsoptimum recht nahe mit dem Optimum der Sorption des Pepsins an Eiweiss zusammenfällt. Da man auch aus anderen Gründen annehmen muss, dass das Pepsin in käuflichen Präparaten oft mit einem Stoff vergesellschaftet ist, durch den es gebunden wird, so kann dieser Umstand die Stabilitätskurve und die Abweichungen zwischen den Versuchen von Ege und den von Northrop wenigstens teilweise erklären. Versuche mit hochgereinigtem Pepsin müssen die Entscheidung bringen.

Ultraviolette Strahlen inaktivieren (Hussey und W. R. Thompson, *Jl Gen. Physiol.* 9, 217; 1925).

H. Synthetische Wirkungen des Pepsins.

Es ist eine sehr alte Beobachtung, dass in konzentrierten Lösungen von Eiweissabbauprodukten die proteolytischen Enzyme unter Umständen eine Bildung von höhermolekularen Stoffen hervorrufen können. Dieser Vorgang, den man oft an der Bildung eines Niederschlages erkennt, wird Plasteinbildung genannt (vgl. I. Teil, 3. Aufl. S. 321). Ob die Plasteinbildung als eine eigentliche Reversion der proteolytischen Spaltung anzusehen ist, ist wohl sehr zweifelhaft, und dasselbe gilt wohl von den früheren Versuchen Robertsons¹.

Zuerst sei hervorgehoben, dass die Bildung eines Niederschlages ein sekundärer Prozess ist, der nur dadurch bedingt ist, dass mitunter einige der durch die Synthese entstandenen Stoffe wasserunlöslich sind. Die grundlegende Feststellung, dass eine Synthese wirklich eintritt, verdanken wir Henriques und Gjaldbäk², die zeigen konnten, dass die Plasteinbildung von einer Abnahme des Formol-titrierbaren Stickstoffes begleitet ist. Hierdurch wird die Deutung von Bayliss³, es handle sich um eine einfache (!) kolloidchemische Ausflockung, unmöglich. Sehr wichtig ist nun, dass nach Henriques and Gjaldbäk die Plasteine in gewissen Fällen nicht mehr

¹ T. B. Robertson, *Jl Biol. Chem.* 8, 287; 1910. — Robertson und Biddle, *Jl Biol. Chem.* 9, 295; 1911.

² Henriques und Gjaldbäk, *H.* 71, 485; 1911 und 81, 439; 1912.

³ Bayliss, *Jl of Physiol.* 46, 236; 1913.

Formolstickstoff enthalten als die genuinen Proteine. Übrigens scheinen sie weniger Totalstickstoff zu haben¹.

Die Fähigkeit zur Erzeugung der Plasteine besitzen wahrscheinlich alle Proteasen, auch solche aus Pflanzen, Hefen und Bakterien².

Dass eine Enzymwirkung wirklich stattfindet, wird durch folgende Tatsachen gestützt:

a) Nur sehr kleine Enzymmengen sind notwendig³.

b) Inaktiviertes Enzym gibt keine Plasteine.

Die Reaktion soll reversibel sein und von der Acidität in charakteristischer Weise abhängen³. Auch die Steigerung der Plasteinbildung mit zunehmender Temperatur haben Borsook und Wasteneys untersucht.

Wie man auch die Plasteinbildung deuten will, sicher ist, dass die gewonnenen Niederschläge keine wirklichen Eiweissstoffe sind⁴, wohl aber dürfte es möglich sein, dass die Reaktion eine Umkehrung einzelner Stufen des enzymatischen Eiweissabbaues ist.

Über das Verhalten der Plasteine im Tierkörper siehe Knaffl-Lenz und Pick, Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 71, 296 u. 407; 1913.

¹ H. Bayer, Hofm. Beitr. 4, 554; 1904.

² Rakoczy, H. 75, 273; 1911. — Kämmerer, Zs Immun. 6, 235; 1911.

³ Wasteneys und Borsook, JI Biol. Chem. 62; 15, 633, 675; 1924/1925. — 63, 563; 1925.

⁴ Lawrow und Salaskin, H. 36; 277; 1902. — Levene und van Slyke, Biochem. Zs 13, 458; 1908 und 16, 203; 1909.

21. Kapitel.

Die übrigen Proteasen der mehrzelligen Tiere.

A. Autolyse von Organen.

Wenn nach dem Tode eines Tieres ein beliebiges Organ herausgenommen und unter Fernhalten von Bakterien sich selbst überlassen wird, tritt mit der Zeit ein weitgehender Zerfall der Gewebe ein. Hierbei sind vor allem proteolytische Enzyme wirksam. Diese stammen nicht aus dem Pankreas auch nicht aus dem Blute¹. Es zeigt sich also, dass die Gewebe selbst proteolytische Enzyme enthalten. Sofern wir wissen, enthalten alle Zellen, tierische und pflanzliche, Proteasen, die während des Lebens der Zelle durch irgendeinen Mechanismus gesteuert werden, die aber nach dem Tode der Zelle ihre volle Wirksamkeit entfalten und eine Selbstverdauung, „Autolyse“, hervorrufen. Aus diesem Umstande, dass die Organproteasen erst nach dem Tode in wahrnehmbare Tätigkeit treten, darf man natürlich nicht den Schluss ziehen, dass sie in der lebenden Zelle unwirksam sind. Vielmehr dürften sie das Enzymsystem ausmachen, wodurch die Zelle ihren Eiweissumsatz, den Aufbau des Zelleiweisses und die Spaltung und Verwertung desselben, vollziehen kann. In welcher Weise nun die lebende Zelle die Synthese und die Spaltung regelt, ist eine Frage, die jetzt noch gar nicht beantwortet werden kann. Die Aufrechterhaltung einer passenden Acidität ist hier natürlich von Bedeutung; aber ausserdem spielen wohl besondere Hemmungskörper mit.

Schon 1855 fand Cloetta² in der Lunge Leucin. Umfangreiche Untersuchungen wurden später von Salkowski³ angestellt. Er fand, dass nach Aufbewahren der Organe in Chloroformwasser Tyrosin und Leucin isoliert werden konnten, welche in den frischen Organen nicht vorkommen. In zellfreien Extrakten erhielt Schwiening eine Autolyse, was also für die enzymatische Natur des Vorgangs ein Beweis ist⁴.

Bei der Autolyse entstehen Aminosäuren und höhere Spaltungsprodukte der Proteine. Dazu kommen auch Ammoniak und Harnstoff. Möglich ist,

¹ Matthes, Arch. exp. Pathol. 51, 442; 1904. — Oker-Blom, Skand. Arch. Physiol. 14, 48; 1903.

² Cloetta, JI prakt. Chem. 66, 211; 1855.

³ Salkowski, Zs klin. Med. 17, 79; 1891. — Die deutsche Klinik 11, 147; 1903.

⁴ Schwiening, Virchows Arch. 136, 444; 1895.

dass dies auf einer Desamidase bzw. Arginase beruht; die Verhältnisse sind indessen gar nicht geklärt.

Es ist noch nicht möglich zu sagen, wieviele Proteasen in den tierischen Zellen vorhanden sind. Auch wissen wir nicht, ob einige der Organproteasen mit den oben beschriebenen proteolytischen Enzymen, Pepsin und Trypsin, identisch sind. Ziemlich sicher dürfte es indessen sein, dass kein eigentliches Pepsin in den Geweben vorkommt. Das bei stark saurer Reaktion, $\text{pH} = \text{etwa } 2$, wirksame Pepsin dürfte nur im Magen der höheren Tiere existieren. Dagegen ist es wohl möglich, dass unter den Organproteasen trypsinartige Enzyme zu finden sind, welche mit der eigentlichen Pankreas-tryptase möglicherweise identisch sind. Sicher ist aber, dass, wenigstens in einigen Fällen, Proteasen mit dem Aciditätsoptimum bei $\text{pH} = 4\text{--}5$ vorkommen und wahrscheinlich ist, dass solche Enzyme die Hauptmenge der Organproteasen ausmachen. Die Unterscheidung mehrerer Enzyme in dem Gemisch der Organproteasen ist nunmehr in mehreren Fällen gelungen, und die ersten derartigen Abgrenzungen machten Hedin und Dernby.

Durch Untersuchungen von Salkowski, E. Fischer, Kossel und anderen wurde festgestellt, dass durch die Autolyse Aminosäuren und höhere Spaltprodukte der Proteine gebildet werden. Über die Wirkungsweise der Enzyme dagegen widersprechen sich die Befunde zum Teil in hohem Grad. Schwiening¹ und Biondi² fanden, dass Alkali die Autolyse verhinderte, während ein Säurezusatz günstig wirkte.

Die Anwesenheit von Proteasen im Buchnerschen Presssaft aus tierischen Geweben zeigten Hedin und Rowland³. Sie fanden auch, dass die Geschwindigkeit der Autolyse in alkalischer Lösung herabgesetzt wurde und am besten in 0,25% Essigsäure verlief. In einer folgenden Untersuchung⁴ unterscheidet Hedin zwischen α -Protease, die in alkalischer Lösung optimal wirkt, und β -Protease, die in saurer Lösung ihre beste Wirkung ausübt. Behandelt man das Gewebe zuerst mit sehr verdünnter Säure, und führt es dann in alkalische Lösung über, so verläuft nach Hedin die Autolyse viel schneller, als wenn man das Gewebe unmittelbar in dieselbe alkalische Lösung bringt. Dies erklärt Hedin damit, dass Hemmungskörper vorkommen, welche in saurer Lösung zerstört werden. Nach Dernby dagegen beruht dies Verhalten darauf, dass in saurer Lösung zuerst eine schwache Vorverdauung durch das peptische Enzym geschieht, wodurch die Substrate dann viel leichter von dem tryptischen Enzym angegriffen werden. Dies ist in voller Übereinstimmung mit den bei Magenpepsin und Pankreas-trypsin gefundenen Verhältnissen.

¹ Schwiening, Virchows Arch. pathol. Anat. 136, 444; 1894.

² Biondi, Virchows Arch. pathol. Anat. 144, 373; 1896.

³ Hedin und Rowland, H. 32, 531; 1901.

⁴ Hedin, Upsala Läkarefören. Förh. 11, 1906, Suppl.

Nachdem Vines¹ die Anwesenheit von mehreren Proteasen in den höheren Pflanzen vermutet hatte, machte Dernby durch Versuche mit Gelatine- und Peptonspaltung wahrscheinlich, dass die proteolytischen Wirkungen der Hefe und der tierischen Gewebe² auf mehreren Enzymen beruht. In Leber, Milz, Pankreas, Magenschleimhaut und in Leukocyten fand er also eine Pepsinase und eine Tryptase. Dazu kommt dann die Peptidase³. In einigen Geweben soll nun eins der Enzyme in sehr grosser Menge vorkommen können und dadurch die Wirkung der anderen Enzyme verdecken.

Die Pepsinase hat nach Dernby ihre optimale Wirkung bei $\text{pH} = 3 - 3,5$, die Tryptase und die Peptidase bei $\text{pH} = 7,5 - 8$. Die optimale Acidität

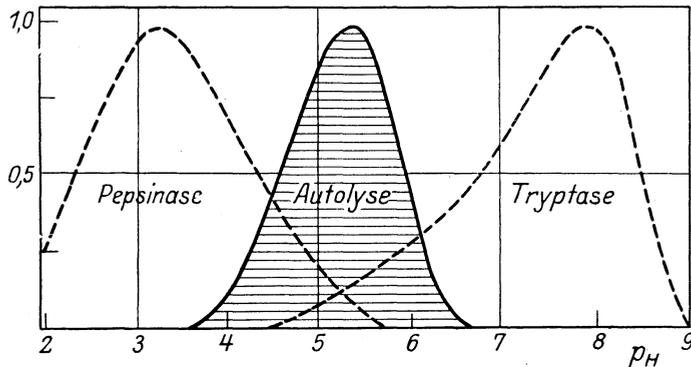


Fig. 72.

der Autolyse setzt sich nun aus diesen drei Aciditätskurven zusammen. Wir führen eine Figur nach Dernby an (Fig. 72).

Dernby schliesst nun, dass, wenn man die Anwesenheit der drei Enzyme und ihre Aciditätsabhängigkeit berücksichtigt, alle weitere Annahmen von Antienzymen usw. überflüssig sind.

Es geht aus mehreren Untersuchungen hervor, dass in gewissen Geweben die Pepsinase oder die Tryptase fehlen kann.

Die Annahme von Bradley⁴, es gebe in den Geweben nur eine einzige echte Protease mit einem pH -Optimum 3–7 ist nach seinen Versuchen nicht berechtigt, wäre aber in qualitativer Übereinstimmung mit den unten zu besprechenden Befunden von Willstätter über die Hefenprotease.

Durchaus unbeantwortet ist die Frage über die Spezifität der Organproteasen. In vielen Arbeiten wird nämlich behauptet, dass die Proteasen eines Organs nur die zelleigenen Proteine angreifen. Wenn es möglich ist, dass die eigenen Proteine besonders leicht angegriffen werden, und dies kann wohl mit der Gegenwart von aktivierenden und hemmenden Stoffen

¹ Vines, Ann. of Bot. 18, 289; 1904.

² Dernby, JI Biol. Chem. 35, 179; 1918.

³ Über die Peptidasewirkung der verschiedenen Organe siehe Kap. 16, S. 401 u. 17, S. 432.

⁴ Bradley, JI Biol. Chem. 52, 467; 1922.

zusammenhängen, so wissen wir indessen auch, dass wenigstens einige besonders leicht verdauliche fremde Proteine (Casein, Fibrin) immer gespalten werden.

Proteasen der Leber.

Am besten bekannt sind die Leberproteasen und die meisten Versuche über Autolyse sind mit Leber angestellt. Bei Versuchen mit Leber studierte Salkowski bekanntlich zuerst die Autolyse¹. Die Enzyme sind schwer von den Zellen zu trennen. So fanden Levène und auch Dernby, dass Extrakte, die nach Reiben des Gewebes mit Sand dargestellt werden, gegen

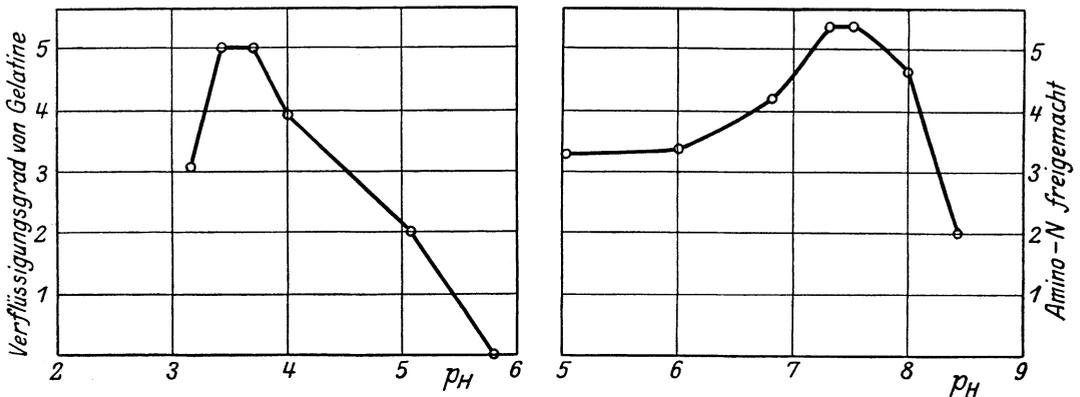


Fig. 73.

Gelatine und Pepton unwirksam waren. Wird dagegen eine Suspension von Leberzellen angewandt, so tritt Spaltung ein. Dies wurde zuerst von Smith² beobachtet.

Die pH-Kurven stellte dann Dernby³ fest. In Figur 73 sind seine Resultate veranschaulicht.

Gelatine wird also nur in saurer Lösung von der Leberpepsinase verflüssigt. In alkalischer und sehr schwach saurer Lösung spaltet die Lebertryptase Peptone. Diese Wirkung der zwei Enzyme zeigt sich auch bei der Autolyse der Leber.

pH	mg Amino-N nach 20 Stunden bei 37°	pH	mg Amino-N nach 20 Stunden bei 37°
3,1	0,69	6,8	1,43
4,0	2,52	7,4	1,75
5,0	3,86	7,9	1,86
6,1	2,35	8,4	0,23

¹ Salkowski, Zs klin. Med. 17, Suppl. 77; 1890.

² Smith, N. Y. Med. Jl 60, 590; 1894.

³ Dernby, Jl Biol. Chem. 35, 179; 1918.

In einem Versuch wurde untersucht, wie sich der Stickstoff zwischen den entstandenen Reaktionsprodukten verteilt.

pH		N im Filtrat nach 72 Stunden bei 37°			
vor	nach	Total	Protein	Peptid	Amine
4,2	4,0	177	9,0	63,0	64,5
7,6	7,0	132	24,0	0,0	51,8

In saurer Lösung ist also viel Peptidstickstoff vorhanden, in alkalischer Lösung keiner, weil hier die Tryptase schneller wirkt.

Später haben Rona und Mislowitzer¹ die Leberautolyse studiert. Sie fanden das pH-Optimum bei 3,6–3,8. Ein zweites Optimum fanden sie nicht. Sie wollen daraus schliessen, dass nur ein pepsinähnliches Enzym bei der Leberautolyse wirksam ist, was auch in Übereinstimmung mit Willstätters Untersuchungen über Hefenprotease wäre.

Der Umstand, dass die Kinetik der gesamten Proteasenwirkung stark mit der Acidität wechselt, kann indessen nicht als ein Beweis dafür angesehen werden, dass mehrere Proteasen teilnehmen. Es scheint ausserdem, als wäre die Methode der Gelatineverflüssigung nicht ganz einwandfrei, und es ist wohl möglich, dass auch in der Leber nur eine Protease mit dem Optimum bei schwach saurer Reaktion vorhanden ist.

Zachrisson² fand in autolysierter Rinderleber Caseinspaltung bei pH = etwa 5 am schnellsten. Die Peptonspaltung hatte zwei pH-Maxima bei etwa 4 und 7. Zachrisson vermutet, dass das Optimum bei neutraler Reaktion von der Wirkung des Erepsins herrühre; dies ist nunmehr nach Waldschmidt-Leitz' Untersuchungen unwahrscheinlich. Ein Enzym, das auf Casein am besten in alkalischer Lösung wirkt, fand Zachrisson nicht. Ein saures Optimum, aber auch starke Eiweisspaltung in schwach alkalischer Lösung fanden Steppuhn und Utkin-Ljubowzoff³. Auch Bradley⁴ fand in der Leber zwei proteolytische Enzyme: ein in saurer Lösung wirksames und eines, das höhere Spaltprodukte in alkalischer Lösung weiter spaltet.

Abweichende Resultate der einzelnen Verfasser können darauf beruhen, dass Lebern von verschiedenen Tieren die Enzyme in relativ verschiedener Menge enthalten.

Wie bei den anderen proteolytischen Enzymen sind die pH-Kurven wohl auch hier von den Eigenschaften sowohl des Enzyms als des Substrates abhängig. Ob die Pepsinase die Eiweisskationen, wie Bradley⁴ und Sevringhaus⁵

¹ Rona und Mislowitzer, *Biochem. Zs* 140, 517; 1923.

² Zachrisson, *Upsala läkareför. Förh.* 28, 333; 1923.

³ Steppuhn und Utkin-Ljubowzoff, *Biochem. Zs* 150, 165; 1924 und 158, 38; 1925.

⁴ Bradley, *Jl Biol. Chem.* 52, 467; 1922.

⁵ Sevringhaus, *Jl Biol. Chem.* 57, 181; 1923.

annehmen, angreifen, ist zweifelhaft. Wahrscheinlicher ist wohl, dass von diesen Enzymen das undissoziierte Eiweiss gespalten wird.

Von den älteren Versuchen über den Einfluss von Salzen usw. auf die Wirkung dieser Proteasen sind die meisten wertlos, da auf pH-Verschiebungen

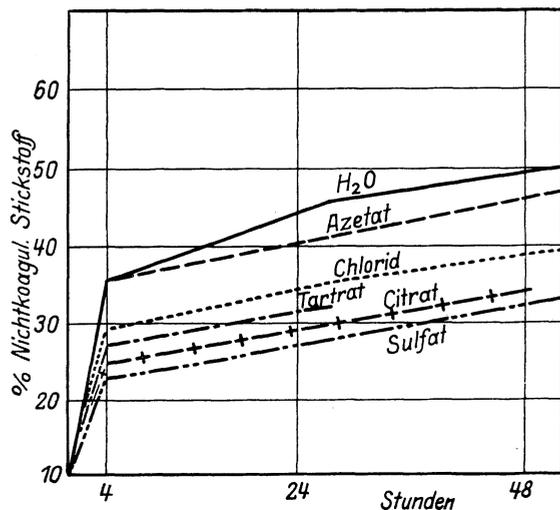


Fig. 74 a.

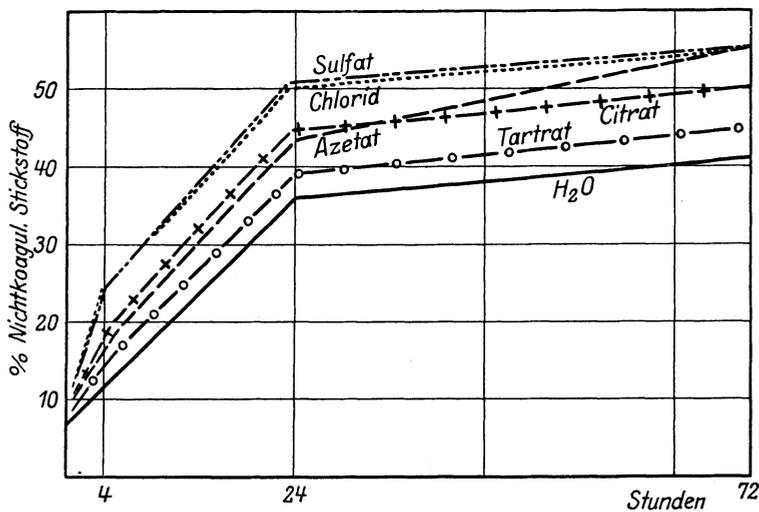


Fig. 74 b.

keine Rücksicht genommen wurde. Neue Versuche verdanken wir Rona¹, und zwar betreffen sie die Leberpepsinase. Es wurde zuerst festgestellt, dass das pH-Optimum vom angewandten Puffer abhängig ist. So wurde gefunden, dass Weinsäure und Milchsäure ein Optimum bei etwa 3,7 gaben, Phtalat-

¹ Rona und Mislowitzer, Biochem. Zs 140, 517; 1923 und 146, 1; 1924.

puffer dagegen bei etwa 4,2. Die Einwirkung der Neutralsalze wurde danach untersucht. Es ergab sich, dass die Einwirkung je nach der Acidität verschieden war. So hemmten die Anionen der Chloride, Sulfate und Citrate bei $\text{pH} = 3,6$ deutlich. Stark hemmten auch unter denselben Bedingungen Tartrat und Bromid, das Acetat war wirkungslos. Wurden indessen dieselben Salze bei $\text{pH} = 5-6$ untersucht, so wurde statt der Hemmung eine deutliche Förderung beobachtet. Wir führen als Beispiel zwei Figuren, 74 a und b, an.

Von den Kationen wurden K, Na und Ca untersucht. Bei optimaler Reaktion hemmen die Chloride dieser Metalle in grösseren Konzentrationen, in kleineren fördern sie. Natrium hemmt mehr, bzw. fördert weniger als Kalium. Abseits von dem Optimum ist auch hier eine Umkehr der Wirkung zu beobachten. Die Natriumkurve liegt über der Kaliumkurve.

Hemmung durch 0,1 n. Salzlösungen bei $\text{pH} = 3,7$ siehe l. c. S. 19, Fig. 17.

Die Spaltprodukte der Substrate hemmen stark. So fand Rona, dass die Autolyse immer bei etwa 50% Spaltung aufhörte. Wurden indessen die Spaltprodukte durch Dialyse beseitigt, so konnte trotz einer unvollständigen Dialyse eine Spaltung von mehr als 90% erreicht werden. Die Hemmung der Spaltungsprodukte kann möglicherweise auch als ein durch eintretende Synthese bedingtes Gleichgewicht angesehen werden.

Die Untersuchungen über die Beeinflussung der autolytischen Enzyme durch Schwermetallsalze usw. sind ohne Beachtung der Acidität ausgeführt und deshalb nicht verwertbar. So sind wohl die umfassenden Versuche von Izar¹, Truffi² und anderen über den Einfluss von Silber- und Quecksilbersalzen auf die Leberautolyse durch Aciditätsverschiebungen entstellt. Sie fanden durchgehend eine Aktivierung bei kleinen Salzmenge, eine Hemmung bei grösseren. Ähnliche Ursachen dürften auch bei den Versuchen über die Einwirkung von verschiedenen Kolloiden vorliegen³. In moderneren Versuchen fand auch Bradley, dass reine Kolloide auf die Autolyse keinen merklichen Einfluss ausübten⁴.

Hata⁵ fand Sublimat in kleinen Mengen stark hemmend. 1 cm seines Leberextraktes wurde durch 0,03 cm 1%iger Sublimatlösung vollkommen inaktiviert. Eine durch mehr als das Doppelte dieser Menge vollkommen vergiftete Enzymlösung konnte indessen durch eine passende Menge K_2S wieder ganz reaktiviert werden.

NaF ist ohne Einfluss (Rona⁶). Grössere Mengen können hemmen

¹ Izar, Biochem. Zs 20, 249; 1909.

² Truffi, Biochem. Zs 23, 270; 1909.

³ Ascoli und Izar, Biochem. Zs 6, 192; 1907; 7, 142; 1907; 10, 356; 1908; 14, 491; 1908 und 17, 361; 1909.

⁴ JI Biol. Chem. 21, 209; 22, 113; 25, 201; 29, 281; 44, 553; 50, 14; 52, 466; 1922.

⁵ Hata, Biochem. Zs 17, 182; 1909.

⁶ Rona, Mislowitzer und Seidenberg, Biochem. Zs 154, 290; 1924.

wegen pH-Verschiebung. Rona hat auch eine Menge Arsenpräparate u. dgl. bei gemessenem pH untersucht und dadurch ältere Arbeiten richtiggestellt. Atoxyl hemmt. As_2O_3 und andere Arsenverbindungen (Asher) hemmen oder aktivieren je nach der Acidität. Vgl. auch Teil I, 2. Aufl., S. 216 u. ff.

Eine spezifische Aktivierung durch Galle ist nicht nachgewiesen. Angaben über den Einfluss von Lipoidgemischen und allerlei weniger definierten physiologisch wirksamen Stoffen sollten mit Vorsicht aufgenommen werden.

Chloroform soll die tiefere Spaltung hemmen¹, Jodoform ist recht unwirksam, was vielleicht mit seiner geringen Löslichkeit zusammenhängt².

Chinin hemmt, jedoch erst in recht grossen Mengen³, ebenso Formaldehyd⁴.

Eine Autolyse findet auch in stark alkoholischer Lösung statt. Nach Wells hemmen erst 90% Alkohol vollständig⁵.

Proteasen der Milz.

Die proteolytischen Enzyme der Milz sind von Hedin und Mitarbeitern studiert worden. In Arbeiten über die Milzautolyse glaubten Hedin und Rowland⁶ festgestellt zu haben, dass zwei Proteasen wirksam sind: eine in saurer Lösung (β -Protease) und eine in alkalischer (α -Protease). Die Wirksamkeit der α -Protease wurde am deutlichsten gezeigt, wenn die Milz zuerst mit schwacher Säure behandelt wurde. Es beruht dies darauf, dass die in der sauren Lösung eingetretene geringe Spaltung der Eiweissstoffe durch β -Protease (Pepsinase) Stoffe entstehen lässt, welche von der α -Protease (Trypsinase) leichter angreifbar sind. Hedin konnte⁷ auch eine gewisse Trennung der Milzenzyme erreichen:

Zerkleinerte Milz wird mit verdünnter Essigsäure behandelt: 24 Stunden bei 37° (Toluol), dann wird filtriert und mit Wasser gewaschen. Das Filtrat enthält manchmal alle Enzyme. Der Rückstand wird mit Caseinlösung während 24 Stunden behandelt. Der Caseinextrakt enthält hauptsächlich β -Protease und Erypsin. Der Rückstand wird gewaschen und danach mit 5% NaCl extrahiert. Die Lösung wird abfiltriert und mit 30 g Ammonsulfat zu 100 ccm versetzt. Der Niederschlag wird abfiltriert und dialysiert. Das Ungelöste wird abfiltriert und in wenig NaOH gelöst. Die Lösung enthält hauptsächlich α -Protease.

Dernby⁸ fand das pH-Optimum des Gelatine-spaltenden Enzyms der Milz bei 3,5—3,8 (Pepsinase). Die peptonspaltende Trypsinase hat ihr Optimum bei etwa 7,5.

¹ Kaschiwabara, H. 80, 45; 1912.

² Vandevelde, Biochem. Zs 3, 315; 1907.

³ Laqueur, Arch. f. exp. Pathol. 55, 240; 1906.

⁴ Kikkoji, H. 63, 109; 1909.

⁵ Wells und Caldwell, JI Biol. Chem. 19, 57; 1914.

⁶ Hedin und Rowland, H. 32, 341 und 531; 1901.

⁷ Hedin, JI Biol. Chem. 54, 177; 1922.

⁸ Dernby, JI Biol. Chem. 35, 179; 1918.

Die Produkte der Milzautolyse wurden von Leathes¹, Cathcart² und Levene³ untersucht.

Hedin gibt an, dass die pH-Optima der Wirkung der β -Proteasen bei Milz von verschiedenen Tieren nicht ganz identisch sind.

Morse fand Autolyse nur in saurer Lösung und weist darauf hin, dass die α -Protease nicht native Eiweissstoffe angreift⁴. Dies ist mit den Ver-

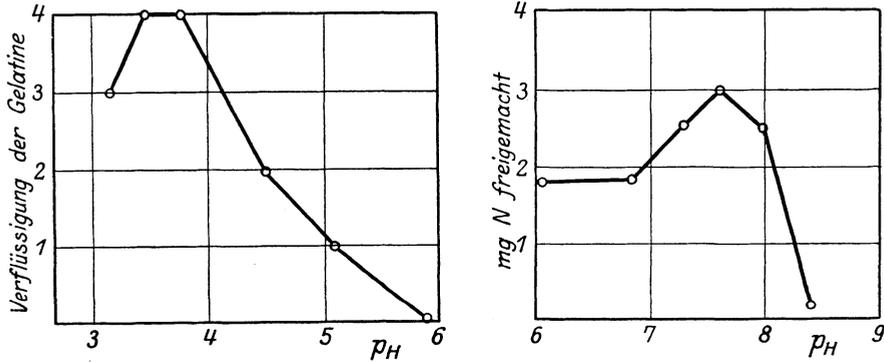


Fig. 75.

suchen von Derby in Übereinstimmung. Wir führen Kurven von Derby an (Fig. 75).

Über die Verdauung der eigenen Eiweissstoffe der Milz hat Derby⁵ ebenfalls Versuche angestellt. Eine Tabelle sei angeführt:

pH im Anfang (ändert sich wenig)	Vermehrung des Aminostickstoffs	
	16 Stunden	72 Stunden
etwa 3	0,03	0,06
etwa 4	0,40	0,78
5,0	1,06	1,28
6,2	0,43	0,73
6,8	0,15	0,43
7,3	0,38	0,69
7,6	0,55	0,78
7,9	0,74	0,98
8,4	0,09	—

Derby findet also auch hier zwei Optima bei pH = 5 und etwa 8. Die Verteilung des durch Trichloressigsäure nicht fällbaren Stickstoffes zwischen den verschiedenen Reaktionsprodukten hat er in einigen Versuchen bestimmt:

¹ Leathes, JI Physiol. 27, 360; 1902.

² Cathcart, JI Physiol. 32, 299; 1904/1905.

³ Levene, Amer. JI Physiol. 11, 437 und 12, 276; 1905.

⁴ Morse, JI Biol. Chem. 31, 303; 1917.

⁵ l. c. Seite 212.

pH im Mittel	mg nicht fällbaren Stickstoffs nach 48 Stunden bei 37°		
	Peptide	Amino-N	NH ₃
3,0	24,8	38,5	2,3
4,1	55,2	142,3	6,2
6,1	2,6	87,9	7,3
7,5	3,3	83,0	5,1

In saurer Lösung werden also auch hier die Peptide angehäuft, was dafür spricht, dass die Pepsinase wie das Pepsin nur die ersten Stufen der Eiweisspaltung beschleunigt.

Wir wollen doch auch hier die Aufmerksamkeit darauf lenken, dass der Umstand, dass die Peptide in saurer Lösung angehäuft werden, nicht zwingend die Verschiedenheit des eiweisspaltenden und des peptonspaltenden Enzyms beweist. Wie schon z. B. die Carbohydrasen eine mit der Acidität wechselnde Kinetik zeigen, so ist dies bei den Proteasen sicher noch ausgeprägter der Fall.

Nach einer Untersuchung von Waldschmidt-Leitz und W. Deutsch¹ enthält die Milz zwei proteolytische Enzyme, eine Protease mit einem pH-Optimum von etwa 4, unwirksam gegenüber Peptiden, und daneben eine Peptidase mit dem Optimum pH = 8,0, spezifisch für die Hydrolyse einfacher Peptide. Der Peptidasengehalt ist sehr beträchtlich, der Proteasengehalt geringfügig, immerhin viel grösser als Hedin in seinen Extrakten fand. Es gelingt, in Glycerinauszügen aus frischer Milz, z. B. durch Adsorption an Kieselgur bei neutraler Reaktion, die beiden Enzyme zu trennen; dabei wird — im Gegensatz zu den Angaben von Hedin — überwiegend die bei saurer Reaktion wirksame Protease adsorbiert. Die Unterscheidung von α - und β -Lienoprotease nach Hedin erscheint also nicht mehr gerechtfertigt.

Proteasen der Nieren.

Die proteolytischen Enzyme der Nieren sind stark wirksam. Sie wurden schon früh untersucht². Vergleichende Untersuchungen über die Autolyse gesunder und kranker Nieren bei Simon³.

Hedin⁴ hat die Existenz mehrerer Enzyme in den Nieren nachgewiesen: Er fand ein „Erepsin“ (nach unseren jetzigen Kenntnissen vielleicht eine Trypsinase + eine Peptidase), das auf Pepton am besten bei pH = 7,8 wirkt, und eine Protease (Pepsinase), welche die Eiweisskörper des Organs und Casein am besten bei pH = 4,3—5,6 spaltet. Weder bei der optimalen Acidität der

¹ Waldschmidt-Leitz und Deutsch, Privatmitteilung.

² Dakin, JI of physiol. 30, 84; 1904.

³ Simon, Biochem. Zs 67, 483; 1914.

⁴ Hedin, H. 122, 307; 1922.

Pepsinwirkung, noch in alkalischer Lösung wurden echte Eiweissstoffe angegriffen.

Die Angaben von Bradley¹ über die Proteasen der Nieren decken sich mit denen von Hedin. Wahrscheinlich haben wir hier eine Protease vom „Papaintypus“. Vgl. unten die Pflanzenproteasen.

Proteasen der Thymusdrüse.

Die proteolytischen Wirkungen des Thymus wurden schon früh von Kutscher² und Conradi³ studiert. Jones⁴ fand im Thymus ein Enzym, welches die Nucleoproteide der Drüse unter Abspaltung von Phosphorsäure und Xanthinbasen angriff. Rhodin⁵ beobachtete, dass die Proteolyse am besten in schwach saurer Lösung stattfindet.

Widmark⁶ extrahiert Thymus mit schwacher Essigsäure und findet in dem Extrakt eine Pepsinase mit maximaler Wirkung bei pH = 5,6 und ein „erepsinähnliches“ Enzym, welches Pepton am besten bei pH = 7,6 spaltet. Wenn er den Extraktionsrückstand dann mit NaCl-Lösung auslaugt, erhält er eine Lösung, die Casein bei pH = 7,8—7,9 spaltet. Bei einem anderen Verfahren wurde eine Lösung gewonnen, die Casein am besten bei pH = 8,8 spaltete.

Proteasen der Lymphdrüsen.

Mit der bei der Besprechung der Milzproteasen geschilderten Extraktionsmethode konnte Hedin⁷ drei Enzyme in den Lymphdrüsen unterscheiden und wenigstens teilweise trennen. Er fand also eine Pepsinase, die Casein bei pH = etwa 5,5 optimal spaltet, eine Tryptase, die Casein bei pH 9—10 angreift und ein Erepsin. Das „Erepsin“ spaltete Pepton und ist also wahrscheinlich mit einer Tryptase vergesellschaftet.

Proteasen der Magenschleimhaut.

Ausser dem Pepsin enthält die Magenschleimhaut auch andere Proteasen. In den Magensaft geht wahrscheinlich nur Pepsin und sogar beim Extrahieren der abgeschabten Schleimhaut mit Wasser erhält man nur Pepsin in der Lösung⁸. Wird dagegen die so von der Hauptmenge des Pepsins befreite Schleimhaut-Emulsion untersucht, so kommen auch die anderen Proteasen zu einer wahrnehmbaren Wirkung. So fand Dernby eine deutliche Peptonspaltung in alkalischer Lösung:

¹ Bradley, JI of biol. Chem. 52, 466; 1922.

² Kutscher, H. 34, 114; 1901/1902.

³ Conradi, Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 1.

⁴ Jones, Am. JI of Physiol. 10, 24; 1904.

⁵ Rhodin, H. 75, 197; 1911.

⁶ Widmark, H. 135, 122; 1924.

⁷ Hedin, H. 125, 289; 1923.

⁸ Dernby, JI Biol. Chem. 35, 202; 1918.

pH im Beginn	Zunahme des Aminostickstoffs
5,0	< 1,0
6,0	2,75
6,8	3,40
7,3	3,63
7,6	4,12
7,9	3,82
8,3	3,46

Es gibt also in der Magenschleimhaut ein tryptaseähnliches Enzym mit dem pH-Optimum etwa 7,6. Durch besondere Versuche wurde festgestellt, dass Pepsin bei seinem pH-Optimum Pepton nicht angriff.

Proteasen der Pankreasdrüse.

Nebst der eigentlichen Tryptase enthält die Pankreasdrüse auch andere Proteasen. Indessen ist die Wirkung des Trypsins verhältnismässig so gross, dass sie die etwaige Wirkung anderer Proteasen verdunkelt. Durch Waschen

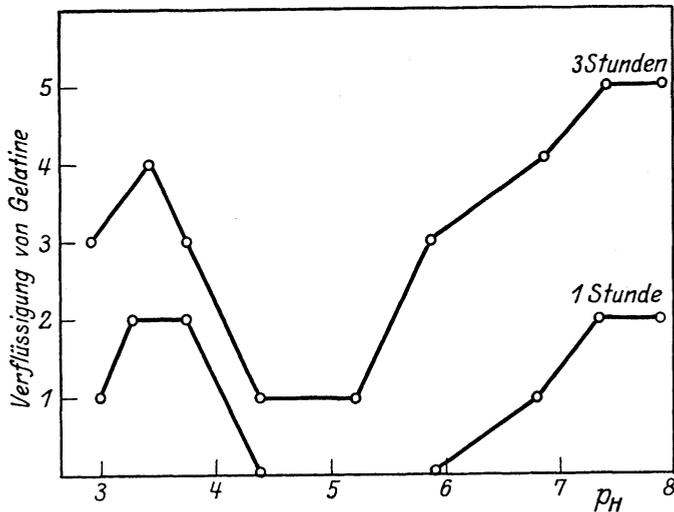


Fig. 76.

von gemahlener Drüse mit Wasser konnte aber Dernby die Hauptmenge der Tryptase entfernen und danach die Prüfung vornehmen. Er fand dann die Kurve (Fig. 76) für die Gelatinespaltung des Pankreas. In dem Pankreas gibt es also eine Pepsinase die bei pH = etwa 3,5 optimal wirkt¹.

Sonstige Organproteasen.

Muskel. Bei der Autolyse des Muskels lösen sich die quergestreiften Elemente. Nach Hedin und Rowland² enthält der Muskelpresssaft eine

¹ Dernby, JI Biol. Chem. 35, 200; 1918.

² Hedin und Rowland, H. 32, 341 und 531; 1901.

Protease, die am besten in alkalischer Lösung wirkt. Die Muskelautolyse verläuft nach Bradley am schnellsten bei $\text{pH} = 4,5 - 5^1$.

Gehirn. Schwache Autolyse am besten bei schwach saurer Reaktion.

Lunge. Jacoby² fand Autolyse der Lungen. Die Enzyme lösen auch Fibrin usw.

Tumoren. Bei verschiedenen Geschwülsten ist eine kräftige Autolyse beobachtet worden. Über die Spezifität der Enzyme ist nichts Sicheres bekannt. Die Enzyme sind von Interesse, da es gelingt durch Injektion von Metallverbindungen die Autolyse so zu steigern, dass sich die Tumoren selbst verzehren.

Die Leukoprotease.

Die Leukocyten enthalten stark wirksame proteolytische Enzyme. Sie gelangen in alle Teile des Körpers und erklären eine Menge alter Angaben über Vorkommen von „Trypsin“. Ebenso werden Angaben über Selbstverdauung gewisser Proteine durch die Anwesenheit von Leukocyten erklärt.

Opie³ und Bradley⁴ fanden das Optimum der Autolyse in schwach alkalischem Medium. Dernby⁵ fand das Optimum der Gelatinespaltung bei $\text{pH} = 3$. Die Peptonspaltung, die viel schwächer war, verlief bei $\text{pH} = 8$ optimal. Es ist wohl möglich, dass die relativen Mengen der Enzyme in Leukocyten verschiedenen Ursprungs verschieden sein können, was die Unstimmigkeiten zwischen den obigen Resultaten erklären könnte.

Die Leukoproteasen sollen sehr stabil und gegen Gifte usw. recht unempfindlich sein. Gelöst werden ausser den oben genannten Stoffen Fibrin, Casein und koaguliertes Serum⁶. Auf interessante Gesichtspunkte von K. Thomas⁷ sei in diesem Zusammenhang hingewiesen.

Placenta.

Die Placenta hat stark proteolytisch wirksame Enzyme. Fibrin wird verdaut. Die Wirkung ist am stärksten in alkalischer Lösung. Die Enzyme besitzen deshalb Interesse, weil durch ihre Wirkung wahrscheinlich die Überführung des Eiweisses der Mutter in das des Embryos vermittelt wird.

Proteasen der Milch.

Ob wirklich gelöste Proteasen in der Milch vorkommen, ist sehr unsicher. Man muss immer mit der Möglichkeit rechnen, dass Bakterien und Leukocyten mitwirken. Pennington⁸ fand in Milch, die nach seiner Ansicht steril war, eine Protease, die besonders leicht Lactalbumin angriff. Immerhin sind die Mengen der Protease sehr gering. Möglich ist wohl, dass aus der

¹ Bradley und Chen, *Jl Biol. Chem.* 59, 151; 1924.

² Jacoby, *H.* 33, 126; 1901.

³ Opie, *Jl exp. Med.* 7, 759; 1905; 8, 410; 1905; 8, 536; 1906; 9, 391; 1907.

⁴ Bradley, *Jl of Hyg.* 10, 209; 1910.

⁵ Dernby, *Jl Biol. Chem.* 35, 205; 1918.

⁶ Jochmann und Lockemann, *Hofm. Beitr.* 11, 450; 1908.

⁷ K. Thomas, *Festschr. Kaiser Wilhelm-Ges.* 1921.

⁸ Pennington, *Jl Biol. Chem.* 16, 331; 1913. — Vgl. Gorini S. 572.

Milchdrüse Proteasen in die Milch übergehen. Die Proteasen der Drüse sind von Hildebrandt¹ und Grimmer² untersucht. Untersuchungen über Proteasen der Milchsäurebakterien verdankt man Chr. Barthel (Medd. Centralanst. Stockholm, Bakt. Afd. 1914—25).

B. Blutproteasen.

Proteasen des normalen Serums.

Es dürfte ziemlich sicher sein, dass im Serum normalerweise Proteasen zu finden sind. Eine zweite Frage ist freilich, ob sie eigentliche Blutenzyme sind oder aus irgendwie gestörten Organen ins Blut übergetreten sind.

Délezenne³, Zunz⁴ und andere fanden, dass normales Serum Gelatine und Casein, sowie koaguliertes Serum angreift, nicht dagegen koaguliertes Eialbumin. Zunz meint, dass die Serumproteine anderer Tiere leichter angegriffen werden als die eigenen. Die Menge der Proteasen ist sehr schwankend auch bei demselben Tiere.

Da es nun bekannt ist, dass die Serumproteine auf proteolytische Enzyme eine grosse Hemmungswirkung ausüben, so wäre es möglich, dass tatsächlich recht wirksame Enzyme vorkommen, deren Wirkung aber durch die Hemmungskörper des Serums verhindert wird. Es hat sich auch gezeigt, dass oft in dem Serum nur sehr schwache proteolytische Wirkungen zu beobachten sind, die indessen nach Behandlung des Serums mit gewissen chemischen Mitteln sehr viel besser hervortreten können. So fand Hedin⁵, mit der Gerbsäuremethode, dass das Serum von Rind und Pferd entweder keine oder eine sehr geringe Einwirkung auf Casein hatte, dagegen eine deutliche Einwirkung auf Pepton. Wurde das Serum mit Ammonsulfat fraktioniert gefällt, so enthielt die bei etwa $\frac{1}{3}$ Sättigung ausfallende Globulinfraction Proteasen, die Casein und Pepton spalteten. Die zwischen halber und voller Sättigung ausfallende Albuminfraction enthält Proteasen, die nur Pepton spalteten. Daneben enthielt diese Fraction die Hemmungskörper.

Von Hedin und anderen⁶ wurde weiter festgestellt, dass bei Behandlung des Serums mit organischen Antiseptics wie Chloroform und Äther die Hemmungswirkung des Serums geschwächt wurde.

Wir schliessen also, dass die Serumproteasen an andere Stoffe des Serums gebunden bzw. sorbiert sind, dass sie aber durch Störung dieser Bindungen zur Wirkung gebracht werden können. So treten oft nach Behandlung des Serums mit Sorptionsmitteln wie Kieselgur usw. Proteasenwirkungen hervor, ebenso nach Fällung mit Alkohol⁷.

¹ Hildebrandt, Hofm. Beitr. 5, 463; 1904. — ² Grimmer, Biochem. Zs 53, 429; 1913.

³ Délezenne und Pozerki, Soc. Biol. 55, 327, 690; 1903.

⁴ Zunz, Bull. Acad. Méd. Belgique. 1905. — ⁵ Hedin, H. 104, 11; 1918.

⁶ Nolf, Arch. internat. Physiol. 18, 549; 1921. — Abderhalden, Fermentforschung 6, 340; 1922.

⁷ Schierge (und Cöster), Zs exp. Med. 32, 142; 1923 und 34, 442; 1923.

Die Eigenschaften der Serumproteasen sind wenig bekannt. Sie sollen am besten bei $\text{pH} = 7$ wirken¹. Sie sollen nicht organspezifisch sein.

Es ist bekannt, dass bei allerlei Krankheiten aus gestörten Organen verletzte Zellen in die Blutbahn gelangen, wobei sie natürlich ihre Proteasen mitführen. Auf diesem Umstand beruht die sog. „Abderhaldensche Reaktion“ (siehe unten). Es ist nun eine Möglichkeit, dass die „normalen“ Blutproteasen nichts anderes sind als solche aus irgend einer Ursache ins Blut gelangte Organproteasen. Vielleicht stammen sie aus Leukocyten.

Absolut unwahrscheinlich ist es also nicht, dass normale Proteasen im Blut fehlen und nur durch besondere Reize aus Organen bzw. Leukocyten ausgezogen werden. Abderhalden vertritt die Ansicht, dass völlig normales Serum keine Proteasen enthält.

Proteasen im Blut unter anormalen Verhältnissen.

Wird einem Tier fremdes Eiweiss parenteral eingeführt, so treten im Blut Proteasen auf, welche die Spaltung des zugeführten Eiweisses bewirken. So konnten Oppenheimer² und Heilner³ von einer Verdauung im Blut sprechen. Möglich wäre, dass hierbei die eigentliche Umsetzung in irgend einem Organ erfolgte; Abderhalden hat indessen gezeigt, dass das Serum selbst der Einspritzung zufolge proteolytische und peptolytische Eigenschaften annimmt. Die deutliche Vermehrung der Proteasen nach Eiweissinjektion kann als sichergestellt betrachtet werden. Die so auftretenden Enzyme nannte Abderhalden „Abwehrfermente“.

Abderhalden fand, dass das Serum Schwangerer die Fähigkeit besass, Placentaeiweiss abzubauen⁴. Wurde einem Tier Placentaeiweiss eingespritzt, so traten auch diese Proteasen auf. Diesen Befund erklärt Abderhalden so, dass bei der Gravidität Enzyme aus der Placenta ins Blut treten, welche organspezifisch wirken. Die sog. Abderhaldensche Reaktion besteht also darin, dass bei gewissen Störungen der Organe im Blut organspezifische Enzyme auftreten. Ob die gefundene Vermehrung der Proteasen bei diesbezüglichen Störungen auf dem Übertreten von Organenzymen oder auf Freilegung von Leukocytenproteasen oder auf einer Aufhebung der Hemmung an vorher schon vorhandenen Serumproteasen beruht, ist indessen gar nicht klar. Über die Spezifität der Enzyme und also über die medizinische Verwendbarkeit der Abderhaldenreaktion sind die Meinungen ebenfalls geteilt. Im III. Teil dieses Werkes wird sich noch Gelegenheit finden, auf diese Fragen ausführlicher zurückzukommen.

¹ Okubo, Ber. Ges. Physiol. 27, 195 und 28, 467.

² Oppenheimer, Hofm. Beitr. 4, 263; 1903.

³ Heilner, Zs Biol. 56, 75; 1911.

⁴ Abderhalden, Siehe z. B. H. 77, 249; 1912. — Siehe auch Abderhaldens Monographie „Abwehrfermente“ (in neueren Auflagen „Die Abderhaldensche Reaktion“), 5. Aufl., 1922.

C. Proteasen der niederen Tiere.

Über die Proteasen der niederen Tiere ist nur wenig bekannt, und Arbeiten mit moderner Methodik fehlen beinahe vollständig. Es dürfte indessen sicher sein, dass wir auch hier dieselben Proteasen haben wie in den Organen der höheren Tiere. So konnten Bodansky und Rose¹ nachweisen, dass bei Cölenteraten sowohl eine Pepsinase mit dem Optimum ihrer Wirkung bei $\text{pH} = 3$ und eine Tryptase mit dem pH -Optimum 7 vorkommt. Im Magen der Honigbiene fand Sarin², allerdings ohne Messung von pH , eine Pepsinase, die in saurer Lösung Gelatine, Fibrin und Casein löst, und eine in alkalischer Lösung wirksame Tryptase.

Bei den Insekten sollen die Proteasen in grösserer Menge in den carnivoren Arten vorkommen³. Schon 1858 fand Basch eine Protease in *Blatta orientalis*⁴.

In Leber und Bauchspeicheldrüse des Skorpions, *Buthus doriae*, fand Sarin⁵ eine Pepsinase. Die Auszüge aus der Leber verflüssigten auch Gelatine und lösten Casein in neutraler und alkalischer Lösung, was auf die Anwesenheit einer Tryptase deutet. Schwächer wirkten in diesem Falle die Auszüge aus der Bauchspeicheldrüse.

Bei Crustaceen kommen in der Leber Proteasen vor. Pepsinasen sollen fehlen. Dagegen finden sich Tryptasen⁶.

Im Lebergewebe des Hepatopankreas der Cephalopoden werden Proteasen erzeugt. Sie sollen bei saurer Reaktion am meisten wirksam sein⁷.

Auch in der Leber der Mollusken hat man Proteasen gefunden⁸.

In Würmern kommen wirksame Proteasen vor, worauf Charles Darwin zuerst hingewiesen hat. Im Darm von *Haemopsis* soll eine Pepsinase existieren, die in recht saurer Lösung wirken soll⁹.

Die meisten der zitierten Arbeiten — und dies gilt auch von einer Menge anderer Beiträge über Proteasen in niederen Tieren — sagen nur wenig über die Art der gefundenen Enzyme. Für die Enzymchemie ist es von weniger Interesse zu wissen ob Proteasen bei allen möglichen Tieren zu finden sind; dagegen ist es eine Aufgabe künftiger Untersuchungen zu zeigen, ob die Enzyme mit den besser bekannten Enzymen der höheren Tiere identisch sind, oder ob sie in anderer Weise wirken.

¹ Bodansky und Rose, Amer. JI of Physiol. 62, 473; 1923.

² Sarin, Biochem. Zs 135, 59; 1923.

³ Bonnoure, C. r. 152, 228; 1911.

⁴ Basch, Wien. Akad. 33, Math.-Nat. Kl. 225; 1858.

⁵ Sarin, Biochem. Zs 129, 359; 1921.

⁶ Hoppe-Seyler, Pflüg. Arch. 14, 394; 1877.

⁷ Bourquelot, C. r. 95, 1174. — Cohnheim, H. 35, 396, 416; 1902.

⁸ Siehe z. B. Biedermann und Moritz, Pflüg. Arch. 75, 1, 1899.

⁹ Spiess, Diss. Genf 1903.

22. Kapitel.

Proteasen der höheren Pflanzen.

Da im allgemeinen die Proteasen der Pflanzen so wenig untersucht sind, dass eine Systematik noch nicht möglich ist, so beschreiben wir hier zuerst die Proteasen der Säfte und Gewebe der Pflanzen und danach die Enzyme der sog. carnivoren Pflanzen.

- A. Papain.
- B. Ananasprotease.
- C. Protease aus Cucurbita Pepo.
- D. Übrige Enzyme in Säften und Früchten.
- E. Proteasen in Samen und Geweben.
- F. Proteasen der carnivoren Pflanzen.

A. Papain.

Schon 1750 beschrieb Griffith Hughes in seiner „Natural History of Barbados“ die eiweisslösende Wirkung des Milchsaftes von dem sog. Melonenbaum, *Carica Papaya* L. Das eiweisspaltende Enzym, das Papain oder Papayotin, wurde zuerst 1879 von Wurtz untersucht¹. Er fand, dass man aus dem rohen, durch Auspressen aus dem Gewebe der Pflanze erhaltenen Saft mittels Alkohol das unreine Enzym fällen kann. Er gibt an, dass das Enzym in neutraler Lösung tierisches Eiweiss in Peptone und Leucin spaltet.

Martin² fand auch, dass das Papain am besten in neutraler Lösung wirkt. Die Optimaltemperatur fand er bei 35°—40°.

Vines³ hat später sorgfältige Untersuchungen über das Papain angestellt. Speziell hat er die Wirkung von Antiseptics untersucht und dabei die eigentümliche Wirkung des Cyanwasserstoffs bemerkt, die Ursache dazu aber nicht erkannt. In einer folgenden Untersuchung von Mendel und Blood⁴ wurde dagegen klar ausgesprochen, dass die Blausäure die Rolle eines Aktivators oder Co-Enzyms für das Papain spielt. Von anderen untersuchten

¹ Wurtz, C. r. 90, 1379; 1880; 91, 787; 1880. — Wurtz und Bouchut, C. r. 89, 425; 1879. — Dieselben, *Le Papaïne*, Paris 1879.

² Martin, *Jl of Physiol.* 5, 313; 1884 und 6, 336.

³ Vines, *Annals of Botany.* 16, 1; 1903; 17, 237 und 597, 1903; 18, 289; 1904; 19, 149 und 171, 1905; 20, 113; 1906; 22, 103; 1908; 23, 1; 1909; 24, 213; 1910.

⁴ Mendel und Blood, *Jl Biol. Chem.* 8, 177; 1910.

Substanzen konnte nur der Schwefelwasserstoff eine ähnliche Aktivierung hervorrufen. Es sei darauf hingewiesen, dass bei vielen Enzymen eine Regeneration nach Metallvergiftung eben durch diese Stoffe leicht und vollständig gelingt. Dass dies im Falle von Papain die Ursache der Aktivierung nicht sein kann, geht schon aus der Untersuchung von Mendel und Blood hervor. Sie zeigten nämlich: Die Aktivierung durch HCN beruht nicht auf a) einer Änderung der Wasserstoffionenkonzentration, b) Zerstörung von Hemmungsstoffen in der Papainlösung, c) Zerstörung von hemmenden Stoffen in dem Substrat, d) einer Denaturierung des Substrats, e) einer Überführung eines Zymogens in ein Enzym. Sie finden, dass die Wirkung der Blausäure am besten als die eines Co-Enzyms aufgefasst werden kann. Zu demselben Schluss kommen in letzter Zeit Willstätter und Mitarbeiter in ihren ausgezeichneten Untersuchungen über pflanzliche Proteasen. Sie fanden¹, dass die Wirkung von HCN auf Papain grosse Ähnlichkeit hat mit der Beziehung zwischen Enterokinase (Co-Tryptase) und Tryptase². Auch die Aktivierung des Papains erfordert eine gewisse Zeit.

Der wichtigste Befund Willstätters bezüglich Papain ist indessen der, dass die Spezifität des Papains von der des aktivierten Enzyms deutlich verschieden ist. Das Papain und das Papaincyanhydrin sind zwei verschiedene Proteasen. Während das nicht aktivierte Enzym zwar Gelatine und andere natürliche Eiweissstoffe anzugreifen vermag, kann es Peptone nicht spalten, und zwar weder die durch seine eigene Wirkung entstandenen, noch käufliche Präparate. Das aktivierte Enzym spaltet dagegen diese Peptone weitgehend. Auch dieses Verhalten ist in Übereinstimmung mit dem bei Trypsin gefundenen, indem die nicht aktivierte Tryptase gewisse einfachere Stoffe angreifen kann, die höheren Proteine dagegen erst in Verbindung mit der Enterokinase spaltet. Die Spezifität der Tryptase und des Papains ist also vertauscht.

1. Bestimmung.

Zur Messung der proteolytischen Wirkung der Pflanzenproteasen eignen sich dieselben Methoden wie bei den Tierproteasen. Am besten ist die Formoltitration nach Sørensen oder die Alkalititration in alkoholischer Lösung nach Waldschmidt-Leitz. Als Substrat für vergleichende Bestimmungen kann Gelatine dienen. Nach Willstätter und Grassmann sind hohe Gelatinekonzentrationen günstig, da hier das Leistungsvermögen des Enzyms ausgenützt wird und kleine Volumina zur Titration genügen.

2. Adsorptionsverhalten des Papains.

Reinigung durch Kaolin und Tonerde. Eine Vorreinigung kann durch Alkohol-fällung erzielt werden. Am besten setzt man zuerst zu dem

¹ Willstätter und Grassmann, H. 138, 184; 1924.

² Waldschmidt-Leitz, H. 132, 181; 1923/24.

rohen Saft etwas Blausäure und überlässt das Gemisch während einiger Zeit der Selbstverdauung. Danach fällt man mit Alkohol und erreicht so eine Konzentration, die etwa dreimal so gross ist wie die der Rohlösung.

Durch Kaolin lässt sich das Papain sowohl in wässriger, wie in alkoholhaltiger Lösung und bei verschiedenen Aciditäten leicht sorbieren. Die Sorption durch Tonerde ist dagegen von allen diesen Verhältnissen stark abhängig. Am besten wird Papain aus schwach ammoniakalischer Lösung sorbiert, und kann aus dem Sorbat durch verdünnte Essigsäure eluiert werden. Viel leichter wird es aus alkoholhaltiger Lösung sorbiert; der Einfluss des Alkohols ist bei Konzentrationen weit unter der beginnenden Fällung schon sehr beträchtlich. Glycerin verhindert die Sorption.

3. Kinetik.

Enzymmenge und Reaktionsgeschwindigkeit. Um eine Messungsmethode für Papain zu begründen, die zur Bestimmung der Ausbeute bei Reinigungsversuchen usw. dienen kann, haben Willstätter und Grassmann die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Enzymmenge untersucht. Wir führen einen Versuch an. Das Enzym (käufl. Succus Caricae) wurde während zwei Stunden mit 5 mg HCN in 20 ccm vorbehandelt. In dieser Zeit wird die maximale Aktivierung erreicht. Danach Gelatinespaltung bei $\text{pH} = 5,2$ und 40° . Die Spaltungsgrade sind in ccm 0,2 n KOH angegeben.

Enzymmenge (mg) für 0,4 g Gelatine in 10 ccm	Reaktionsdauer in Stunden				
	0,5	1,0	1,5	2,0	4,0
1,25	0,26	0,50	0,66	0,82	1,14
2,5	0,61	0,97	—	1,40	1,77
5	0,87	1,26	1,54	1,77	2,20
10	1,23	1,73	2,02	2,20	2,62
20	1,50	1,96	—	2,48	2,76

In Figur 77 stellen die Autoren die Spaltung nach einer Stunde als Funktion der Enzymmenge dar. Der Zusammenhang ist nicht einfach. Vielleicht spielen natürliche Hemmungskörper mit, da die Kurve den entsprechenden bei Pepsin usw. recht ähnlich ist.

Zeitlicher Verlauf. Hier wie bei den anderen Proteasen wird der zeitliche Verlauf der Eiweisspaltung von so vielen, wenig bekannten Faktoren beeinflusst, dass eine Aufstellung von Formeln keinen Sinn hat. Wie schon aus der obigen Versuchsreihe hervorgeht, wird die Spaltungsgeschwindigkeit besonders bei den grösseren Enzymmengen mit der Zeit sehr rasch verkleinert. Dies ist auch hier auf die verzögernde Wirkung der Spaltprodukte zurückzuführen.

Einige durch Papain nicht weiter spaltbare Produkte haben Willstätter und Grassmann auf ihre hemmende Wirkung geprüft. Für Leucyl-Glycin liess sich mit Gelatine als Substrat eine Hemmung nachweisen. Gelatine-pepton, durch Papain dargestellt, wirkte auch hemmend, sowohl auf Papain wie auf Cyanhydrin. Eine grössere Hemmung wird durch das weniger abgebaute käufliche Pepton aus Albumin ausgeübt. Sie erstreckt sich auch auf das Cyanhydrin.

Zeitlicher Verlauf der Aktivierung durch Cyanwasserstoff. (Nach dem Vorgange von Willstätter wird die Verbindung Enzym-HCN, kurz Papaincyanhydrin genannt.) Der Cyanwasserstoff wirkt auf Papain

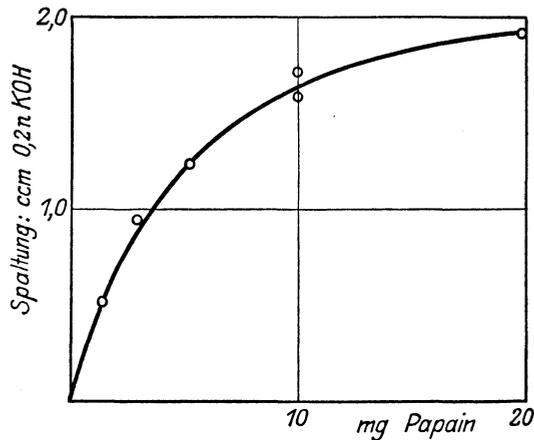


Fig. 77.

mit messbarer Geschwindigkeit ein. Mischt man Papain mit einer grösseren Menge HCN und entnimmt nach verschiedenen Zeiten Proben, deren eiweiss-spaltende Wirkung gemessen wird, so ergibt sich eine mit der Zeit steigende Proteasenwirkung. Es zeigt sich dabei, dass nach einer gewissen Zeit ein Maximum erreicht wird und dass die Wirkung danach wieder bis zu einem konstanten Wert abnimmt. Die Erklärung dieses auffallenden Verhaltens findet Willstätter in der verschiedenen Spezifität des Papains und des Cyanhydrins. Aus seinen Arbeiten geht, wie wir oben schon gesagt haben, hervor, dass das Cyanhydrin gewisse Bindungen im Eiweissmolekül löst, die nicht von dem Papain angegriffen werden, und umgekehrt deuten die Versuche nach Willstätter darauf hin, dass für die Lösung gewisser anderer Bindungen das nicht aktivierte Papain überlegen ist. Es kann also für gewisse Substrate eine bestimmte Mischung von Papain und Cyanhydrin besser wirken als das reine Cyanhydrin. Als Beispiel für die Aktivierung durch HCN wird folgende Tabelle angeführt:

Hydrolyse von Gelatine bei 40°. Spaltungsbeträge in ccm 0,2 n KOH angegeben:						
Für jede einzelne Hydrolyse von 0,4 g Gelatine in 18 ccm, angewandt:		Dauer der Aktivierung vor dem Vermischen mit dem Substrat (Stunden)				
Papain mg	Blausäure mg	0	0,5	1	2	längere Zeit
9,0	0,98	1,30	1,48	—	1,34	1,38 n. 3,5 St.
9,0	24,4	1,28	1,91	2,00	1,91	—
9,0	4,8	1,26	1,76	1,98	1,82	1,83 n. 6 St.
4,5	4,8	0,83	—	1,43	1,45	1,47 n. 19 St.
2,25	4,8	0,53	—	0,79	1,03	1,07 n. 19 St.

Wie früher Mendel und Blood kommen auch Willstätter und Grassmann zu dem Schluss, dass die Papainaktivierung durch HCN nicht etwa auf Beseitigung von Hemmungskörpern u. dgl. beruhen kann. Wenn nämlich nach den verschiedensten Reinigungen die Aktivierung untersucht wurde, zeigte sich dieselbe Abhängigkeit von der Zeit usw.¹

Mendel und Blood fanden, dass, wenn die Blausäure durch einen Luftstrom aus der Lösung ausgeblasen wurde, die Aktivierung zurückging, um bei erneuertem Zusatz von HCN wieder aufzutreten. Diese Versuche wurden von Willstätter völlig bestätigt. Am besten entfernt man die Blausäure durch Eindampfen im Vakuum. Der zeitliche Verlauf der neuen Aktivierung durch HCN ist derselbe wie derjenige der ersten. Auch das Maximum nach einstündiger Einwirkung findet sich wieder. In folgender Tabelle haben Willstätter und Grassmann einige Aktivierungsversuche mit verschiedenen Papainpräparaten zusammengefasst:

Vorbehandlung	Dauer der Einwirkung vor dem Vermischen mit dem Substrat (Stunden)				
	1 Min.	0,5	1	2	längere Zeit
Keine	1,26	1,77	1,98	1,82	1,83 n. 6 St.
Gereinigt durch Alkoholfällung .	1,11	1,80	1,94	1,86	1,81 n. 4 St.
Gereinigt durch Tonerdesorption .	1,31	1,82	—	1,98	—
Aktiviert, von HCN befreit, wieder aktiviert	1,07	1,60	1,81	1,70	1,73 n. 18 St.

Aktivierung durch H₂S.

Die schon von Mendel und Blood gefundene Aktivierung durch Schwefelwasserstoff haben Willstätter, Grassmann und Ambros genauer studiert². Sie fanden, dass in den Fällen, wo Papain allein wirkungslos ist (mit genuinem Eieralbumin und mit Pepton), Schwefelwasserstoff ein geeignetes Co-Enzym ist, dass in einigen Fällen ebenso gut wirkt wie HCN, in anderen Fällen schwächer.

¹ Vgl. Myrbäck: H. 158, 160; 1926 u. zwar S. 231.

² Willstätter, Grassmann und Ambros, H. 151, 236; 1926.

Mit Schwefelwasserstoff konnte ein zeitlicher Verlauf der Aktivierung nicht festgestellt werden, sondern diese Reaktion scheint mit grosser Geschwindigkeit zu verlaufen.

Die Spezifität des Papains und des Cyanhydrins.

Wie früher schon gesagt ist, haben Willstätter und Mitarbeiter gefunden, dass die Aktivierung des Papains mit HCN nicht bloss eine Geschwindigkeitssteigerung bedeutet, sondern dass das Cyanhydrin als proteolytisches Enzym für gewisse Substrate spezifisch ist.

Mendel und Blood beobachteten, dass für die Spaltung von Pepton Witte und für das Auftreten von Tyrosin und Leucin bei der Spaltung von Eialbumin die Anwesenheit von HCN erforderlich ist. Willstätter und Grassmann fanden, dass bei Behandlung von „Pepton ex Albumine Merck“ mit nicht aktiviertem Papain in den ersten Stunden eine kleine Spaltung eintrat, die indessen in den folgenden Stunden und Tagen nicht zunahm. In diesem Pepton sind also nur vereinzelte Bindungen von Papain lösbar. Papain + HCN bewirkt dagegen eine durchgreifende Hydrolyse.

Enzym	Reaktionsdauer in Stunden			Reaktionsdauer in Tagen			
	1	2	4	1	2	4	8
Papain ohne HCN	0,16	—	0,16	0,14	—	—	0,17
Papain mit 2,5 mg HCN vorbehandelt	0,22	0,31	0,41	0,71	0,94	1,09	1,19

Ähnliche Verhältnisse wurden bei dem Abbau von Gelatinepeptonen gefunden. Dass bei der Papainwirkung grosse Mengen von Aminosäuren entstehen, wurde schon durch die ersten Arbeiten über dieses Enzym bekannt. Die Wirkung des Papains auf einfache Peptide prüften zuerst Abderhalden und Teruuchi¹. Mit sehr grossen Enzymmengen konnten sie Glycyl-l-Tyrosin spalten. Dagegen konnte Frankel² keines der Dipeptide Glycylglycin, Alanylglycin, Glycylalanin, Alanylalanin und Glycyltyrosin zerlegen. Neuerdings fanden auch Willstätter und Grassmann sowohl Papain wie sein Cyanhydrin gegen Glycylglycin und d-l-Leucylglycin völlig inaktiv. Dagegen wurde das Tripeptid Leucyl-Glycyl-Leucin durch Papaincyanhydrin, wenn auch langsam, gespalten.

Aciditätskurve. Baginski³ fand das Wirkungsoptimum in neutraler Lösung. In alkalischer Lösung fand es Emmerling⁴ und Rippetoe⁵, in

¹ Abderhalden und Teruuchi, H. 49, 21; 1906.

² E. M. Frankel, JI Biol. Chem, 31, 201; 1917.

³ Baginski, H. 7, 211; 1883.

⁴ Emmerling, Chem. Ber. 35, 695; 1902.

⁵ Rippetoe, JI of Ind. and Engin. Chemistry 4, 517; 1912.

saurer Graber¹. Frankel² hat mit Indicatoren die wahre Acidität ermittelt und fand das Optimum bei $\text{pH} = \text{etwa } 5$. Für Papain + HCN fand er dasselbe Optimum, nur mit langsamerer Senkung nach der alkalischen Seite hin. Willstätter und Grassmann fanden auch das Optimum der Gelatinespaltung bei $\text{pH} = 5$. Der Abfall der Kurve ist nach der sauren Seite steil, nach der alkalischen flach. Genau dasselbe Optimum wurde beim Papaincyanhydrin gefunden (Fig. 78).

Salzwirkungen. Nach Willstätter haben die Salze der gewöhnlichen Puffermischungen keinen spezifischen Einfluss. Ältere Angaben über

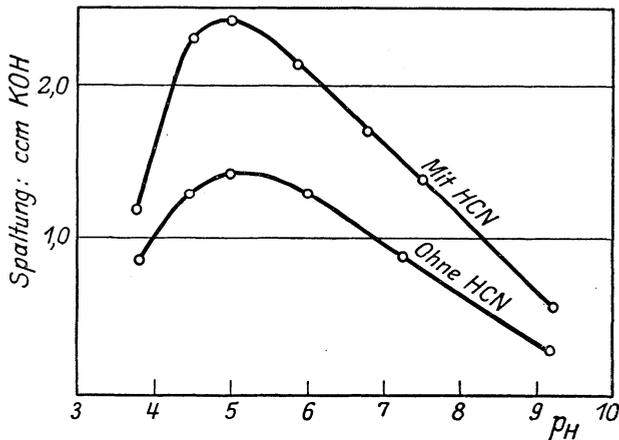


Fig. 78.

Förderung und Hemmung durch Salze sind im allgemeinen durch Aciditätsverschiebungen zu erklären.

Bezüglich NaF fanden Willstätter, Grassmann und Ambros, dass die Peptonspaltung gar nicht beeinflusst, dagegen die Fibrinlösung merklich gehemmt wurde. Dies hängt wohl damit zusammen, dass im letzten Falle das Substrat fest ist.

4. Verschiedene Substrate.

Wie bei den tierischen Proteasen war auch hier zu erwarten, dass das pH Optimum mit dem Substrat variiert.

Wie man sich auch die Bindung zwischen Enzym und Eiweiss vorstellen mag, so muss in jedem Falle der Dissociationszustand des Eiweisses von Bedeutung sein. Willstätter und Mitarbeiter haben nun verschiedene Substrate untersucht: Gelatine gab, wie oben erwähnt, das Optimum bei 5. Der isoelektrische Punkt der Gelatine ist 4,8.

Für Albuminpepton fanden sie dasselbe Optimum bei 5. Das Albuminpepton hat auch bei etwa 4,8 seinen isoelektrischen Punkt. Über

¹ Graber, JI of Ind. and Engin. Chemistry 3, 919; 1911.

² E. M. Frankel, JI Biol. Chem. 8, 177; 1910.

die Fibrinlösung durch Papain berichten die älteren Arbeiten, dass sie am besten in schwach alkalischer Lösung verläuft. In guter Übereinstimmung damit fanden Willstätter, Grassmann und Ambros¹ das pH-Optimum der Fibrinlösung bei 7,1—7,3. Bemerkenswert ist, dass nach Kugelmass² der isoelektrische Punkt des Fibrins bei $\text{pH} = 7,2$ liegt. Die Aciditätskurve findet sich in der Figur 79.

Aus den Versuchen von Willstätter scheint also hervorzugehen, dass das Spaltungsoptimum recht gut mit den isoelektrischen Punkten der einzelnen Proteine zusammenfällt. Aus diesen Tatsachen schliesst Will-

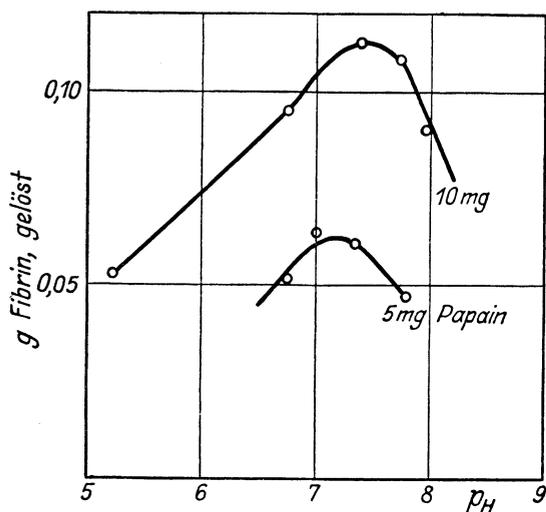


Fig. 79.

stätter, dass das Papain der Typus einer dritten Gruppe von Proteasen ist, in welcher die Enzyme im Gegensatz zu Pepsin und Pankreastryptase das isoelektrische Eiweiss binden und spalten. Diese Enzyme scheinen nach den Untersuchungen der letzten Zeit, vor allem nach denen der Willstätterschen Schule, mehr verbreitet zu sein, als man früher vermutet hat. Dahin gehören die Protease der Hefe und vielleicht die sog. Gewebspepsinasen. Für eine künftige rationelle Einteilung der

Proteasen dürfte dieser Gesichtspunkt leitend werden.

Die Wirkung des Papains auf genuines Eialbumin ist nach den schon früher besprochenen Untersuchungen von Délezenne, Pozerski u. a. bei gewöhnlicher Temperatur nicht merkbar. Bei relativ hoher Temperatur wird die Wirkung bedeutend. Willstätter hat dieses Phänomen auf die verschiedene Angreifbarkeit des nativen und des denaturierten Eialbumins zurückgeführt. „Der Unterschied im Verhalten des genuinen und des denaturierten Eiweisskörpers beruht wohl im wesentlichen auf konstitutionellen Änderungen der Proteine, mit denen die Denaturierung verbunden ist. Man erkennt in dem Enzym ein feines Reagens auf die konstitutionellen Eigentümlichkeiten des Substrates.“

In folgender Tabelle stellen Willstätter und Mitarbeiter die Resultate über die Spaltung des Eialbumins zusammen. Das Eialbumin wurde nach einer besonderen Methode hergestellt, um jede Denaturierung auszuschliessen.

¹ Willstätter, Grassmann und Ambros, H. 151, 307; 1926 u. z. S. 315.

² Kugelmass, C. r. Soc. Biol. 87, 802; 1922.

Wir sehen aus der Tabelle, dass bei 40° das nicht aktivierte Papain das native Eialbumin kaum angreift, dagegen leicht denaturiertes spaltet. Bei 70° findet man eine recht bald aufgehörende Wirkung auf das native Eiweiss.

Versuch bei 40° Substrat	Aktivator	Spaltung (ccm $\frac{n}{5}$ KOH) nach Reaktionsdauer in Stunden			
		2	4	24	72
Eialbumin nativ . . .	—	0,07	—	0,13	0,10
" " . . .	5 mg HCN	0,31	0,42	1,57	3,12
" " . . .	0,7 mg H ₂ S	0,19	0,28	0,65	1,01
" denaturiert	—	—	0,94	1,08	1,22

Versuch bei 70°		Reaktionsdauer in Minuten			
		10	30	60	120
Eialbumin nativ . . .	—	0,13	0,26	0,31	0,32

Bemerkenswert ist in diesen Versuchen, dass das Papaincyanhydrin das native Eialbumin zu spalten vermag. Bindungen in dem nativen Eiweiss, die nur von dem aktivierten Enzym gelöst werden, werden durch die Denaturierung in solche verwandelt, welche auch von dem nicht aktivierten Enzym angegriffen werden können.

5. Einfluss der Temperatur.

In fast allen älteren Untersuchungen wurde für Papain ein auffallend hohes Temperaturoptimum gefunden¹. So ist behauptet worden, dass noch bei 90° und 100° eine starke Proteolyse stattfindet. Wurde ein passendes Gemisch von Papain mit Eialbumin oder Serumeiweiss über freier Flamme erhitzt, so wurde beim Kochen beinahe kein Koagulum erhalten. Bei 40°, wo die Papainwirkung im allgemeinen optimal verläuft, wurden diese Substrate äusserst langsam angegriffen. Diese und ähnliche Versuche würden für eine ausserordentliche Hitzestabilität des Papains sprechen. Wie schon Mendel und Blood die Erscheinung als die gewöhnliche Wechselwirkung zwischen Zerstörung und mit der Temperatur vergrösserter Reaktionsgeschwindigkeit erklärten, haben in neuerer Zeit Willstätter und Grassmann gezeigt, dass das Papain auch in Anwesenheit von HCN und viel Substrat, welches das Enzym schützt, 90° nicht erträgt. Eine Temperatur von 80° bewirkt schon unter denselben Verhältnissen eine sehr schnelle Zerstörung. Die grossen Anfangswirkungen bei hohen Temperaturen treten vor Erreichung dieser Temperaturen ein.

¹ Délezenne, Mouton und Pozerski, C. r. Soc. Biol. 60, 63, 309; 1906. — Pozerski, Ann. Inst. Pasteur, 23, 205, 321; 1909. Griffith Hughes schreibt: "This juice is of so penetrating a nature, that if the unripe fruit when unpeeled is boiled with the toughest old salt meat, it will soon make it soft and tender."

Die Optimaltemperatur ist nach den alten Untersuchungen 45°—60°. Nach Willstätter und Grassmann liegt sie bei 65°—70°. Die Geschwindigkeit der Anfangsspaltung steigt im Intervall von 30°—70° bei einer Temperatursteigerung von 10° auf etwa das Doppelte.

B. Die Ananasprotease (Bromelin).

Diese Protease kommt im Saft von *Ananassa sativa* vor und hat im Handel Bedeutung erlangt. Die Frucht ist ausserordentlich saftreich: jede Ananas von Durchschnittsgrösse liefert etwa einen Liter Saft. Der Saft reagiert sauer, er enthält viel Zucker, aber wenig koagulierbares Eiweiss. Der Trockensubstanzgehalt ist durchschnittlich 10%.

Die Proteasen der Ananas sind am eingehendsten von Chittenden¹, Vines² und Caldwell³ untersucht worden. In neuerer Zeit ist das Studium dieser Protease von Willstätter und Mitarbeitern wieder aufgenommen worden⁴.

Das Enzym kann aus dem Saft mit Alkohol niedergeschlagen werden. Der sehr zuckerreiche Niederschlag lässt sich indessen nur schwer in trockener Form gewinnen, was grosse Verluste an Enzym verursacht.

Auch die von Chittenden und Caldwell angewandten Methoden der Fällung mit Kochsalz führen zu grossen Verlusten an Aktivität.

Wie Willstätter fand, lässt sich das Enzym durch $\frac{3}{4}$ -Sättigung mit Ammonsulfat ohne Verlust in dem 20—40fachen Reinheitsgrad aussalzen. Der Niederschlag wird sehr rasch abzentrifugiert und mit Alkohol und Äther getrocknet. Aus einem Liter erhält man in dieser Weise etwa 5 g Trockenpräparat.

Eigenart der Ananasprotease. Nach Vines soll das Bromelin, in schärfstem Gegensatze zu Papain, von HCN gehemmt werden. Seine Versuche waren mit der ungenauen Methodik der damaligen Zeit angestellt und der genannte Befund dürfte irrig sein. Willstätter findet, dass das Bromelin wie das Papain von HCN aktiviert wird. Ohne HCN vermag es Gelatine zu spalten, die Wirkung wird durch HCN um etwa 50% vergrössert. Gegen Albuminpepton ist das Bromelin zum Unterschiede von Papain nicht wirkungslos, wirkt aber nur sehr schwach und wird auch hier bedeutend durch HCN aktiviert. Auch H₂S aktiviert. Besonders beim Albuminpepton ist die Wirkung der des Papains vergleichbar. Willstätter schliesst: „Die Protease des Ananas steht dem Papain sehr nahe. Sie könnte ein besonderes Enzym sein, das dem Papain sehr ähnlich wäre; aber die Erscheinungen sind auch vollständig so zu verstehen, dass die Ananasprotease und das Papain iden-

¹ Chittenden, Trans. Conn. Acad. 8. Dec. 1891. — J1 of Physiol. 15, 249; 1894.

² Vines, Annals of Botany 17, 597; 1903; 19, 149; 1905.

³ Caldwell, Bot. Gaz. 39, 409; 1905.

⁴ Willstätter, Grassmann und Ambros, H. 151, 286; 1926; H. 151, 307; 1926.

tisch sind und die beobachteten Unterschiede (Wirkung auf Peptone, wenn auch schwache; geringere Aktivitätssteigerung durch die Zusatzstoffe) durch Vergesellschaftung mit einem natürlichen Aktivator bedingt sind.“ In der folgenden Beschreibung einiger Eigenschaften der Ananasprotease findet man Belege für diese Ansicht.

Temperatur. Der Ananassaft arbeitet nach alten Angaben am kräftigsten bei Temperaturen zwischen 50° und 60°. Noch bei 70° zeigt er eine starke Wirkung.

Aktivierung. Die Ananasprotease wird in verschiedenen Reinheitsgraden von HCN aktiviert. Der Effekt ist deutlich, aber bei verschiedenen Präparaten verschieden gross. Auch hat Schwefelwasserstoff, wie oben erwähnt, eine aktivierende Wirkung. In der folgenden Tabelle haben Willstätter, Grassmann und Ambros einige Versuche über die Aktivierungen zusammengestellt: Man sieht leicht, dass Papain und Bromelin sich gegen die zwei Aktivatoren qualitativ übereinstimmend verhalten. Auch bei Bromelin findet man die Abhängigkeit der Aktivierung von der Zeit. Bei sehr langen Einwirkungszeiten von HCN sinkt wieder die enzymatische Wirkung, was vielleicht auf Enzymzerstörung beruht.

Enzym	Aktivator	Substrat	ccm n/5 KOH nach Stunden					Aktivierung in %
			1	4	24	48	96	
Konzentrierter Saft 1	—	Gelatine	0,76	1,16	1,61	1,94	2,40	—
" "	5 mg HCN	"	0,84	1,48	2,38	2,86	3,58	10—50
" "	2,8 mg H ₂ S	"	—	1,12	1,56	1,88	2,26	—
Trockenpräparat 1	—	"	0,56	1,13	1,93	—	—	—
"	3,4 mg H ₂ S	"	0,71	1,42	2,13	—	—	10—30
"	—	Pepton	0,06	—	0,30	0,42	0,60	—
"	5 mg HCN	"	0,18	0,54	1,06	1,40	2,00	200—230
"	3,4 mg H ₂ S	"	—	—	1,38	—	2,18	260—300
Rohsaft 4	—	Gelatine	—	2,10	2,74	3,20	—	—
"	5 mg HCN	"	—	2,47	3,45	—	—	18—26
"	3,4 mg H ₂ S	"	—	2,04	3,17	3,58	3,88	0—16
"	—	Pepton	—	0,54	0,95	1,52	1,90	—
"	5 mg HCN	"	—	0,93	1,97	2,53	2,87	70
"	3,4 mg H ₂ S	"	—	1,13	2,15	2,75	3,05	80—130
Trockenpräparat 4	—	Gelatine	—	1,72	2,22	2,40	2,82	—
"	5 mg HCN	"	0,76	2,13	3,26	3,80	4,19	20—50
"	—	Pepton	—	0,08	0,49	0,71	1,09	—
"	5 mg HCN	"	—	0,80	1,55	1,99	2,40	120—200

Reaktionsgeschwindigkeit und Enzymmenge. Man findet hier wie bei Papain, dass kleine Enzymmengen eine relativ grössere Wirkung haben, was wohl auf natürliche Hemmungskörper zurückzuführen ist. Willstätter gibt folgende Figur 80.

Die Hemmungskörpertheorie wird durch folgende Beobachtung gestützt.

Beim Altern der Ananassäfte findet man bei annähernder Konstanz der Wirkung auf Pepton fortdauernde Aktivitätsverminderung gegenüber Gelatine. Dies beruht auf der Ausbildung eines spezifischen Hemmkörpers, denn gealterter Ananassaft wirkt auf die gelatineverdauernde Wirkung eines Ananastrockenpräparates stark hemmend.

Aciditätskurve. Optimale Hydrolyse der Gelatine erfolgt im Bereich von $\text{pH} = 4,5$ bis $5,0$, übereinstimmend mit dem Maximum der Gelatine-

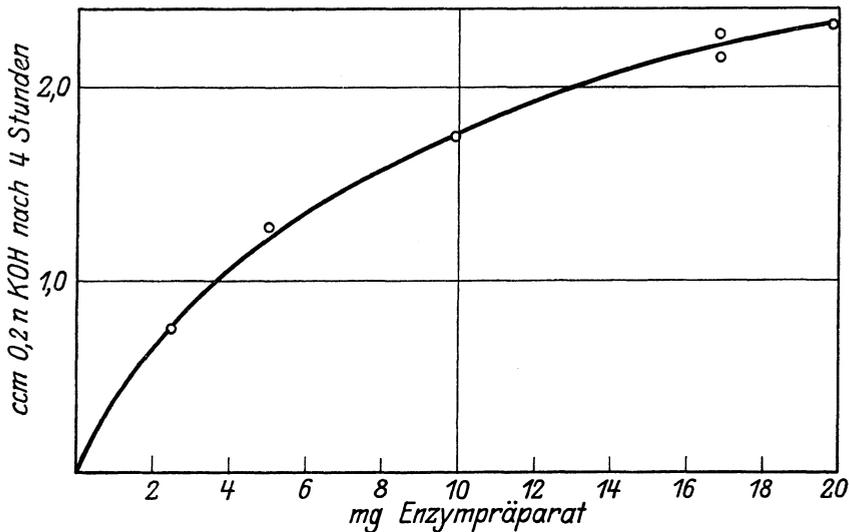


Fig. 80.

spaltung durch Papain und mit dem isoelektrischen Punkt des Substrates. Für das Vorkommen von mehreren Proteasen im Ananassaft geben die Versuche von Willstätter keine Anhaltspunkte.

Für die Spaltung von Albuminpepton erhält man, wie bei Papain, das Optimum auch bei etwa $\text{pH} = 5$.

C. Die Protease aus Cucurbita Pepo¹.

Da nach den neuen Untersuchungen von Willstätter die Protease der Kürbisse ein von Papain und Bromelin ganz abweichendes Verhalten zeigt, werden hier die Arbeiten über dieses Enzym in Kürze besonders referiert.

Material. Am besten geht man von grünhäutigen Früchten mit farblosem Fleisch aus. Ein mittlerer Kürbis von 6 kg Gewicht lieferte in einem Beispiel 2,5 Liter trüben Saft. Um eine genügend starke Wirkung zu erzielen, dampft man den Saft im Vakuum ein. Das Enzym ist in der Rohlösung unter Toluol monatelang haltbar. Eine Fällung mit Alkohol gelingt hier nicht, da dabei alles Enzym zerstört wird. Mit Ammonsulfat kann eine enzym-

¹ Willstätter, Grassmann und Ambros, H. 151, 303; 1926 und 151, 315; 1926 und 152, 172; 1926.

haltige Fällung erzeugt werden, die, in Wasser gelöst, ein aktive Enzymlösung gibt, die durch Dialyse weiter gereinigt werden kann.

Verhalten gegen Cyanwasserstoff. Im Gegensatz zum Papain wird die Kürbisprotease von HCN und H₂S stark gehemmt. Als Beispiel führen wir eine Tabelle von Willstätter an.

Versuchsdauer	1	2	8 Tage
Ohne Zusatz	1,97	3,09	5,58 ccm $\frac{n}{5}$ KOH
Mit HCN 10 mg	1,30	1,91	5,50 „ „ „
Mit H ₂ S 5 mg	1,04	1,14	2,99 „ „ „

Die sehr starke Abweichung der Kürbisprotease vom Papain zeigt sich ausserdem in den Aciditätskurven bei Spaltung verschiedener Substrate.

Aciditätskurven.

Nach Fermi und Buscaglioni¹ soll die Protease von Cucurbita am besten in neutraler Lösung wirken (Gelatinespaltung). Dies wurde von Willstätter bestätigt:

pH der Lösung		Spaltung ccm $\frac{n}{5}$ KOH
Beginn	Ende	
4,3	4,5	1,5
5,0	5,2	2,5
5,4	5,5	3,3
6,6	6,5	3,8
7,0	6,7	4,2
8,0 Kontrolle mit gekochtem Enzym		0,3

Die Spaltung des Albuminpeptons zeigt dagegen bei pH = 6,3 ein schmales Optimum mit steilem Abfall der Kurve nach beiden Seiten hin.

Während also in den jetzt beschriebenen Fällen die Kürbisprotease von dem Papain stark abweicht, zeigt sie bei der Fibrinauflösung dasselbe Optimum bei etwa 7,4. Es handelt sich indessen hier um ein festes Substrat, und es ist möglich, dass hier Sorption oder Bindung des Enzyms an der Eiweiss-oberfläche und ähnliche Umstände die Aktivitätskurve mitbestimmen. Fest steht jedenfalls, dass die Kürbisprotease in mancher Hinsicht von dem Papain abweicht, so dass man mit Willstätter annehmen kann, dass sie zwei verschiedene Enzyme sind und dass die Verschiedenheiten nicht durch Hemmungskörper und dgl. vorgetäuscht werden. Bemerkenswert ist, dass die Kürbisprotease Aktivitätsoptima zeigt, die weder mit dem isoelektrischen Punkte der Substrate, noch mit dem Gebiet maximaler Salzbildung nach Northrop zusammenfallen.

¹ Fermi und Buscaglioni, Zbl. f. Bakt. 5, 24; 1899.

Sorptionsverhalten. Im Gegensatz zu Papain wird die Kürbisprotease durch Tonerde aus saurer Lösung leicht, aus ammoniakalischer schlecht adsorbiert. Bei Sorptionsversuchen mit Tonerde konnten keine Verschiebungen in der Wirksamkeit der Lösungen gegenüber verschiedenen Substraten beobachtet werden.

D. Andere Proteasen in Säften und Früchten.

Marcano¹, der zuerst die Eiweissverdauung durch Ananassaft untersucht hat, fand auch in vielen anderen Früchten ähnliche Wirkung. Schon früher hatte er gefunden, dass der ausgepresste Saft der Blätter einiger Arten von Agave imstande war, Fleisch zu verdauen. Die recht schwache Wirkung des Agavesaftes wurde von Chloroform nicht gehemmt und war bei etwa 40° am grössten.

Wittmack² und Bouchut³ fanden eine Protease im Milchsaft von *Ficus carica*. Die Angaben von Bouchut über die Eiweissverdauung wurden von Hansen⁴ bestätigt. Hansen fand das Enzym am besten in schwach saurer Lösung wirksam, auch in einer alkalischen Flüssigkeit war es nicht ganz wirkungslos. Nach Mussi⁵ dagegen ist es in neutraler Lösung wirkungslos. Mussi fällte das Enzym aus dem Saft mit Alkohol. Nach Gerber⁶ hemmen H_2O_2 , $HgCl_2$, Jod.

Im Saft vom Kachree-Kürbis (*Cucumis utilissimus*) fand Green⁷ eine Protease, die koaguliertes Eialbumin langsam löste. Am wirksamsten war sie in alkalischer Lösung, schwächer in neutraler, noch schwächer in saurer.

Eine Protease in Anagallis fanden Dacomo und Tommasi⁸. Die Existenz dieses Enzymes wird aber von Bufalini bestritten⁹.

Mohnsaft soll nach Annett¹⁰ eine Protease enthalten.

In reifen Weintrauben soll nach Pantanelli¹¹ eine eigentümliche Protease vorkommen, die bei saurer Reaktion das eigene Eiweiss autolytisch angreift.

Eine Protease in Bananen beschreibt Bailey¹².

¹ Marcano, C. r. 99, 811; 1884 und 107, 117; 1888. — Bull. of Pharmacy 5. 213; 1884.

² Wittmack, Vers. d. d. Naturf. und Ärzte 1879; 222.

³ Bouchut, C. r. 91, 67; 1880.

⁴ Hansen, Arb. Bot. Inst. Würzburg, 3, 265.

⁵ Mussi, Ref. in Pharm. JI 3 ser. 21, 560; 1890/91.

⁶ Gerber, Soc. Biol. 74, 1336; 1913.

⁷ Green, Ann. of Botany, 6, 195; 1892.

⁸ Dacomo und Tommasi, Rev. de Therap. 59, 470.

⁹ Bufalini, Biochem. Zbl. 10, 1886.

¹⁰ Annett, Biochem. JI 16, 765; 1922.

¹¹ Pantanelli, Zbl. f. Bakt. 31, 545; 1912 und 42, 480; 1914.

¹² Bailey, JI Amer. Chem. Soc. 34, 1706; 1912.

E. Proteasen der Samen.

Die Proteasen der Samen einiger Pflanzen sind recht gut untersucht, teilweise mit moderner Methodik. Über die Proteasen der übrigen Gewebe dagegen sind unsere Kenntnisse sehr lückenhaft. Teils wurde die Autolyse der verschiedenen Teile untersucht¹, teils wurde in einigen Fällen die Spaltung zugesetzter Eiweissstoffe gemessen². Proteasen kommen in allen Geweben vor und in jedem Wachstumsstadium der Pflanze. Aus den wenigen einwandfreien Arbeiten scheint hervorzugehen, dass Peptidasen vorkommen neben einer Pepsinase, wogegen eine Tryptase zu fehlen scheint. Anzunehmen ist wohl, dass es sich auch hier um Enzyme vom Typus des Papains oder des Kürbisenzyms handelt.

Die Proteasen der Samen werden bei der Keimung in Tätigkeit gesetzt. Deshalb sind eigentlich nur keimende Samen untersucht worden. Entdeckt wurde zuerst eine Protease in den Samen der Wicke von Gorup-Besanez³. Die Protease fand er dann in den Samen des Hanfes, des Flachses und der Gerste. Er gibt an, dass das Enzym Fibrin in Peptone zu verwandeln vermag, worauf eine deutliche Biuretreaktion des Filtrates hindeutet. Er stellte auch fest, dass unter gewissen Bedingungen in den Schoten ganz junger Wickenpflanzen grosse Mengen Leucin und Asparagin nachgewiesen werden können.

Die Protease der Samen von *Lupinus hirsutus* untersuchte Green⁴. Sie ist in schwach saurer Lösung gegen Fibrin wirksam. Ein ähnliches Enzym fand er in den Samen von *Ricinus communis*.

Neumeister⁵ fand derartige Enzyme in anderen Samen, so von Gerste, Mohn, Raps, Mais und Weizen. Aus den Extrakten sorbierte er das Enzym durch Fibrin. Wurden dann die Fibrinflocken in eine schwach saure Lösung gebracht, so trat Verdauung ein. Neumeister fand das Enzym nur in schwach saurer Lösung wirksam. Die Säure soll nach ihm eine organische sein, Mineralsäuren zerstören das Enzym.

Über Proteasen in Mehl siehe Swanson⁶. Eine Untersuchung über die Proteasen in Weizen haben Sharp und Elmer ausgeführt⁷.

Proteasen des Malzes.

Grosses Interesse haben wegen der praktischen Verwendung die Proteasen des Malzes. Sie wurden in Malzextrakte von Fernbach und Hubert

¹ Palladin und Mitarbeiter, *Biochem Zs* 39, 290; 42, 325; 1912; 44, 318; 1912.

² E. A. Fisher, *Biochem. JI* 13, 124; 1919.

³ v. Gorup-Besanez, *Chem. Ber.* 7, 1478; 1874 und 8, 1510; 1875.

⁴ Green, *Ann. of Bot.* 7, 112; *Proc. Roy. Soc.* 48, 370.

⁵ Neumeister, *Zs Biol.* 30, 447; 1894.

⁶ Swanson und Tague, *Jl Amer. Chem. Soc.* 8, 1098; 1916.

⁷ Sharp und Elmer, *Cereal Chemistry*, 1, 83, 1924.

gefunden¹. Reinigungsversuche sind kaum vorgenommen worden. Aus Malzextrakten kann das Enzym durch Alkohol gefällt werden. Durch Glycerin kann man das Enzym auch extrahieren.

In der rohen Gerste kommt nach Windisch und Schellhorn², denen wir eine umfassende Untersuchung verdanken, dasselbe, oder ein ähnliches Enzym vor. In schlecht geernteten oder eiweissreichen Gersten kann das Enzym in beträchtlicher Menge vorkommen. Beim Beginn der Keimung tritt eine starke Vermehrung ein, die dann bis zum Grünwerden der Pflanze weitergeht.

Temperatur. Nach Fernbach, dessen Resultate von Windisch bestätigt wurden, beeinträchtigen Temperaturen unter 60° das Enzym kaum. Bei 70° tritt schnelle Zerstörung ein. Wahl³ fand dagegen das Temperatur-optimum bei etwa 30°, Adler⁴ bei 46°. Durch den Darrprozess wird das Enzym geschwächt, aber nicht vollkommen zerstört.

Substrate. Nach mehreren Autoren sollen die Samenenzyme in der Hinsicht spezifisch sein, dass sie das eigene Eiweiss schneller oder vollständiger abbauen.

Auf zugesetzte Eiweissstoffe wirken sie im allgemeinen schwach. Gelatine und Edestin werden eingermassen leicht gespalten. Eieralbumin wird nach Lundin⁵ nicht gespalten. Die pflanzlichen Eiweisse werden im allgemeinen leichter angegriffen als die tierischen. Serumeiweiss wird nicht hydrolysiert, denaturiertes soll langsam gelöst werden. Feste Eiweissstoffe werden nur schwer gelöst.

Aciditätsbedingungen.

a) Die Autolyse. Windisch² gibt an, dass die Protease auf das durch den Keimprozess gelöste Eiweiss am besten in schwach saurer Lösung wirkt. Zusatz von organischen Säuren in kleinen Mengen wirkte fördernd. Fernbach⁶ fand die Reaktion des primären Phosphates am günstigsten. Ein Optimum bei pH = 5,8 fand Schjerning⁷. Mit modernerer Methodik ermittelte Adler das Aktivitätsoptimum bei 4,5–5,0. Unter Anwendung der Formoltitration hat dann Lundin das Optimum der Malzautolyse bestimmt. Aus seiner folgenden Fig. 81 findet man das Optimum bei pH = 4,5. Die Kurven, welche die Abhängigkeit der Formolstickstoffbildung von der Zeit veranschaulichen, verlaufen recht geradlinig, was darauf hindeutet, dass die in den Versuchen von Lundin gebildeten Abbauprodukte noch nicht er-

¹ Fernbach und Hubert, C. r. 130, 1783; 1900.

² Windisch und Schellhorn, Woch. f. Brau. 1900, S. 334.

³ Wahl, Internat. Kongr. angew. Chem. 1912, 14, 215.

⁴ Adler, Zs ges. Brauwesen, 38, 17; 1915.

⁵ Lundin, Biochem. Zs 131, 193; 1922.

⁶ Fernbach, C. r. 131, 293; 1901.

⁷ Schjerning, C. r. Trav. de Carlsberg 6, 225; 1906; 8, 169; 1910; 11, 45; 1914.

heblich hemmen. Dass Anhäufung von Abbauprodukten in der Lösung die weitere Tätigkeit des Enzyms vermindert, stellte schon Windisch fest.

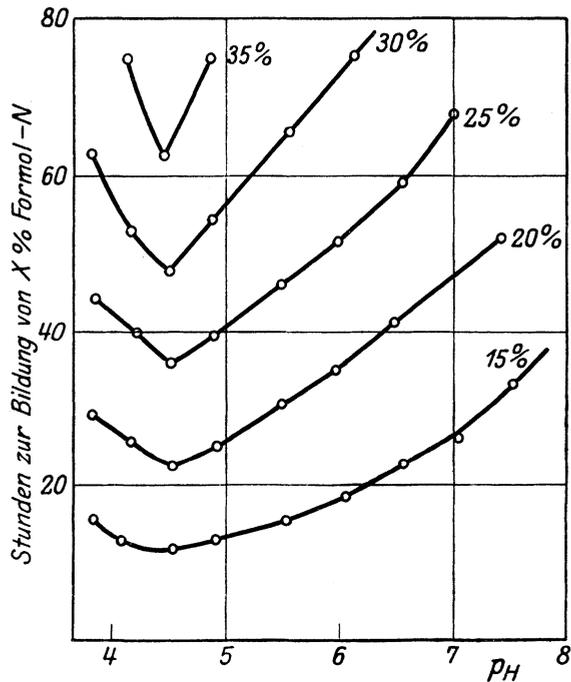


Fig. 81.

Lundin hat weiter den Reaktionsverlauf bei verschiedenen Aciditäten verfolgt und die verschiedenen Abbauprodukte bestimmt. Wir führen eine Tabelle an:

pH	Autolysezeit Stunden	Total-N im Filtrat	Albumin-N	Peptid-N	Amino-N	Ammoniak-N	Amino-N + Ammoniak-N
3,1	18	42,8	4,5	29,3	9,0	0	9,0
	100	50,6	0,5	28,5	20,6	1,0	21,6
	200	53,4	0,9	28,0	23,5	1,0	24,5
4,4	18	57,3	3,5	29,3	24,6	0	24,6
	100	71,6	3,5	27,8	39,3	1,0	40,3
	200	74,7	4,2?	26,1	41,3	2,5	43,8
6,8—7,1	18	42,8	5,3	27,0	10,5	0	10,5
	100	54,3	4,2	22,5	25,6	2,0	27,6
	200	55,7	5,6	16,9	29,2	4,0	33,2

Bei Betrachtung der Versuche 1 und 3, wo der totale Stickstoffgehalt des Filtrates ungefähr gleich ist, findet man einen beträchtlichen Unterschied im Verlauf der Autolyse. Bei der Autolyse in saurer Lösung nimmt der

Albuminstickstoff rasch gegen 0 ab, während er sich im Versuch 3 in neutraler Lösung während der ganzen Zeit etwa konstant hält. Betreffs des Peptidstickstoffes sind die Verhältnisse gerade umgekehrt, und beim Amino-stickstoff steigen in beiden Versuchen die Werte; im Versuch 3 jedoch viel schneller. Lundin schliesst, dass in saurer Lösung eine Pepsinase arbeitet, welche die Eiweissstoffe in peptonähnliche Stoffe spaltet, während in neutraler Lösung hauptsächlich ein (trypsin- oder) erepsinähnliches Enzym wirksam ist.

b) Die Autolyse der Keimlinge. Bei entsprechenden Versuchen mit Malzkeimlingen kam Lundin zu dem auffallenden Resultat, dass es hier kein Enzym gibt, das in einigermassen saurer Lösung wirkt. Bei $\text{pH} = 6$

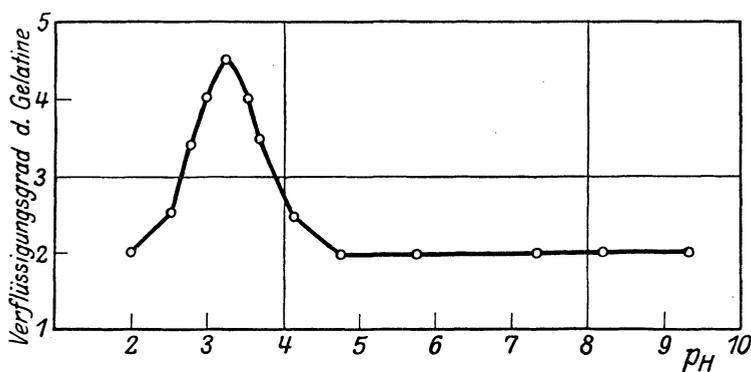


Fig. 82.

wurden dagegen die Eiweissstoffe gespalten. Lundin schliesst also auf ein trypsinähnliches Enzym. Vielleicht ist es richtiger, ein Enzym vom Papain-typus anzunehmen.

c) Die Wirkung der im Malz und in Keimlingen vorkommenden Proteasen hat nun Lundin näher untersucht. Er hat sie mit Substraten von verschiedenem Hydrolysegrad reagieren lassen und die Aciditätskurven ermittelt.

d) Die „Malzpeptase“, wohl besser Malzpepsinase genannt. (Für die Namen kann man einstweilen keine rationellen Vorschläge machen, da sowohl diese wie viele andere tierische und pflanzliche Proteasen noch zu wenig bekannt sind.)

Dieses Enzym des Grünmalzes wurde auf Thymogelatine nach Palitzsch und Walbum¹ und nach Derby² geprüft. Es wurde eine Aciditätskurve mit dem Optimum bei $\text{pH} = 3,5$ (Fig. 82) gefunden. Mit fertigem Pilsner Malz wurde eine Aciditätskurve mit dem Optimum bei 3,7—4,4 ermittelt.

Salze, welche die Acidität nicht verändern, haben eine sehr unbedeutende Wirkung.

¹ Palitzsch und Walbum, *Biochem. Zs* 17, 1; 1912.

² Derby, *Biochem. Zs* 81, 107, u. zw. 138; 1917.

Durch die Malzpeptase werden Eieralbumin und daraus hergestelltes Acidalbumin nicht angegriffen.

e) Die Malztryptase¹. Die tryptische Wirkung wurde durch Versuche über die Spaltung von Wittepepton gemessen. In einer Anzahl Versuche wurde ein recht breites Optimum zwischen 5 und 6 gefunden. Das Enzym dürfte keine echte Tryptase sein, vielmehr kann man an ein papainähnliches Enzym denken. Die neuen Versuche von Willstätter über die Hefenprotease haben gezeigt, dass sie zu jener Gruppe gehört. Ob nun, wie Lundin glaubt, eine Pepsinase vorkommt, dürfte nach den Willstätterschen Arbeiten etwas zweifelhaft sein, da die Gelatineverflüssigungsmethode für die in Rede stehende Entscheidung nicht ganz einwandfrei ist.

f) Malzkeimtryptase. Die Protease der Keimlinge wurde sowohl nach der Gelatinemethode, wie durch Peptonspaltung untersucht. In beiden Fällen wurde die optimale Aciditätszone 6,3—7,2 erhalten. Im letzten Falle war die optimale Zone schmäler. Hier dürften wir sicher eine Protease vom Papaintypus vor uns haben.

Bei der Peptonspaltung verläuft die Formolstickstoffbildung während des ersten Drittels der Reaktion der Zeit angenähert proportional. Auch hier sind wirkliche Neutralsalze von unbedeutendem Einfluss.

Proteasen der carnivoren Pflanzen².

Die bisher besprochenen Pflanzenproteasen arbeiten intracellular. Man findet jedoch im Pflanzenreich unzweifelhaft Fälle, wo eine wahre Sekretion von eiweissverdauenden Säften auf der Oberfläche der Pflanze, oder in besonderen Behältern stattfindet. Bei diesen Pflanzen findet man also einen Verdauungsprozess, der dem der Tiere ähnlich ist. Die sogenannten insektenfressenden Pflanzen fangen nach verschiedenen Methoden Insekten, töten sie und verdauen sie. Da über die einzelnen Enzyme nur wenig bekannt ist, beschreiben wir sie für die wichtigsten in Betracht kommenden Pflanzen:

Nepenthes, Sarracenia, Darlingtonia. Bei diesen Pflanzen werden gewisse Blätter ganz oder teilweise in Kannen verwandelt, die eine Flüssigkeit enthalten, wozu die Insekten getaucht werden. Die zwei letztgenannten Pflanzen dürften in den Kannen nur Wasser haben. Die hineingelangten Insekten sterben, faulen und werden resorbiert. Im Falle von Nepenthes ist die Frage, ob sezernierte Proteasen vorkommen, strittig. Hooker³ konstatierte zuerst die eiweissverdauende Wirkung der Flüssigkeit, hat jedoch

¹ Unter den älteren Arbeiten seien noch diejenigen von Weiss (Proteolyt. Enzyme, Kopenhagen 1902), von Windisch und Schellhorn (Woch. Brau. 17, 29; 1900), sowie von Fernbach und Hubert (C. r. 139, 293 u. 1783; 1900) erwähnt.

² Ältere zusammenfassende Darstellungen geben J. Reynolds Green, der sich auch selbst mit Pflanzenproteasen beschäftigt hat (Ann. of Bot. 1892) und Effront (Les Catalyseurs Biochimiques, Paris 1914).

³ Hooker, Brit. Assoc. Reports. 1874 (Belfast) 102.

darauf hingewiesen, dass sie auf anwesenden Bakterien beruhen kann. Tatsächlich besitzt aber *Nepenthes* in den Kannen eine Art Drüsen. Aus der Kannenflüssigkeit gewann Lawson Tait ein unreines Enzympräparat¹. Gorup-Besanez² fand, dass die ruhenden Kannen einen nur wenig aktiven Saft absonderten; wurden sie dagegen mit verdaulichem Material gereizt, so wurde ein saurer, stark aktiver Saft sezerniert. Er fand, dass der Saft Fibrin löst. Zu ähnlichen Resultaten kamen auch Vines³ und Hansen⁴, zu einem entgegengesetzten Ergebnis gelangten Dubois⁵ und Tischutkin⁶; sie schreiben die Spaltung den Bakterienwirkungen zu. Dahin äussert sich auch neuerdings Franca⁷; die Enzymtheorie stützen dagegen Goebel⁸, sowie Abderhalden und Teruuchi⁹. Es ist möglich, dass das Alter der Kanne und andere ähnliche Umstände grosse Verschiedenheiten bedingen können.

Utricularia. Die Pflanze trägt Bläschen, welche mit einer Vorrichtung versehen sind, die den Eintritt kleiner Wassertiere erlauben, den Austritt aber verhindern. Ob in den Bläschen ein sezerniertes Enzym vorkommt, ist zweifelhaft. Ein tryptisches Enzym wollte Luetzelburg nachgewiesen haben¹⁰; nach seiner Methode kann das gefundene Enzym aus den Geweben stammen. Dasselbe gilt von den neueren Versuchen von Adowa¹¹. Da Adowa indessen mehr Protease in den Extrakten der Bläschen fand als in den Extrakten anderer Teile der Pflanze, ist es immerhin möglich, dass die Blasen Enzyme absondern.

Drosera. Darwin¹² untersuchte die Blätter der *Drosera* sehr genau. Die Blätter besitzen Drüsen, welche nach Anreiz mit verdaulicher Substanz einen sauren Saft absondern. Fällt ein Insekt auf das Blatt, so biegen sich die gestielten Drüsen darüber, und der Saft löst die verdaulichen Teile. Nach Darwin werden ausser gewöhnlichem Eiweiss auch Bindegewebe und Knorpel gelöst. Legt man unverdauliche Substanz auf ein Blatt, so wird nur wenig Saft sezerniert. Morren¹³ zeigte dann, dass eine Bakterienwirkung ausgeschlossen ist. Rees und Will¹⁴ sahen in dem *Drosera*enzym eine Pepsinase,

¹ Lawson Tait, *Nature*, 1251; 1875.

² v. Gorup-Besanez, *Chem. Ber.* 9, 673; 1876.

³ Vines, *Jl of anat. Phys.* 11, 124; 1877.

⁴ Hansen, *Arb. Bot. Inst. Würzburg*, 3, 265.

⁵ Dubois, *C. r.* 111, 315; 1890.

⁶ Tischutkin, *Ref. in Bot. Zbl.* 50, 304; 1892 und 53, 322; 1893.

⁷ Franca, *Riv. de Biol.* 6, 161. — *Ber. Phys.* 27, 320; 1924.

⁸ Goebel, *Pflanzenbiol. Schilderungen* 11, 186; 1893.

⁹ Abderhalden und Teruuchi, *H.* 49, 20; 1906.

¹⁰ v. Luetzelburg, *Flora* 100, 145; 1910.

¹¹ Adowa, *Biochem. Zs* 150, 101 und 153, 506; 1924.

¹² Darwin, *Insektivorous plants*. London 1888.

¹³ Morren, *Acad. Scienc. Belgique* 39, 870; 40, 6, 525, 1040; 42, 1019.

¹⁴ Rees und Will, *Bot. Zs* 1875 (29. Okt.).

ebenso White¹. Eine moderne Untersuchung verdanken wir Dernby² (Formolmethode und Fällung mit Stannochlorid nach Schjerning). Er fand, dass Acidalbumin bei einer Acidität von etwa $\text{pH} = 5$ optimal gelöst wurde. In alkalischer Lösung konnte keine Spaltung von Milcheiweiss beobachtet werden. Peptidasen wurden nicht gefunden.

Nach Franca sezerniert auch *Drosophyllum* Enzyme.

Dionaea. Darwin untersuchte auch *Dionaea* und fand ähnliche Verhältnisse wie bei *Drosera*. Er dachte auch hier an Bakterienwirkung, und die Entscheidung dürfte noch etwas zweifelhaft sein.

Pinguicula. Die Blätter der *Pinguicula* scheiden an den Rändern der Oberfläche eine Verdauungsflüssigkeit aus. Dernby hat die Proteasen des Blattpresssaftes untersucht. Er fand ein Enzym, das bei neutraler und schwach alkalischer Reaktion das Milchcasein abbaut. Die optimale Wasserstoffionenkonzentration war etwa $\text{pH} = 8$. Keine peptischen (ereptischen) Enzyme konnten nachgewiesen werden³.

¹ White, Proc. Roy. Soc. 83, 134; 1910.

² Dernby, Biochem. Zs 78, 197; 1916.

³ Dernby, Biochem. Zs 80, 152; 1917.

23. Kapitel.

Proteasen der Pilze, Hefen und Bakterien.

Über die proteolytischen Enzyme der höheren Kryptogamen besitzen wir nur wenige Untersuchungen. Noch geringer ist natürlich die Zahl der Arbeiten, in denen moderne Methoden zur Anwendung gekommen sind. Dass Proteasen in den höheren Pilzen auftreten, geht aus vielen Untersuchungen hervor. Über die Anzahl der Enzyme und deren Wirkungsbedingungen geben indessen die Arbeiten wenig Auskunft. Dass bei schwach saurer Reaktion optimal wirkende „Pepsinasen“ vorkommen, ist sicher. Dass ausserdem noch tryptische Enzyme z. B. bei der Autolyse mitwirken, ist wohl wahrscheinlich, aber nicht bewiesen. Angaben über Proteasen bei höheren Pilzen finden wir bei Hjort¹, Bourquelot und Hérissé², Delezenne und Mouton³ und bei Zellner⁴. Peptone, Gelatine und Casein werden gespalten, nach Vines⁵ auch Fibrin. Die Spaltung von Hühnereiweiss haben mit moderner Methodik (pH = 4,5) Melin und Helleberg verfolgt⁶. Kikkoji⁷ hat in *Cortinellus Edodes* eine Protease gefunden, die am besten in neutraler oder schwach saurer Lösung wirken soll.

Bei Schimmelpilzen kommen ebenfalls Proteasen vor⁸, die nach alten Angaben in saurer Lösung am besten spalten sollen⁹. Vines gibt an, dass eine Protease in *Aspergillus oryzae* am besten in schwach alkalischer Lösung wirkt. Oshima und Hoshi¹⁰ haben die Proteasen des *Aspergillus Ochraceus* untersucht und sie denen des *A. oryzae* recht ähnlich gefunden. Casein, Eialbumin, Protein von *Scomber Japonicus* und Wittepepton wurden gespalten. Aminosäuren wurden reichlich gefunden. Über die Aciditätsbedingungen machen sie folgende Angaben:

¹ Hjort, Zbl. f. Physiol. 10, 192; 1896.

² Bourquelot und Hérissé, C. r. 127, 566; 1898.

³ Delezenne und Mouton, C. r. 136, 167 und 633; 1903.

⁴ Zellner, Chemie der höheren Pilze. Leipzig 1907.

⁵ Vines, Ann. Bot. 17, 237; 1903.

⁶ Melin und Helleberg, Biochem. Zs 157, 146; 1925.

⁷ Kikkoji, H. 51, 201; 1907.

⁸ Malfitano, Ann. Inst. Pasteur 14, 60; 1900. — Saito, Biochem. Zbl. 2, 1370; 1904.

⁹ Schäffer, Fermente in Schimmelpilzen. Diss. Erlangen 1900.

¹⁰ Oshima und Hoshi, JI Soc. Agricult. Forestry. Sapporo, Japan 16, 483; 1925.

Wittepepton: Aminosäurebildung bei 40° Optimum bei pH=5,1
 Casein: " " " " = 6,1
 " Verflüssigung bei 40° " " " = 7,4

Die Protease des *A. oryzae* hat ihr Optimum bei etwa 5 (Okada¹).

Die Proteasen der Strahlenpilze haben Näslund und Dernby² untersucht.

Proteasen der Hefen.

Die Autolyse der Hefe wie die der tierischen Organe wurde von Pasteur, Duclaux, Schützenberger, Salkowski und anderen untersucht³. Hahn und Geret zeigten danach, dass der Buchnersche Presssaft die Fähigkeit

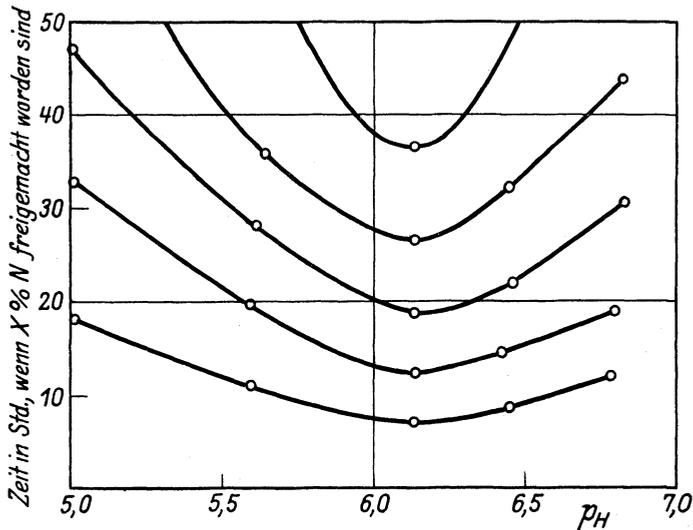


Fig. 83.

besitzt Eiweissstoffe wie Fibrin, Eieralbumin usw. zu spalten⁴. Hahn nannte das proteolytische Enzym Endotryptase, welcher Name andeuten soll, dass das Enzym während des Lebens der Zelle nicht austreten kann. Das Enzym wirkt in schwach saurer Lösung; auch tiefe Spaltprodukte entstehen. Die sog. Endotryptase wurde dann von vielen Autoren untersucht und speziell wurden durch ihre Arbeiten die Bausteine des Hefeneiweisses gut bekannt. Alle diese Untersuchungen nehmen die Existenz nur eines Enzymes an. Der erste, der die Annahme von mehreren Proteasen in der Hefe gemacht hat, ist Vines⁵: „Die zwei Verdauungs-Prozesse, nämlich die Auf-

¹ Okada, *Biochem. JI* 10, 130; 1916.

² Näslund und Dernby, *Biochem. Zs* 138, 497; 1923.

³ Pasteur, *Ann. de Chim. Phys.* 58, 401. — Duclaux, *Thèse de Paris* 1865, 44. — Schützenberger, *Intern. wiss. Bibl.* 1875. — Salkowski, *H.* 13, 506; 1889.

⁴ Hahn und Geret, *Zs Biol.* 40, 117; 1900. — Siehe auch Martin Hahn, *Chem. Ber.* 31, 200; 1898.

⁵ Vines, *Ann. of Bot.* 18, 289; 1904 und 23, 1; 1909.

lösung von Fibrinflocken und die Spaltung von Wittepepton werden nicht von derselben Protease bewirkt. Vielmehr zeigen die Resultate dieser Arbeit das Vorhandensein von zwei verschiedenen Proteasen an: die eine im Wasser leicht löslich, wirkt nur peptolytisch, die andere, im Wasser weniger, aber in 2% NaCl-Lösung leicht löslich wirkt nur peptonisierend.“ Die grosse Verwirrung in der älteren Literatur beruht, wie Dernby hervorhebt, auf dem Umstande, dass man nicht untersucht hat, wie viele Enzyme bei der Hefenautolyse wirklich beteiligt sind und nicht den Zusammenhang ermittelt hat zwischen dem Autolysenvorgang und der Wasserstoffionenkonzentration. Durch die Untersuchungen von Dernby¹ und von Iwanoff² wurden über die Hefenproteasen viele neue Ergebnisse gewonnen.

Was zuerst die Hefenautolyse betrifft, so bestätigt Dernby die alten Angaben, dass sie nur in schwach saurer Lösung erfolgt, zwischen den Grenzen pH = 4—7. Er verfolgte die Zunahme des Aminostickstoffs, und gibt Figur 83 an.

Dernby hat die verschiedenen Abbauprodukte bei verschiedenen Aciditäten bestimmt: 500 g Hefe + HCl + NaOH + Wasser = 500 ccm. Dauer 216 Stunden bei 37°. In der Tabelle findet man die Verteilung des Stickstoffs zwischen den verschiedenen Produkten.

pH bei der Autolyse	Stickstoff %				
	Total-N im Filtrat	Eiweiss-N	Peptid-N	Amino-N	Ammoniak-N
6,9—7,2	50,7	19,6	4,5	22,4	4,2
6,0—6,8	89,5	18,7	6,0	51,1	13,7
3,9—3,9	48,7	1,9	32,0	14,1	0,7

Aus diesen Resultaten schliesst Dernby im Anschluss an die Auffassung von Vines, dass bei der Hefenautolyse mindestens zwei Enzyme wirksam sind, nämlich eine in saurer Lösung wirksame Pepsinase, welche die Eiweissstoffe in peptonartige Stoffe zerlegt und eine in alkalischer Lösung wirkende Tryptase, welche die Peptone weiter abbaut. Durch weitere Versuche wollte Dernby folgende proteolytische Enzyme in der Hefe unterscheiden:

Ein „Hefepepsin“ (Pepsinase), welches genuine Eiweissstoffe zu Peptonen aber nicht weiter spaltet. pH-Optimum bei etwa 4,5—5;

eine Hefetryptase, welche nicht Eieralbumin und Hefeneiweiss, wohl aber Gelatine, Casein und Wittepepton spaltet. Das Enzym vermag nicht, diese Stoffe vollständig zu Aminosäuren abzubauen. pH-Optimum bei 7,0;

¹ Dernby, Biochem. Zs 81, 107; 1917.

² N. N. Iwanoff, Biochem. Zs 58, 217; 1913. — 63, 359; 1914. — 120, 1; 1920. — Zs f. Gärungsphysiol. 1, 230; 1913. — Siehe auch drei ältere Arbeiten von Butkewitsch, Gromow (H. 42) und Grigorjew (H. 42).

eine Hefeereptase, die dem Darmerepsin ähnlich ist und einfache Peptide in Aminosäuren spaltet.

„Die Autolyse der Hefe ist ein Verdauungsprozess, der von den Enzymen Hefepepsin, Tryptase und Ereptase bewirkt wird und kann nur bei solchen Wasserstoffionenkonzentrationen vor sich gehen, wenn diese Enzyme gleichzeitig wirken können.“ Dernby gibt untenstehende orientierende Figur 84 (t ist eine Zeit gleichen Umsatzes).

Ganz andere Auffassungen über die Proteasen der Hefen vertreten in einer neuen Untersuchung Willstätter und Grassmann¹. Wie sie früher im Falle von Papain zeigen konnten, dass die Ansichten von Vines über mehrere Proteasen nicht haltbar sind, so fanden sie auch hier, dass dasselbe

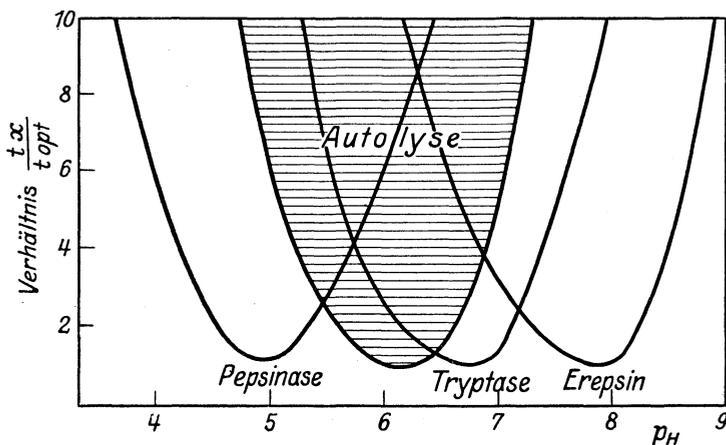


Fig. 84.

Enzym der Hefe sowohl Eiweiss zu peptonisieren als die Peptone weiterzuspalten vermag. Mit anderen Worten: Nach Willstätter und Grassmann haben wir in der Hefe ausser der Peptidase (dem Hefenerepsin) nur eine Protease, die wie das Papain und die Ananasprotease ein pH-Optimum bei 5—6 hat. Sie wird durch Blausäure nicht aktiviert. Dieses Enzym dürfte mit dem „Hefepepsin“ Dernbys zu identifizieren sein. Allerdings hat Dernby das Optimum in ein wenig saurerer Lösung gefunden, was Willstätter und Grassmann auf die Versuchsmethodik Dernbys zurückführen.

Dernby hat das pH-Optimum der Gelatineverflüssigung und der Spaltung von Acidalbumin untersucht. Mit steigender Temperatur verschiebt sich das Optimum, aber nur wenig, gegen die saure Seite. Für verschiedene Substrate ist das Optimum nicht ganz dasselbe. Für Acidalbumin fand Dernby etwa pH = 4,8, für Gelatine etwa 4,3. Neutralsalze in Konzentrationen kleiner als etwa 1 n sind beinahe wirkungslos. Natriumsulfat, Kaliumnitrat und Kaliumbromid hemmen ein wenig und deutlich mehr als andere untersuchte Salze.

¹ Willstätter und Grassmann, H. 153, 250; 1926.

Eine Hefentryptase tritt nach Dernby bei der Verdauung von Acidalbumin und Hefeneiweiss in den ersten Stufen der Reaktion nicht in Wirksamkeit. Bei der Verflüssigung der Gelatine dagegen erhielt er zwei pH-Optima, wovon das saure von der Pepsinase und das alkalische von der Tryptase herrühren soll. Dernby gibt folgende Figur 85.

Das dritte Maximum bei $\text{pH} = 9$ dürfte auf der Wirkung des Alkalis beruhen. Die Wirkung der Hefentryptase auf Thymolgelatine geht nach Dernby viel tiefer als die der Pepsinase. Dabei wirkt natürlich die Ereptase teilweise mit. Dernby hat auch die Spaltung des Wittepeptons untersucht und auch hier das Optimum bei $\text{pH} = \text{etwa } 7$ gefunden. Das Spaltungsoptimum des Caseins liegt auch bei etwa 7.

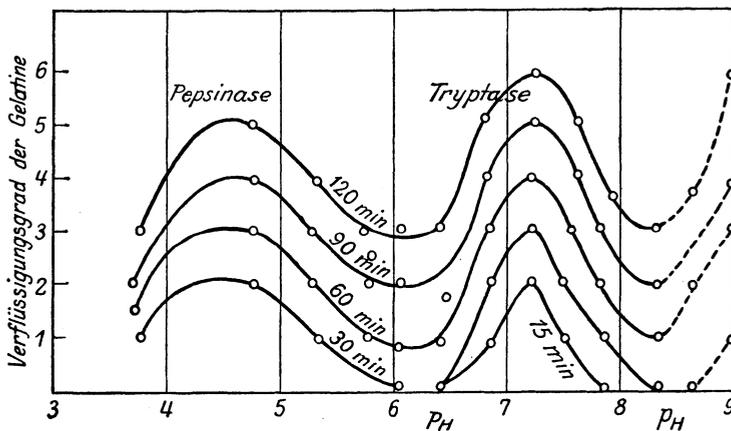


Fig. 85.

Neutralsalze haben auch hier einen nur geringen Einfluss.

Im Gegensatz zu Dernby finden nun Willstätter und Grassmann bei der Gelatinespaltung nur ein Optimum, und zwar unter Anwendung der einwandfreien Bestimmungsmethode von Waldschmidt-Leitz, wo doch nur die Gesamthydrolyse gemessen wurde. Dasselbe Optimum fanden sie für die Spaltung des Albuminpeptons (Merck). Das Optimum wurde bei verschiedenen Enzymproben nicht ganz identisch gefunden, was auf die Anwesenheit von Erepsin und Begleitstoffen in verschiedenen Mengen zurückgeführt wird. Wir führen eine Kurve (Fig. 86) über zwei Gelatineversuche mit verschiedenen Enzympräparaten und eine Figur 87 über die Peptonspaltung an.

In dem „Hefentryptsin“ (dem Hefenpepsin nach Dernby) sehen Willstätter und Grassmann eine Protease vom „Papaintypus“. Die eigentümliche Wirkung dieser Proteasen kann durch die Hypothese erklärt werden, dass sie die undissoziierten Eiweissmoleküle angreifen. Das Magenpepsin und das echte Pankreastrypsin sollen dagegen die Eiweissionen, positive bzw. negative binden und spalten.

Die Hefenprotease wirkt auch auf Fibrin ein, nicht auf Eialbumin. Die Versuche von Dernby über die Albuminspaltung wurden mit einem durch Säure stark veränderten, sog. Acidalbumin angestellt.

Herstellung der Enzymlösung.

Nach einer von Koelker¹ angegebenen Methode, der sich auch Dernby bedient hat, bereitet man eine Enzymlösung folgendermassen:

500 g gewaschene Brauereihefe werden mit 30 g Calciumcarbonat und 30 ccm Chloroform zerrieben und während drei Tagen sich selbst überlassen. Der

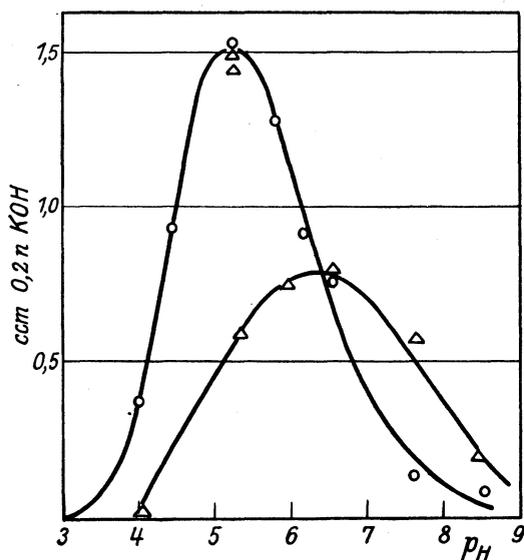


Fig. 86.

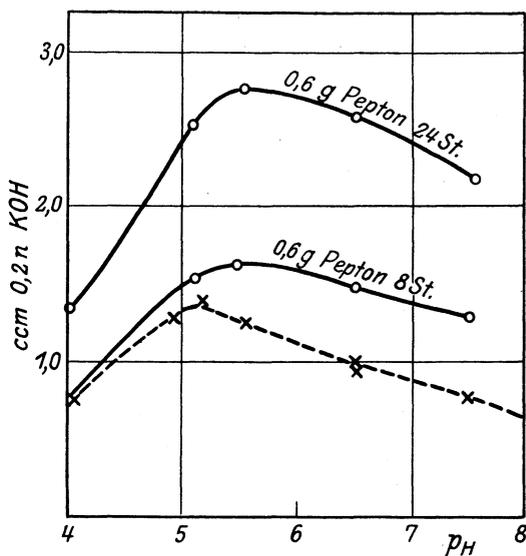


Fig. 87.

Autolysesaft wird danach durch wiederholtes Filtrieren klar gewonnen. Bei Stehen bei Zimmertemperatur verliert der Saft rasch an Wirksamkeit. Durch Dialyse durch Kollodium nach Sørensen können grosse Mengen von niedrigmolekularen Verunreinigungen beseitigt werden.

Nach Euler und Dernby² kann die proteolytische Wirksamkeit durch Vorbehandlung der Hefe mit Lindners Nährlösung vergrössert werden.

Dernby hat einige Methoden zur weiteren Reinigung des Enzymgemisches versucht. Die Aktivitätsverluste waren indessen zu gross.

Eine schnelle Vergiftung der unverdünnten Hefe durch Essigester oder Toluol und eine sehr kurz dauernde Autolyse unter Neutralisieren halten auch Willstätter und Grassmann für das beste Verfahren zur Gewinnung der Hefenproteasen. Die Verflüssigung nimmt in Anwesenheit von Essigester nur etwa 10 Minuten in Anspruch. Nach etwa einer Stunde und häufigem Neutralisieren mit Ammoniak wird die erste Fraktion des Autolysats, die

¹ Koelker, H. 67, 297; 1910.

² Euler und Dernby, H. 89, 408; 1914.

nur wenig Protease enthält, entfernt. Nach 1—2 Tagen ist die Protease genügend freigelegt.

Trennung von Hefentrypsin und Erepsin. Die Enzyme werden von Tonerde verschieden adsorbiert, und die Trennung kann durch fraktionierte Sorption durchgeführt werden. Durch eine erste Behandlung eines Essigesterneutralautolysates mit Tonerde wurde etwa die Hälfte des Erepsins und etwa 85% der Hefentryptase sorbiert. Durch eine zweite Tonerdesorption konnte alles Trypsin entfernt werden. In der Restlösung fanden sich noch 29% des Erepsins ohne tryptische Wirkung. Aus dem zweiten Sorbat konnte erepsinfreies Trypsin mit verdünntem Ammoniak eluiert werden. Ausbeute 35%.

Trennung der Proteasen von Saccharase. In einem Falle gelang es schon Hahn und Geret, ein saccharasefreies Proteasenpräparat zu gewinnen. Die Methode bestand in Alkohol- und Bleiacetatfällung. Willstätter und Grassmann fanden, dass man leicht aus den Autolysaten mit Essigsäure zugleich mit dem ausfallenden Hefeneiweiss viel Protease fällen kann, ohne dass nennenswerte Mengen Saccharase ausgeschieden werden. Die kleinen Mengen Saccharase, die dem Niederschlag anhaften, können durch Waschen mit sehr verdünnter Essigsäure entfernt werden. Mit verdünntem Ammoniak gehen dann die Proteasen in Lösung. Eine bedeutende Steigerung des Reinheitsgrades erreicht man durch Fällen der gealterten Autolysate mit Essigsäure.

Hemmungen der Hefenproteasen usw.

Die gewöhnlichen Antiseptica hemmen nicht¹; auch 1% HCN soll nicht hemmen. Grössere Mengen Formaldehyd hemmen (0,5%). Kleinere Mengen Äthylalkohol und Glycerin sind ohne Einfluss (Dernby).

NaF ist ohne Einfluss². Über die Wirkung von CuSO₄ auf die Hefenautolyse findet man Versuche bei Svanberg und Euler³, welche eine recht starke Hemmung beobachteten. Die Autolyse kam in den mit Kupfersulfat versetzten Proben bald zum völligen Stillstand, was auf einer Zerstörung der Proteasen beruht. Hier wie bei mehreren anderen Enzymen dürfte die sog. Metallvergiftung aus zwei Faktoren zusammengesetzt sein, nämlich aus einer reversiblen Inaktivierung durch Salz- oder Komplexbildung und einer irreversiblen Zerstörung des Enzyms, welche damit zusammenhängt, dass die Enzymgiftverbindungen gewöhnlich eine kleinere Stabilität besitzen als das freie Enzym.

Der Hefenpresssaft enthält einen hemmenden Stoff, der von Buchner⁴ Antiprotease genannt wurde. Dass dieser Stoff eine spezifische Wirkung hat,

¹ Gromow und Grigorjew, H. 42, 299; 1904.

² Euler und Dernby, H. 89, 408; 1914.

³ Svanberg und Euler, Fermentf. 4, 90; 1921.

⁴ Buchner und Haehn, Biochem. Zs. 26, 171; 1910.

ist unwahrscheinlich. Seine Wirkung dürfte von derselben Art sein wie die Hemmung des Pankreastrypsins durch Serumalbumin u. dgl. Angaben von Haehn¹ über Beziehungen zwischen der Antiprotease und sog. Gärungsaktivatoren müssen schon aus dem Grunde mit Vorsicht aufgenommen werden, weil die Wirkung und sogar die Existenz dieser Stoffe sehr zweifelhaft ist.

Proteasen der Bakterien.

Alle untersuchten Bakterien enthalten Proteasen; über die Anzahl der Enzyme ist man nicht einig. Es scheint auch aus modernen Untersuchungen hervorzugehen, dass die Bakterienproteasen sozusagen weniger differenziert sind als die der höheren Tiere. So fand Dernby², wie man früher in alten Untersuchungen angenommen hatte, nur eine Protease, die von Trypsintypus sein soll; sie hat das pH-Optimum bei 6—7. Dies kann möglicherweise darauf hindeuten, dass wir hier tatsächlich mit anderen Proteasen zu tun haben, als in z. B. den tierischen Geweben. Andererseits ist das pH-Optimum weniger scharf abgegrenzt, was vielleicht damit zusammenhängt, dass in Wirklichkeit mehrere Enzyme mitwirken. Das Wahrscheinlichste ist wohl, dass auch hier Enzyme vom Papaintypus vorliegen.

Die oft geäußerten Ansichten, dass in vielen Bakterien keine Peptidasen vorkommen, dürften wohl auf unvollkommener Methodik beruhen. In modernen Untersuchungen fand man bei passender Acidität immer Peptidasewirkung. In saurer Lösung kann dagegen die z. B. von einer Pepsinase bewirkte Spaltung früh stehen bleiben, da die Wirkung der etwaigen Peptidase stark geschwächt ist.

Über die Frage, inwieweit die Proteasen der Bakterien in die Kulturlösung übergehen können, gibt es eine grosse Literatur. Darüber dürfte man einig sein können, dass eine wahre Sekretion von proteolytischen Enzymen nicht vorkommt. Sicher ist es indessen, dass in steril filtrierter Kulturflüssigkeit gewisser Bakterien-Proteasen auftreten. Es ist jedoch kein Grund zu einer anderen Annahme, als dass sie aus abgestorbenen oder geschädigten Zellen stammen. Durch besondere Reize können von der Oberfläche der Zellen Proteasen abgegeben werden. Es stimmt dies damit überein, dass durch Zusatz von gewissen Stoffen, wie Chloroform u. a. die Abgabe stark vergrössert werden kann.

Die moderne Methode zur Gewinnung des Enzymgemisches ist die Autolyse unter Zusatz von zelltötenden Mitteln. Eine Reinigung der Bakterienproteasen ist kaum versucht. Blanc und Pozerski haben durch Alkohol-fällung eine gewisse Anreicherung erzielt³.

Bezüglich des Gehaltes der verschiedenen Bakterien an Proteasen liegen

¹ Haehn und Schifferdecker, *Biochem. Zs* 138, 210; 1923.

² Dernby, *Biochem. Zs* 126, 105; 1922.

³ Blanc und Pozerski, *Soc. Biol.* 83, 1315, 1343, 1369; 1920.

einige Versuche von Dernby und Walbum¹ vor. Wir führen folgende Tabelle an:

Bakterienart	Wirkungsgrad			
	Bouillonfiltrat		Zermahlene Bacillen	
	Gelatine	Pepton	Gelatine	Pepton
Tuberkelbacillen	0	0	0	0
Pneumokokken	0	0?	0?	10
Diphtheriebacillen	0	2	0?	10
Staphylokokken	0	5	0?	20
Tetanusbacillen	0?	20	10	30
B. proteus	100	100	50	50
B. prodigiosus				
B. pyocyaneus				
B. histolyticus				
B. sporogenes				

Die Verfasser heben hervor, dass diese Schätzung recht subjektiv sein muss, und dass es wohl möglich ist dass die proteolytische Fähigkeit eines gewissen Bacillus unter verschiedenen Bedingungen stark variieren kann.

Über die optimale Acidität der Bakterienproteasen liegen ausser den eingangs erwähnten nur wenige Angaben vor. Dernby fand bei der Autolyse ein saures Optimum $\text{pH}=4-6$. Blanc und Pozerski fanden bei $\text{pH}=5,5$ in *B. sporogenes* und *histolyticus* Spaltung von koagulierten Proteinen.

Über die angreifbaren Substrate besitzen wir einige Angaben. Casein, Gelatine und das eigene Zelleiweiss werden angegriffen, nicht dagegen rohes Eiereiweiss u. dgl. Über Spezifität der Enzyme machen Avery und Cullen Angaben² dahingehend, dass die betr. Enzyme nur eigenes Zelleiweiss lösen.

Die Proteasen des Bacillus Natto hat neuerdings Oshima³ studiert. Er fand, dass alle untersuchten Eiweisse ausser ungekochtem Eiereiweiss schnell und weitgehend gespalten wurden.

Eiweiss	Optimum pH
Casein, Verflüssigung bei 40°	5,9
„ Aminosäurebildung	7,8—8,4
Edestin, Verflüssigung	6,0
„ Aminosäurebildung	8,0—8,8
Wittepepton, Aminosäurebildung	9,1

Hieraus dürfte man mit dem Verfasser auf die Anwesenheit von peptonisierenden und peptonspaltenden Enzymen schliessen können.

¹ Dernby und Walbum, Biochem. Zs 138, 505; 1923.

² Avery und Cullen, JI of exp. Med. 33, 199; 1923.

³ Oshima, JI of Soc. Agrik. Forestry. Sapporo, Japan, XVI, 387; 1925.

Anhang zum Abschnitt über Proteasen.

Methoden zur Bestimmung der Eiweisspaltung.

Die Methoden zur Bestimmung der enzymatischen Eiweisspaltung gründen sich entweder auf die Bestimmung des zu jeder Zeit noch unveränderten Substrates oder die Bestimmung der nach einer gewissen Zeit gebildeten Reaktionsprodukte. Auch beim Studium einer so komplizierten Reaktion wie die des Eiweissabbaues genügt es für die Bestimmung der enzymatischen Tätigkeit eines Präparates, eine Methode zu besitzen, die die Berechnung der Enzymmenge in einer willkürlichen Einheit erlaubt. Wollen wir dagegen die verschiedenen Stufen der Reaktion kennen lernen und die dabei auftretenden Produkte, so wird es notwendig werden mehrere Methoden zur Bestimmung der anwesenden Stoffe gleichzeitig anzuwenden¹. Die Bestimmung des unveränderten Substrates und die Bestimmung der Totalmenge der Spaltprodukte (z. B. die Menge freigemachten Aminostickstoffs) sind nach den befindlichen Methoden gut ausführbar, und nach einigen davon kann auch die Verteilung des Stickstoffs auf verschiedene Spaltprodukte einigermaßen bestimmt werden. Da indessen die primären Spaltprodukte in den meisten Fällen noch nicht bekannt sind, ist es klar, dass noch mehrere Untersuchungsmethoden für ein volles Verständnis der Eiweisspaltung nötig sind.

Bestimmung des unveränderten Substrates.

a) Feste Substrate.

Obleich man bei der Spaltung von festen Substraten die schon an sich sehr komplizierten Verhältnisse der Proteolyse noch unübersichtlicher macht, können diese Bestimmungsmethoden recht gute Dienste leisten, wenn es nur gilt, die relative Wirksamkeit eines Enzympräparates zu ermitteln. Manche von diesen Methoden besitzen ausserdem erhebliches historisches Interesse.

Die Mettsche Probe.

In engen Glasröhren wird Eiereiweiss aufgesogen und durch Einlegen in kochendes Wasser zur Koagulation gebracht. Zur Messung der Wirksamkeit einer Proteasenlösung wird

¹ Siehe z. B. die Charakterisierung der Pepsinwirkung durch Stendel, Ellinghaus und Gottschalk, H. 154, 21; 1926.

Dernby und Walbum¹ haben den Zusammenhang zwischen Proteasenwirkung und Toxicität gewisser Bacillen untersucht. Sie machen die Annahme, dass das Diphtherietoxin nichts anderes ist als ein Eiweissabbauprodukt. Sie fanden nämlich, dass die Toxicität ein Maximum erreicht und danach abfällt. Diese Zerstörung des Toxins, die lange bekannt ist, führen sie auf die weitere proteolytische Spaltung zurück. Es zeigte sich nämlich, dass die Acidität allein für die Toxinzerstörung nicht ausschlaggebend sein kann.

Phänomen von d'Herelle.

Ganz besonderes Interesse verdienen die verschiedenen Formen der Zellauflösung in tierischen Flüssigkeiten (Bakteriolyse), welche im wesentlichen wenigstens, auf proteolytischen Spaltungen beruhen. Unter diesen Formen der Zellauflösung hat ganz besonders das von d'Herelle entdeckte und nach ihm benannte Phänomen² wegen seiner medizinischen Bedeutung und der Eigenart der damit verknüpften Vorgänge zu eingehenden Studien angeregt.

Die ausserordentlich umfangreiche Literatur über das d'Herellesche Phänomen liegt zum grossen Teil ausserhalb des Rahmens dessen, was wir in diesem Band der „Chemie der Enzyme“ zu behandeln haben. Denn, wenn auch die Wirkung der Bakteriophagen derjenigen proteolytischer Enzyme in vieler Hinsicht nahezustehen scheint, so weisen andererseits Bakteriophagen und Enzyme ganz bedeutende Unterschiede auf; die Analogien, welche gelegentlich hervorgehoben wurden, sind überwiegend formeller Art und lassen wesentliche Tatsachen unberücksichtigt. So ist z. B. die Vermehrung des Katalysators auf Kosten des Substrates (entsprechend der Vermehrung der Lysine auf Kosten der Bakterien) in der Enzymchemie vollkommen unbekannt. Man wird also d'Herelle darin beipflichten, dass die Bakteriophagen autonome Wesen (lebendes „Ultravirus“) sind³.

Immerhin er bietet das d'Herellesche Phänomen so viel von grösstem Interesse für die Enzymchemie und berührt so nahe manche ihrer Grundprobleme, dass wir im III. Teil dieses Werkes eingehender auf die anscheinend eigenartige Gruppe der zwischen den Bakterien und Enzymen stehenden „Ultramikroben“ zurückkommen müssen.

¹ Dernby und Walbum, *Biochem. Zs* 138, 505; 1923. — Siehe auch Dernby und Siwe, *Biochem. Zs* 134, 3; 1922.

² d'Herelle, *Le bacteriophage*, Monogr. de l'Institut Pasteur. Paris 1921. — d'Herelle, *C. r.* 165, 373; 1917. — *Nederl. Maanadschr. f. Geneesk.* 13, 33; 1925. — *Soc. Biol.* 93, 498; 1925.

³ Für die Beurteilung der Art der wirksamen Substanz ist ihr Verhalten bei und nach der Alkoholfällung nicht unwesentlich und ist von verschiedenen Seiten (d'Herelle 1921. — Bronfenbrenner, *Proc. Soc. exp. Biol. a Med.*) studiert und zu Schlüssen verwendet worden. d'Herelle vertritt die Auffassung, dass die Ultramikroben durch den Alkohol zerstört werden, und dass die schwach lytische Wirkung des Alkoholniederschlages auf ein proteolytisches Enzym zurückzuführen sei. Siehe auch *Zbl. f. Bakt. (I)* 96, 385; 1925.

einfach ein Eiweissrohr hineingelegt und nach einer bestimmten Zeit die Länge der gelösten Eiweissssäule gemessen. Nach späteren Untersuchungen sollen sich die Enzymmengen wie die Quadrate der Längen der Säulen verhalten. Die Mettsche Probe wird am meisten bei Pepsinbestimmung angewandt. Eine passende Acidität muss natürlich durch Salzsäurezusatz eingestellt werden. Es ist klar, dass diese Methode nur eine sehr rohe Schätzung der Enzymmenge erlaubt.

Fibrinmethoden.

Sehr oft angewandt wurden die Methoden, nach welchen die Auflösung fester Fibrinflocken beobachtet wird¹. Am besten färbt man dann das Fibrin nach Grützner² mit einem Farbstoff, der erst nach der Verdauung des Fibrins in die Lösung übergeht. Am häufigsten wurde Carmin verwendet. Das Fibrin wird gut ausgewaschen und in Glycerin aufbewahrt. Die Färbung geschieht in einer ammoniakalischen Farbstofflösung. Vor der Anwendung wird das Glycerin weggewaschen. Smorodinzew und Adowa³ nehmen statt Carmin eine Glycerinlösung von Diphenylosanilin. In der Versuchslösung kann colorimetrisch die Verdauung verfolgt werden. Eine Schwierigkeit bei dieser Methode ist, die Fibrinmengen in den verschiedenen Versuchen gleichmässig zu erhalten; die Verteilung des Fibrins kann nur schwer mit befriedigender Genauigkeit beurteilt werden. In neuerer Zeit hat Willstätter⁴ eine neue Methode der Fibrinauflösung angewandt: Käufliches, trockenes Fibrin (Merck) wurde in der Kugelmühle fein gemahlen und durch ein Sieb mit 0,2 mm Maschenweite gesiebt. Vor dem Versuch wird die abgewogene Fibrinmenge in Wasser und einem Teil der Pufferlösung aufgeschwemmt. Zu der Suspension, die gewöhnlich 0,540 g lufttrockenes = 0,500 g trockenes Fibrin enthält, wurde die Enzymlösung, der Rest der Pufferlösung und Wasser gesetzt, so dass das Totalvolumen 15 ccm betrug. Das Gemisch wird während des Versuches im Schüttelthermostaten kräftig geschüttelt. Am Ende der Versuchszeit wird rasch auf 0° abgekühlt und zentrifugiert. Der ungelöste Teil wurde mit Eiswasser, Alkohol und Äther gewaschen und im Wägegglas bei 110 getrocknet und dann gewogen. In einem bei verschiedenen Enzymen verschiedenen weiten Bereich ist die Fibrinauflösung der Enzymmenge proportional.

In einer nach Abschluß des Kap. 21 erschienenen Untersuchung über Papain wenden Ringer und B. W. Grutterink⁵ die Lösungsgeschwindigkeit von Spritblaufibrin als Mass der enzymatischen Wirksamkeit an. Wir führen aus ihrer Arbeit, deren Ergebnisse übrigens mit denen von Willstätter und Grassmann schwer vereinbar sind, eine Versuchsreihe (VIII, l. c. S. 290—291) an.

¹ Brücke, Sitz.-Ber. d. Kais. Akad. d. Wissensch. zu Wien 37, 131; 1859; 43, 601; 1861; v. Gorup-Besanez: Chem. Ber. 7, 1478; 1874; 8, 1510; 1875.

² Grützner, Pflüg. Arch. 8, 452; 1874; 106, 463; 1905.

³ Smorodinzew und Adowa, H. 149, 173; 1925.

⁴ Willstätter, Grassmann und Ambros, H. 152, 168; 1926.

⁵ Ringer und B. W. Grutterink, H. 156, 275 u. zw. 290; 1926.

Papain de Bussy. Jedes Röhrchen 100 mg Spritblaufbrin, Salzsäure und Wasser bis zu 12 ccm oder Glykokollösung und Wasser bis zu 12 ccm. Nach 30 Minuten 1 ccm Papainlösung mit 20 mg zugegeben. Verdauungszeit 6,5–12 Minuten.

Nr.	Norm. der Salzsäure	Verdauungszeit Min.	Inaktives Enzym		Aktives Enzym	
			pH	Verdauung korr. auf 12 Min.	pH	Verdauung korr. auf 12 Min.
1	0,052	12	1,47	2,435	—	2,798
2	0,015	6,5	2,41	4,812	—	280,112
3	0,008	8	3,06	3,500	—	135,900
4	0,004	12	3,70	2,435	—	24,600
5	0,0026	12	4,47	1,522	—	28,860
6	0,001	12	5,62	1,000	—	9,620
7	Glykokoll, 0,077 norm.	12	7,09	0,000	—	0,000

In der Figur 88 geben Ringer und Grutterink die Säurewirkung und die um die Säurewirkung korrigierte Enzymwirkung. „Wir sehen erstens

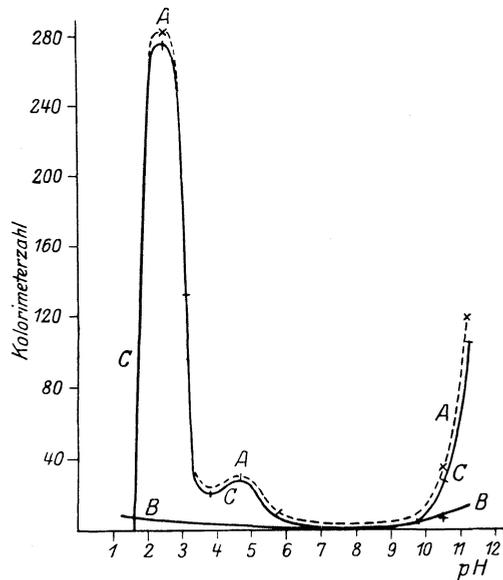


Fig. 88.

Lösungsgeschwindigkeit bei wechselnden Reaktionen von Spritblaufbrin durch Papain de Bussy. A Beobachtete Kurve. B Blindkurve. C Um die Blindwerte korrigierte Verdauungskurve.

wieder das sehr stark ausgeprägte Maximum der Fibrinlösung bei pH = etwa 2,5. In der Nähe von pH = 7 ist die Verdauung = 0 . . .“.

Elastinmethode von Abderhalden¹.

Aus dem Ligamentum nuchae des Pferdes bereitet Abderhalden durch Digerieren mit 1% KOH, danach mit 1% Essigsäure und schliesslich mit 5% HCl, Waschen mit Wasser

¹ Abderhalden und Strauch, H. 71, 320; 1911; Abderhalden und Wachsmuth H. 71, 339; 1911.

und Extraktion mit Alkoholäther sein Elastin. Die Auflösung des festen Substrates wird dann beobachtet. Für eine Schätzung der Enzymmenge kann die Methode in Frage kommen.

Caseinmethode von Volhard und Löhlein¹.

Diese Methode stützt sich einerseits auf ein von Thomas und Weber, andererseits ein von Meunier (1901) angegebenes Verfahren. Beide gehen vom Casein aus — Thomas und Weber lösen in 1900 ccm Wasser mit Hilfe von 3,2 g Ätznatron = 70 ccm $\frac{1}{4}$ -n-NaOH, oder 5,04 g Salzsäure (= 138 ccm $\frac{1}{4}$ -n-HCl) 100 g Casein auf. Die alkalische Lösung dient zur Bestimmung von Trypsin, die saure für Pepsin. Nach beendeter Verdauung wird eventuell mit Schwefelsäure angesäuert und mit 20% Glaubersalzlösung ausgesalzen. Nach dem Filtrieren wird der Niederschlag von Schwefelsäure durch Auswaschen befreit, dann wird das Filter nebst unverdaulichem Casein getrocknet und gewogen und das Gewicht des unverdaulichen Eiweisses mit dem bei einem gleichen blinden Versuche ohne Trypsin oder Pepsin erhaltenen verglichen. Die Menge des in Lösung gegangenen Eiweisses gibt das Mass für die verdauende Kraft des zu bestimmenden Magensaftes.

Nach Meunier wird der zu untersuchende Magensaft (14 ccm) mit Salzsäure (0,4 ccm pur.) und 1 g Casein versetzt und geschüttelt; nachdem sich das Casein abgesetzt hat, entnimmt man der klaren Flüssigkeit 2 ccm und bestimmt darin den Gehalt an freier Salzsäure. Die übrigen 10 ccm mit dem ungelösten Casein bleiben 24 Stunden im Wasserbade von 40°. Dann wird wiederum in 2 ccm Filtrat die Salzsäure bestimmt. Da durch Pepsinverdauung Salzsäure an Eiweiss gebunden wird, drückt die Abnahme des Wertes für freie Säure den Grad der Pepsinwirkung aus.

Volhard geht nun von der oben erwähnten gewichtsanalytischen Methode von Thomas und Weber aus. Diese basiert darauf, dass reines, unverändertes Casein in Verdauungssalzsäure gelöst, durch Natriumsulfat vollständig gefällt wird. Setzt man also unter sonst gleichen Bedingungen einer bestimmten, gleichen Menge Caseinlösung verschiedene Enzymmengen zu und lässt sie gleich lange im Wasserbad von 40° auf die Eiweisslösung einwirken, so wird der durch Zusatz von Natriumsulfat ausgefallte Rückstand um so geringer sein, je weniger Casein unverdaut geblieben, d. h. je mehr durch die Enzymwirkung peptonisiert worden ist: Je grösser der Rückstand, desto geringer die Enzymmenge unter den sonst gleichen Versuchsbedingungen. Auf Grund dieser Erwägung sammeln Thomas und Weber den Niederschlag auf gewogenem Faltenfilter, waschen ihn mit destilliertem Wasser aus, trocknen und wägen ihn. Die Gewichts-differenz der Rückstände aus einem pepsinhaltigen und einem pepsinfreien Versuch dient also hier als Mass für die peptische Wirkung.

Die Umständlichkeit dieser Gewichtsbestimmung vermeidet Volhard durch Titration der Filtrate. Er geht von der Annahme aus, dass bei fortschreitender Peptonisierung der Caseinlösung die Acidität des Filtrates zunehmen müsse, indem die durch das Natriumsulfat nicht mehr fällbaren salzsauren Peptone das Filter passieren.

Ricinmethode von M. Jacoby².

1 g Ricin Merck wird in 100 ccm 1,5% iger Kochsalzlösung aufgeschwämmt. Zu jeder Probe nimmt man 2 ccm dieser Ricinlösung und setzt dazu für die Pepsinbestimmung 0,5 ccm 0,1 n HCl. In einer Anzahl Röhren, die so beschickt worden sind, gibt man nun absteigende Mengen der zu untersuchenden Pepsinlösung und füllt mit gekochter Enzymlösung auf 3,5 ccm auf. Die Röhren werden dann 3 Stunden im Brutschrank gehalten, und man sieht nach, bei welcher Verdünnung eben die anfangs sehr trübe Ricinlösung klar geworden ist.

¹ Volhard und Löhlein, Münch. med. Wochenschr. 1903, Nr. 49 und Hofm. Beitr. 7, 1906.

² Jacoby, Biochem. Zs 1, 53; 1906. — Jacoby und Solms, Zs f. klin. Med. 64; 1907.

Methode von Michaelis und Rothstein¹.

Zur Pepsinbestimmung nimmt man mit Wasser 12fach verdünntes Serum (Mensch oder Versuchstier) und setzt so lange eine 10% Lösung von Sulfosalicylsäure zu, bis Kongopapier eben violett gefärbt wird. Dies entspricht etwa $\text{pH} = 1,9$. Zu 5 ccm dieser stark trüben Eiweisslösung setzt man 1 ccm verschieden stark verdünnter Enzymlösung. Die Zeit zur Aufhellung der Lösung wird mit derselben Zeit in einem Versuche mit einer Kontrollenzymlösung verglichen. Als Kontrollenzymlösung wird eine unbegrenzt haltbare glycerinhaltige Lösung eines käuflichen Pepsinpräparates benutzt.

b) Gelöste Substrate.

Ausfällung des unveränderten Substrates.

Hier kann jedes Substrat benutzt werden, das von einem geeigneten Fällungsmittel gefällt wird, ohne dass die durch die Enzymwirkung entstandenen Produkte gefällt werden.

Methode von Sörensen². Sörensen benutzte zu seinen Versuchen über die Pepsinverdauung eine Lösung von Acidalbumin. Die nach verschiedenen Zeiten noch vorhandenen Mengen Substrat werden durch Fällung mit Gerbsäure oder Stannochlorid entfernt und im Filtrat der Stickstoff bestimmt (Kjeldahl). Die Gerbsäurelösung enthält nach Hedin am besten³: 100 g Gerbsäure, 50 g NaCl, 50 g Natriumacetat und 50 ccm Eisessig im Liter. Die Stannochloridlösung Sörensens wird durch Lösen von 50 g Zinn in rauchender Salzsäure, Eindampfen zu 130 ccm und Verdünnen auf 1 Liter hergestellt.

Methode nach Glässner⁴. Hier wird Globin aus Rinderblut als Substrat verwendet. Aus salzsaurer Lösung wird das unveränderte Globin mit Ammoniak gefällt (Pepsinbestimmung).

Methode von Gross⁵. Eine saure Caseinlösung wird durch Zusatz von Natriumacetat gefällt. Als Pepsineinheit gilt die Pepsinmenge, die in 15 Min. 10 ccm einer 1%igen Caseinlösung so verändert, dass nunmehr keine Fällung mit NaAc erhalten wird.

Methode von Fuld-Ege. 0,1 g Edestin Merck wird in 100 ccm 0,03 n HCl unter Kochen gelöst. Nach einer Verdauungszeit von 30 Min. setzt man festes Kochsalz zu und beobachtet, ob eine Trübung auftritt⁶. Ege⁷ hat diese Methode dahin modifiziert, dass er nach einer gewissen Ver-

¹ Michaelis und Rothstein, *Biochem. Zs* 105, 60; 1920. — *Dtsch. med. Woch.* 1918, Nr. 25.

² Sörensen, *Biochem. Zs* 21, 288; 1909.

³ Hedin und Masay, *H.* 100, 263; 1917.

⁴ K. Glässner, *Biochem. Zs* 127, 312; 1922.

⁵ Gross, *Berl. klin. Woch.* 1908, Nr. 13; 643.

⁶ Fuld und Levison, *Biochem. Zs* 6, 473; 1907.

⁷ Ege, *H.* 127, 125; 1923.

dauungszeit die Menge Salzlösung bestimmt, die zur Erreichung eines bestimmten Trübungsgrades nötig ist.

Nephelometrische Methode von Rona und Kleinmann¹. Als Substrat wird verdünntes, menschliches Blutserum verwendet. Die Trübung von nach verschiedenen Zeiten entnommenen Proben durch Sulfosalicylsäure und Salzsäure wird nephelometrisch mit der Trübung der ursprünglichen Eiweisslösung durch dasselbe Reagens verglichen. 20 ccm Serumverdünnung $\frac{1}{25}$ wird mit Aciditätsregulator und physiologischer Kochsalzlösung auf 75 ccm verdünnt. Zwei Proben von je 5 ccm werden ausgenommen und durch Zusatz von 5 ccm Flüssigkeit neutralisiert. Dann wird durch Zusatz von 5 ccm 25% HCl und 8 ccm 20% Sulfosalizylsäurelösung die Trübung hergestellt und nach 3 Min. im Nephelometer untersucht. In ähnlicher Weise verfährt man mit den nach Zusatz der Enzymlösung zu den übrigen 65 ccm Eiweisslösung gewonnenen, mehr oder weniger verdauten Proben. Die Trübung ist dem Eiweissgehalt genau proportional.

Gelatineverflüssigung nach Fermi, Modifikation von Th. Madsen, Palitzsch und Walbum². 1400 g gute Gelatine werden unter Zusatz von 2 g Thymol auf 4000 ccm in lauwarmem Wasser gelöst. Von dieser 35%igen Lösung werden 200 g vor der Ausführung des Versuches auf 1 Liter verdünnt. In den Versuchen werden 40 ccm dieser Lösung zu 50 ccm verdünnt. Durch Zugabe von Säure bzw. Lauge wird die erwünschte Acidität eingestellt. Nach bestimmten Zeiten werden 5 ccm ausgenommen, durch 1 ccm Lösung von Base bzw. Säure neutralisiert, in ein Probierrohr gefüllt und ohne Schütteln während 15 Min. abgekühlt. Die Konsistenz der Gelatine wird dann nach einer besonderen Skala beurteilt. Diese Methode, der sich viele Autoren auch in den letzten Jahren bedient haben, ist, von anderen eventuellen Fehlern abgesehen, recht grob, da die Beurteilung der Konsistenz der Gelatine notwendigerweise recht willkürlich werden muss.

Chemische Bestimmung der Reaktionsprodukte.

Diese Methoden, die erst eine genaue Messung der enzymatischen Eiweisshydrolyse ermöglicht haben, gründen sich auf die Bestimmung einiger der durch die Enzymwirkung freigesetzten Atomgruppen. Die ausserordentlich anwendbaren Methoden der Bestimmung der Aminogruppen nach van Slyke und der Bestimmung des Carboxyls nach Sørensen und nach Willstätter und Waldschmidt-Leitz brauchen wir hier nicht zu beschreiben, da sie schon im Zusammenhang mit den Peptidasen beschrieben worden sind (vgl. S. 443 u. ff.). Das gleiche gilt von der Bestimmung des Aminostickstoffs nach Folin.

¹ Rona und Kleinmann, *Biochem. Zs* 140, 478; 1923.

² Fermi, *Arch. f. Hyg.* 12, 242; 1891; 55, 142; 1906. — Palitzsch und Walbum, *Biochem. Zs* 47, 1; 1912.

Unzweifelhaft verdienen, wie neuerdings auch Waldschmidt-Leitz hervorhebt, für die Messung der Pepsinwirkung einfache chemische Methoden, die nur selten angewandt worden sind, den Vorzug. „Allein die chemische Analyse, die die gesamte Menge gebildeter Reaktionsprodukte erfasst, gewährleistet eine sichere Beschreibung des enzymatischen Reaktionsverlaufs. Verfahren zur Bestimmung des Pepsins, die diese Richtlinien befolgen, werden auf der Ermittlung der bei der Hydrolyse freigelegten sauren oder basischen Gruppen aufzubauen sein, auf deren Bildung zuerst die Untersuchungen von V. Henriques und J. K. Gjaldbæk¹ und von J. Christiansen² hingewiesen haben. So erweist sich das Verfahren der alkalimetrischen Bestimmung von Aminosäuren und Peptiden in alkoholischer Lösung, das die

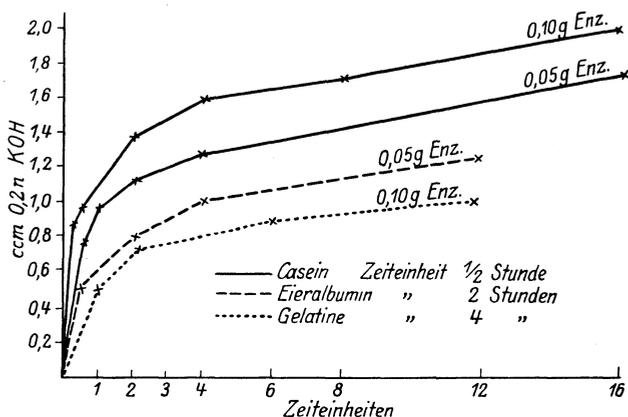


Fig. 89.

Pepsinwirkung und Acidität.

Gesamtheit der bei der Proteolyse entstehenden sauren Gruppen ergibt und das sich bei der Untersuchung vieler anderer Proteasen bewährt hat, auch für den Fall der peptischen Verdauung als geeignet.“

„Die alkalimetrische Analyse der Verdauungsprodukte ergibt für die Wirkung des Pepsins auf die verschiedenen Substrate, wie Waldschmidt-Leitz in vorstehender Fig. 89 veranschaulicht, in allen Fällen beträchtliche Zunahmen an Acidität. Die allgemeinere Anwendbarkeit dieses Verfahrens für den Vergleich verschiedener Proteolysen geht zudem aus der Tatsache hervor, dass der Reaktionsverlauf der Enzymwirkung unabhängig von der Natur der angewandten Substrate beobachtet wird.“

„Der von E. Schütz aufgestellten Beziehung, nach welcher der Umsatz $x = k\sqrt{t}$, folgt der Verlauf der Aciditätszunahmen indessen (Waldschmidt-Leitz, Tabelle 1, S. 122) in keinem Falle.“

Hingewiesen sei hier nochmals auf die vergleichenden Versuche, welche

¹ Henriques und Gjaldbæk, H. 75, 362; 1911 und 83, 83; 1913.

² J. Christiansen, Biochem. Zs 46, 50; 1912.

Steudel, Ellinghaus und Gottschalk¹ über Pepsinwirkung an verschiedenen Substraten (Casein, Serumglobulin und Glutencasein) mit den Methoden von Sörensen und Willstätter, van Slyke und Folin angestellt haben.

M. Kawahara² titriert eine mit Kongorot versetzte 0,5 ‰-Lösung von Eialbumin in 0,1 n. HCl und gibt die Grenzkonzentration des Pepsins an, die noch einen deutlichen Umschlag in Blauviolett hervorruft. Über die klinische Anwendbarkeit des Verfahrens haben wir keine Erfahrung; an Genauigkeit kommt es der Titration in alkoholischer Lösung nicht gleich.

Physikalisch-chemische Methoden.

Zu nennen sind schliesslich noch eine Methode zum Vergleich der enzymatischen Wirksamkeit von Enzymlösungen, wobei doch auf die absolute Bestimmung der Reaktionsprodukte verzichtet wird. Dies ist die Bestimmung der Leitfähigkeit. Sjöqvist³ fand, dass während der Pepsinverdauung eine bedeutende Änderung der Leitfähigkeit eintritt, und hat zuerst die Leitfähigkeitsbestimmung für die Messung der Pepsinverdauung angewandt, nach ihm haben Bayliss u. a. sie benutzt. Northrop hat später diese Methode weiter ausgebildet⁴.

Eine optische Methode hat E. Schütz⁵ zur Anwendung gebracht. Er entfernt aus den pepsinhaltigen Albuminlösungen das unverdaute Eiweiss und bestimmt aus der optischen Drehung der zurückbleibenden Lösung die Menge der gebildeten Peptone. Ebenso haben E. Schütz und Huppert⁶ gearbeitet. Wir stimmen mit Waldschmidt-Leitz und Simons (H. 156) darin überein, dass diese Methode der weiteren Grundlage entbehrt.

Noch weniger kann die Methode von Spriggs, den Fortschritt der Eiweisspaltung durch Messung der inneren Reibung von Eiweisslösungen zu ermitteln, empfohlen werden.

Die Ergebnisse dieser Methode werden, wie Waldschmidt-Leitz zutreffend bemerkt, durch die Eigenschaften unbekannter und ungleichartiger Zwischenprodukte in hohem Masse beeinflusst. „So ergibt der Vergleich der peptischen Hydrolyse beispielsweise von Casein und von Gelatine, der auf die viscometrische Analyse des Reaktionsverlaufes gegründet ist und den die nachstehende Figur 90 veranschaulicht, ein durchaus verschiedenes Verhalten. Während die innere Reibung der Gelatinelösung unter der Einwirkung des Pepsins eine rasche Abnahme erfährt, die nach kurzer Zeit zu einem Endwert führt, bewirkt im Beispiel des Caseins die Bildung eines hochviscosen Zwischen-

¹ Steudel, Ellinghaus und Gottschalk, H. 154, 21; 1926.

² M. Kawahara, Pflüg. Arch. 206, 360; 1924. — Kawahara und Peczenik, ebenda 206, 369; 1924.

³ Sjöqvist, Skand. Arch. Physiol. 5, 277; 1893/95.

⁴ Northrop, JI of gen. Physiol. II, 113; 1919.

⁵ E. Schütz, H. 9, 577; 1885.

E. Schütz und Huppert, H. 30, 1; 1900.

produktes der Hydrolyse zunächst einen bedeutenden Anstieg der Viscosität, deren Abklingen erst mit dem langsam erfolgenden Abbau dieses Zwischenproduktes einsetzt. Die messbare Menge des gebildeten Reaktionsproduktes, die das Ausmass der beobachteten Viscositätserhöhung bestimmt, hängt, wie aus der Figur hervorgeht, von dem Geschwindigkeitsunterschied seiner Bildung und seiner Spaltung ab, der mit der angewandten Enzymmenge wechselt. So ist es zu erklären, dass die Wirkung geringer Enzymmengen

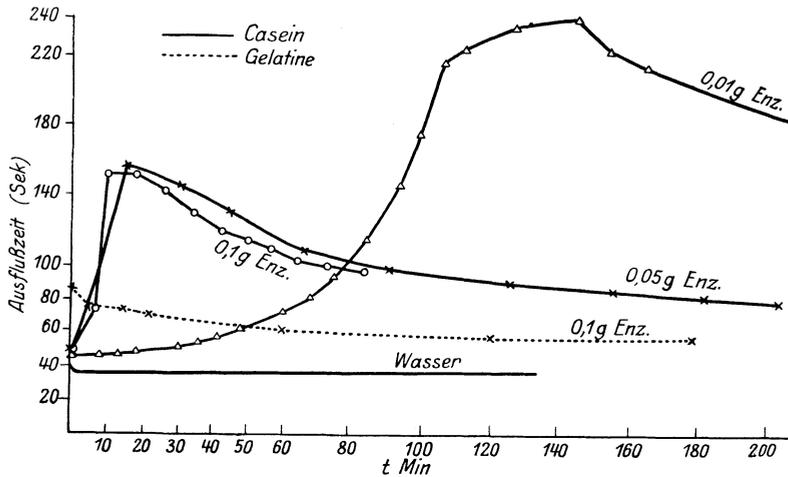


Fig. 90.

Pepsinwirkung und Viscosität.

zu absolut höheren Viscositätswerten führt, als sie bei Anwendung grosser Pepsinmengen beobachtet werden; eine einfache Messung des Enzyms lässt sich auf Grund der viscosimetrischen Analyse nicht durchführen.“

„Zu den in der Figur veranschaulichten Versuchen verwandte man 20,0 ccm 3%ige Lösung von Casein bzw. 10,0 ccm 6%ige Gelatine mit je 10,0 ccm $\frac{1}{3}$ mol. Salzsäure, Citratpuffer von pH = 1,2 und wechselnden Mengen Pepsin bei 30°, das pH des Versuchsansatzes betrug 2,8 bzw. 2,2; die Bestimmung der inneren Reibung erfolgte im Ostwaldschen Viscosimeter durch Messung der Ausflusszeit gleicher Volumina der Ansätze bei 30°.

24. Kapitel.

Lab, Chymosin.

A. Einleitung.

Dass Extrakte aus dem vierten Magen des Kalbs die Fähigkeit haben, Milchgerinnung hervorzurufen, ist längst bekannt und ausgenutzt¹. Die alte Deutung des Vorgangs, die ihn in Verbindung mit der Milchsäurebildung setzten (Liebig), wurde durch Arbeiten von Berzelius u. a. als unrichtig erwiesen. Durch grundlegende Versuche konnte in späterer Zeit Hammarsten, dem wir die bedeutendsten Arbeiten in diesem schwierigen Kapitel verdanken, die völlige Unabhängigkeit der Labgerinnung von der Milchsäurebildung zeigen und den Vorgang als eine Enzymwirkung charakterisieren. Als Name des Enzyms schlug er Chymosin vor². (Im Vorschlag Oppenheimers, den Namen in „Chymase“ zu ändern, können wir keinen Fortschritt sehen.)

Die Frage über die Wirkungsweise des Chymosins ist eine sehr verwickelte. Dies beruht teilweise darauf, dass die gewöhnliche Bestimmungsmethode des Chymosins, die Messung der Gerinnungszeit einer Milchprobe, in keiner Weise durchsichtig ist. Abgesehen davon, dass der Ausfall der Prüfung von Verschiedenheiten in der Milch usw. abhängt, steht es gar nicht fest, dass die Ausfällung des Caseins mit der eigentlichen Enzymwirkung zusammenhängt. Vielmehr dürfte es ziemlich sicher sein, dass die Ausfällung ein sekundärer Vorgang ist, der nur darauf beruht, dass gewisse Produkte der Chymosineinwirkung mit anderen Stoffen der Milch schwer lösliche Verbindungen bilden.

Es kann nämlich als bewiesen angesehen werden, dass die Wirkung des Chymosins ein Abbau des Caseinogens³ ist. Es hat sich gezeigt, dass die Umwandlung von Caseinogen in Casein mit einer Spaltung verbunden ist, und dass diese Spaltung durch Chymosin nicht, wenn die Caseinstufe erreicht ist, aufhört, sondern weiter geht⁴. Caseinogen wird also von Chymosin

¹ Über die Lokalisation des Labenzym im getrockneten Labmagen siehe Hekma und Brouwer, Ref. in Ber. ges. Physiol. B. 36, 213; 1926.

² Ältere Literatur bei Bang, Erg. d. inn. Med. 9, 435; 1912.

³ Mit Caseinogen bezeichnen wir das lösliche Proteid der Milch; mit Casein ein Abbauprodukt davon, das gerinnungsfähig ist. (Oppenheimer hat sich ebenfalls dieser Nomenklatur angeschlossen.)

⁴ van Dam, H. 61, 147; 1909.

abgebaut. Abbau und Gerinnung gehen parallel. Das Eintreten der Gerinnung hat nur insofern etwas mit der Enzymwirkung zu tun, als eine gewisse Abbaustufe ausfallen kann, und zwar hat es sich gezeigt, dass die Koagulation an die Anwesenheit von Kalksalzen gebunden ist. Das was gefällt wird, ist eine komplexe Verbindung von Casein und Kalk.

Das Chymosin ist also sicher ein caseinogenspaltendes Enzym, es bleibt zu untersuchen, ob seine Wirkung auf Caseinogen beschränkt ist oder ob es auch andere Eiweissstoffe angreift, d. h. ob es eine Casease oder eine Protease ist. Nun weicht Casein als Salz einer substituierten Phosphorsäure in seiner Konstitution von den eigentlichen Proteinen stark ab und wird, wie bekannt, von den verschiedenen Proteasen sehr leicht angegriffen. Es wäre deshalb nicht auffallend, wenn das Chymosin nur Caseinogen angriffe. Wir wissen indessen aus Hammarstens Arbeiten, dass auch andere Proteine, allerdings solche von etwas eigenartiger Konstitution, das Legumin der Erbsen und das Syntonin, das Acidalbumin des Muskels, von Chymosin abgebaut werden¹. Sehr interessant ist auch die Entdeckung Neubergs², dass künstlich phosphorylierte Proteine bei Gegenwart von Kalksalzen von Chymosin zur Gerinnung gebracht werden. Wir dürften also behaupten können, dass das Chymosin eine Protease ist. Es liegt, wenn dies richtig ist, eigentlich kein Anlass vor, das Chymosin von den anderen Proteasen getrennt zu behandeln; aber der charakteristische Vorgang, der die grösste Aufmerksamkeit erweckt hat, die Koagulation, und die eigenartigen Bestimmungsmethoden dieses Enzyms rechtfertigen, dass wir hier das Chymosin von den eigentlichen Proteasen getrennt behandeln. Übrigens ist über die wahre Natur und die Wirkungsweise des Enzyms so wenig bekannt, dass wir über die eigentlich proteolytischen Wirkungen desselben beinahe nichts sagen können.

Beruhet nun die Gerinnung der Milch durch Lab darauf, dass eine Stufe im Caseinogenabbau durch Kalksalze fällbar ist, so konnte eine Gerinnung erwartet werden, wenn überhaupt eine Protease das Caseinogen spaltet. Dahin spricht sich z. B. Oppenheimer aus und führt auch an, dass alle Säfte usw., die Proteasen enthalten, auch eine Labwirkung zeigen. Es muss indessen hier die Aufmerksamkeit darauf gelenkt werden, dass nicht alle Proteasen, welche Caseinogen spalten, auf dieselbe Weise angreifen und dieselben Zwischenstufen erzeugen müssen. So ist es wohl wahrscheinlich und geht übrigens aus vielen Versuchen hervor, dass der Abbauweg der Eiweissstoffe bei Pepsin ein ganz anderer ist als bei Pankreastrypsin. Es ist, wie auch Oppenheimer hervorhebt, durchaus wahrscheinlich, dass das Chymosin der dritten Gruppe der Proteasen, nämlich denen vom „Papaintypus“ (Willstätter) angehört, deren besondere Wirkung sein soll, dass sie die Proteine bei deren isoelektrischen Punkten angreifen. Diese hypothetische

¹ O. Hammarsten, H. 102, 105; 1918.

² Neuberg und Oertel, Biochem. Zs 60, 491; 1914.

dritte Gruppe gewinnt durch neuere Untersuchungen immer mehr an Wahrscheinlichkeit. Dahin gehört nach den neuesten Untersuchungen Willstätters die Hefenprotease. Zählen wir einstweilen das Chymosin dieser Gruppe zu, so liegt der Gedanke nahe, dass das Chymosin mit der Gewebsepsinase identisch ist¹. Dies gilt für das echte Kalbslab, nicht für die labenden Enzyme der älteren Tiere. Es hat sich nämlich gezeigt, dass diese, die sog. Parachymosine, sich von dem echten Kalbslab qualitativ unterscheiden, und zwar dürfte man annehmen können, dass die Labwirkung des Magensaftes der ausgewachsenen Tiere von dem echten Pepsin ausgeübt wird (siehe unten).

Wir begegnen hier der alten Streitfrage, ob die Labwirkung von dem Pepsin ausgeübt wird. Die Ansicht, dass Lab und Pepsin identisch sind, stammt von Pawlow². Er beobachtete, was andere Autoren später bestätigt haben, dass in Fistelsäften von Hunden die Wirkungen vollkommen parallel gehen. Bei anderen Tieren ist es ebenso und die Parallelität bleibt auch nach teilweiser Zerstörung der Enzymlösung bestehen.

Andererseits liegen Versuche, besonders an Kälbern, vor, denen zufolge von einer solchen Parallelität keine Rede sein kann. Hammarsten³ beobachtete, dass bei Kalbslab die labende Wirkung viel grösser war als die peptische, während bei Hundefistelsaft das Verhältnis umgekehrt ist. Wurden die Enzyme nicht auf Milch, sondern auf eine reine, schwach saure Caseinogenlösung geprüft, so zeigte sich dasselbe Verhältnis. Bei Vergleich von Lab und Schweinepepsin fand auch van Dam⁴, dass Präparate, die gleich stark labend wirkten, eine verschieden starke Pepsinwirkung zeigten. So war in einem Falle bei der Mettschen Probe das Schweinepepsin 9mal wirksamer.

In weiteren Arbeiten kam Hammarsten dann durch Versuche in neutraler Lösung mit Alkalicaseinaten, wo die Wirkung des Pepsins verschwindend klein ist, zum Resultat, dass, nach der Mettschen Probe beurteilt, pepsinreiche und pepsinarme Präparate gleich stark caseinogenabbauend wirken können. In derselben Weise schloss er, dass der Chymosinabbau des Legumins mit dem Pepsin nichts zu tun hat. Dies gilt nun, wie wir auch früher betont haben, für das echte Chymosin ganz junger Tiere.

Der endgültige Beweis, dass das echte Lab und das Pepsin ganz verschiedene Enzyme sind, wäre die präparative Trennung oder die Zerstörung des einen Enzyms unter Erhaltung der Wirkung des anderen.

Hammarsten hat in einer Reihe ausgezeichneter Arbeiten zuerst gezeigt, dass man durch Erwärmen von Kalbslab die labende Kraft stark schwächen kann, ohne dass die geringe Pepsinwirkung beeinflusst wird. Diese

¹ Oppenheimer, Die Fermente und ihre Wirkungen, 983.

² Pawlow und Parastschuk H. 42, 415; 1904.

³ O. Hammarsten, H. 56, 18; 1908.

⁴ van Dam, H. 79, 247; 1912.

Versuche sind von Schmidt-Nielsen¹ bestätigt worden. Andere Methoden haben Burge², Rakoczy³ und andere gefunden. Die gegen diese Befunde erhobenen Einwände, dass die Entstehung von bei verschiedenen Aciditäten verschieden wirkenden Hemmungskörpern die Abschwächung des einen Enzyms vortäuschen könnte, sind nach neuen Versuchen von Hammarsten nicht stichhaltig.

Er verrieb die Drüsenschicht des Labmagens mit der fünffachen Menge Kochsalz und trocknete die Masse. Wenn er 40 g des Trockenpräparates mit 100 ccm Wasser behandelte, bekam er eine Lösung, die stärker peptisch wirkte, und einen ungelösten Rest, der kaum Pepsin enthielt aber stark labend wirkte. Hammarsten gibt folgende Zusammenstellung⁴.

	Chymosinwirkung	Pepsinwirkung
Nr. 1 Lösung	1	> 100
Bodensatz	5	1
Nr. 2 Lösung	1	> 200
Bodensatz	7	1
Nr. 3 Lösung	1	> 800
Bodensatz	1,6	1
Nr. 4 Lösung	1	> 600
Bodensatz	1	1

Beim Vergleich mit einer nicht behandelten verdünnten Infusion erwies sich die Pepsinwirkung als relativ 50 mal grösser als die des Kochsalzbodensatzes, während umgekehrt in der Kochsalzpräparatlösung die Pepsinwirkung 200 mal grösser war als in der unbehandelten Infusion. Eine wirkliche Trennung der Enzyme ist also durchgeführt worden.

Nach einer anderen Methode, die hauptsächlich in Fällung mit gesättigter Kochsalzlösung und Dialyse besteht, konnte Hammarsten auch ein vollkommen pepsinfreies Chymosin darstellen⁵.

Die Versuche Hammarstens und auch anderer Forscher machen es wahrscheinlich, dass das echte Kalbslab ein selbständiges Enzym ist, das von Pepsin ganz unabhängig ist. Das Chymosin wäre demnach eine in schwach saurer Lösung wirksame, selbständige Protease. Unbedingt erforderlich ist noch eine Untersuchung mit genau eingehaltenen Aciditäts-

¹ Schmidt-Nielsen, H. 48, 92; 1906. Vidensk. Skrifter, I. Math. Naturv. Kl. 1908, 9 Christiania 1908.

² Burge, Amer. JI Physiol. 29, 350; 1912.

³ Rakoczy, H. 68, 421; 1910 und 73, 453; 1911.

⁴ O. Hammarsten, H. 94, 104; 1915.

⁵ O. Hammarsten, H. 108, 243; 1919 und 121, 240; 1922.

bedingungen, um zu zeigen, ob Chymosin wirklich derjenigen Gruppe von Proteasen angehört, die durch ein pH-Optimum bei etwa $\text{pH} = 5$ charakterisiert sind.

B. Darstellung einer Chymosinlösung aus Magenschleimhaut.

Aus der Schleimhaut des Magens, die als der einzige normale Bildungsort des Enzyms angesehen werden muss, gewinnt man durch Auslaugen mit sehr verdünnter Säure (0,1—0,2% HCl) eine Lösung, die nach Neutralisieren eine starke Labwirkung zeigt. Mit Ammonsulfat und mit Kochsalz kann das unreine Enzym ausgesalzt werden. Auch eine Fällung mit Alkohol ist möglich.

Die Behandlung der Schleimhaut mit Säure soll nach der älteren Auffassung die Überführung eines Zymogens in fertiges Enzym bewirken. Nach anderen Ansichten (Hedin) dagegen ist sie als eine Beseitigung natürlicher Hemmungskörper zu betrachten¹. Überhaupt ist diese Frage noch unmöglich zu beantworten, da unsere Kenntnisse über die Chymosinwirkung im allgemeinen recht lückenhaft sind.

Reinigungsversuche im modernen Sinne sind nicht vorgenommen. Die chemischen Eigenschaften der Präparate sind also im wesentlichen die der Verunreinigungen. Besonders geben die Präparate oft die gewöhnlichen Eiweisreaktionen.

C. Wirkungsgrad und Bestimmung.

Wie wir oben auseinandergesetzt haben, ist die Wirkung des Kalblabs die einer Protease, welche vielleicht aus dem einen oder anderen Grunde Caseinogen leichter als andere Eiweisstoffe angreift. Der Labung geht sicher ein Abbau voran; nur ist es nicht festgestellt, wie tiefgreifend dieser ist. Einen Zuwachs des Formolstickstoffs hat man bisher nicht beobachten können. Aus diesem Grunde den Schluss zu ziehen, dass die Spaltung eine rein physikalische Desaggregation ist, kann nicht statthaft sein. Wir weisen darauf hin, dass ähnliche Annahmen für die anderen wahren Proteasen gemacht worden sind, dass aber alle modernen Untersuchungen zeigen, dass der proteolytische Eiweisabbau rein chemisch aufzufassen ist.

Die wirksame Menge des Labs bestimmt man gewöhnlich, indem man die Zeit misst, die zwischen dem Zusatz des Chymosins zu einer Milchprobe und der Gerinnung verfließt. Wir wissen nämlich, dass die Reaktionsgeschwindigkeit den Enzymmengen direkt proportional ist, dass also in diesem Falle

$$\text{Gerinnungsdauer} \times \text{Chymosinkonzentration} = \text{Konst.}$$

Bei sehr verdünnten Enzymlösungen zeigen sich Abweichungen von diesem einfachen Gesetz, indem sie eine relativ längere Gerinnungszeit erfordern. Dies wird auf Enzymzerstörung zurückgeführt².

¹ Hedin, H. 72, 187; 1911 und 74, 242 und 76, 355; 1912.

² Gerber, Soc. Biol. 63, 575; 1907. — van Dam, H. 61, 147; 1909 und 64, 316; 1910.

Über eine Artspezifität des Chymosins in dem Sinne, dass es die Milch der eigenen Tierart besser labt, liegen Versuche vor. Nach einer Untersuchung von Bang¹ ist indessen eine diesbezügliche Spezifität recht zweifelhaft. Verschiedenheiten in der Wirkung beruhen eher auf Verschiedenheiten der Caseine. Übrigens ist die Bestimmungsmethode eine solche, dass sekundäre Einflüsse nicht leicht ausgeschlossen werden können. Die grösste Beachtung verdient nämlich der Umstand, dass das, was in der Mehrzahl der Untersuchungen gemessen wird, die Ausfällung des Caseins, ein sekundärer Vorgang ist, der mit der Enzymwirkung nichts zu tun hat, und der von allerlei Umständen beeinflusst werden kann, ohne dass eine Einwirkung auf das Enzym vorhanden ist.

Die Fällung des Caseins beruht auf der Anwesenheit von Kalksalzen in der Lösung. Der ausfallende Niederschlag ist eine komplexe Kalkverbindung und wurde früher Paracaseinkalk genannt². Nach unserer Nomenklatur ist Caseinkalk der Name. Verreibt man Caseinogen mit reinem Calciumcarbonat und Wasser, so erhält man eine etwa neutrale Lösung von Caseinogenkalk. Durch Einwirkung von Chymosin wird eine solche Lösung nicht koaguliert. Die proteolytische Wirkung dagegen ist vorhanden, denn wird eine so behandelte Lösung mit einem Kalksalz versetzt, so tritt unmittelbar Gerinnung ein. In der Lösung hat sich also aus dem Caseinogenkalk Caseinkalksalz gebildet. Setzt man noch ein Kalksalz hinzu, so fällt der unlösliche komplexe Caseinkalk aus. Die Kalksalze können durch Salze anderer zweiwertiger oder mehrwertiger Metalle ersetzt werden. Dagegen wirken die Salze der Alkalimetalle auf die Gerinnung hemmend, da sie die Bildung der Kalkverbindung zurückdrängen. Die Wirkung der Salze auf die Gerinnung kann natürlich sehr leicht eine Wirkung auf das Enzym vortäuschen.

Für das Studium des Chymosins wäre es am besten eine Methode anzuwenden, welche die Bestimmung der zu jeder Zeit gebildeten Menge Caseinkalk erlaubt. Eine ganz einwandfreie solche Methode gibt es gegenwärtig kaum. Sehr interessant ist doch in dieser Hinsicht eine von Rona und Gabbe³ angegebene Methode: Sie fanden, dass bei bestimmter Menge CaCl_2 und bestimmter Acidität jede Mischung von Caseinogen und Casein eine bestimmte „Gerinnungstemperatur“ zeigt. Durch Vergleich mit Mischungen von ungelabter und gelabter Milch bekannter Zusammensetzung konnten sie den prozentischen Anteil von Casein in der zu untersuchenden Probe ermitteln.

Zu nennen ist auch hier die Methode von Laqueur⁴, wo eine Menge der komplizierten Verhältnisse bei der natürlichen Milch dadurch vermieden

¹ Bang, *Ergebn. d. inn. Med.* 9, 435; 1912.

² Siehe z. B. Arthus und Pagès, *Arch. de Physiol.* 2, 330, 540; 1890.

³ Rona und Gabbe, *Biochem. Zs* 134, 39; 1922/23.

⁴ Laqueur, *Hofm. Beitr.* 7, 273; 1905.

wird, dass er eine reine Caseinlösung verwendet und die Zunahme der inneren Reibung während der Reaktion bestimmt.

Die Notwendigkeit der Kalksalze für die Gerinnung geht sehr deutlich aus Versuchen mit sog. Oxalatomilch hervor. Wenn man mit Oxalat die Kalksalze der Milch ausfällt und dann den Überschuss des Oxalats durch Dialyse entfernt, so gerinnt die Milch nach Behandlung mit kalkfreier Lablösung nicht¹. Setzt man dagegen Calciumchlorid zu, gerinnt sie sofort. Diese Gerinnung tritt in genau derselben Weise ein, wenn man zuerst das Enzym zerstört hat.

Über die Vertretbarkeit des Calciums liegen neue bemerkenswerte Beobachtungen und Messungen von Marui² vor. Durch einwertige Kationen kann Ca unter keinen Umständen ersetzt werden, „dagegen wirken alle zwei- und dreiwertigen Kationen in einer Weise, welche in höherem oder geringerem Grad mit der des Ca verglichen werden kann“.

Auch ein weiterer Befund des gleichen Forschers: „Jede beliebige Suspension, welche an sich nicht stabil ist, und nur dadurch stabil wird, dass sie durch Casein geschützt wird, wird durch das Labferment zur Gerinnung gebracht“, kann, wenn er sich bestätigt, Ausgangspunkt für weitere Fortschritte auf diesem noch dunklen Gebiet werden.

Eine ganz besondere Methode zur Messung der Chymosinwirkung wird von van Dam angewendet. Er bestimmt den Abbau des Caseinkalkes durch längere Einwirkung des Enzyms. Hier können also alle die modernen Methoden zur Messung der Eiweisspaltung zur Anwendung kommen. Die Zulässigkeit dieses Verfahrens fusst natürlich auf der Annahme, dass Chymosin eine Protease ist. Dies scheint ja sicher zu sein. Vielleicht ist es doch am besten durch Parallelbestimmungen nach dieser und einer Labungsmethode sich von der Übereinstimmung zu überzeugen.

Aciditätsbedingungen. Das pH-Optimum der Labgerinnung haben Michaelis und Mendelsohn untersucht³. Sie fanden, dass es bei Gegenwart von Kalk zwischen etwa $H = 4 \cdot 10^{-7}$ und 10^{-6} liegt. Sicher liegen die Punkte $3 \cdot 10^{-6}$ und $1 \cdot 10^{-7}$ ausserhalb der Optimalzone. Das Optimum der Säurefällung des Caseins in reiner Lösung oder in der Milch liegt dagegen bei $2,5 \cdot 10^{-5}$. Durch Gegenwart von Kalksalzen wird es deutlich nach der sauren Seite zu verschoben und unschärfer. Zwischen dem Optimum der Säurefällung und dem der Labfällung findet sich nach Michaelis eine Zone, in der das Casein weder durch Lab noch durch Säure optimal gefällt wird. „Die Labwirkung ist daher nicht eine Verbreiterung der Zone der allgemeinen Säurewirkung, sondern eine spezifische Wirkung; auch ist das Ca für die Labwirkung

¹ Arthus und Pagès, Arch. de Physiol. 2, 330, 540; 1890.

² Marui, Biochem. Zs 173, 371; 1926. — 173, 331; 1926.

³ Michaelis und Mendelsohn, Biochem. Zs 58, 315; 1913/14.

durch vermehrte H-Ionen nicht ersetzbar.“ Die Verdauung des Paracaseinkalkes durch Chymosin hat auch ein Optimum bei sehr schwach saurer Reaktion. Es liegt nach van Dam¹ bei $\text{pH} = \text{etwa } 5$.

D. Kinetik und Hemmungen.

1. Zeitlicher Verlauf.

Über den zeitlichen Verlauf der Bildung von Casein aus dem Caseinogen kann nur wenig gesagt werden, da die älteren Methoden eine genaue Bestimmung der in Lösung befindlichen Caseinmenge nicht erlauben. Indirekt hat zuerst Fuld² das Zeitgesetz festzustellen versucht. Gibt man zu einer Mischung von Lab und Milch nach einer gewissen Einwirkungszeit eine neue Menge Milch, so wird nach Fuld die Gerinnungszeit nicht geändert. Dies bedeutet, dass auch bei Gegenwart der doppelten Milchmenge nach derselben Zeit dieselbe Menge Casein gebildet worden ist. Diese und andere Versuche sprechen dafür, dass die Bildung des Caseins gleichmässig verläuft, d. h. dass in gleichen Zeiten gleiche Mengen Caseinkalk entstehen. Wie die eigentliche Gerinnung von der gebildeten Caseinmenge abhängt, ist eine Frage, die auch noch nicht vollständig beantwortet werden kann. Die Gerinnung tritt bekanntlich sehr plötzlich ein. Dass indessen vor der Gerinnung eine Änderung des Zustandes des Caseins zustande kommt, zeigen z. B. Versuche über die Viscosität.

Man verdankt Gerber³ eine grosse Reihe von Untersuchungen über die Geschwindigkeit der Milchgerinnung und Labwirkung, aber bis jetzt ist ein Eindringen in den enzymatischen Vorgang noch nicht gelungen.

2. Hemmungen.

Ausser den Hemmungen des Chymosins durch Säuren und Alkalien muss die irreversible Zerstörung des Enzyms vor allem durch OH-Ionen beachtet werden. So fanden Schmidt-Nielsen⁴ und Moseley⁵, dass schon so kleine Konzentrationen Hydroxylionen schädigen, dass oft die natürliche Milch das Enzym bei langen Versuchszeiten irreversibel inaktivieren kann.

Neutralsalze scheinen im allgemeinen die eigentliche Enzymwirkung zu hemmen. Auf die Gerinnung können sie einen ganz verschiedenen Einfluss ausüben. Die Kalksalze haben nicht nur für die Ausfällung des Caseins eine Bedeutung, sondern sollen auch in kleinen Konzentrationen die Enzymwirkung befördern⁶.

¹ van Dam, H. 61, 147; 1909.

² Fuld, Hofm. Beitr. 2, 178; 1902.

³ Gerber, Soc. Biol. 63.

⁴ Schmidt-Nielsen, Upsala läkarefören. förh. 11, Suppl. 26; 1906.

⁵ Moseley und Chapman, Proc. Linnean Soc. South Wales 31, 568; 1906.

⁶ Rona und Gabbe, Biochem. Zs 134, 39; 1922.

Die Antiseptica wurden von Freudenreich untersucht¹. Formalin und Chloroform sollen in kleinen Mengen recht bedeutungslos sein.

Glycerin hemmt².

In mehreren Arbeiten ist festgestellt worden, dass Peptone und ähnliche Stoffe auf die Chymosinwirkung einen stark verzögernden Einfluss haben. Sieht man in dem Chymosin eine Protease, so können vielleicht diese Hemmungen mit den bei anderen Proteasen bekannten Hemmungen durch die Reaktionsprodukte und ähnliche Stoffe in Zusammenhang gesetzt werden. Glykokoll soll nach Spiro hemmen².

Die Hemmungen der Labwirkung durch mehr oder weniger charakterisierte Stoffe aus lebenden Organismen sind natürlich hier in noch höherem Grade als bei anderen Proteasen schwer systematisch zu behandeln. Da im allgemeinen der ganze Labungsvorgang untersucht wurde, können die gefundenen Einwirkungen ebenso gern auf Beeinflussung der Caseinfällung beruhen wie auf eine Änderung der enzymatischen Reaktionsgeschwindigkeit. Da die zugesetzten Stoffe oft kolloidal gelöst sind, können sie als Schutzkolloide die Ausfällung verhindern.

Labungshemmende Stoffe sind zuerst von Hammarsten und Rödén im normalen Serum gefunden worden³. Pferdeserum hemmt am kräftigsten, aber auch Ochsen- und Kaninchenserum und Schweineserum zeigen eine ausgesprochene Hemmung. Der Hemmungskörper findet sich in der sog. Pseudoglobulinfraktion⁴ (34—46% Ammonsulfat). Er passiert Chamberlandfilter. Die Hemmung wird aber nicht durch Dialyse des Serums aufgehoben.

Hedin hat die labungshemmenden Stoffe des Serums in mehreren Arbeiten untersucht⁵. Er fand, dass die Hemmungskörper durch Behandlung mit 0,1—0,2% HCl gelähmt oder zerstört wurden. Wichtig ist die Feststellung Hedins, dass die Hemmung durch normales Serum nicht artspezifisch ist. Hedin macht besonders auf die deutlichen Analogien aufmerksam zwischen den Hemmungen des Labs durch Serum usw. und den Hemmungen des Pankreastrypsins durch dieselben Stoffe. Auch hier hat Hedin ähnliche Hemmungserscheinungen durch bekannte Stoffe wie Kohle usw. hervorrufen können. Sehr interessant sind die Versuche Hedins, das sog. Labzymogen als inaktive Verbindung zwischen dem wirklichen Enzym und in der Magenschleimhaut vorkommenden Hemmungskörpern zu erklären⁶. Er fand, dass eine „Zymogenlösung“ (neutrale Infusion des Kalbmagens) immer wirksames Lab enthält. Dieses Lab zeigt indessen in seiner Wirkung gewisse Abweichungen von dem durch Salzsäureextraktion erhaltenen. Geringe

¹ Freudenreich, Zbl. f. Bakt. 4, 309; 1898.

² Spiro, Hofm. Beitr. 7, 485; 1905 und 8, 365; 1906.

³ Hammarsten und Rödén, Upsala. läkerefören förh. 22, 546; 1887.

⁴ Fuld und Spiro, H. 31, 132; 1900.

⁵ Hedin, H. 60, 85; 1909; 60, 364; 1909; 63, 143; 1909; 74, 242; 1911.

⁶ Hedin, H. 72, 187; 1911.

Enzymmengen geben eine verhältnismässig kürzere Gerinnungszeit. (Man erinnert sich hier der Versuche von Northrop über die in rohen Pepsinpräparaten vorkommenden Hemmungskörper, die eine vollkommen analoge Wirkung haben.) Hedin fand weiter, dass, wenn man das „Zymogen“ kurze Zeit in 0,017 n NH₃ auf 37° erwärmt und dann neutralisiert, es seine labungserregende Wirkung eingebüsst hat und statt dessen die Wirkung zugesetzten Labs hemmt. Diese Hemmung ist der des Serums völlig analog und verschwindet durch kurze Behandlung mit Salzsäure. Eine Mischung von Lab und Serum, die eine schwache Labwirkung zeigt, weicht in derselben Weise wie das Zymogen von dem Enzym-Zeit-Gesetz ab. Eine solche Mischung verhält sich gegen HCl und NH₃ völlig wie das natürliche „Zymogen“, das also nach Hedin nichts anderes ist als eine Mischung von Chymosin mit natürlichen Hemmungskörpern.

Das Antilab.

Die Existenz eines spezifischen Antienzylms ist auch hier recht zweifelhaft. Ausser einer Menge Substanzen, deren Wirkung auf völlig unspezifische Einflüsse zurückzuführen ist, gibt es Stoffe, welche streng spezifisch die Labwirkung zu hemmen scheinen. So verhalten sich nach Hedin die im sog. Zymogen vorhandenen Hemmungskörper¹. Die daraus durch die Einwirkung von verdünntem Ammoniak erhaltenen Lösungen hemmten die Wirkung des arteigenen Labs, aber nicht anderer Labenzyme.

Eine andere Frage ist, ob dies die Verschiedenheit der Labenzyme verschiedener Tiere beweisen kann.

Immunantichymosin. Morgenroth² hat die labungshemmende Wirkung verschiedener Immunsera untersucht. Er konnte Antilabsera erhalten, die so stark wirkten, dass ein Zusatz der 200-fachen Enzymmenge nötig war um die Gerinnung hervorzurufen. Diese Körper wirken nicht auf die Labung durch Pflanzenproteasen. Hedin hat später den Immunantikörper studiert³. Er fand, dass derselbe auch nach Einspritzung des Zymogens erhalten wurde. Die Hemmungskörper des Zymogens verhindern also die Antikörperbildung nicht. Vielmehr werden jene nach Hedin als Material dabei verwendet. Die wichtigste Eigenschaft des Immunantichymosins ist die Artspezifität.

E. Einfluss der Temperatur auf die Labwirkung und die Stabilität des Chymosins.

1. Temperatur.

Das Chymosin wirkt am besten etwa bei Körpertemperatur. Fuld fand die „Optimaltemperatur“ bei 45°. Es wirkt natürlich auch, obgleich schwächer

¹ Hedin, H. 74, 242; 1911; 76, 355; 1912.

² Morgenroth, Zbl. f. Bakt. 27, 721; 1900.

³ Hedin, H. 77, 229; 1912.

bei niedrigeren Temperaturen¹. Wie bei allen Enzymen ist hier die Abhängigkeit der Wirkung von der Temperatur von zwei Faktoren zusammengesetzt: Die vergrösserte Reaktionsgeschwindigkeit und die vergrösserte Zerstörung.

Bei dieser speziellen Reaktion gilt ausserdem folgendes: Die Zeit der enzymatischen Gerinnung hängt von der Temperatur in anderer Weise ab als die enzymatische Spaltung des Caseinogens. Auch bei so tiefen Temperaturen, bei welchen keine Gerinnung eintritt, findet eine Umwandlung des Caseinogens statt. Dies hat Laqueur durch Messung der inneren Reibung bewiesen². Die Abhängigkeit der Chymosinwirkung von der Temperatur haben Madsen und Walbum durch die Formel (vergl. I. Teil, S. 245 u. ff.)

$$\frac{K_1}{K_2} = C \cdot \frac{Q}{R} \cdot \frac{T_1 - T_2}{T_1 T_2}$$

darzustellen versucht³. In drei Versuchen fanden sie $Q = 89130, 91200, 58330$.

Bemerkenswert ist die Tatsache, dass gekochte oder auch nur erwärmte Milch langsamer gerinnt als rohe (Loevenhart⁴). Der analoge Effekt tritt auch bei reinen Caseinogen-Kalklösungen ein (Michaelis und Marui⁵), deren Koagulierbarkeit durch Erhitzen auf 100° ganz aufhört.

Nach Marui⁶ beruht die schlechtere Gerinnbarkeit des gekochten Caseins unter der Wirkung des Chymosins nicht auf einer Erhöhung des Kalkbindungsvermögens des Caseins durch das Kochen. Die Wirkung des Erhitzens ist reversibel.

2. Stabilität.

Die Stabilität des Chymosins ist wie die der anderen Enzyme von der Acidität abhängig. Das Optimum liegt nach Versuchen, in welchen die Acidität noch nicht nach modernen Methoden bestimmt wurde, in schwach saurer Lösung. Wahrscheinlich fallen Aktivitätsoptimum und Stabilitätsoptimum einigermassen zusammen. Die Stabilität in Lösung hängt ausserdem von der Konzentration und natürlich in höchstem Grade von der Anwesenheit von enzyymbindenden Stoffen ab. Die natürlichen Hemmungskörper spielen wahrscheinlich auch hier eine Rolle. Die „Zerstörungstemperatur“ bzw. „Tötungstemperatur“ ist nach Bang⁷ für konzentrierte Lösungen beim Optimum etwa 65° (vgl. hierzu I. Teil, S. 272).

Glycerinlösungen sind wie gewöhnlich viel beständiger. Trockenpräparate vertragen Erhitzen.

¹ König, Biochem. Zs 110; 266.

² Laqueur, Biochem. Zbl. 4, 334.

³ Madsen und Walbum, Upsala läkarefören. förh. 11, Suppl. 24.

⁴ Loevenhart, H. 41, 177; 1904. — (Siehe auch L. S. Palmer, Proc. Soc. exp. Biol. 19, 137; 1921.)

⁵ Michaelis und Marui, siehe JI exp. Med. 1, 45; 1922.

⁶ Marui, Biochem. Zs 193, 363; 1926.

⁷ Bang, Skand. Arch. Physiol. 25, 105; 1911.

Starkes Licht schädigt, vor allem die chemisch wirksamen Strahlen¹. Dagegen sollen Röntgenstrahlen und radioaktive Strahlung wirkungslos sein.

F. Die Parachymosine.

Gehen wir davon aus, dass das echte Chymosin, das Kalbslab, ein selbständiges von Pepsin verschiedenes Enzym ist, so ist die Frage zu beantworten, warum alle Pepsinpräparate, auch die reinsten bisher dargestellten, Labwirkung zeigen. Andererseits haben alle Versuche über die labenden Enzyme der ausgewachsenen Tiere gezeigt, dass eine Trennung von Pepsin oder eine stärkere Abschwächung der einen Wirkung durch irgend einen Eingriff nicht gelungen ist. Anzuführen ist hier z. B. die Untersuchung von Michaelis und Rothstein². Aus allen einschlägigen Arbeiten scheint hervorzugehen, dass die Labenzyme der älteren Tiere, die sog. Parachymosine, mit dem Pepsin untrennbar zusammenhängen. Es gibt nun zwei Möglichkeiten die Verhältnisse zu klären:

1. Die Parachymosinwirkung ist die gewöhnliche Pepsinwirkung, die nur dank besonderer äusserer Umstände in der Gerinnung zum Ausdruck kommt. Dies ist an und für sich nicht unmöglich, vielmehr wird eine Labwirkung allen Proteasen zugeschrieben. Indessen kommt nun der Umstand hinzu, dass das Optimum der Labung mit der der Pepsinwirkung nicht zusammenfällt. Hier zeigt sich wieder die Notwendigkeit, die Gerinnung und die Labwirkung zu unterscheiden. Es ist wohl möglich, dass die Wirkung des „Parachymosins“ das gewöhnliche Optimum des Pepsins zeigt, dass aber die Bedingungen für die Gerinnung bei einer anderen Acidität günstiger sind.

2. Die labende Wirkung der Parachymosine wird zwar von demselben Molekül ausgeübt wie die Pepsinwirkung, aber von anderen Gruppen, „Seitenketten“. Diese strukturell chemische Auffassung bietet zwar der modernen Enzymchemie keine Schwierigkeiten, da die Anschauungen über die strukturelle Bindung zwischen Enzym und Substrat immer mehr an Wahrscheinlichkeit gewinnen; die Frage ist aber, ob solche Annahmen in diesem Falle notwendig sind.

An eine elektrochemische Verschiedenheit des Pepsins und Parachymosins dachte zuerst Michaelis³. Nach seiner durch die neueren Arbeiten über Pepsin modifizierten Auffassung soll man sich die Sache so vorstellen, dass Pepsin als Säure die Eiweisskationen angreift, derselbe Molekül in nicht dissoziiertem Zustand als Lab das nicht dissoziierte Caseinogen spaltet. Diese Auffassung ist denkbar, weitere Versuche mit einer modernen, einwandfreien Methodik, besonders einer guten Bestimmungsmethode der Labwirkung müssen die Entscheidung bringen.

¹ Schmidt-Nielsen, Hofm. Beitr. 5, 355 u. 398; 6, 175; 1906; H. 58, 233; 1909.

² Michaelis und Rothstein, Biochem. Zs 105, 60; 1920.

³ Michaelis, Biochem. Zs 17, 231; 1909.

G. Methoden zur Bestimmung der Labwirkung.

Man ermittelt die Verdünnung, bei welcher eine gewisse Menge Milch bei 40° in 30 Minuten zur Koagulation gebracht werden kann¹.

Da die für Labbestimmungen verwandte käufliche Milch hinsichtlich ihres Chymosingehaltes sehr stark variiert, so schlagen Blum und Fuld² vor, an Stelle der Milch ein Milchpulvergemisch anzuwenden, das fabrikmässig hergestellt wird und seiner Zusammensetzung nach konstant ist.

Von diesem Milchpulver werden 3 g mit dem neunfachen Gewicht Wasser zusammengebracht. Dies geschieht so, dass die abgewogene (oder in ausgewogenem Hohlmass unter Klopfen und Glattstreichen abgemessene) Menge Milchpulver in kleinen Portionen unter Umrühren in so viel destilliertes Wasser gegeben wird, dass ein halbflüssiger Teig entsteht, worauf der Rest des Wassers zugesetzt wird. Unter mässigem Umrühren geht nun fast alles in Lösung, ohne dass irgendwelches Erwärmen erforderlich wäre. Diese Lösung, deren Herstellung nur ein paar Minuten dauert, kann man ohne weiteres benutzen, wenn man nur das allerunterste fortlässt. Andererseits kann man sie im Eisschrank bis drei Tage aufbewahren. Jedenfalls ist ein Calciumzusatz, wie er von den Verfassern in der ersten Mitteilung verlangt wurde, nicht nötig.

Es werden nun 20 Röhrrchen folgendermassen gefüllt:

Man nimmt von unverdünntem Magensaft folgende Mengen:

0,10; 0,15; 0,21; 0,32; 0,46; 0,68; 1,0;

von der zehnfachen Verdünnung:

0,1; 0,15; 0,21; 0,32; 0,46; 0,68;

von der hundertfachen Verdünnung:

0,1; 0,15; 0,21; 0,32; 0,46; 0,68.

Das zwanzigste Röhrrchen bleibt zu Kontrollzwecken mit 1,5 ccm gekochtem reinen Saft reserviert.

Diese Proben, welche (abgesehen von der letzten) den Inhalt in einer Verdünnung von 1:10 bis 1:10000 enthalten (eine Vorprobe kann daher unterbleiben), werden in ein Wasserbad von Zimmerwärme, ein grosses Gefäss mit Wasser von 17,5° C gesetzt, worin sie zwei Stunden verbleiben.

Alsdann werden sie mit je einem Tropfen 20/oiger Chlorcalciumlösung versetzt und in ein Wasserbad von 40° auf fünf Minuten übertragen. Das Verhältnis Mageninhalt:Milchpulverlösung in der schwächsten gerinnenden Mischung gibt direkt den Labwert des Mageninhalts an und damit zugleich dessen Fermentgehalt im allgemeinen.

Auf andere Methoden von Rona und Gabbe, sowie von Laqueur ist oben (S. 588) bereits hingewiesen worden.

¹ Glaessner, Hofm. Beitr. 1; 1901. — Hammarsten, H. 22, 103; 1896.

² Blum und Fuld, Berl. klin. Woch. 1905 und Biochem. Zs 4, 62; 1907.

25. Kapitel.

Chemische Vorgänge bei der Blutgerinnung.

Ob an der Gerinnung des Blutes ein Enzym, das Thrombin (Alex. Schmidt), beteiligt ist, lässt sich gegenwärtig weder bejahen noch verneinen. Die Entscheidung hängt in gewissem Sinne auch davon ab, wie wir ein Enzym überhaupt definieren. Deswegen habe ich auch hier dem vermutlich katalytisch wirkenden Stoff Thrombin nicht eine neue Bezeichnung geben wollen, welche ihn durch die Endsilbe *ase* als Enzym charakterisieren würde. Immerhin wird man in einer Monographie über die Chemie der Enzyme eine Darstellung des gegenwärtigen Standes des Thrombin-Problems erwarten, und deshalb seien also die neueren Forschungsergebnisse über die Chemie der Blutgerinnung kurz geschildert. Ältere Stadien der Entwicklung dieses Gebietes findet man in Monographien¹ und in Oppenheimers bekanntem Werk. — Siehe ferner Fuld und Spiro, Hofm. Beitr. 5; 1904.

A. Einleitung.

Die Lehre von der Blutgerinnung als enzymatischem Vorgang stützt sich auf die Untersuchungen von Alex. Schmidt² und von Olof Hammarsten³. Während von der Lehre Alex. Schmidts in ihrer ursprünglichen Form wenig mehr übrig geblieben ist, verdankt man Hammarstens Arbeiten als bleibende Resultate erstens die Einsicht, dass es sich bei der Blutgerinnung um die Umwandlung des Fibrinogens in Fibrin handelt, und zweitens die Isolierung des Fibrinogens. Dass die Blutgerinnung nur in Gegenwart von Kalksalzen verläuft, fanden 1890 Arthus und Pagès⁴.

Über die Einzelheiten bzw. über die Teilvorgänge der Blutgerinnung bestehen viele verschiedene Auffassungen oder „Theorien“. Folgende Darstellung kann zur Einführung in das Gebiet und als Ausgangspunkt für spätere Besprechung besonderer Fragen im III. Teil dieses Werkes dienen.

Im kreisenden Blut kommt ein Eiweissstoff, Fibrinogen, vor, dessen Verwandlung in Fibrin die Blutgerinnung bedingt. Zur Überführung des Fibrinogens in Fibrin ist das Thrombin erforderlich, das als solches im kreisenden Blut nicht oder höchstens in ganz geringen Mengen vorkommt,

¹ Morawitz, Abderhaldens Handb. d. bioch. Arbeitsmeth. 5, 223; 1911. — Oppenheimers Handb. d. Biochemie, 2. Aufl., 4, 44; 1923.

² Alex. Schmidt, Arch. Anat. u. Physiol. 1861.

³ Olof Hammarsten, Upsala Läkareför. förh. 1876. Arch. ges. Physiol. 17—19; 1878—1880.

⁴ Arthus und Pagès, Arch de Physiol. (5) 2, 739; 1890.

welches vielmehr aus einer im Blutplasma oder in den Formelementen des Blutes vorhandenen Vorstufe, dem Prothrombin, entsteht. Dieser Übergang von Prothrombin in Thrombin ist derjenige Teilvorgang bei der Blutgerinnung, welcher die Mitwirkung von Kalksalzen erfordert. Ausser den Kalksalzen ist aber (wenigstens noch) eine andere in verschiedenen Gewebsextrakten befindliche sog. zymoplastische Substanz für den Übergang Prothrombin — Thrombin erforderlich, welche Morawitz als Thrombokinase bezeichnet hat. Als zymoplastische Substanz bzw. als Thrombokinase fungiert zweifellos das Kephalin (Howell und Mac Lean), das vielleicht durch andere ähnliche Stoffe vertreten werden kann. Eine wesentliche Komponente des Gesamtsystems scheint ausserdem das Antithrombin zu sein, welches den Übergang Prothrombin-Thrombin hemmt.

Die verschiedenen auf diesem Gebiete führenden Forscher haben sich leider nicht auf eine gemeinsame Nomenklatur einigen können, so dass eine Reihe von Synonymen existieren. Die folgende Zusammenstellung (nach Morawitz) erleichtert das Studium der verschiedenen Darstellungen.

Thrombokinase (Morawitz)	Thrombogen (Morawitz, Nolf)
= Cytozym (Fuld, Bordet)	= Plasmozym (Fuld)
= Thrombozym (Nolf)	= Serozym (Bordet)
= thromboplast. Substanz (Howell).	

Wir gehen nun dazu über, die Tatsachen in der auch früher befolgten Ordnung zu beschreiben.

B. Substrat und Reaktionsprodukt. Fibrinogen und Fibrin.

Das Fibrinogen, das ausser im Blutplasma noch in der Lymphe, im Magensaft und ferner im Knochenmark und in einigen Transsudaten vorkommt, stammt vermutlich aus der Leber¹. Es gehört in die Klasse der Globuline ist aber durch gewisse Sondereigenschaften gegenüber den übrigen Globulinen gekennzeichnet. Es ist eine im feuchten Zustand elastische Masse, die sich in verdünnter Kochsalzlösung auflöst, durch konz. Kochsalz aber gefällt wird. Hinsichtlich der Lösungs- und Fällungs-Konzentrationen unterscheiden sich die Fibrinogene verschiedener Herkunft. Spez. Drehung $[\alpha]_D = -52,5^\circ$. Ausgangsmaterial ist Pferdeleber, mit so viel Oxalat versetzt, dass es 0,3% Oxalat enthält. Man zentrifugiert die Formelelemente des Blutes ab und lässt wenigstens 20 Stunden bei 0° stehen. Nach Hammarsten wird Fibrinogen dargestellt, indem man Blutplasma mit dem gleichen Volumen gesättigter 0,5–1%iges Kaliumoxalat enthaltender Kochsalzlösung fällt, den Niederschlag in 8%iger NaCl-Lösung wieder aufnimmt und in dieser Weise

¹ Literatur über die Beziehungen zur Leber: Doyon, Journ. de Physiol. et Path. 14, 229; 1912. — G. H. Whipple, Amer. Cl. Physiol. 33, 50; 1914. — K. Hiruma, Biochem. Zs 139, 152; 1923.

mehrere Male umfällt¹. Die Trennung von dem das Fibrinogen begleitenden Fibringlobulin geschieht nach einem von Huiskamp² angegebenen Verfahren mittels konz. Natriumfluoridlösung.

Das aus dem Fibrinogen durch Schlagen entstandene Fibrin (Faserstoff) besitzt im allgemeinen die Lösungseigenschaften der koagulierten Eiweissstoffe; es ist in Wasser sowie in Alkohol unlöslich. Hammarsten macht ferner folgende Angaben: In Salzsäure von 1⁰/₁₀₀ wie auch in Kali resp. Natronlauge von 1⁰/₁₀₀ quillt er stark zu einer gallertähnlichen Masse auf, die bei Zimmertemperatur erst nach mehreren Tagen, bei Körpertemperatur zwar leichter, aber jedenfalls auch nur langsam sich löst. Bei der Lösung in Alkali findet eine Denaturierung unter Ammoniakabspaltung statt. Von verdünnten Neutralsalzlösungen kann der Faserstoff nach längerer Zeit bei Zimmertemperatur, bei 40° viel leichter gelöst werden (vielleicht unter Mitwirkung von Enzymen, Trombolysin, Rosenmann³).

Was nun den Chemismus der Blutgerinnung, also der Umwandlung Fibrinogen-Fibrin betrifft, so sind die verschiedensten Meinungen geäußert worden und eine Entscheidung lässt sich um so weniger geben, als gerade diejenigen Versuche, welche eine solche herbeiführen oder wenigstens erleichtern könnten, fehlen. Die frühere, von mehreren Autoren vertretene Ansicht, dass das Fibrin durch hydrolytische Spaltung des Fibrinogens entsteht, hat sich nicht aufrecht erhalten lassen. Andere Forscher nahmen an, dass sich das Fibrinogen mit einem weiteren Protein verbinde, so dass das Fibrin einen Komplex zweier oder mehrerer Proteine darstellt (Nolf⁴, Mills⁵, Perutz und Rosemann⁶), oder dass das Fibrinogen durch Lipide ausgeflockt wird (Zak⁷, E. Zunz⁸). Auch die Vertreter dieser Auffassungen waren nicht imstande, überzeugende Beweise beizubringen.

Nach einer von Hekma⁹ aufgestellten und eingehend begründeten Theorie handelt es sich bei der Fibrinogen-Gerinnung im wesentlichen um eine Überführung des Alkalisalzes Fibrinogen in den entsprechenden isoelektrischen Stoff, für welchen nach allgemeinen Erfahrungen aus der Eiweisschemie eine geringere Löslichkeit vorausgesetzt werden kann. Dass der Eintritt des isoelektrischen Punktes wie für die Eiweissflockung überhaupt so auch

¹ Nähere Angaben bei Hammarsten, H. 22, 333; 1896. — Nach Heubner (Arch. exp. Path. u. Pharm. 49, 229; 1903) geschieht die Fällung am besten in neutraler, die Wiederauflösung bei schwach alkalischer Reaktion.

² Huiskamp, H. 46, 182.

³ Rosenmann, Biochem. Zs 128, 372; 1922. — 129, 101; 1922. (Hemmungskörper der Fibrinolyse, von Rosenmann als Thromboligin bezeichnet).

⁴ Nolf, Arch. intern. Physiol. 3—7; 1908—1909.

⁵ Mills, Jl Biol. Chem. 46, 135, 167; 1921. — Mills und Mathews, Arch. int. Physiol. 24, 73; 1924.

⁶ Perutz und Rosemann, Biochem. Zs 92, 90; 1918.

⁷ Zak, Arch. f. exp. Path. 97, 499; 1923.

⁸ Zunz, Soc. Biol. 87, 385; 1922.

⁹ Hekma, Biochem. Zs 62—77; 1913—1916. — 143, 105; 1923.

Die Vorstufe des Thrombins findet sich ausser im Plasma im Knochenmark. Yamada¹ nimmt hingegen an, dass das Prothrombin im Knochenmark schon zu Thrombin aktiviert ist. Auch Lymphe enthält nach Howell² Prothrombin (auch die übrigen zur Gerinnung erforderlichen Komponenten können diesem Forscher zufolge in der Lymphe vorhanden sein).

Darstellung des Thrombins. Hammarsten³ entfernt aus Serum die Globuline durch Magnesiumsulfat, verdünnt das Filtrat mit Wasser und fällt nun das Thrombin mit Magnesiumhydroxyd, oder er verwendet entkalktes Serum und dialysiert. Die nach seinen Verfahren dargestellten Thrombinlösungen enthalten nur noch 0,3—0,4 ‰ feste Stoffe.

Nach der Methode von Howell⁴ wäscht man Fibrin aus Schweineblut in fliessendem Wasser mehrere Stunden unter Kneten aus, bis alles Hämoglobin entfernt ist. Die weisse Fibrinmasse wird dann fein verteilt, während 2—3 Tagen in eisgekühlter Kochsalzlösung extrahiert und schliesslich koliert und filtriert. Aus dem trüben, stark thrombinhaltigen Filtrat entfernt man die Eiweisskörper, indem man es mehrmals mit dem halben Volumen Chloroform auf der Schüttelmaschine durchschüttelt und filtriert (Chloroformniederschlag bleibt auf dem Filter). Nach wiederholtem Schütteln und Filtrieren erhält man schliesslich eine wasserklare sehr eiweissarme Lösung mit kräftiger Thrombinwirkung. Durch schnelles Eintrocknen der Lösung bei 35°—40° erhält man ein haltbares Präparat, das in physiologischer Kochsalzlösung wieder eine wirksame Lösung gibt.

Neuerdings macht Bleibtreu⁵ in einer bemerkenswerten Mitteilung auf ein bereits 1909 von J. Mellanby angegebenes Verfahren zur Thrombindarstellung aufmerksam, und er beschreibt das Verfahren, wie er es anwendet, folgendermassen:

Gut zentrifugiertes Oxalatplasma wird abgemessen. Mindestens die 10-fache Menge destillierten Wassers bereitgestellt und dieser ungefähr $\frac{1}{30}$ des Volumens des Oxalatplasmas an Normalessigsäure zugesetzt. Diesem schwach essigsäuren Wasser wird dann die abgemessene Menge Oxalatplasma unter Umrühren zugesetzt.

Nach 1—2 Stunden hat der Fibrinogenniederschlag sich so weit abgesetzt, dass die darüberstehende Flüssigkeit abgossen werden konnte. Dann wird aufs neue eine grosse Menge destillierten Wassers zugesetzt und durchgerührt. Es dauert diesmal etwas länger, bis sich der Niederschlag hinreichend abgesetzt hat. Die überstehende, nunmehr schon fast farblose Flüssigkeit wird abgossen, der Niederschlag auf ein Filter gebracht und nach Ablaufen des Restes der Flüssigkeit noch einmal mit destilliertem Wasser durchgespült.

Dann wird nach Abtropfen des Waschwassers durch mässiges Auspressen der Niederschlag noch nach Möglichkeit von anhaftender Flüssigkeit befreit und alsdann unter Zerkleinern der zusammengeballten Massen in so viel destilliertem Wasser suspendiert, als etwa $\frac{2}{8}$ des angew. Oxalatplasmas entspricht.

¹ Yamada, Biochem. Zs 87, 273; 1918.

² Howell, Amer. Jl Physiol. 35, 483; 1914.

³ Hammarsten, H. 22, 333; 1896. — 28, 93; 1899. Weitere Angaben bei Morawitz, Abderhaldens Handb. d. Biochem. Arbeitsmethoden 5.

⁴ Howell, Amer. Jl Physiol 26, 1; 1910.

⁵ Bleibtreu, Pflüg. Arch. 213, 642; 1926.

Zur Kinasebereitung bevorzugt Bleibtreu Stierhoden.

„Da die Bildung des Thrombins bei erhöhter Temperatur schneller vor sich geht als bei Zimmertemperatur, wurde die Suspension des Fibrinogens in Wasser in einem Wasserbad auf 30° gebracht, durch Zusatz von $\frac{1}{40}$ des Volumens gesättigter NaCl-Lösung das Fibrinogen in Lösung gebracht. . .

Dann wurde der Gewebsextrakt, inzwischen auch auf etwa 30° erwärmt, zugesetzt und zwar in ziemlich reichlicher Menge, etwa $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{6}$ des Volumens der angewandten Fibrinogenlösung und dann endlich etwa $\frac{1}{60}$ des Volumens 1%-iger CaCl₂-Lösung zugefügt. Das Ganze gut umgerührt, bleibt dann bei 30° stehen. Meistens beginnt nach 2—5 Minuten die Gerinnung und nach nicht langer Zeit geseht die ganze Masse zu einem weissen, festen Gerinnungsklumpen. . .

Nach Eintritt der Gerinnung bleibt dann nichts weiter zu tun übrig als aus diesem Gerinnungsklumpen die Flüssigkeit abzapfen und vom entstandenen Fibrin zu trennen.“ Bleibtreu findet es am besten, bald nach den ersten Anfängen der Gerinnung durch Rühren mit dem Glasstab zu defibrinieren. Dann lässt sich der grösste Teil der Flüssigkeit von Fibrin abgiessen und der Rest aus dem Fibrinklumpen mit der Hand auspressen. Die so gewonnenen Lösungen „haben nun tatsächlich die erstaunlich grosse, von Mellanby ihnen zugeschriebene Gerinnungswirkung auf Fibrinogenlösungen, sowie auch auf Oxalatplasma“ (Wirksamkeit siehe S. 603).

Was die weitere Reinigung der Thrombinlösungen betrifft, so empfiehlt sich nach Bleibtreu die von Howell angegebene Chloroform-Aceton-Methode.

„Wenn eine Eiweisslösung mit einer nicht zu kleinen Menge Chloroform geschüttelt wird, entsteht eine Emulsion, an die ein grosser Teil des Eiweisses adsorbiert wird; wenn Thrombin neben Eiweiss vorhanden ist, so bleibt das Thrombin grossenteils in Lösung. Wenn eine eiweisshaltige Thrombinlösung mit dem gleichen Volumen Aceton gemischt wird, so wird mit dem grössten Teil des Eiweisses auch das Thrombin ausgefällt. Durch die Acetonfällung wird aber das Eiweiss in Wasser unlöslich bzw. schwer löslich, während das Thrombin sich aus dem Niederschlag mit Wasser auswaschen lässt.“

Die Rohthrombinlösung wird demgemäss mit Aceton gefällt, dann wird die Acetonfällung mit Wasser ausgezogen und die noch vorhandenen Eiweissreste werden durch Ausschütteln mit Chloroform entfernt.

Die Adsorbierbarkeit des Thrombins an Casein wurde von Bleibtreu und Atzler¹ zu Reinigungsversuchen verwendet.

Unter anderen Verfahren mag noch ein neuerdings von Tsunoo² angegebenes erwähnt werden: Er adsorbiert das Thrombin aus Serum durch Casein, das er im Serum unter Schütteln auflöst. Dann wird das Casein durch Essigsäure ausgefällt; man verdünnt mit Wasser auf das 2—3-fache Volumen, dekantiert die oben stehende Flüssigkeit ab, verdünnt nochmal, zentrifugiert, trocknet den Niederschlag im Exsiccator und pulverisiert das Thrombinpräparat. Mit 94%-igem Alkohol kann eine weitere Reinigung vorgenommen werden.

Thrombokinase (Thrombozym nach Nolf).

Die Thrombokinase findet sich in den Blutplättchen und wird von diesen an das Serum abgegeben. Demgemäss enthält das Plasma stets ein wenig Thrombokinase.

¹ Bleibtreu und Atzler, Pflüg. Arch. 181, 340; 1920. — Bleibtreu, ebenda 194, 318; 1922.

² Tsunoo, Pflüg. Arch. 205, 255; 1924.

Die Tatsache, dass Vogelblut (im Gegensatz zu Säugetierblut) nur sehr schwer gerinnt, lässt sich demgemäss auf den Mangel an echten Blutplättchen zurückführen.

Ferner findet sich Thrombokinasen in Leukocyten (Bordet¹, Austin und Pepper², Nolf³).

Bemerkenswert ist, dass nach Morawitz, Bordet u. a. auch in Organen bzw. in deren Extrakten Thrombokinasen vorkommen (nicht aber fertiges Thrombin wie Leo Loeb⁴ annahm). Über die Identität dieser Gewebekinasen mit denjenigen der Blutplättchen sind die Meinungen geteilt. Thrombokinasemangel bei der Hämophilie siehe S. 607.

Darstellung der Thrombokinasen aus Geweben. Morawitz⁵ schüttelt gleiche Mengen Organbrei (z. B. Leberbrei) 20 Minuten mit Kochsalzlösung, kühlt die Lösung mehrere Stunden im Eisschrank ab und dekantiert. Diese trüb aussehende Kochsalzlösung verwendet er zu den Gerinnungsversuchen.

Batelli⁶ stellt Thrombokinasen aus Brei von Pferde- oder Hammellunge dar, rührt mit dem doppelten Volumen Wasser an, kocht, säuert mit Essigsäure an, zentrifugiert den Niederschlag, neutralisiert, setzt Alkohol zu und trocknet im Vakuum.

Cecil⁷ stellt das Howellsche Thromboplastin aus getrocknetem Thymusbrei durch Glycerinextraktion dar.

Kinasen (Koaguline) kommen nach Leo Loeb⁸ in Geweben von Avertebraten zusammen mit vollständigem Thrombin vor.

Die Hemmungskörper.

Die Hemmungskörper werden zum Teil als Anti-Thrombine, teils als Anti-Kinasen angesehen und bezeichnet.

Anti-Thrombine, welche die Bildung des Thrombins verhindern bzw. hemmen, sollen im Blut selbst, im Plasma und im Serum vorkommen⁹. Es soll sich um eine thermolabile Substanz von Proteincharakter handeln.

Unter den Säugetierblut-fremden Hemmungskörpern, die zu den eigentlichen Anti-Thrombinen gehören, ist nach Morawitz, Gratia¹⁰ u. a. das

¹ Bordet und Delange, Ann. Inst. Pasteur, 26, 657 und 737; 1912.

² Austin und Pepper, Arch. of intern. Med. 11, 305; 1913.

³ Nolf, Arch. Néerl. de Physiol. 7, 348.

⁴ Leo Loeb, Hofm. Beitr. 5—9; 1906/07.

⁵ Morawitz, Abderhaldens Handb. d. Biochem. Arbeitsmeth. 5, 223 u. zw. 278; 1911.

⁶ Batelli, Soc. Biol. 68, 789; 1910.

⁷ Cecil, Amer. J. Physiol. 29, 156; 1911.

⁸ Leo Loeb, Biochem. Zs 24, 479; 1910.

⁹ Literatur hierzu: Collingwood und Mac Mahon, J. of Physiol. 45, 119; 1912. — 47, 44; 1913. — Minot, Amer. J. Physiol. 39, 131; 1915. — Denny und Minot, Amer. J. Physiol. 38, 233; 1916. — Nolf, Ann. Inst. Pasteur, 31, 155; 1917. — Gratia, Ann. Inst. Pasteur, 35, 513; 1921.

¹⁰ Gratia, Soc. Biol. 83, 311; 1921.

von J. B. Haycraft¹ entdeckte Hirudin zu zählen, das von Franz² und neuerdings von E. Zunz³ eingehend studiert wurde.

Anti-Thrombine bzw. Anti-Kinasen spielen nach Howells Theorie eine wesentliche Rolle beim Gesamtvorgang der Blutgerinnung⁴.

Als Hauptquelle dieser Hemmungsstoffe wird die Leber angegeben.

Ein wertvolles Resultat neuerer Arbeiten von Howell scheint die Aufklärung über die Mitwirkung des Heparins⁵ zu sein, welches Howell als eine notwendige Ergänzung eines im Blut vorhandenen Pro-Anti-Thrombins ansieht. Neuerdings hat Howell dieses Heparin weitgehend gereinigt und hält es für eine gepaarte Glukuronsäure von Glukosid-Struktur, die Schwefelsäure und eine noch unbekannte Stickstoff-Komponente enthält.

Hemmungskörper, in denen Morawitz⁶ Anti-Kinasen vermutet, kommen in Schlangengiften vor.

D. Eigenschaften des Thrombins und der Thrombokinasen.

1. Thrombin.

Wirksamkeit von Thrombinlösungen. Bleibtreu⁷ gibt in dankenswerter Weise auch Zahlen für die Wirksamkeit seiner nach Mellanby (vgl. S. 600) dargestellten Lösungen. Als eine gute mittlere Wirkung betrachtet er diejenige einer Thrombinlösung, welche mit dem gleichen Volumen Rinderoxalatplasma vermischt, in weniger als 10 Sekunden den Anfang der Gerinnung zeigten, woran sich sehr schnell eine feste Gerinnung der ganzen Masse anschloss. Bisweilen erfolgte der Anfang der Gerinnung auch schon in 4 Sekunden.

Für ein nach dem Verfahren von Howell mit Chloroform und Aceton hergestelltes Präparat macht Bleibtreu folgende Angaben:

In einer 0,05⁰/_o-igen wässrigen Lösung gibt es, mit gleichen Teilen Rinderoxalatplasma versetzt, in meist weniger als 10 Sekunden Gerinnung. — Biuretreaktion positiv. Die Analyse ergab 4,7⁰/_o Asche. Die Analyse des organischen Teiles ergab annähernd Proteinzusammensetzung.

Hochgereinigte Lösungen scheint ferner Howell erhalten zu haben⁸. Wie schon erwähnt, sind seine besten Thrombinlösungen fast frei von gerinn-

¹ Haycraft, Arch. f. exp. Path. 18, 209; 1884.

² Fr. Franz, Arch. f. exp. Path. 49, 342; 1903.

³ E. Zunz und M. van Geertruyden-Bernard, Arch. intern. de Physiol. 20, 79; 1922.

⁴ W. H. Howell, Amer. Jl Physiol. 29, 187; 1911. — 31, 1; 1912.

⁵ W. H. Howell, Amer. Jl Physiol. 63, 434; 1922.

⁶ Morawitz, D. Arch. f. klin. Med., 80, 340; 1904.

⁷ Bleibtreu, Pflüg. Arch. 213, 642; 1926.

⁸ Howell, Amer. Jl Physiol. 26; 1910. — Siehe auch Wöhlisch und Paschkis, Zs exp. Med. 40, 121; 1924.

barem Eiweiss und ferner phosphorfrei. Durch Fibrin¹ und ausserdem durch Calciumphosphat (Bordet) wird es stark adsorbiert.

Der erreichte Reinheitsgrad dürfte immerhin noch nicht so gross sein, dass sich aus der (anodischen) Wanderung im elektrischen Strom Schlüsse ziehen lassen². Howell³ fand seine Präparate in wässriger Lösung thermolabil.

2. Thrombokinasen (Zymoplastische Substanzen).

Für den Proteincharakter der Plasma-Kinase hatten sich Morawitz und Collingwood⁴ ausgesprochen.

Ohne die Literatur hier ausführlich referieren zu wollen — dies würde selbst bei Beschränkung auf die letzten Jahre zu weit führen — kann zusammenfassend gesagt werden, dass die Kinasen Phosphatide sind (Howell, Bordet⁵, Zak⁶, Waksman⁷ u. a.).

Hier ist insofern ein weiterer chemischer Anhaltspunkt gefunden, als das chemisch ziemlich gut charakterisierte Kephalin, ein ätherlösliches Monophosphatid 1N:1P wirksam befunden wurde; die Ergebnisse verschiedener Forscher gehen darüber auseinander, ob reines Kephalin (Mac Lean⁸) oder die Mischung desselben mit Lecithin (Gratia und Levene⁹) am wirksamsten ist.

Zunz und La Barre¹⁰ nannten eine aus Kephalin gewonnene sehr wirksame Fraktion Cytozymin.

Die zymoplastische Wirksamkeit von Aminosäuren ist in letzter Zeit besonders eingehend von E. Zunz studiert worden, welcher nunmehr als wirksamen Aktivator einen Komplex aus einem Lipoid und einer Aminosäure (bzw. Peptid oder Albumose) annimmt.

E. Kinetische Probleme.

Die bis jetzt vorliegenden Messungen sind über das Stadium der ersten Orientierung kaum hinausgekommen; Reaktionskonstanten sind erst in einigen Fällen berechnet worden und demgemäss sind auch die Konzentrationsfunktionen der an der Fibrinogen-Gerinnung beteiligten Stoffe noch wenig bekannt. Vor allem steht noch die Frage offen, was als Mass der Reaktion gewählt werden soll.

¹ Gessard, C. r. 150, 1617; 1910. — Foà, Arch. di Fisiol. 10, 479; 1912. — Es dürfte sich die Methodik von R. Fricke (Koll. Zs 39) empfehlen.

² Resch, Biochem. Zs 78, 297; 1917.

³ Howell, Amer. Jl Physiol. 31, 1; 1912. — 32, 264; 1913.

⁴ Collingwood und Mac Mahon, Jl of Physiol. 47, 44; 1913.

⁵ Bordet und Delange, Arch. f. exp. Path. 71, 295; 1913.

⁶ Zak, Arch. f. exp. Path. 70, 27; 74, 1; 1912/13. — 97, 499; 1923.

⁷ S. A. Waksman, Amer. Jl Physiol. 46, 375; 1918.

⁸ Mac Lean, Amer. Jl Physiol. 41, 250. — 43, 586; 1917.

⁹ Gratia und Levene, Jl Biol. Chem. 50, 455; 1922.

¹⁰ Zunz und La Barre, Arch. intern. de Physiol. 18, 116; 1922. — Soc. Biol. 90, 655; 1924.

Unter denjenigen Methoden, welche bis jetzt für kinetische Messungen angewandt wurden, dürften Viscositätsbestimmungen und evtl. nephelometrische Bestimmungen entwicklungsfähig sein. Diesbezügliche Daten findet man bei Kugelmass, dessen Arbeit wir die folgende Figur 91 entnehmen.

Da die Ausfällung des Fibrins vermutlich nahe mit seinem Ladungszustand zusammenhängt, ist eine genaue Bestimmung der Acidität in den Reaktionslösungen natürlich unerlässlich. In alkalischen Lösungen ist die Blutgerinnung gehemmt; genauere Angaben über das Aciditäts-Optimum der Gerinnung haben Kuwashima¹, Tsunoo² und Zunz³ sowie besonders Kugelmass gemacht. Hiernach würde das Optimum (für 38°) bei etwa $\text{pH} = 7$ liegen, nahe am isoelektrischen Punkt des Fibrins ($\text{pH} = 7,2$). Weitere Versuche sind wünschenswert. Nach Kugelmass ändert sich die Acidität bei der Fibrinogen-Gerinnung wesentlich; der genannte Forscher kommt zum Resultat, dass das Reaktionsprodukt Fibrin saurer ist als das Fibrinogen. Dagegen findet E. H. Hirsch⁴, dass während der Gerinnung die Acidität der Lösung zunimmt.

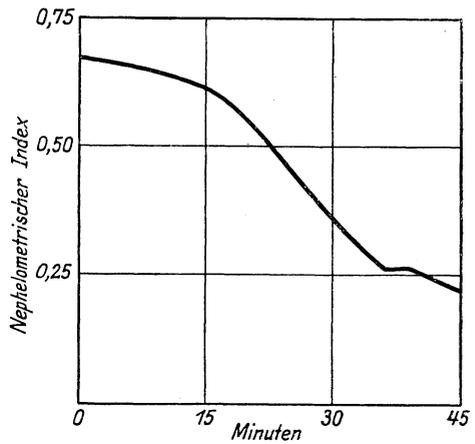


Fig. 91.

Vermutlich kompliziert sich der Einfluss der Acidität dadurch, dass — wie bei den Proteolysen — sowohl das Substrat als das Katalysator-System durch Salzbildung vom Aciditäts- bzw. Alkalinitätsgrad der Lösung abhängig ist.

Von grösster Bedeutung für die Ausfällung des Fibrins sind die Neutralsalze.

Man hat hier zu unterscheiden a) die nicht kalkfällenden Salze, b) die kalkfällenden Salze.

Was erstere Gruppe betrifft, so steht fest, dass die Neutralsalze einwertiger Ionen die Thrombinwirkung hemmen.

Unter den zweiwertigen Kationen ist Mg^{++} zu nennen.

Wie schon einleitend hervorgehoben, spielen die Ca-Salze eine ganz besondere Rolle. Man unterscheidet zwei Wirkungen:

1. Die Beschleunigung der Thrombinbildung durch Kalksalze.
2. Die Umsetzung mit dem Fibrinogen.

¹ Kuwashima, JI of Biol. 3, 91, 1923.

² Tsunoo, Pflüg. Arch. 205, 255; 1924.

³ E. Zunz und La Barre, Soc. Biol. 85, 1107; 1921.

⁴ E. H. Hirsch, JI Biol. Chem. 61, 795; 1924.

Was letzteren Einfluss betrifft, so wechselt derselbe mit der Salzkonzentration, und zwar geht der fördernde Einfluss kleiner Calciumsalzmengen in eine Hemmung bei grösserer Konzentration derselben über^{1,2}. Nach Hammarsten¹ liegt die Grenze etwa bei 0,1% Ca.

Da die Calciumsalze in erster Linie die Thrombin-Bildung beeinflussen, so gilt das gleiche, natürlich in umgekehrtem Sinne, für die kalkfällenden Salze, besonders Oxalate und Fluoride, ferner auch Citrate. Auch die Hemmung durch die gallensauren Salze dürfte auf den von ihnen bewirkten Calcium-Entzug zurückzuführen sein.

Bleibtreu (Pflüg. Arch. 213) findet in seinen zuverlässigen Versuchen angenäherte Proportionalität zwischen Gerinnungsgeschwindigkeit und Thrombinmenge.

F. Einfluss der Temperatur.

Der Einfluss der Temperatur auf die Stabilität des Thrombins ist insofern von besonderem Interesse, als sich daran die Frage knüpft, ob das Thrombin den Enzymen zuzuzählen ist oder nicht.

Die exakte Bestimmung dieses Temperatur-Einflusses ist dadurch erschwert, das bis jetzt Reaktionskonstanten sich noch nicht haben berechnen lassen.

Hiruma³ gibt an, dass das Thrombin in wässriger Lösung schon bei 15° in 24 Stunden um 50% an Wirksamkeit abnimmt; es würde also in dieser Zeit zur Hälfte zerstört werden. Dazu wäre in erster Linie noch die Angabe der Acidität der Lösung erforderlich. Schwer vereinbar ist mit dieser Angabe die Beobachtung von Blaizot⁴, dass Thrombin kurzes Erhitzen auf 100° überdauern soll, sofern hier eben nicht die Aciditätsverhältnisse viel günstigere waren.

Was dann den Einfluss der Temperatur auf die Geschwindigkeit der Gerinnung betrifft, so fand Kugelmass folgende Zahlen:

Temperatur Grade	Koagulationszeit in Minuten
39	25
35	35
20	50
8	90
4	125

Die Berechnungen und Erörterungen, die Kugelmass an diese Zahlen knüpft, sind nicht ohne weiteres verständlich.

¹ Hammarsten, H. 22, 333; 1896. — Horne, JI of Physiol. 19, 356; 1896.

² Fleig und Lefèvre, JI de Physiol. Path. 4, 615; 1902.

³ Hiruma, Biochem. Zs 139, 152; 1923.

⁴ Blaizot, Soc. Biol. 71, 447; 1911.

Die Angaben von Rettger, Howell, Stromberg und Bleibtreu stimmen dahin überein, dass eine Steigerung der Gerinnungsgeschwindigkeit nur zwischen 0° und 15° eintritt, während zwischen 15° und 40° der Temperatureinfluss sehr gering ist; hier kompensieren sich vermutlich 2 Einflüsse.

Eine Optimal-Temperatur geben Simson und Rasmussen bei 38–40° an, Yamada¹ bei 37° (Thrombin aus Knochenmark).

G. Zur Pathologie der Blutgerinnung. Hämophilie.

Die Hämophilie wird von der grossen Mehrzahl der Forscher auf den Mangel an Thrombin, zurückgeführt², welcher seinerseits einer Störung der Thrombinbildung zuzuschreiben ist. Es steht nämlich fest, dass der Fibrinogengehalt des hämophilen Blutes normal ist. Wesentlich ist ferner die Tatsache, dass das Blut von Hämophilen durch normale Gewebsskinase koaguliert wird (Morawitz, H. Schloessmann).

Als Ursache der gestörten Thrombinbildung dürfte zufolge der von Sahli zuerst geäusserten Ansicht der Mangel an Thrombo-Kinase anzusehen sein. Für diese Auffassung sprechen sich auch auf Grund neuer Untersuchungen Howell und Cekada aus. Diese Forscher konnten nachweisen, dass das Prothrombin im hämophilen Blut in etwa der gleichen Menge vorhanden ist wie im normalen. Sie finden aber, dass die Blutplättchen des hämophilen Blutes sich durch ihre viel grössere Stabilität von denjenigen des normalen Blutes unterscheiden und führen also die Hämophilie auf diese Anomalie zurück.

E. Zunz und La Barre (Soc. Biol. 93, 867; 1925) fanden das Blut bei mehreren Fällen von anaphylaktischem Schock ungerinnbar.

Weitere kinetische Studien werden wohl festere Grundlagen für die Beurteilung des Mechanismus des Blut-Gerinnungsvorganges schaffen. Bei dem jetzigen Stand der Forschung hat der Verf. sich nicht imstande gesehen, eine einheitliche Darstellung der Fibrinbildung zu geben und ein Referat über die zahlreichen „Theorien“ würde dem Leser kaum eine grössere Klarheit über die Sachlage vermitteln. Deswegen mag die obige Beschreibung der wichtigsten Tatsachen genügen.

Anhang: Methoden zur Messung der Blut-Gerinnungszeit.

Sämtliche Methoden leiden daran, dass die chemische Reaktion, welche den zeitlichen Verlauf bestimmt, ihrer Natur nach nicht bekannt ist, und also eine sekundäre Erscheinung, nämlich das Auftreten einer Trübung oder Flockung und die dadurch verursachte Zustandänderung des Systems zum Gegenstand der Messung gemacht werden muss.

¹ Yamada, Biochem. Zs 87, 273; 1918.

² Sahli, Zs klin. Med. 56, 264; 1905. — Deutsch. Arch. klin. Med. 99, 518; 1910. — Siehe auch Morawitz und Lossen, Deutsch. Arch. klin. Med. 94, 110; 1908.

Wenn durch Bildung des Fibrins die Reaktionslösung in ein makroheterogenes System übergeht, äussert sich die Änderung des Dispersitätsgrades natürlich hinsichtlich der meisten physikalischen Eigenschaften. Zur quantitativen Messung sind die Änderung der Viscosität und die Abnahme der Durchsichtigkeit der Lösung verwendet worden. Über die Änderung der Leitfähigkeit bei der Fibrinbildung gehen die Angaben auseinander.

1. Viscositätsmessungen.

Das Ausfluss-Viscosimeter — etwa die bekannte von Wi. Ostwald angegebene Form — eignet sich nicht ohne weiteres für koagulierende Systeme. Heubner und Rona¹ haben aber bei ihrer Methode, durch welche die Ausflussgeschwindigkeit des Blutes aus engen Glascapillaren gemessen wird, mehrere der bei solchen Bestimmungen auftretenden Schwierigkeiten überwunden.

Für manche klinische Zwecke liefert vielleicht die von Frisch und Starlinger² vorgeschlagene Methodik ausreichend genaue Ergebnisse.

Zur Messung zäher Flüssigkeiten oder weicher heterogener Gemische sind mehrere Apparat-Typen ausgearbeitet worden, so ein Fall-Apparat von Ladenburg, ferner Schwingungs-Viscosimeter von Couette³, Verschaffelt u. a. Ein solches wurde neuerdings von Kugelmass⁴ zur Bestimmung der Gerinnungszeit verwendet.

Fuld⁵ bestimmt den Zeitpunkt der Gerinnung des Blutes in der Weise, dass er eine Metallkugel durch eine Blutschicht hin- und herschleudert, und feststellt, wann die Bewegung der Kugel durch das (gerinnende) Blut gehemmt wird.

Wöhlisch⁶ misst als Gerinnungspunkt denjenigen Zeitpunkt, bei welchem einige Blutropfen auf einer geneigten, schwach konkaven Unterlage nicht mehr fließen bzw. ihre Oberfläche verändern.

2. Nephelometrische Methode.

Ob Eintritt und Fortschreiten der Trübung ein geeignetes Mass für die der Blutgerinnung zugrundeliegende chemische Reaktion ist, müssen erst weitere Untersuchungen zeigen. Kugelmass hat in seinen mehrfach erwähnten Arbeiten sich auch eines einfachen Nephelometers bedient. Die Verwendung des Nephelometers, in welchem die trübe Schicht seitlich belichtet ist (System Rona-Kleinmann), dürfte sich auch hier empfehlen.

¹ Heubner und Rona, *Biochem. Zs* 130, 463; 1922.

² Frisch und Starlinger, *Wien. klin. Wochenschr.* 34, 344; 1924.

³ Couette, *Am. Chim. Phys.* (6) 21, 433; 1890.

⁴ Kugelmass, *Soc. Biol.* 87, 885; 1922.

⁵ Fuld, *Berl. klin. Wochenschr.* 1912, Nr. 28. — Ladenburg, *Ann. d. Physik.*

⁶ Kugelmass, *Arch. intern. de Physiol.* 21, 139 u. zw. 172; 1923. — Wöhlisch und Pieritz, *Zs f. d. ges. exp. Med.* 27, 61; 1922.

Nachträge und Druckfehler.

13. Kapitel. Die hydrolysierenden Enzyme der Nucleinsäuren und ihrer Spaltprodukte.

Zur Kenntnis der Substrate: Steudel, Über den partiellen Abbau der Thymonucleinsäure, H. 154, 116; 1926. — Levene und Mitarb., Über Nucleosidasen. — Levene und Ione Weber, JI Biol. Chem. 60, 693—720; 1924. — Levene und Harry Sobotka, JI Biol. Chem. 65, 463—477; 1925. — Levene und Simms, JI Biol. Chem. 65, 519; 1925. — Wohlgemuth, J. und Klopstock, Nucleotidase in der Haut, Biochem. Zs 153, 487; 1924.

Zur Frage der Uricolyse: Thannhauser, Lurz und P. v. Gara, H. 156, 251; 1926.

14. Kapitel. Urease.

Vorkommen: Im Tierkörper: Luck, Biochem. JI 18, 825; 1924. — Magen-Urease: Luck und Seth, Biochem. JI 19, 365; 1925.

Im Blut: Murray, Biochem. JI 19, 294; 1925.

Leberenzym: Cance, Biochem. JI 19, 134; 1925.

Im Samen von Cucurbitaceen: Saburo Imai (1925).

Nach Versuchen aus diesem Laboratorium (Euler und Brunius, H. im Druck) ist die Wirksamkeit der Urease in einem Ureasepräparat (Arlco-Urease) $U_f = 10 \cdot 10^{-2}$.

Für das von Onodera vermutete Co-Enzym haben wir hier keine Anhaltspunkte gefunden.

Für rohe Urease-Lösungen scheint Tonerdehydrat kein geeignetes Adsorptionsmittel zu sein. Dagegen wurde mit Kaolin bei $pH = 2,7$ eine Adsorption von 80% der gelösten Urease erzielt. Elution gelingt bei $pH = ca. 9$. Dialyse der rohen Enzymlösung führt zu einer Verdreifachung des U_f -Wertes.

Reinigungs- und Darstellungsmethode.

Ein Reinigungsverfahren, das anscheinend sehr effektiv ist, hat J. Sumner (JI Biol. Chem. 69, 435; 1926) beschrieben. Dieser Forscher unterscheidet lösliche und unlösliche Urease (Sumner und Viola A. Graham, Proc. Soc. exp. biol. a. med. 22, 504; 1925); er fasst beide als Proteine auf.

Zur Kinetik: Revoltella, Biochem. Zs 134, 336; 1922.

Über die Temperaturempfindlichkeit der Urease macht Mori Angaben (JI of biophysics 1, 54; 1924).

Zur Methodik: D. D. van Slyke, Proc. Soc. exp. biol. a. med. 22, 486; 1925. — Volumetrische Bestimmung von Harnstoff mit Urease: Gruskin, Jl Lab. Clin. Med. 10, 223; 1924.

15. Kapitel. Amidasen, Arginase und Purinaminasen.

Amidasen:

Asparaginase: A. Clementi und G. Cantamessa (Gaz. chim. ital. 54, 781; 1924), Verlauf der Desamidierung des Asparagins.

Hippuricase: Nach A. Palladin nimmt mit fortschreitender Entwicklung des Skorbut die Fähigkeit des Meerschweinchenorganismus zur Synthese der Hippursäure ab. — T. Shizuaki fand Spaltung von Dibenzoyl-l-Tyrosin und Dibenzoyl-l-Leucin (Chem. Zbl 1926, I, 3240).

Arginase: Die Kenntnis dieses Enzyms ist wesentlich erweitert worden durch eine neue Untersuchung von Edlbacher und Röthler (H. 148, 245 u. 273; 1925), welche die erste Mitteilung (H. 145, 69; 1924) fortsetzt. Für die Bestimmung des aus Kalbsleber dargestellten Enzyms wurde eine neue Methode ausgearbeitet. Kossel und Fr. Curtius (H. 148, 283; 1925) setzten die S. 383 erwähnte Untersuchung von Hino am *B. pyocyaneus* fort. Das nicht gespaltene Arginin wurde als Salz der Flaviansäure gefällt. In allen Fällen, in denen mit sterilen Emulsionen nach Hino gearbeitet wurde, beobachteten die Verfasser nur Spaltung von d-Arginin. In einer Lösung von d,l-Arginin bleiben also 50% als l-Arginin zurück.

16. Kapitel. Di-Peptidasen.

Levene und Simms (Jl Biol. Chem. 61, 445; 1924) untersuchten die Hydrolyse von Peptiden mit Salzsäure bei 100°. Dabei wurde festgestellt, dass drei Reaktionen gleichzeitig verlaufen:

1. Die Spaltung des Dipeptides in Aminosäuren.
2. Die Bildung eines ringförmigen Anhydrides (Diketopiperazinringes).
3. Die Öffnung des Anhydridringes unter Peptidbildung.

Dagegen konnte die direkte Synthese des Peptides aus Aminosäuren vernachlässigt werden. Dies wurde schematisch folgendermassen ausgedrückt:



Mit dieser Wirkung der Salzsäure vergleichen dann Levene und Simms (Jl Biol. Chem. 62, 711; 1925) die Wirkung des Erepsins (der Dipeptidase). Hier verlaufen zwei Reaktionen gleichzeitig: 1. die Hydrolyse, 2. die Anhydridbildung. Unter der Annahme, dass das neutrale Dipeptid die reagierende Molekülart ausmacht, wird die folgende Formel aufgestellt, deren Herleitung im Original nachgesehen werden muss:

$$kt = \ln \frac{(a - B)Z}{(a - B)Z - X} = \ln \frac{A'}{A' - X}.$$

Hier bedeutet: $k = k_1 + k_2$,

k_1 = Reaktionskonstante der Hydrolyse,

k_2 = Reaktionskonstante der Anhydridbildung,

a = Anfangskonzentration des Dipeptids zur Zeit $t = 0$,

B = Äquivalente der anwesenden Base (NaOH),

$$Z = \frac{k_1 - k_2}{k_1 + k_2}, \quad A' = (a - B) Z = (a - B) \frac{k_1 - k_2}{k_1 + k_2}.$$

17. Kapitel. Enzymatische Spaltung von Peptonen usw.

Caseinolytische Wirkung von Erepsin-Präparaten: A. Clementi, Biochem. Zs 136, 71; 1923.

Substrate: Levene und Simms (Jl Biol. Chem. 55, 801; 1923) geben eine Berechnung des isoelektrischen Punktes eines Ampholyten mit beliebig vielen sauren und basischen Gruppen

$$I = \sqrt{\frac{\sum K_a}{\sum K_b}} \cdot K_w$$

Die Bezeichnungen und die Form des Ausdrucks entsprechen der Formel von Michaelis (vergl. I. Teil, 3. Aufl., S. 35).

Methoden zur Bestimmung der Peptid- und Peptonspaltung.

Interferometrische Methode: E. Kaufmann, Biochem. Zs 177, 206; 1926.

18. Kapitel. Tryptase.

Giftwirkung des Chinins: Smorodinzew und Adowa, Biochem. Zs 135, 128; 1924.

Elektrodialyse: Fricke u. Mitarb. Koll. Zs 39, 152; 1926.

21. Kapitel. Autolyse von Organen.

Aktivierung der Leber-Autolyse durch Jod: Steppuhn, Biochem. Zs 174, 84; 1925.

Spezifität des Serum-Trypsins: Fuchs, Biochem. Zs 175, 201; 1926.

Methoden zur Bestimmung der Eiweisspaltung: Rona und Kleinmann, Nephelometrische Untersuchungen über fermentative Eiweisspaltung, Biochem. Zs 169, 320; 1925.

23. Kapitel. Bakterienproteasen.

Untersuchungen über Milchsäurebakterien: Siehe Barthel, Medd. Centralanst. landw. Versuchswesen, Stockholm, 1914—1926.

Druckfehler.

Seite 335 Anmerkung 5 steht Steppuin statt Steppuhn.

Seite 335 Anmerkung 7 steht Me Cance statt Mc Cance.

Seite 342 Anmerkung 1 steht Sunner statt Sumner.

Seite 372 Zeile 18 von oben steht Wishard statt Wishart.

Seite 379 Anmerkung 3 steht Linhard statt Linhardt.

Seite 388 Anmerkung 4 steht Savarè statt Savaré.

Seite 456 Zeile 19 von oben steht Henriquez statt Henriques.

Verzeichnis der hydrolytischen (und koagulierenden) Enzyme und ihrer spezifischen Aktivatoren und Hemmkörper.

- Amidasen** 375.
Aminoacylase 379.
Aminosäuren, biologische Spaltung 386.
Amylasen 83.
 — pflanzliche 110.
 — tierische 88.
Ananas-Protease 552.
Antilab 592.
Anti-Saccharase 203.
Anti-Thrombin 602.
Anti Trypsin 491.
Arginase 381.
Autolytische Enzyme 527.
- Blutgerinnung, Vorgänge bei der,** 596.
Blutproteasen 540.
Bromelin 552.
- Carbamasen** 315.
Carubinase 74.
Cellobiase 269.
Cellulase 66.
Chlorophyllase 48.
Cholesterase 48.
Chymosin 583
Co-Tryptase 467, 497.
Cucurbita-Pepo-Protease 554.
Cytasen (Zytasen) 72.
Cytoxym 597, 599.
- Dextrinasen** 87.
Diastasen, siehe Amylasen 83.
Diastase (Taka) 130.
Dipeptidasen 391.
- Emulsin** 210, 277, 296.
Entero-Kinase 467, 497.
Erepsin, siehe Dipeptidasen 391 und Trypsin.
Esterasen 6.
 — pflanzliche 33.
 — tierische 7.
- β -Fructosidasen** 163.
Fructo-Stachyase 208.
- β -Galaktosidasen** 283.
Gelase 78.
Gentianase 208.
Gentiobiase 274.
 α -Glucosidasen 145.
 β -Glucosidasen 210.
Glycerin-Phosphatase 61.
- Hadromase** 76.
Hämophilie 607.
Hemizellulasen 72.
 α -Hexosidasen 145.
Hippuricase 379.
Histozym 379.
- Inulinase** 76.
Invertin 163.
- Kefir-Lactase** 296.
- Lactase** 284.
 — pflanzliche 286.
 — tierische 285.
Lezitase 46.
Lichenase 73.
Lipasen, siehe Esterasen 6.
- Melibiasi** 294.
Melizitase 209.
Myrosin 301.
Myrosinase 301.
- Nucleosidasen** 315, 316, 329.
Nucleotidasen 59, 316, 325.
- Oxy-nitril-Glucosidasen** 238.
- Papain** 543.
Parachymosine 594.
Pektase 80.
Pektinasen 78.
Pepsin 505.
Peptidasen 391.
Peptonspaltung, enzymatische 428, 432.
Phosphatasen 53.
Phosphatase 56.
Phytase 63.
- Phyto-Saccharasen** 33.
Plasmozym 597, 599.
Poly-Amylasen 87, 88.
Poly-Nucleotidasen 316, 324.
Proteasen 451.
 — Einteilung 458.
 — der carnivoren Pflanzen 561.
 — der höheren Pflanzen 543.
 — der mehrzelligen Tiere 527.
 — der Pilze, Hefen und Bakterien 564.
 — der Samen 557.
 — in Säften und Früchten 556.
Prothrombin 599.
Ptyalin 88.
- Raffinase (= Saccharase)** 204.
Rhamnasen 209.
- Saccharase** 163.
 — der Kryptogamen 170.
 — der Phanerogamen 169.
 — tierische 164.
Saccharo-Phosphatase 58.
Seminase 74.
Serozym 597.
Sinigrinase 300.
Stärke-Phosphatase 59.
- Taka-Diastase** 130.
Tannase 305.
Thrombogen 597, 599.
Thrombokinase 597, 599, 601, 603.
Thromboplast. Substanz 597.
Thrombozym 597.
Trehalase 159.
Trypsin, siehe Tryptase.
Tryptase 459.
- Urease** 315, 334.
- Xylanase** 73.
- Zellulase** 66.
Zymophorer Stoff 436.
Zymophosphatase 53.
Zytasen 72.

Autoren-Verzeichnis für den 1. und 2. Abschnitt.

- Abderhalden**, E. 12, 13, 15, 31,
 44, 199, 286, 326, 330, 387,
 339, 393—397, 400—405, 410
 bis 416, 418, 419, 421, 427
 bis 432, 435, 437—442, 452,
 454, 455, 461, 462, 506—508,
 510, 540, 541, 548, 562, 576.
Abelous 381.
Achalme 493.
Achard 31.
Adametz 290.
Adler 59, 64, 113, 434, 558.
Adolf 514.
Adowa 562, 575 611.
Agulhon 195, 227.
Ahlgren, G. 386.
Allihn 140.
Ambard 104.
Amberg 19, 61, 326, 331, 386.
Ambros 456, 547, 549, 550, 552
 bis 554, 575.
Anderson, J. Arlington 331.
Andriik 331.
Anger, Gerda 231, 253.
Annett 336—338, 556.
Araki 326.
Arinkin 328.
Armstrong, E. F. 145, 147,
 151, 156, 157, 163, 205, 206,
 211, 214, 219—221, 230, 239,
 246, 252, 267, 276, 282—284,
 286—296, 334, 335.
Armstrong, H. E. 28, 33, 34,
 36, 145, 163, 205—207, 211,
 214, 219, 221, 223, 232, 239,
 246, 250—252, 256, 267, 286,
 288, 289, 339, 342, 348, 349,
 353, 354, 357, 359, 371, 372.
Arnheim 409.
Aron 461.
Arrhenius 12, 232, 477, 478,
 513, 515, 520, 523.
Arthus 31, 588, 589, 596.
Asarnoj 127, 198.
Ascoli 108, 110, 124, 460, 533.
Astruc 522.
Aszódi 371.
Atkinson, H. V. 15.
Atzler 601.
Aubry 148, 150, 219, 273, 296.
Auerbach 167.
Auld 161, 163, 226, 241, 242,
 244—249, 250—267, 276.
Austin 602.
Avery 78, 132, 198, 572.
Axenfeld 164.

Bach 32, 189.
Bach, A. 27, 46, 390.
Bäckström 55.
Baginski 548.
Bahlmann 372.
Bailey 556.
Bainbridge 106, 107.
Baker 117, 128.
Baldwin 100, 103, 113, 129.
Bamberger, M. 338.
des Bancel, L. 476, 477, 479.
Bang, J. 92, 106, 109, 140, 185,
 320, 449, 583, 588, 593.
Baraja 30.
Barendrecht 290—292, 340, 343,
 344, 348, 350, 355—357, 360,
 363, 364, 372.
Barfoed 297.
Barkan, G. 384.
Barral 109.
Barthel, Chr. 68, 337, 540, 611.
de Bary 76.
Basch 542.
Basedow 505.
Bass 224.
Bastianelli 165.
Batelli 602.
Battesti 30.
Bau, A. 160—162, 206, 294, 295.
Baumgarten 93, 116.
Baur, E. 14, 17, 387.
Bayer, G. 31.

Bayer, H. 525.
Bayliss 14, 64, 219, 255, 266,
 276, 336, 344, 350, 351, 353,
 363, 432, 443, 467, 472, 473,
 474, 477, 479, 480, 494, 498,
 504, 525, 531.
Béchamp 197.
Beddard 106, 107.
Beensch 219, 277, 283.
Beijerinck 80, 124, 152, 221,
 237, 289, 301, 336, 339.
Beitzke 266.
v. Benzúr 110.
Benedict 78.
Benjamin 348, 354, 359, 371.
Benzur, J. 106, 107.
Berblinger 107.
Berczeller 15, 114, 116.
Berg 221.
Bergel, Fr. 337, 338.
Bergel, S. 47, 48.
Bergell, P. 203, 376, 377, 381,
 433, 440.
Bergman, Stig 86.
Bergmann, Max 235, 236, 269,
 305, 307, 308 455, 462.
Bergtheil 237.
Bernard, Claude 12, 105, 108,
 164, 250.
Bernfeld 434, 435.
Berthelot 6.
Bertrand, G. 80, 81, 89, 140,
 162, 199, 211, 214, 244, 247,
 252, 267, 269, 272, 273, 297,
 298.
Berzelius 88, 583.
Bevan 66.
Bial 108, 109, 152.
Bickel 3.
Biddle 309, 525.
Biedermann 73, 98, 105, 126,
 542.
Biefeld 94.
Bielozerski 434.
Bien 7, 31.

- Bierry 73, 78, 100, 104, 165, 206,
 208, 209, 283—285, 296, 381.
 Biffen 42.
 Billon 47.
 Biltz 122.
 Binet 104.
 Biondi 433, 528.
 Bjerrum 353, 397.
 Blagoveschenski, A. V. 434.
 Blagowestschenski, A. 440.
 Blaizot 606.
 Blanc 571, 572.
 de la Blanchardière 329, 332.
 Blaxall 69.
 Bleibtreu 600, 601, 603, 606,
 607.
 Bliss 490.
 Bloch 189.
 Block 381.
 Blood 434, 543, 544, 547, 548,
 551.
 Bloxam 237.
 Blum 595.
 Blunt 195.
 Boas 127.
 Bodansky 541.
 Bodenstein 22, 23.
 Boehringer 331.
 Boidin 131.
 Boissevain 98.
 Bokorny 226, 301—303.
 Boldyreff 16, 26.
 Bolin, I. 215, 221.
 Bondi 44.
 Bonem 382, 383.
 Bonfanti 108, 110, 124.
 Bonnoure 542.
 Borchers 494.
 Bordet 597, 599, 602, 604.
 Borodin 378.
 Borgenstam 198.
 Borsook 482, 487, 526.
 Boselli 77.
 Bostock 388.
 Botazzi 433.
 Bouchardat 98.
 Bouchut 543, 556.
 Bournot 35, 41.
 Bourquetot 2, 75, 77, 80, 87,
 95, 127, 148, 150, 152, 159,
 160—162, 197, 206, 208, 209,
 211, 212, 216—221, 225, 226,
 230—232, 237—239, 253, 273
 bis 276, 286, 296, 542, 564.
 Boutron 210.
 Braconnot 79.
 Bradley, H. C. 17, 285, 433,
 529, 531, 533, 537, 539.
 Brahm 286, 430.
 Brandting, G. 335, 366, 368.
 Braun 204.
 Brauns 278.
 Braunstein 373, 440.
 Bréaudat 236.
 Bredig 264, 265.
 Bremer 42.
 Bridel 150, 206, 208, 209, 216,
 217, 219, 231, 273, 275, 284,
 286, 292.
 Brill 454.
 Brodie 107.
 Bronfenbrenner 573.
 Brouwer 583.
 Brown, Adrian 359.
 Brown, H. T. 73, 74, 104, 110,
 117, 118, 122, 124, 126, 132,
 165, 169, 267.
 Browne, C. A. jun. 76.
 Brücke 510, 516, 575.
 Brünnich 239.
 Brugsch 26, 47, 376, 377.
 Brunacci 92.
 Brunius 609.
 Buadze 431.
 Buchner, E. 2, 289, 389, 509,
 528, 565, 570.
 Buetow 335, 376.
 Bufalini 556.
 Buglia 16, 92, 101.
 Bull 227.
 Burge 586.
 Burger 88.
 Burian 333.
 Burrows 335, 351, 364.
 Buscaglioni 555.
 Busch 165.
 Busquet 31.
 Bussy 300.
 Butkewitsch 378, 389, 566.
 Bywaters 116.
 Caemmerer, G. 411, 427, 430.
 Caillas 164.
 Caldwell, Mary L. 86, 97, 151,
 162, 205, 214, 239, 242, 267,
 283, 534, 552.
 Calmette 131, 313.
 Campbell 111.
 Camus 26, 31, 41, 308.
 Cance 609.
 Cantamessa 610.
 Carbone 326.
 Carlson, A. J. 89, 108, 109.
 Carnot 341, 369, 370.
 Cash 8.
 Cathcart 491, 535.
 Cecil 602.
 Cekada 607.
 Chanoz 13.
 Chapman 590.
 Charlier 224.
 Charpentier, C. A. G. 68.
 Chauchard 126.
 Chen 539.
 Chibnall 378.
 Chien, Shen 599.
 Chittenden 89, 94, 489, 490,
 552.
 Chodat, R. 390.
 Christiani 88.
 Christiansen, J. 580.
 Chrzaczsz 110, 124, 135.
 Ciamician 232.
 Clark, E. D. 123, 138, 139, 142..
 Clark, Harry 496.
 Clark, Mary E. 169.
 Clayton 69.
 Clementi 47, 333, 378—382,
 384, 403, 404, 419, 431, 433,
 445, 610, 611.
 Clendon 410.
 Clerc 31.
 Clibben 303.
 Cloetta 527.
 Clogne 47.
 Cöster 540.
 Cohn 290.
 Cohn, E. J. 453.
 Cohnheim, Otto 400, 432, 433,
 440, 542.
 Cohnstein 46.
 Coirre 275, 276.
 Cole 187, 395, 396.
 Colette 131.
 Colin, H. 77.
 Collin, H. 169, 206.
 Collingwood 602, 604.
 Collum, Mac 63.
 Compton 162, 244, 272, 273.
 Connstein, W. 7, 15, 34, 36—38,
 41, 43.
 Conradi 537.
 Costy 338, 365, 366.
 Couette 608.
 Court, D. 434.

- Courtauld 162, 214, 239, 242, 267.
 Cramér, H. 196, 198, 203.
 Cremer 131.
 Croftan 108.
 Csányi 212—215, 241, 243, 244, 247, 248, 267, 268, 286, 288.
 Cullen, Glenn E. 30, 132, 198, 340, 341, 359, 360, 362, 365 bis 367, 370, 572.
 Cummins 489.
 Curme 284.
 Curtius, F. 383, 384, 610.
 Curtius, Th. 419, 429.
 Cytronberg 48.
 Czapek 76, 111, 305, 309.
- D**
 Dacomo 556.
 Dakin 13, 27, 30, 264, 381, 382, 384, 387, 388, 395, 397, 536.
 v. Dam 583, 585, 587, 589, 590.
 Dammann 239.
 Dammhahn 405.
 Danilewsky 464.
 Danjou 239.
 Darwin, Ch. 542, 562, 563.
 Dastre 105, 463, 467.
 Dauphinee 383, 384.
 Davidsohn 7, 9, 10, 17, 19, 33, 45, 46, 439, 483, 484, 487, 514.
 Davis, L. H. 98, 119.
 Dean 77, 434.
 Deetjen 401.
 Defresne 87.
 Deist 370.
 Delange 602, 604.
 Delbrück, K. 159, 303.
 van Delden 80.
 Deleano 42, 434.
 Delezenne, C. 16, 467, 488, 496, 503, 540, 550, 551, 564.
 Demant 165.
 Denny 602.
 Derby 399, 405, 406, 409, 410, 413, 414, 416, 418, 433, 528 bis 530, 534, 535, 537—539, 560, 563, 565—573.
 Detmer 136.
 Deutsch 416, 536.
 Dezani 509.
 Dick 85.
 Dienert 294, 295.
 Dieter 378.
- Dietz 14, 22, 23, 43.
 Dixon, M. 390.
 Djenab 58.
 Doblin 493.
 Dobson 169.
 Doby 114, 126, 169.
 Donath 16, 17, 37.
 Donnan 487.
 Dorf Müller 321, 324, 336, 327, 329.
 Dörle 510.
 Downes 195.
 Dox, A. W. 63, 308, 327, 338, 376, 378, 380.
 Doxiades 152.
 Doyon 13, 31, 527, 597.
 Driessen, J. H. 35.
 Dubois 562.
 Dubosc, A. 34.
 Dubourg 131.
 Duclaux 2, 127, 197, 290, 565.
 Dudley 388.
 Dunlop 35.
 Dunstan 239, 251, 252, 267.
 Dzierzowski 30.
- E**
 Ebrill 279.
 Ebsen, J. 32.
 Edie 490.
 Edlbacher, 382, 383, 384, 482, 610.
 Efront 75, 93, 114, 119, 125, 127, 198, 375, 378, 388, 561.
 Ege 508, 510, 524, 578.
 Ehrenreich 179, 460, 510.
 Ehrlich, F. 79, 389, 390, 394.
 Eissler 84, 86.
 van Ekenstein 214, 277.
 Eliasberg 197.
 Ellenberger 71, 88.
 Ellinger 395.
 Ellinghaus 449, 574, 581.
 Elmer 557.
 Elvove 21, 27—29.
 Embden 65.
 Emberg 197.
 Emmerling 195, 243, 276, 339, 390, 548.
 Engel 15, 21, 44.
 Epstein, Chasuva 436.
 Erbacher 423.
 Ericson, G. 182, 185.
 Eriksson, A. 179.
 Erlenmeyer 164.
- Ernström, E. 90, 91, 95—97, 103, 113, 114, 125.
 v. Euler, B. 54, 55, 196.
 Evans, C. L. 94, 137.
 Everest 234.
 Eves 105.
 Eyre 250, 251.
- F**
 Färber 211, 226, 241, 301.
 Fajans 264, 266.
 Falck, R. 75.
 Fales 186.
 Falk, K. G. 7, 18, 26, 33—38, 62, 336, 348.
 Falk, Mary 345, 369.
 Falloise 8, 432.
 Falta 116.
 Fanto 44, 45.
 Faurholt 333, 372, 373.
 Fawsitt 334, 351.
 Fearon, W. R. 335, 352, 373, 389.
 Feist 256, 261.
 Felix 381, 382, 506, 516.
 v. Fellenberg 79, 164.
 Fenger 15.
 Fenton 353.
 Fermi 132, 198, 227, 555, 579.
 Fernbach 113, 124, 127, 195 bis 197, 306, 309, 557, 558, 561.
 Feulgen 319, 321, 323, 325, 333.
 Fichtenholz 221, 230.
 Fick 309.
 Fiessinger 47, 48.
 Fischer, E. 59, 108, 145—147, 150—153, 159—163, 165, 206, 209, 214, 215, 218—223, 227, 233—239, 245, 251, 253, 264, 269, 272—274, 276—285, 289 bis 291, 294—296, 302, 303, 305, 307, 308, 312, 325, 330, 381, 392—394, 397—400, 420, 421, 429, 431, 439, 451—454, 528.
 Fischer, E. A. 494, 557.
 Fischer, Hans 320, 387, 402.
 Fischer, Hermann 307.
 Fiske, C. H. 265, 370, 372, 376.
 Fleig 606.
 Flohl 140.
 Flohr 20.
 Floresco 98.
 Foà 285, 332, 497, 604.

- Focke, Fr. 599.
 Fodor, E. 114, 116, 410, 411,
 412, 414, 415, 418, 419, 428,
 429, 434, 435, 436, 438, 439,
 440, 484.
 v. Fodor, K. 274.
 Fokin 17, 35.
 Folin 345, 354, 366, 370, 371,
 372, 449, 581.
 Folpmers 390.
 Fosse 337, 338, 353, 364, 371,
 373, 374.
 Foster 109.
 Fränkel 124.
 Frätznick 386.
 Franca 562, 563.
 Francis 136.
 Franck, H. H. 7.
 Franke 140.
 Frankel, E. M. 405, 548, 549.
 Franz, Fr. 603.
 Frédéricq 105.
 Frémy 79, 80.
 Freudenberg, K. 27, 30, 31,
 45, 270, 305—313, 392.
 v. Freudenreich 290, 591.
 Fricke 494, 604, 611.
 Fricker 91.
 Friedel 510.
 Friedemann 20.
 Friedmann, J. C. 402.
 Friedmann, M. 377, 378.
 v. Friedrichs 270.
 Frisch 608.
 Fromherz 387.
 Fromme 8, 9.
 Frouin 26, 104, 165, 224, 250,
 467.
 Fuchs, B. 382.
 Fuchs, H. J. 611.
 v. Fürth 16, 17, 377, 378, 491.
 Fuhrmann 42, 132, 198.
 Fuld 578, 590—592, 595, 596,
 597, 608.
 Funk, Cas. 466.
 Funke 54.

 Gabbe, 588, 590, 595.
 Gadamer 300—302.
 Gamgee 17.
 v. Gara 609.
 Garard 99.
 Gardiner 74.
 Garnier 42.
 Gatin 72, 84.

 Gaunt 237.
 Gayon 131.
 Geduld 152.
 Geerligs, Prinsen 131.
 van Geertruyden-Bernard, M.
 603.
 Gérard 41, 211, 224, 341, 369,
 370.
 Gerber 35, 114, 556, 587, 590.
 Geret 327, 434, 565, 570.
 Gerock 221.
 Geselschab 370.
 Geslin 77.
 Gessard 604.
 Gettler 99, 112.
 Giaja 73, 78, 100, 161, 162,
 206, 224, 250, 284, 285.
 Gigon 114.
 Gillet 33.
 Gillot 206.
 v. Gilson 307.
 Gjaldbæk, J. K. 424, 425, 440,
 456, 482, 507, 525, 580.
 Glaessner 285, 467, 578, 595.
 Glaubach 431.
 Glendinning 117, 118, 122.
 Glenn 78.
 Gley 160.
 Glimm 122, 125.
 Glinski 134.
 Glover 205, 207, 214.
 Goebel 116, 562.
 Goette 47.
 Gompel 206, 224.
 Gonnermann 224, 226, 376.
 Goodman 326.
 Goodwin 269.
 Gorini 539, 572.
 Goris 221, 338, 365, 366.
 v. Gorup-Besanez 557, 562, 575.
 Gosney 36.
 Goto 431, 506.
 Gottlieb 384.
 Gottschalk 449, 574, 581.
 Gould 108.
 Goyaud 80.
 Graber 549.
 Grafe 76.
 Graham, Viola A. 342, 609.
 Gramenitzky 130.
 Gran 78.
 Graser 339.
 Grassmann 405, 408, 415, 423,
 426, 456, 457, 544—554, 567
 bis 570, 575.

 Gratia 602, 604.
 Graves, S. S. 332.
 Green, J. Reynolds 33, 36, 66,
 74, 77, 110, 111, 126, 556,
 557, 561.
 Greenbank 396.
 Greshoff 253.
 Griffin 179.
 Grigaut 372.
 Grigorjew 566, 570.
 Grimmer 540.
 Grisson 224.
 Grober 522.
 Groll, J. Temminck 16, 91, 92,
 336, 340, 344, 366.
 Gromow 566, 570.
 Gross, A. 103.
 Gross, Eberh. 384.
 Gross, O. 8, 66, 578.
 Grosser 61—63.
 Grünert, 104, 165.
 Grütznern 17, 88, 98, 100, 104,
 575.
 Gruskin 374, 610.
 Grutterink, B. W. 575, 576.
 Gruzewska 84.
 Guérin 372.
 Guignard 211, 239, 250, 302,
 303.
 Guldberg 6.
 Gulewitsch 395.
 Guyemant 517.
 György 32, 335, 343—345, 349.

 van der Haar, A. W. 297.
 Haen 390, 570, 571.
 Hahn, Amandus 89, 90, 113,
 114, 384, 385, 389.
 Hahn, Arnold 341, 370, 371.
 Hahn, Martin 285, 327, 434,
 565, 570.
 Hairs 251.
 Hall, J. W. 401, 402.
 Halliburton 107.
 Hämäläinen, J. 235.
 Hambly 335, 351.
 Hamburg 124.
 Hamburger, K. 98, 124,
 152.
 Hamburger, H. J. 46, 285, 467,
 468, 502.
 Hamburger, W. W. 402, 404.
 Hamlin 7.
 Hammarsten, E. 318, 325.

- Hammarsten, O. 90, 97, 317,
 509, 583, 584, 585, 586, 591,
 595—598, 600, 606.
 Hammett 384.
 Hamsik 15, 16, 18, 25, 30.
 Handovsky 431, 438.
 Haneborg 522.
 Hanriot 31, 32.
 Hansen, A. 556, 562.
 Hansen, E. Chr. 152, 197.
 Hansteen, B. 73.
 Harden 53—57, 131, 345.
 Harding 54, 55, 206.
 Harlay 211.
 Harpuder 90, 113.
 Harriot 308.
 Harris 399, 446.
 Harrison 276.
 Hart 63.
 Harteneck, A. 407—409, 415,
 421, 423, 426, 456, 458, 459,
 468.
 Hasenöhr 308.
 Hata 93, 348, 489, 521, 533.
 Hawkins 198.
 Haworth 85, 151, 163, 269,
 284, 294.
 Haycraft, J. B. 603.
 Hayden, C. E. 88.
 Haynes, Dorothy 32.
 Hazewinkel 237.
 Hebert 249.
 Heckel 394.
 Hedelius 177.
 Hedin 416, 433, 438—440, 461,
 463, 464, 473, 491, 492, 508,
 528, 534—538, 540, 578, 587,
 591, 592.
 Heidenhain 466, 496.
 Heilner 541.
 Heinricher 302.
 Heinsheimer 8.
 Heinze 127, 290.
 Hekma 285, 467, 468, 502, 503,
 583, 598, 599.
 Helferich 215, 220, 222, 226,
 227, 229, 230, 232, 236, 237,
 330.
 Helleberg 564.
 Heller, F. 71.
 Hemptinne 6.
 Hendry 453.
 Henneberg 131.
 Henri, V. 101, 102, 118, 228
 bis 230, 443, 476, 477, 479.
 Henriques, V. 424, 425, 440,
 456, 4*2, 507, 525, 580.
 Henry 226, 239, 241, 246, 251,
 252, 267, 276.
 Henze 395.
 Hepburn 30.
 Herborn 280.
 d'Herelle 573.
 Hérissé 75, 80, 160, 162, 206,
 208, 209, 211, 212, 214, 216,
 221, 225, 226, 231, 237—239,
 250, 253, 274—277, 286, 564.
 Heron 104, 165.
 v. Herwerden 327.
 Herzfeld 199, 463.
 Herzig 307.
 Herzog, R. O. 86, 156, 157,
 228, 454, 455, 462, 513, 518,
 519.
 v. Hess 31.
 Hess, Leo 224, 403.
 Heubner 64, 349, 598, 608.
 Heut, G. 211, 225, 253.
 Hewlett 13, 33.
 Higuchi 224.
 Hildebrandt 235, 540.
 Hill, Croft 153, 154, 276.
 Hino 333, 610.
 Hippus 33.
 Hirata 98, 107, 109.
 Hirsch, E. H. 443, 604.
 Hirschberger 75.
 Hiruma, K. 597, 606.
 Hjort 564.
 Hocheder 52.
 Hoefft 84.
 van't Hoff 6, 219, 231, 232,
 398.
 Hofmeister 88, 432.
 Hofrén-Lagerberg, G. 409.
 Holderer 269, 272, 273.
 Holm 396.
 Holmgren B. 340, 342.
 Hooker 561.
 Hopkins, F. G. 395, 396, 453.
 Hoppert 379.
 Hoppe-Seyler 68, 105, 542.
 Hoppfe 71.
 Horne 606.
 Horowitz 339.
 Horton 163, 211, 214, 219, 221,
 2*3, 232, 239, 246, 252, 256,
 267, 286, 288, 289, 334, 339,
 348, 353, 354, 359, 371.
 Hosaeus 131.
 Hoshi 564.
 Howell, W. H. 597, 600, 601,
 602, 603, 604, 607.
 Hoyer 34, 36—38, 41, 43.
 Huber 211.
 Hubert 557, 558, 561.
 Hudson, C. S. 151, 159, 171,
 172, 174, 182, 190—192, 200,
 206, 228, 278, 280, 284.
 Huerre 152.
 Hug 51, 52.
 Hughes, Griffith 543, 551.
 Huiskamp 598.
 Hull, Mary 15.
 Hunter 383, 384, 403.
 Huppert 531.
 Hurwitz 117.
 Husler 61.
 Huss 42.
 Hussey 461, 492, 496.
 Hutchinson 69.
 Ibrahim 8, 26, 285.
 Imai, S. 609, 610.
 Imai, T. 419.
 Imhäuser 333.
 Inouye 9.
 Irvine 77, 85, 110, 169.
 van Italie 253.
 van Iterson, C. jun. 66, 67, 71.
 Iwanoff, L. 54, 55, 327, 434.
 Iwanoff, N. N. 333, 351, 395,
 441, 566.
 Iwanow, Serg. 40, 41.
 Izar 45, 533.
 Jacobs 60, 279, 320, 322, 323,
 329, 330.
 Jacobsen, K. A. 390.
 Jacobson, J. 93, 189.
 Jacoby, M. 335, 341, 344, 345,
 348, 349, 351, 363, 365, 369,
 372, 380, 433, 510, 539, 577.
 Jacquemart 371.
 Jäggi 394.
 Jaffé 395.
 Jalander 35, 36, 43.
 Jamada 195.
 Jancke 86.
 Jansen 340, 440.
 Jastrowitz 328.
 Jawein 88.
 Jegorow 63.

- Jensen 42.
 Jensen-Carlen 330.
 Jessen-Hansen 444, 445.
 Jewell 73.
 Jochmann 493, 539.
 Jodlbaur 195.
 Jörgensen, A. 291.
 Johannesohn 490, 522.
 Johansson, D. 54, 55, 196.
 Johansson, J. E. 70.
 John 91.
 Johnson 136, 137.
 Johnston 21, 27—29.
 Jona 164.
 Jones, L. R. 80.
 Jones, W. 61, 320, 321, 323,
 325, 326, 328, 331, 385, 386,
 537.
 de Jong 252.
 Jorissen 251.
 Jorpes 325.
 Josephson, K. 159, 171, 185,
 203, 342, 400, 406, 408, 409,
 413, 416, 418, 419, 429, 459.
 Joubert 339.
 Junkersdorf 140.
 Juschtschenko 27, 30, 326.

 Kahn-Marino 501.
 Kämmerer 526.
 Kalaboukoff 20, 26, 47.
 Kalanthur 160.
 Kanitz, 15, 18, 20, 21, 43, 399.
 Kantorowicz 493.
 Karczag 61.
 Karrer 66, 77, 84—87, 117,
 159, 223, 269—271, 276, 392,
 394.
 Kasarnowski 157.
 Kaschiwabara 534.
 Kastle 19, 21, 22, 24, 25, 27
 bis 29, 43, 169.
 Kato Kan 338.
 Katô, N. 344, 345, 368.
 Kaufmann 489, 490.
 Kaufmann, E. 611.
 Kawahara, M. 581.
 Kay, H. D. 341, 352, 353, 365,
 374.
 Kean 76.
 Kellermann 76.
 Kelley 309.
 Kellner 130.
 Kendall 100, 102, 103, 123,
 138, 139, 142.

 Kende 93.
 Kerner 105.
 Kiesel 336—339, 363, 372, 378,
 383.
 Kikawa 522.
 Kikkoji 327, 338, 534, 564.
 Kilian 108, 109.
 King 108.
 Kirchhoff 110.
 Kisch 107.
 Kito 108.
 Kjeldahl 114, 116, 117, 194,
 493, 578.
 Klason, P. 226.
 Klebs 226.
 Kleinmann 65, 512, 513, 518
 bis 520, 579, 608, 611.
 Klempin 119, 125.
 Klinger 199, 463.
 Klöcker 128, 153, 170.
 Klopstock 609.
 v. Knaffl-Lenz, E. 166, 199,
 204, 313.
 Knauthe 72.
 Knoop 387, 390, 395.
 Knorr 282.
 Knudson, Lewis 310.
 Kobel 454.
 Kober 332.
 Kobert 224, 225.
 Kobzarenko 404, 433, 440.
 Koch, A. 131.
 Koch, H. 402.
 Kochmann 344.
 Koelker, A. H. 402, 404, 405,
 406, 411, 416, 437, 438, 442,
 569.
 König 269, 593.
 Königs 283.
 Körner 300.
 Kohnstamm 72.
 Kolbach 140.
 Kondo, Kenro 48.
 Kopec 8.
 Korentschewsky 101.
 Korowin 88.
 Kossel 317, 319, 332, 381—383,
 384, 395—397, 453, 457, 506,
 528, 610.
 Kossmann 127, 198.
 Kossowicz 302, 338, 380.
 Kostytschew 197.
 Kotake, Y. 390.
 Kotschneff, Nina 329.
 Kozai 131.

 Kratschmer 106.
 Krauch 221.
 Krause 326.
 Krauss 40.
 Kraut 423.
 Kriebler, Vernon K. 242, 253,
 255, 257, 262.
 Kröber 153, 156.
 Krogh 70.
 Kroulik 69.
 Krüger, Friedr. 165.
 Krüger, Martin 330.
 Krukenberg, A. 89, 105.
 Kruse, V. 132, 198, 380.
 Kudo 488.
 Kübel 91, 93.
 v. Kühlewein 237.
 Kühne 459, 466.
 Külz 87.
 Küttner 16, 20.
 Kugelmass 550, 599, 605—608.
 Kuhn 155, 177, 204, 205, 207,
 208.
 Kullberg 53—57, 173, 174, 202.
 Kumagawa 267.
 Kunze 301.
 Kuriyama, S. 105, 108, 206.
 Kurono, K. 378, 389.
 Kusumoto 152, 224.
 Kutscher 434, 537.
 Kuwashima 605.
 Kylin 79.

 La Barre 604, 605, 607.
 Labberté 363.
 Laborde 127.
 Lachmann 209, 296.
 Ladenburg 135, 608.
 van Laer, H. 120, 122, 125.
 van Laer, M. H. 120, 225, 241.
 Lafar 80, 290, 294.
 Lalou 229.
 La Mer 99.
 Lampe 31.
 Landergren, S. 187, 189.
 Landsiedl 338.
 Landsteiner 491, 493.
 Lang, Lina 77.
 Lang, S. 388.
 Langer, H. 116.
 Langhans 84.
 Langstein 285.
 Lapidus 93, 101.
 Lappe 285.

- Lapworth 253.
 Laqueur 8, 16, 534, 588, 593, 595.
 Lattes 326, 428.
 Launay 89.
 Laurin 171, 192, 193, 194.
 Law 163.
 Lawrow 526.
 Laxa 42.
 Lea 97, 341.
 Leathes 535.
 v. d. Leck 226.
 Lees 252.
 Lefèvre 206, 606.
 Légrand 297.
 Lehmann 165.
 Leitch 85, 151, 284, 294.
 Leonard, V. N. 386.
 Lépine 109, 110.
 Lepkovsky 72.
 Lesser 105, 106.
 Leube 165, 339.
 Leuchs 88, 394, 398, 429.
 Levene, A. 59—61, 237, 279, 280, 316, 317, 319—325, 329—331, 333, 389, 394, 411, 416, 441, 461, 506, 526, 530, 535, 604, 609—611.
 Levison 578.
 Lewis, D. S. 109.
 Lewis, G. N. 335, 364.
 Lewis, H. B. 73.
 Lewis, R. C. 78.
 Lewkowitsch 261.
 Liebig, J. 162, 210, 371, 583.
 Liepmann 433.
 Lillienfeld 319.
 Limbosch 96, 97, 100.
 Lindemann 109.
 Lindner 78, 132, 153, 160, 204, 206, 294, 295, 569.
 Ling 117, 119, 140, 141.
 Linhardt 379.
 Lintner 64, 83, 111, 116, 139, 141, 156.
 Lintwarew 104.
 Lintzel 385, 389.
 v. Lippmann 2, 284, 300, 331.
 Lisbonne 496.
 Litmanowicz 88.
 Ljungdahl, Malte 372.
 Lockemann 539.
 Loeb, J. 514, 516.
 Loeb, Leo 602.
- Löb, Walter 92.
 Löhlein 577.
 Loevenhart 10, 13, 14, 16, 17, 19, 22, 24—29.
 Lövgren 340, 342, 343, 345—347, 357—359, 361, 363, 366, 372.
 Loew, O. 116, 490.
 Loewenherz 6.
 Löwy 33.
 Lohmann 301, 302.
 Lohrisch 70.
 Lombroso, Ugo 13, 47, 428.
 London 8, 61, 326, 521.
 Long, E. R. 386.
 Long, J. H. 15.
 v. Lookeren-Campagne 236.
 Lorrain 48.
 Lossen, J. 607.
 Lowartz 97, 105.
 Lowry 217.
 Lublin, A. 335, 369.
 Luck 335, 369, 378, 609.
 Luckhardt 108, 109.
 Ludwig 231.
 Lüdecke 61.
 Lüdy 13.
 Lüers 144, 396.
 v. Luetzelburg 562.
 Luger 93, 116.
 Lumia 35.
 Lundin 558—560.
 Lurz 609.
 Lussana 403.
- Macht** 189.
 Mac Lean 597, 604.
 Mack, E. 335, 352, 353, 364, 373, 374.
 Macleod 105, 108.
 Mac Mahon 602, 604.
 Madsen, Th. 579, 593.
 Maeda 433.
 Maestrini 211, 241.
 Magnus 16, 19, 28.
 Malfitano 84, 564.
 Mallèvre 80, 81.
 Manasse 381.
 Mandel 320, 321.
 Manning 165.
 Mansini 165.
 Manwaring 401.
 Maquenne 83, 128, 269.
 Marcano 556.
 Marcet 8.
- Marckwald 264.
 Margolis 518, 519.
 Marshall 76, 336, 340, 342, 349, 350, 359, 362, 370—372, 379.
 Marstone 463, 510.
 Martin 543.
 Martini 227.
 Marui 589, 593.
 Masai 433, 439, 440, 578.
 Maseré 221.
 Mason 109.
 Mastbaum 35.
 Masuda 47.
 Maszewski 94.
 Mateer 336.
 Mathews 395, 506, 508, 598.
 Mattaar 364.
 Matthes 527.
 Mauban 44.
 Mayer, P. 8, 47.
 Mays, K. 426.
 Mazoné 126.
 Mc Beth 69.
 Mc Cance 335, 390.
 Mc Fayen 69.
 Mc Guigan 94.
 Mc Kenzie 264.
 Mc Lester 401.
 Medigreceanu 59, 60, 230, 316, 319, 404.
 Meisenheimer 2, 170, 289.
 Melin 564.
 Mellanby, J. 15, 467, 488, 600, 601, 603.
 Meloy 27, 31.
 Mendel 89, 104, 105, 107, 165, 206, 386, 543, 544, 547, 548, 551.
 Mendelsohn 514, 516, 519, 589.
 Menten 186.
 v. Mehring 87.
 Mesterzat 88.
 Mett 574, 575, 585.
 ter Meulen 237.
 Meunier 577.
 Meyer 235.
 Meyer, Georg 384.
 Meyer, G. M. 389.
 Meyer, Hermann 196.
 Meyer, Kurt 493.
 Meyer, Otto 508.
 Meyerhof 177,
 Michaelis 9, 10, 30, 31, 32, 45, 46, 89, 90, 100, 113, 137, 145, 148, 149, 155, 157, 170, 173,

- 175, 177, 179, 185, 186, 187,
191, 439, 483, 484, 487, 510,
514, 515, 516, 519, 524, 525,
578, 589, 593, 594, 611.
- Michalik 89.
Miescher 316, 318, 397.
Mihara 224, 326, 383.
Miller 267.
Mills 598.
Minami 18, 19, 20, 92, 101.
Minkowski 224.
Minot 602.
Miquel 339, 341.
Mislowitzer 433, 444, 531, 532,
533.
Mitchel 386.
Mito, T. 406.
Miura 165.
Miyoshi 76.
Mörner, K. A. H. 371, 373.
Moissonier 341, 369, 370.
Moll 341, 354, 365, 369.
Molnár 42.
Mom 336.
Momferatos-Floros 328.
Montesano 198.
Moore 239, 252.
Morawitz 596, 597, 599, 600,
602—604, 607.
Morel 13, 31.
Morell, J. A. 383.
Morgenroth 592.
Mori 130, 609.
Moriggia 239.
Morinaka 381, 382.
Moritz 73, 105, 542.
Morren 562.
Morris 73, 74, 110, 117, 124,
126, 132, 169, 267.
Morse 535.
Moschkoff 84.
Moseley 590.
Moneyrat 394.
Mouton 551, 564.
Müller, E. 72, 88.
Müller, Ed. 134.
Müller, Fr. 47.
Muenck 337.
Muir 48.
Murray 609.
Musculus 87, 333, 341.
Mussi 556.
Mutch 380, 381.
Myers 108, 109, 410.
- Myrbäck IV, 86, 168, 177, 179,
185, 186, 188, 189, 191, 193,
469, 480, 503, 547.
- Nägeli 85—87, 117, 188, 223.
Näslund 565.
Nagano 104, 153, 165.
Nagaoka 130.
Nakagawa 318, 319, 325, 336,
345, 367.
Nakawa 324.
Nakayama 326, 433.
Nakazawa, R. 131.
Nasse 100, 107.
Nawiasky 378.
Negelein 388.
Neideck 380.
Neilson 91.
Neimann 235.
Nelson, J. M. 7, 34, 37, 179,
186.
Nelson, R. A. 15, 84.
Némec 62, 338, 372.
Nencki 13, 14, 17, 509.
Neppi 460.
Nernst 22.
Neubauer, O. 64, 387, 402.
Neuberg IV, 20, 47, 58, 59,
61, 63, 79, 204, 207, 209,
211, 226, 235, 241, 266, 296,
301, 320, 327, 328, 331, 379,
380, 381, 394, 403, 506, 584.
Neumann, R. 64, 345.
Neumeister 557.
Neuschlosz 187.
Newcombe 70, 74, 76.
Nicloux 26, 35, 36, 38—41, 374.
Niesel 108, 145, 147, 152, 160,
165, 206, 239, 283, 285.
Nilsson, R. 493.
Nishimura 130.
Noguchi 379, 380.
Nolf 540, 597, 598, 601, 602.
Nordefeldt 212, 214, 242, 253
bis 263.
Nordlund, F. 57.
Norris 89, 90, 98.
Northrop 84, 186, 443, 461, 471,
472, 474—476, 478, 480—482,
484—487, 492, 494—496, 511,
512, 515—520, 523—525, 555,
581, 592.
Novy 490.
Nowak 396.
- Odén, Sven 82.
Oertel 506, 584.
Ohlsén 57.
Ohta 214, 266.
Okada, S. 565.
Oker-Blom 527.
Okey, Ruth 77.
Okubo 541.
Okuda, Y. 326.
Olsen 47.
Olsson, U. 90, 92, 93, 114, 115,
124, 135, 187, 332.
Omelianski 69.
Omi 224.
Onodera 341, 344—346, 348
bis 350, 366—368, 609.
Oosthuizen 169, 211.
Opie 539.
Oppenheimer, C. 2, 88, 300, 456,
459, 461, 541, 583—585, 596.
Oppenheimer, G. 154, 156, 158,
203, 290—293, 298, 299, 310.
Oppler 401.
Ormerod 28, 33, 34, 36.
Osborne 111, 214, 394.
Oshima, K. 127—129, 140, 508,
564, 572.
Ossi 239.
Ostwald, Wi. 582, 608.
Ostwald, Wo. 516.
O'Sullivan, C. 163, 171, 173,
190, 194, 199, 200, 202.
O'Sullivan, J. 169.
Ottenstein, B. 321, 330.
- Page 64.
Pagenstecher 26, 30.
Pagès 588, 589, 596.
Paine, H. S. 55, 131, 171,
190—192, 228.
Palitzsch 560, 579.
Palladin, A. 380, 557, 610.
Palmer, C. C. 88.
Palmer, L. S. 593.
Pantanelli 191, 556.
Pantz 206.
Panzer 109.
Pappenheim 459.
Parastschuk 505, 585.
Pariset 109.
Partos 371.
Partridge 385.
Paschkis 603.
Pasteur 335, 339, 565.

- Pastore 90.
 Patten 93, 396.
 Patterson 374.
 Pauletig, Marius 86.
 Pauly 333.
 Pavy 105—107, 267, 276.
 Pawlow 8, 9, 13, 134, 413,
 467, 501, 505, 508, 585.
 Payen 79, 110.
 Péan de Saint Gilles 6.
 Pearce 105, 108.
 Pechstein 89, 90, 113, 137.
 Peczenik 581.
 Peirce 10, 16, 19, 27, 29, 30.
 Peiser 324.
 Pökelharing 15, 16, 18, 508,
 509, 514.
 Pennington 30, 539.
 Pepper 602.
 Peratoner 274.
 Pernossi 227.
 Persiel 469, 473, 479, 491, 522.
 Persoz 110.
 Perutz 598.
 v. Pesthy 8, 14, 44.
 Petersen, H. 164.
 Petow 349.
 Petrow, G. G. 378.
 Pettersson, Erik 506.
 Pfaltz 411.
 Pfandler 434.
 Pfeiffer, H. 381, 401, 402, 433,
 496.
 Pfüger 140.
 Philoche, Ch. 101, 102, 119, 129.
 Pick 105, 106, 108, 167.
 Pieper 431.
 Pieritz 608.
 Piéron 164.
 Pierozek 135.
 Pighini 327, 328, 331.
 Pincussen 326, 328, 368, 489.
 Pincussohn 404, 411, 427, 489.
 Pin, Yin Yi 335, 336, 339, 341.
 v. Planta 208.
 Plenge 327.
 Plesch 440.
 Pletnew 433.
 Plimmer 54, 55, 61—64, 285,
 317, 336.
 Pollak 58, 59, 134, 460.
 Pomomarew 505.
 Poppe 489, 521.
 Porcher 26, 272, 285.
 Porter, A. E. 27, 31, 48.
 Portier 285.
 Posternak 63.
 Pottevin 14, 18, 22, 24, 25—26,
 119, 124, 214, 226, 283, 306,
 308, 309.
 Power 239, 252.
 Pozerski 93, 100, 540, 550,
 551, 571, 572.
 Pregl 65, 104.
 Prentiss 453.
 Preti 100.
 Pribram 33.
 Pringle 397, 506.
 Pringsheim, H. 67—69, 72, 76,
 77, 84, 85, 86, 87, 127, 133,
 206, 271—273, 290, 295, 389,
 405, 441.
 Prjanischnikow 378, 395, 441
 Procter 221.
 Pugliese 107.
 Punnet 128, 129, 138.
 Purdie 279.
 Puriewitsch 253.
 Purkinje 459.
 Rachford 13, 16, 17.
 Racke 170, 172, 173, 174, 177,
 178, 179, 182, 183, 185, 191,
 197, 201—203.
 Rahn 232.
 Rakoczy 508, 526, 586.
 Rakusin 510.
 Ramond 27.
 Ranc 381.
 Raper, H. S. 390.
 Raske 235.
 Rasmussen 607.
 Raubitschek 440.
 Ravenna 232.
 Read 323.
 Réaumur 505.
 Rees 562.
 Reh 326.
 Reicher 6, 20, 47.
 Reinitzer 74, 124.
 Reiser 339.
 Reiss 74, 75.
 Renaud 522.
 Resch 604.
 Rettger 607.
 Revoltella 341, 367, 369, 609.
 Reychler 126.
 Rhodin 537.
 Riabouschinsky 521.
 Ribaut 381.
 Rice, Fr. E. 406, 407.
 Richards 328.
 Richter-Quittner 116.
 Riehe 381.
 Riesser 382.
 Rilliet 405.
 Ringer, W. E. 89, 486, 509,
 514, 575, 576.
 Ripper 245.
 Rippetoe 548.
 Rivkind 211, 252.
 Roberts 72, 98, 103, 136.
 Robertson 164, 169, 463, 525.
 Robinson, N. E. 390.
 Robiquet 210, 306.
 Rockwood 91, 92, 93.
 Rödén 591.
 Röhm 26.
 Röhmman 104, 109, 124, 152,
 153, 165, 276, 285.
 Roger 92, 109.
 Rogozinski 457.
 Rolf 61.
 van Romburgh 252.
 Rona, Elisabeth 489, 521.
 Rona, P. 7, 9, 26—28, 30—32,
 45, 145, 148, 149, 155, 157,
 189, 341, 343—345, 349, 397,
 402, 403, 409, 433, 444, 507,
 512, 513, 518—520, 531—533,
 579, 588, 590, 595, 608, 611.
 Rose 279.
 Rosemann 598.
 Rosenberg, E. 47.
 Rosenberg, T. 114.
 Rosenfeld, L. 329.
 Rosenheim 15, 18, 20, 47.
 Rosenmann 598.
 Rosenthal 109, 110, 493.
 Rosenthaler 162, 211, 214,
 255, 256, 257, 260.
 Ross 98, 542.
 Rothstein 186, 191, 524, 525,
 578, 594.
 Röhler 610.
 Rouge 42.
 Roux 83, 84.
 Rovere 335.
 Rowland 528, 534, 538.
 Rowntree 320.
 Rubner 42.
 Rudan 76.
 Rudberg, E. 376.
 Rugozinsky 506.
 Ruhland 169.

- Rumpel 490.
 Ryan 89, 279.
- Sachs, Fr. 326—328, 333.
 v. Sachs, J. 74.
 Sagel 402.
 Sahli 490, 607.
 Saiki 72, 105, 107.
 Saito 128—130.
 Sakaguchi 381.
 Salaskin 526.
 Salazar 285.
 Salge 10.
 Salkowski 433, 527, 528, 530,
 565.
 Sallinger 126.
 Salviole 432.
 Sameč 59, 84, 86, 394.
 Sandberg, M. 339.
 Sandras 98.
 Sanguineti 131.
 Saphra 341, 370, 371.
 Sarin 542.
 Sasaki, T. 395, 405, 508.
 Sato 109.
 Satta 326.
 Sauerland 317.
 Saussure 110.
 Savaré 30, 388.
 Sawitsch 497.
 Saxl, P. 27, 30, 45, 403.
 Scales 69.
 Schäffer, G. 127, 226, 423, 433,
 465, 468, 564.
 Schöffner, A. 407—409, 412,
 415, 416, 418, 420, 421, 423,
 426, 446, 455—457.
 Scharlinger 84, 133.
 Schaumberg 110.
 Scheckenbach 290.
 Scheele 306.
 Scheibler 393.
 Schellenberg 76.
 ScheHhorn 558, 561.
 Schepowalnikow 467, 503.
 Scheunert 70, 72.
 Schierge 540.
 Schifferdecker 571.
 Schilling 88.
 Schiöning 128.
 Schirokauer 108, 109.
 Schittenhelm, A. 61, 326—328,
 330, 385, 386, 389, 402, 404,
 506.
- Schjerning 558, 563.
 Schlesinger 88, 98, 99, 102 bis
 104, 106, 108, 111, 112, 123,
 143.
 Schloessmann, H. 607.
 Schmidt, A. 29.
 Schmidt, Alex. 596.
 Schmidt, J. 386.
 Schmidt, R. 507, 508.
 Schmidt-Nielsen 586, 590, 594.
 Schmiedeberg 234, 235, 379.
 Schmit-Jensen 70.
 Schmitt, A. 227.
 Schneegans 221.
 Schneider, W. 300—304.
 Schnitzler 339.
 Schön 124.
 Schöndorf 140.
 Schönfeld, R. 434—436.
 Schotte 236, 269.
 Schröder 239.
 Schrötter 326, 327.
 Schrupf 509.
 Schuchardt, Th. 256.
 Schudel 140, 297.
 Schütz, E. 12, 16, 17, 21, 38,
 40, 477, 511, 520, 580, 581.
 Schütz, J. H. 511.
 Schuetze 203—204.
 Schützenberg 565.
 Schulow, J. 378.
 Schultz 88.
 Schulze, A. 442.
 Schulze, E. 63, 72, 208, 209,
 321, 378, 394, 395.
 Schumoff-Simanowski 47.
 Schunck 233.
 Schwab, E. 387.
 Schwann 88, 505.
 Schwarzschild 378.
 Schweizer 67, 390.
 Schwiening 433, 527, 528.
 Scott 317.
 Seegen 106.
 Seidenberg 533.
 Seillière 73.
 Sendju 383.
 Seo, Y. 380.
 Sepp 304.
 Seth 335, 369, 609.
 Sevringhaus 531.
 Seymour 35.
 Sharp 449, 557.
 Shaw 88.
 Shaw-Mackenzie 15.
- Shedd 169, 211.
 Sherman 86, 92, 97—100, 102
 bis 104, 111—113, 116, 120,
 123, 124, 128, 129, 138, 139,
 142, 143.
 Shibata 338, 376, 378, 380.
 Shiga 383.
 Shiguaki, T. 610.
 Shore 152.
 Siau 107.
 Sickel 393.
 Sieber, N. 27, 30, 47, 433, 509.
 Sigmund 33, 38, 220, 221, 308.
 Simms 411, 416, 441, 506, 609
 bis 611.
 Simon 94, 146, 536.
 Simonds 27.
 Simoneli 490.
 Simonowski 433.
 Simons 424, 581.
 Simson 607.
 Singer 430.
 Siewe 573.
 Sjöberg, K. 65, 111, 126, 132.
 Sjöqvist, J. 371, 373, 443, 511,
 520, 581.
 Skraup 269, 395.
 Slimmer 394.
 Slosse 96, 97, 100.
 van Slyke, D. D. 30, 99, 112,
 185, 335, 339, 440, 341 bis
 344, 348, 349, 351, 355, 358
 bis 362, 365—367, 370, 372,
 443, 446—449, 515, 526, 579,
 581, 610.
 Smirnoff 159, 223, 270, 271, 378.
 Smorodinzew 379, 380, 514,
 521, 575, 611.
 Smith, J. L. 48.
 Smith, William J. 94, 302, 530.
 Snapper 379.
 Sobotka, H. 331, 609.
 Söhngen 42.
 Sörensen 9, 36, 113, 185, 188,
 243, 291, 342, 381, 406, 409,
 443, 444, 445, 483, 513 bis
 515, 523, 544, 569, 578, 581.
 Solera 97.
 Solms 577.
 Sonntag 247, 267.
 Souder 14, 17.
 de Souza 15, 16.
 Soxleth 140.
 Spallanzani 505.
 Spatzier 301, 302.

- Spieckermann 42.
 Spiess 542.
 Spillmann 350.
 Spiro 591, 596.
 Spriggs 581.
 Stade 8, 10, 11, 21, 43.
 Standenaht 402, 496.
 Stangassinger 384.
 Starkenstein 101, 105—107, 137.
 Starling 14, 433, 467, 498, 504, 608.
 Stassano 47, 467.
 Stauber 98.
 Stawraki 329.
 Steele 77.
 Steibelt 145—148, 154, 155, 156, 158, 170, 203, 291, 310.
 Steinbeck 403.
 Steinitz 235.
 Stenberg 73.
 Stenström 335.
 Steppuhn 335, 531, 611.
 Steudel 318, 319, 324, 325, 326, 449, 574, 581, 609.
 Stewart 490.
 Stiehler 304.
 Stiles 93.
 Stix 431.
 Stokes, G. G. 135.
 Stoll 48, 51—53.
 Strada 494.
 Strauch 510, 576.
 Strauss 285.
 Strecker 392.
 Strich 109, 402.
 Stromberg 607.
 Stuber 599.
 Suarez 79.
 Sugga 341, 365.
 Sugiura 36, 62, 336, 348.
 Sumner, J. 342, 609.
 Sundberg 509.
 Sundvik 235.
 Suto 267.
 Suzuki 63, 64, 398, 429.
 Svanberg, O. 65, 81, 112, 121, 123, 133, 139, 142, 152, 166, 168, 171—174, 178, 186 bis 189, 195, 196, 202, 203, 232, 430, 570.
 Svedberg, Th. 453.
 Swanson 557.
 Tague 557.
 Tait, Lawson 562.
 Tanaka 30, 34, 37, 78,
 Tanberg 128, 129.
 Takahashi 394.
 Takahata, T. 341, 344, 369.
 Takaishi 63.
 Takamine jun. 128, 129 136.
 Takemura 506.
 Takeuchi 335, 336, 337, 341.
 Tammann 227—229, 231—233, 244, 249, 303.
 Tanaka 335, 431.
 Tanfani 33.
 Tanret 77, 146, 209, 211, 279.
 Tapernoux 26.
 v. Tappeiner 195.
 Tateyama 402, 431.
 Taubmann 345.
 Taunod 601.
 Taylor, A. E. 39, 40.
 Tebb 104, 105, 106, 124, 152.
 Teodoresco 327.
 Terroine, E. 13, 14, 15, 17, 18, 19, 20, 25, 26, 43, 47, 100, 423, 433, 465, 468, 501.
 Terry 91.
 Teruuchi 403, 405, 432, 548, 562.
 Teschendorf 126.
 Thannhauser 319, 321—324, 326, 327, 329, 330, 332, 609.
 Thiele, F. H. 46.
 Tholin 57.
 Thomas, A. W. 100, 103, 113, 124, 129.
 Thomas, F. 237.
 Thomas, K. 381, 539, 577.
 Thomas', Pierre 224, 250, 339.
 Thompson 496.
 Thoms 336.
 Thorin 54, 55.
 Thunberg, T. 387.
 Thurlow 390.
 van Tieghem 68, 169, 306, 313, 380.
 Tischatkin 562.
 Todd, A. H. 373.
 Toeniessen 317.
 Tohoku 30.
 Tollens 72, 73, 76, 79.
 Tomiter 382.
 Tommasi 556.
 Tompson, F. W. 163, 171, 173, 190, 194, 199, 200, 202.
 Tonegutti 35.
 Tottingham 72.
 Traetta-Mosca 169, 211, 274.
 Traube 45.
 Trier 331.
 van Trigt 89.
 Troensegaard 453—455, 457, 461.
 Troitzki 336, 337, 338.
 Truthe 122.
 Truffi 533.
 v. Tschermak 73, 78.
 Tschernorutzki, M. 108, 166, 326.
 Tschernorutzky, Helene 326, 327.
 Tsou-Hia-Hsü 463.
 Tsuchihashi 521.
 Tsuji 15.
 Tsunoo 605.
 Tubby 165.
 Türk 395.
 Tutin 79, 252.
 Twort 226.
 Ueda, H. 393.
 af Ugglas siehe v. Euler
 Ukai 30.
 Ulander 73.
 Ullmann 314.
 Ultee 253, 255.
 Umber 26.
 Umeda 44, 345.
 Usuki 47.
 Utkin-Ljubowzoff 531.
 Vandevelde 68, 164, 285, 489, 521, 534.
 Vella 165.
 Venth 256.
 Verneuil 505.
 Vernon 96, 98, 100, 103, 104, 136, 426, 433, 494, 495, 498, 501, 503.
 Verschaffelt 608.
 Viehoever 339, 362, 372.
 Villars 335, 352, 353, 364, 373, 374.
 Vines 401, 434, 529, 543, 552, 562, 564, 565—567.
 Vinson 169.
 Vintilesco 209.
 Vischniac 31.
 Visser 228.

- Vögtlin 386.
 Vogel 206.
 Volhard 8, 9, 10, 12, 21, 43,
 254, 268, 577.
 Volk 44.
 Vollbrecht 305, 306, 307, 310,
 311.
 Vongerichten 280.
 Vorbrott 64.
 Votoček 280, 282.
 Vulquin 227, 243.
- Waage** 6.
 Wabulenko 337.
 Wachsmuth 576.
 Wälti 117.
 Wagenaar 336.
 Wahl 558.
 Wakabayashi 104.
 Waksman 138, 378, 604.
 Walbum 560, 572, 573, 579,
 593.
 Waldschmidt-Leitz, E. 391,
 400, 401, 402, 407—409, 412,
 414—416, 418, 420—429, 431,
 434, 442, 443, 446, 451,
 455—462, 464—466, 468, 470,
 479, 486, 487, 488, 491,
 497—504, 513, 531, 536, 544,
 568, 579—581.
 Waldvogel 47.
 Walker, Fl. 86, 92, 97.
 Walker, Jennie A. 120.
 Walker, J. Wallace 242.
 Walker, James 335, 351—353.
 Waller 116.
 Walpole 445.
 Walther 13, 134.
 Warburg, O. 388, 393.
 Warfield 402.
 Wartenberg 34, 36—38, 41, 43.
 Wasmund 144.
 Wasserzug 198.
 Wasteneys 482, 487, 526.
 Weber, Jone 331, 609.
 Weber 577.
 Weewers 221.
 Wegscheider 372, 373.
 Wehmer 70, 76, 127, 128, 308.
 Weil 12, 13, 44.
 Weill 100.
 Weinland 199, 285, 433.
- Weinstein, J. W. 402.
 Weiss, F. 381, 397, 488, 561.
 Weissweiler 252.
 Wells 386, 534.
 Welsch 467.
 Welter 40, 374.
 Wendel 394.
 Went 71, 131, 160, 198.
 Werner, E. A. 334, 337, 351,
 352, 364.
 Wersilowa 8.
 Wertheimer 412, 413.
 Wester 336, 340, 344, 348,
 349, 350, 359, 363, 368.
 Whipple, G. H. 597.
 White 563.
 Widmark, E. 380, 537.
 Widmer 66, 159, 269, 270.
 Wiechowski 107, 381.
 Wieland 253, 262, 387, 388.
 Wiener, K. 328, 386, 404.
 Wiesel 80.
 Wijsman 124.
 Wilenko 109.
 Will, Heinr. 300.
 Will, H. 290, 562.
 Williamson, G. S. 401, 402.
 Willstätter IV 35, 41, 48, 49,
 50, 51, 52, 53, 61, 67, 140,
 145—149, 150—158, 162,
 163, 170, 171, 172, 173,
 174—185, 191, 197, 200, 201,
 202—208, 212—215, 234,
 241, 243, 244, 247, 248, 267,
 268, 269, 274, 286, 288, 290,
 291—295, 297, 298, 299, 310,
 401, 405, 408, 415, 416, 420,
 421, 423, 434, 443, 446, 451,
 456, 458, 459, 462, 464, 468,
 469, 470, 473, 479, 491, 501,
 522, 529, 531, 544—554, 555,
 561, 567—570, 575, 579, 581,
 584, 585.
 Windaus 48, 234, 395.
 Windisch 74, 140, 558, 559, 561.
 Winkelblech 399.
 Winternitz 27, 31, 385, 386.
 Winterstein 63, 72, 208, 319,
 395.
 Wirth, Chr. 139, 253.
 Wishart, G. M. 371, 372.
 v. Wittich 98, 105, 106.
- Wittmack 556.
 Wöhler 162, 210.
 Wöhlisch 599, 603, 608.
 Wohl, A. 122, 125, 392.
 Wohlgemuth, J. 16, 20, 47,
 91—93, 101, 104, 105—110,
 123—126, 128, 129, 132, 136,
 137, 141, 144, 317, 326, 402,
 433, 609.
 Wolff 77.
 Wolpe 110.
 Wooley 15, 467, 488.
 Wormall 390.
 Wortmann 196.
 Wrede 300, 304.
 Wróblewski 111.
 Wu 370, 449.
 Wunderly, K. 387.
 Wurtz 543.
 Wynhausen 110.
- Yamada 600, 607.
 Yamagawa 60, 331.
 Yamazaki 348, 353, 357, 368.
 Young 53—56, 345, 492, 493.
 Youngburg 372.
 Yoshimma 63.
- Zach 215, 281.
 Zacharias 341, 342, 348, 351,
 355, 361.
 Zachrisson 508, 531.
 Zak 598, 604.
 Zaleski 63.
 Zechmeister 269.
 Zegla 106.
 Zeisel 44, 45, 52, 79.
 Zellner, J. 41, 127, 225, 308,
 564.
 Zemplén 77, 206, 272, 273,
 275, 276, 290, 291, 295,
 336—338, 372.
 Zimmerlund 65.
 Zinsser 8.
 Zsigmondy 226.
 Zuntz, N. 70.
 Zunz, E. 423, 433, 488, 540,
 598, 603—605, 607.
 Zweifel 88, 98.