

Über proteolytische Enzyme.

Von

R. O. Herzog.

(Aus dem Laboratorium für allgemeine Chemie zu Utrecht.)

(Der Redaktion zugegangen am 18. Juli 1903.)

1895 teilte Okouneff¹⁾ das Wesentliche der Erscheinung mit, die W. W. Sawjalow²⁾ Plasteinbildung genannt hat. Man hat dieselbe bei der Einwirkung von Pepsin,¹⁾ Trypsin³⁾ und Papayotin⁴⁾ kennen gelernt; sie besteht darin, daß nach Zusatz der Enzyme zu konzentrierten Lösungen von Spaltungsprodukten der Eiweißkörper, «Albumosen», nach einiger Zeit entweder Flocken- oder Gallertenbildung eintritt.

Die Chemie dieser Vorgänge haben M. Lawrow und S. Salaskin⁵⁾ zu studieren begonnen.

Nachdem in neuerer Zeit die von der Theorie vorausgesehene⁶⁾ Synthese durch Fermente mehrfach experimentell bestätigt wurde, lag es nahe, auch die «Plasteinbildung» als Reversion zu deuten.

Immerhin schien es nicht ganz leicht, nachzuweisen, daß die «peptisch wirkende Gruppe» etwa des «Pepsinmoleküls» mit der «plasteinbildenden» identisch sei und daß nicht etwa ein Gemisch in solchem Sinne wirksamer Agentien vorliege.

Hier soll versucht werden, die Deutung als Reversion auf folgendem Wege wahrscheinlich zu machen.

E. Weinland⁷⁾ hat kürzlich gefunden, daß Preßsaft aus

¹⁾ Diss. St. Petersburg russ. Ferner ders. Verf. Physiologiste russe 1898; Lawrow, Diss. St. Petersburg 1897 (cit. n. Sawjalow); Schapirow, Diss. Jurjew 1896. (Malys J. 1896, S. 400.)

²⁾ Deutsch: Pflügers Arch., Bd. 85, S. 171 (1901).

³⁾ Okouneff, Sitzungsber. d. Ges. russ. Ärzte zu St. Petersburg, S. 452 (1900—1901), (cit. n. Salaskin).

⁴⁾ Vgl. Kurajeff Hofmeisters Beitr. Bd. 1, S. 121 (1901).

⁵⁾ Diese Zeitschr., Bd. XXXVI, S. 277 (1902).

⁶⁾ Van't Hoff, Zeitschr. für anorg. Chem., Bd. 18, S. 1 (1898).

⁷⁾ Zeitschr. f. Biologie, Bd. 44, S. 1 und 45 (1902).

Ascaris Antifermente gegenüber Pepsin und Trypsin enthält. Sind nun die spaltende und die synthetische Wirkung der proteolytischen Fermente auf dieselbe Ursache zurückzuführen, so muß ein Mittel, das auf die eine Funktion hemmend wirkt, denselben Einfluß auf die andere Funktion nehmen. Das ist in der Tat der Fall.

Vor kurzem hat E. J. Spriggs¹⁾ auf Veranlassung von Professor Kossel gezeigt, daß die Veränderung der Viskosität einer Eiweißlösung mit dem Fortschritt der Pepsinwirkung mit Hilfe des Ostwaldschen Apparates bequem und präzise sich bestimmen läßt.

Die Viskosität einer fünfprozentigen Gelatinelösung z. B. nimmt auf Zusatz von Pepsinsalzsäure in der ersten Zeit rapide, später langsamer ab. (Ich fand z. B. als Durchflußzeiten: Anfangs 3 Min. 46 Sek. Nach 40 Minuten 2 Min. 37 Sek. Nach einer weiteren Stunde 45 Sek. Nach 4 Stunden 35 Sek.)

Versetzt man eine konzentrierte Lösung von käuflichem Pepton mit Pepsin, so nimmt die Viskosität erst langsam, nach einigen Stunden bedeutend zu.

Darnach ergab sich etwa folgende Versuchsanordnung.

Zwei annähernd gleiche Viskosimeter wurden mit gleichen Mengen von Peptonlösung, Ferment und das eine mit gekochtem (und filtrierten), das andere mit natürlichem *Ascaris*preßsaft beschickt. Die Menge desselben war so gewählt, daß bei der Proteolyse die Hemmung deutlich zu konstatieren war. Bei allen Versuchen wurde zunächst das Ferment und das Antiferment vermischt und erst das Gemisch, das meist kurze Zeit gestanden hatte, mit Peptonlösung versetzt.

Die Versuche sind durchwegs im Ostwaldschen Thermostaten bei 40° durchgeführt.

Das verwendete Pepsin verdanke ich der großen Güte des Herrn Professors Pikelharing, welcher mir sein völlig reines Präparat,²⁾ dessen Analysen auf eine chemisch einheitliche Substanz zu schließen erlauben, überließ. Auch an dieser Stelle danke ich herzlich für die große Liebenswürdigkeit.

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. XXXV, S. 465 (1902).

²⁾ Diese Zeitschr., Bd. XXXV, S. 8 (1892).

Als Trypsin wurde das beste von Dr. G. Grübler-Dresden zu beziehende Präparat, als Papayotin das sehr wirksame Präparat von Merck verwendet. Die Peptonlösung wurde aus dem besten Fibrinpepton-Merck bereitet.

Die Ascarispreßsäfte entstammten zwei Darstellungen, Präparat 1 aus Heidelberg, Präparat 2 aus Utrecht.

Um vor Bakterienwirkung sicher zu sein, sind alle Versuche so angestellt, daß ein Volumen der Lösung ein halbes Prozent Fluornatrium enthält.

Versuche mit Pepsin.

Ca. 0,01 g des trockenen Enzyms wurden in 25 ccm Wasser gelöst, das 1 0/0 NaCl und 1/2 0/0 NaF enthielt. Da der Ascarispreßsaft, welcher für diese Versuche in Verwendung kam (Präp. 1), schwach sauer reagierte, wurde weiter keine Säure zugesetzt. Auf 1 Tropfen¹⁾ Fermentlösung wurde 1 ccm Preßsaft und 1 ccm ca. 50 0/oiger Peptonlösung²⁾ verwendet.

Versuch 1.

Die Durchflußzeit beträgt

	mit gekochtem Ascarissaft	mit natürlichem Ascarissaft
nach Stunden 0	5 Min. 31 Sek.	6 Min. 10 Sek.
7	6 » 10 »	6 » 17 »
11	6 » 55 »	6 » 29 »
21	10 » 0 »	6 » 43 »

Versuch 2.

Die Durchflußzeit beträgt

	mit gekochtem Ascarissaft	mit natürlichem Ascarissaft
nach Stunden 0	5 Min. 18 Sek.	6 Min. 43 Sek.
4	5 » 32 »	6 » 52 »
7	5 » 59 »	6 » 55 »
11	6 » 57 »	7 » 25 »
24	15 » 7 »	7 » 33 »

¹⁾ Immer aus gleichem Tropfröhrchen.

²⁾ Die Konzentration der Peptonlösung ist hier und im Folgenden nur annähernd angegeben.

Versuch 3.

Die Durchflußzeit beträgt

	bei Zusatz von H ₂ O (+ 1/2 ‰ NaF)		mit natürlichen
	statt Ascarissaft		Ascarissaft
nach Stunden	0	3 Min. 27 Sek.	4 Min. 7 Sek.
	1 1/2	3 » 32 »	4 » 10 »
	5	3 » 50 »	4 » 18 »
	17	10 » 20 » (trüb)	4 » 30 » (klar geblieben)

Versuche mit Trypsin.

1 g Ferment in 25 ccm Wasser gelöst, das 1 ‰ NaCl und 1/2 ‰ NaF enthält; davon 3 Tropfen zu 1 ccm Ascarispreßsaft, 1 Tropfen Sodalösung und 2 ccm ca. 60 ‰iger Peptonlösung.

Versuch 1.

Die Durchflußzeit beträgt

	mit gekochtem Ascarissaft	mit natürlichem
	(2. Präp. 2. Pressung)	Ascarissaft
nach Stunden	0	11 Min. 20 Sek.
	18	11 » 51 »
	30	12 » 17 »

Versuch 2.

Die Durchflußzeit beträgt:

	mit gekochtem Ascarissaft	mit natürlichem
	(1. Präp.)	Ascarissaft
nach Stunden	0	21 Min. 5 Sek.
	4 1/2	21 » 5 »
	48	23 » 34 »

Dieser Preßsaft hatte recht schwachen Einfluß auf Trypsinwirkung; dies zeigt z. B. folgender Versuch:

3 Tropfen Trypsinlösung, 1 ccm Ascarissaft, Sodalösung und 2 ccm einer ca. 30proz. Peptonlösung. (Bei dieser Konzentration nahm die Viskosität ab.)

Der Unterschied der Durchflußzeiten betrug beim Versuch mit gekochtem Ascarispreßsaft 14 Sekunden, mit natürlichem Preßsaft 20 Sekunden in 4 Stunden. Nach weiteren 12 Stunden hatte sich in beiden Versuchen die Viskosität nicht geändert.

Versuche mit Papayotin.

Es bot Interesse, auch ein pflanzliches Enzym zu untersuchen.

1 g Papayotin gelöst in 25 ccm H₂O, das 1 0/0 NaCl und 1/2 0/0 NaF enthält. Davon 5 Tropfen zu 1 ccm Ascarispreßsaft¹⁾ (1. Präp.), 4 Tropfen Sodalösung und 2 ccm 35 0/0iger Peptonlösung.

Die Durchflußzeit beträgt

nach Stunden	0	mit gekochtem Ascarisssaft	mit natürlichem Ascarisssaft
		3 Min. 15 Sek.	3 Min. 7 Sek.
	20	3 » 23 »	3 » 10 »
	32	3 » 29 »	3 » 12 »
	48	3 » 37 »	3 » 14 »

Ein Versuch, bei welchem die Peptonlösung durch 5 0/0ige Gelatinelösung ersetzt ist, zeigt die Durchflußzeiten:

nach Stunden	0	2 Min. 20 Sek.	2 Min. 5 Sek.
	1	1 » 48 »	1 » 39 »
	3	1 » 37 »	1 » 34 »
	15	1 » 31 »	1 » 29 »

Aus den mitgeteilten Versuchen ergibt sich:

1. Die proteolytischen Enzyme bewirken die Zunahme der Viskosität in konzentrierten Lösungen der Spaltungsprodukte von Eiweißkörpern.

2. Diese Zunahme wird gehemmt bei Zusatz von Ascarispreßsaft und zwar im selben Verhältnis, wie die Abnahme bei der abbauenden Tätigkeit der Fermente.

Auch Papayotininwirkung wird gehemmt.

3. Die Hemmung zeigt sich in bedeutender Herabdrückung der Reaktionsgeschwindigkeit. Vollständige Aufhebung der Fermentwirkung konnte bisher nicht beobachtet werden. Dies Verhalten erinnert an die Beobachtungen, die S. Arrhenius

¹⁾ Die Menge desselben hätte für die Versuche größer gewählt werden können. Es sollte aber das gleichartige Verhältnis beim Auf- und Abbau deutlich gezeigt werden.

und Th. Madsen¹⁾ kürzlich über Toxin und Antitoxin mitgeteilt haben.

Durch Kochen des Preßsaftes wird, wie Weinland²⁾ mitgeteilt hat, die hemmende Wirkung auf die Proteolyse aufgehoben. Ebenso die Hemmung der Zunahme der Viskosität.

Ich halte es darum für wahrscheinlich, daß die regelmäßig beobachtete Zunahme der Viskosität den Beleg für die Reversion³⁾ erbringt.

Es wäre wünschenswert, einen chemischen Beweis dafür zu erhalten, daß die entstandenen Substanzen kompliziertere Körper sind als die ursprünglich in der Peptonlösung vorhandenen. Dafür sprechen nun in der Tat die Eigenschaften, welche Okouneff,⁴⁾ Sawjalow⁵⁾ sowie M. Lawrow und S. Salaskin⁶⁾ beschrieben haben. In neuester Zeit hat ferner Sawjalow⁷⁾ in einer vorläufigen Mitteilung erwähnt, daß es ihm gelungen sei, Koagulation durch Kochen bei Gegenwart von Essigsäure zu erzielen — eine Reaktion, die bisher für genuine Eiweißkörper als charakteristisch galt. Damit scheint auch der chemische Befund im Sinne der oben gegebenen Anschauung.

Verhältnis zur Labgerinnung.

Die im Vorhergehenden genannten proteolytischen Fermente haben durchwegs auch die Eigenschaft, die Milch zur Gerinnung zu bringen. Ebenso enthalten die Hefezellen nicht nur ein proteolytisch, sondern, wie kürzlich R. Rapp⁸⁾ fand, auch ein labartig wirkendes Enzym. Da man im allgemeinen noch nicht soweit gekommen ist, Fermente als chemisch reine Substanzen darzustellen, hat man zumeist geglaubt, mit einem Fermentgemisch, mit Verunreinigungen zu tun zu haben.

¹⁾ Zeitschr. f. physik. Chem. Bd. 44, S. 7 (1903).

²⁾ l. c.

³⁾ Das Wort ist hier in weiterem Sinne gebraucht. Vgl. das Folgende (Möglichkeit der Entstehung von Isomeren).

⁴⁾ l. c.

⁵⁾ l. c.

⁶⁾ l. c.

⁷⁾ Zentralbl. f. Physiol. Bd. 16, S. 625 (1903).

⁸⁾ Zentralbl. f. Bakteriol. (II. Abt.) Bd. 9, Nr. 17, 18 (1902).

Aber nach den Versuchen von Pekelharing¹⁾ wird man doch annehmen müssen, daß dieser Forscher mit einem chemisch wohl definierten Individuum arbeitet. So konnten M. Nencki und N. Sieber²⁾ die Hypothese aussprechen, daß verschiedenen Gruppen [Seitenketten] in dem Fermentmolekül die verschiedenartige Wirksamkeit zukomme. Auch Pawlow³⁾ hält proteolytische und labende Funktion für nicht trennbar.

Mag man sich mit der Tatsache in der Form abfinden, wie sie in der genannten Hypothese ausgesprochen ist, mag man sich eine etwas andere Vorstellung machen (wofür mir gewisse Gründe zu sprechen scheinen), es kann jedenfalls für überaus wahrscheinlich gelten, daß man die Annahme der Verunreinigung nicht mehr halten können.

Es bot also großes Interesse, das Verhalten des Ascarispreßsaftes zur Labwirkung der Fermente zu untersuchen. Ich habe mehrere Parallelversuche mit verschiedenen Präparaten gemacht: niemals zeigte sich ein Unterschied in dem Zeitintervall bis zum Eintritt der Gerinnung, ob gekochter oder natürlicher Ascarispreßstoff zugesetzt war. Auch die Reihenfolge der Mischung ergab keinen Unterschied.

Die «Plasteinwirkung» verhält sich demnach völlig verschieden von der Labwirkung.⁴⁾ Doch soll erwähnt sein, daß man sich wohl vorstellen kann, es würden z. B. durch die peptische Reversion Produkte gebildet, welche von Lab gefällt werden.

Schlußbemerkungen.

Wenn auch die genauere Kenntnis der «Plasteine» noch fehlt, darf man wohl — wie schon oben wahrscheinlich ge-

1) Diese Zeitschr., Bd. XXII, S. 233 u. Bd. XXXV, S. 8 (1902).

2) Diese Zeitschr., Bd. XXXII, S. 291 (1901).

3) Pawlow und Paraschtschuk. Vortrag auf d. Kongreß nord. Naturforscher und Ärzte auf Helsingfors (1902).

4) Ich möchte mir vorbehalten, den Versuch nach der anderen Seite zu wenden und den Einfluß von Antilab auf die verschiedenartige Wirksamkeit zu studieren.

macht wurde — annehmen, daß sie durch Kondensation der Albumosen entstehen, also komplizierter sind als diese. Aber vielleicht ist auch noch gestattet, auf die Analogie bei den auf Zuckerarten hydrolytisch wirkenden Enzymen hinzuweisen: man hat bis jetzt zumeist bei der Reversion die Bildung von Isomeren¹⁾ des ursprünglichen Ausgangsmaterials gefunden. Vielleicht ist Ähnliches auch bei den proteolytischen Fermenten der Fall und liegt darin auch eine Begründung der veränderten Eigenschaften der gebildeten Produkte. Auf die biologische Bedeutung dieses Vorganges — falls sich diese Vermutung als richtig erweisen sollte — braucht wohl nicht näher eingegangen zu werden. Denkt man noch an Verschiedenheiten in der Durchlässigkeit der Membrane, so scheinen manche Rätsel des Lebens heller beleuchtet.

Des weiteren würde aus der Annahme der Reversion folgen, wie vorsichtig man mit Rückschlüssen von den durch die Wirkung der Verdauungsfermente gewonnenen Bruchstücken des Eiweißmoleküls auf die ursprüngliche Konstitution wird sein müssen.²⁾ Man hat es mit Gleichgewichten und zwar möglicherweise recht komplizierter Art zu tun.

Die Versuche sollen im Sinne des physikalisch-chemischen Studiums fortgesetzt werden. Zunächst wird der Einfluß der Konzentration und der Acidität (resp. Alkalinität) zu untersuchen sein. Man darf erwarten, daß so gewisse, augenblicklich noch nicht gut verständliche Tatsachen näher beleuchtet werden können.

Am Schlusse möchte ich Herrn Professor E. Cohen, der mir in größter Liebenswürdigkeit alle Mittel zur Verfügung stellte und mich mit freundlichem Rat reichlich unterstützte, den herzlichsten Dank aussprechen.

¹⁾ Vgl. E. Frankland Armstrong, Chem. News. Bd. 86, S. 166 (1902). Ferner diese Zeitschr., Bd. XXXVII, S. 385 (1903).

²⁾ Man könnte hier auch auf die Kühneschen Annahmen hinweisen, die sich wohl auch nach neueren chemischen Untersuchungen als unhaltbar zu zeigen scheinen.
