

Über die Verdauung von rohem Hühnereiweiß durch Papain.

Von
Fritz Sachs.

(Aus der Chemischen Abteilung des Pathologischen Institutes der Universität zu Berlin.)
Der Redaktion zugegangen am 20. April 1907.)

In dem Umstande, daß unter den Eiweiß verdauenden Enzymen Pepsin und Trypsin die am längsten bekannten und am besten studierten sind, ist wohl der Anlaß zu suchen für ein gewisses Bestreben, alle proteolytischen Fermente in 2 Klassen einzuteilen, in peptische und tryptische, und die einzelnen unter ihnen je nach ihren Eigenschaften einer dieser Abteilungen einzureihen. Man sah bei dieser Klassifizierung von jeher als Kriterien an: erstens die Reaktion, bei der das betreffende Ferment seine Wirkung entfaltete, zweitens die Spaltungsprodukte, bis zu welchen die verdauende Wirkung führte. Das Papain nimmt in diesem System heute noch eine unstrittene Stellung ein. Die älteren Beobachter fanden zumeist die Spaltung nicht weitergehend, als bis zum Auftreten von Peptonen. Zwar erhielt schon Wurtz¹⁾ aus einem Fibrin-Papain-Digestionsgemisch einen krystallinen Körper, den er für Leucin hielt. Indessen ist das Auftreten von Aminosäuren erst durch die neueren Untersuchungen von Emmerling,²⁾ sowie Kutscher und Lohmann³⁾ sicher erwiesen. Auch Mendel,⁴⁾ der keine

¹⁾ Wurtz, Sur la papaine. Nouvelle contribution à l'histoire des ferments solubles. Comptes rendus des séances de l'Académie des sciences, Bd. XCI, S. 787 (1880).

²⁾ Emmerling, Über die Eiweißspaltung durch Papayotin. Berichte d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXV, S. 695 und 1012 (1902).

³⁾ Kutscher und Lohmann, Zur Kenntnis der Papayotinverdauung. Diese Zeitschrift, Bd. XLVI, S. 383 (1905).

⁴⁾ Mendel und Underhill, Observations on the digestion of proteids with papain. Transactions of the Connecticut Acad., XI (Oct. 1901), zitiert nach Zentralbl. f. Physiol., 1901, S. 689.

Mendel, Observations on vegetable proteolytic enzymes with special reference to papain. Americ. Journ. of Med. Sciences, Bd. CXXIV, S. 310 (1902).

Aminosäuren, auch bei Anwendung gut wirkender Papainpräparate, nachweisen konnte und ein eventuelles Auftreten derselben auf autolytische Prozesse zurückführte, fand schließlich in dem Papayotin-Merck ein Präparat, durch dessen Wirkung er positiven Ausfall der Tryptophanreaktion erzielen konnte. Wenn man die Spaltungsprodukte als maßgebend betrachtet, wäre das Papain also den tryptischen Fermenten zuzuordnen. Bezüglich der zu seiner Wirkung erforderlichen Reaktion ist aber noch keine Einigkeit erzielt.

Die Beobachtungen der einzelnen Autoren stehen in striktem Gegensatz zu einander, ohne daß es möglich wäre, etwa in der Anwendung verschiedener Substrate oder verschiedener Papainpräparate hierfür eine hinreichende Erklärung zu finden. Ich halte es darum für zwecklos, die in der Literatur ziemlich zerstreuten Angaben an dieser Stelle gesondert aufzuführen. Von größerem Interesse ist es, daß gelegentlich auch ein und derselbe Beobachter je nach Anwendung verschiedener Substrate oder Fermentpräparate einen divergenten Einfluß der Reaktion konstatiert hat. So fand Polak¹⁾ bei Verdauung von Fleisch einen Zusatz von Salzsäure ohne merklichen Einfluß, dagegen bei Verdauung von koaguliertem Eiweiß mehr oder weniger hemmend. Hobein²⁾ will festgestellt haben, daß die Papainpräparate von Merck und Gehe nur in alkalischer, die von Reuss-Boehring und Finkler auch in saurer Lösung wirken; er hält es darum für möglich, daß im Milchsaft des Melonenbaums verschiedene Fermente enthalten sind. Osswald³⁾ stellte vergleichende Verdauungsversuche an mit koaguliertem Hühnereiweiß, rohem Ochsenfleisch und Diphtheriemembränen. Er fand für Papain-Reuss bei der Auflösung von koaguliertem Hühnereiweiß und Diphtheriemembranen einen Salzsäurezusatz deutlich verstärkend, bei Verdauung von Ochsenfleisch keinen

¹⁾ J. Polak, Verdauungsversuche mit Papain, Papayotin und Pepsin. *Nederlandsch Tijdschrift voor Geneeskunde*, 1882, zitiert nach *Malys Jb.*, 1882, S. 254.

²⁾ Zitiert nach Osswald, *Münch. Med. Wochenschr.*, 1894, S. 665.

³⁾ Osswald, Untersuchungen über das Papain (Reuss), *Münchener Med. Wochenschr.*, 1894, S. 665.

deutlichen Einfluß der Salzsäure. Fischer¹⁾ konstatierte einen wesentlich verschiedenen Wirkungsgrad für Fibrin und koaguliertes Hühnereiweiß; auch er kommt auf die Vermutung, daß der rohe Saft zwei verschiedene proteolytische Fermente enthält. Fischer fand ferner im Gegensatz zu Hobein das Mercksche Präparat auch in saurer Lösung gut wirksam, in der das Reussche ungemein schwächer wirkte, für letzteres dagegen in alkalischer Lösung eine wesentlich bessere Verdauungskraft als für Papayotin-Merck. Nach derartigen Ergebnissen hält es Windmüller²⁾ für verständlich, wenn die Angaben der einzelnen Autoren so sehr von einander abweichen.

Während die meisten früheren Untersucher mit den verschiedensten Eiweißarten in fester Form gearbeitet haben, sind Papainverdauungsversuche mit gelöstem Eiweiß nur in beschränkter Zahl angestellt worden. Eine ältere Mitteilung von Wittmack³⁾ besagt, daß flüssiges Hühnereiweiß, mit Milchsaft von *Carica papaya* versetzt, beim Erhitzen auf 58—60° C. gelatinös, bei weiterem Erhitzen vollständig gelöst und bei 80° zu einer milchigen Flüssigkeit wird, die die Eigenschaften der Peptone zeigt. Hirsch⁴⁾ beobachtete bei 4 stündiger Digestion bei 38° eine intensive Verdauung von flüssigem Hühnereiweiß durch Papain-Boehringer und Reuss (gemessen an der Menge der durch Hitze nicht koagulablen N-haltigen Substanz). Die Gegenwart freier HCl beeinträchtigte diese Wirkung ganz erheblich, während bei allen anderen untersuchten Eiweißarten in fester Form, wie Fibrin, Fleisch, koaguliertem Hühnereiweiß, ein Zusatz von Salzsäure für die Verdauung von Vorteil war. Auch Rehm⁵⁾ stellte eine intensive Wirkung auf flüssiges Hühner-

¹⁾ August Fischer, Materialien zur Pharmakologie der Pepsinpräparate und deren Surrogate, Magisterdissert. Dorpat 1901 (russisch, zitiert nach Windmüller, Inaug.-Dissert. Rostock 1902).

²⁾ Windmüller, Über Papain, Inaug.-Dissert. Rostock 1902.

³⁾ Wittmack, 52. Versammlung deutscher Naturforscher und Ärzte, Baden-Baden 1879, zitiert nach Albrecht, Corr.-Bl. f. Schweiz. Ärzte, X, S. 684.

⁴⁾ Hirsch, Über Papain und seinen Wert als Digestivum, Therapeutische Monatshefte, 1894, S. 609.

⁵⁾ Rehm, Über die Einwirkung fluoreszierender Stoffe auf das Eiweiß spaltende Ferment Papain, Inaug.-Dissert. München 1903.

eiweiß fest. Nach 7-stündiger Digestion betrug die Menge der durch Hitze koagulablen, also nicht verdauten Substanz 25 bis 30 % des Gesamteiweißes. Über den Einfluß der Reaktion stellte Rehm keine Versuche an. Besonders betonen möchte ich, daß die beiden letztgenannten Autoren in allen ihren Versuchen am Ende der Digestion das Verdauungsgemisch zwecks Ausfällung des unverdauten Eiweißes erhitzen, und daß Hirsch vor dem Erhitzen stets neutrale Reaktion herstellte, während Rehm seine Gemische, die während der Digestion jedenfalls schwach alkalisch reagierten, nachher direkt in kochendes, schwach essigsäures Wasser goß.

Nach neueren Untersuchungen scheint es nun, daß die Beobachtungen von Hirsch und Rehm, ohne daß ihre Richtigkeit bezweifelt werden soll, eine andere, eigenartige Deutung erfahren müßten. Von Delezenne, Mouton und Pozerski¹⁾ wurde nämlich im vergangenen Jahre ein höchst merkwürdiges Phänomen beschrieben, welches sie bei dem Studium der Verdauung von gelöstem Eiweiß durch Papain (Merek) auffanden: Sie versetzten frisches Hühnereiweiß oder Hammelserum mit einer gewissen Menge Papain und ließen eine Reihe derartig ganz gleich bereiteter Gemische verschiedene Zeit lang entweder bei Zimmertemperatur oder im Brutschrank digerieren. Säuereten sie nun, d. h. nach den jeweils verschiedenen langen Zeiträumen, die einzelnen Proben mit Essigsäure an und erhitzen sie auf 100°, so beobachteten sie mit zunehmender Dauer der Digestion ein gleichzeitiges Anwachsen des koagulablen Eiweißes, d. h. eine Abnahme der Verdauungsprodukte. Also eine scheinbare Umkehrung der Verdauung. Daß diese Umkehrung in der Tat nur eine scheinbare ist, ebenso, daß es sich nicht etwa um Plasteinbildung handelt, konnten dieselben Autoren bereits in einer zweiten Mitteilung zeigen.²⁾

¹⁾ Delezenne, Mouton, Pozerski, Sur l'allure anormale de quelques protéolyses produites par la papaïne. C. R. de la Société de Biologie, 1906, Nr. 2, S. 68.

²⁾ Delezenne, Mouton, Pozerski, Sur la digestion brusque de l'ovalbumine et du sérum sanguin par la papaïne. C. R. de la Société de Biologie, 1906, Nr. 6, S. 309.

Wandten sie nämlich nach beendeter Digestionszeit zur Bestimmung des unverdauten Eiweißes andere Methoden als die Hitzefällung an, z. B. die Fällung mit Alkohol oder mit Trichloressigsäure, so war das Gewicht der Niederschläge nicht geringer, als in den Kontrollversuchen, in denen die Fermentwirkung ausgeschaltet war, d. h. es war eben keine Verdauung eingetreten, trotzdem die Gemische vor der Fällung bis zu 4 Stunden bei Zimmertemperatur oder im Brutschrank digeriert waren. Die Verdauung mußte also in den durch Hitze gefällten Proben erst in der kurzen Zeit eingetreten sein, in der sich die Temperatur von 40° bis 100° hob. Daß die Spaltung des Eiweißes dabei eine recht intensive ist, geht aus der Tatsache hervor, daß die Filtrate auch nach Sättigung mit Ammoniumsulfat starke Biuretreaktion mit roter Farbe gaben. Bei Zimmer- oder Brutschranktemperatur bleibt jedoch das Eiweiß auch nach tagelangem Stehen mit Papain unverdaut. So konnte Jonescu¹⁾, der die Resultate Delezennes und seiner Mitarbeiter vollauf bestätigte und in verschiedenen Punkten erweiterte, auch nach 7tägiger Digestion keine Verdauungsprodukte nachweisen. Man muß daher wohl annehmen, daß auch bei den älteren Versuchen mit gelöstem Eiweiß die eigentliche Verdauung erst während der Ausführung der Hitzefällung eingetreten ist.

Nach diesen Darlegungen setzt sich das Delezennesche Phänomen aus zwei getrennt zu betrachtenden merkwürdigen Erscheinungen zusammen: Erstens tritt hier die verdauende Wirkung erst bei für Fermente ungewöhnlich hohen Temperaturen ein, zweitens wird diese Verdauungskraft des Papains bei hoher Temperatur durch den vorhergehenden Kontakt mit dem Verdauungssubstrat bei Zimmer- oder Brutschranktemperatur geschwächt. Der günstige Einfluß so hoher Temperaturen ist zwar, wie gesagt, etwas Ungewöhnliches, aber er ist gerade für das Papain nicht neu. Die Beobachtung von Rossbach,²⁾ daß auch geringe Wärmegrade die Wirkung nicht unterstützen,

¹⁾ Jonescu, Über eine eigenartige Verdauung des Hühner- und Serumeiweißes durch Papain, Bioch. Zeitschrift, Bd. II, S. 177 (1906).

²⁾ Rossbach, Physiologische und therapeutische Wirkungen des Papayotins und Papains, Zeitschr. f. klin. Med., VI, S. 527.

steht ganz vereinzelt da. Den günstigen Einfluß höherer Temperaturen, als sie sonst für Fermentwirkungen in Betracht kommen, ersieht man dagegen aus einer Reihe auch älterer Arbeiten, wie denen von Wittmack,¹⁾ Roy,²⁾ Woodbury,³⁾ Kilmer.⁴⁾

Im folgenden wird uns hauptsächlich das zweite Phänomen beschäftigen, die Abnahme der Verdauungskraft beim Stehenlassen der Eiweißpapaingemische. Jonescu⁵⁾ hat diese Erscheinung durch eine Hypothese zu erklären versucht. Er sagt: «Es scheint, daß das an Receptoren sehr reiche Albuminmolekül die Fermentmoleküle bindet und neutralisiert. Die Menge des gebundenen Fermentes wird mit der Zeit immer größer, sodaß schon binnen 5 Stunden das Papain in seiner Wirkung sehr viel eingebüßt hat». Indem ich eine derartige Annahme als recht plausibel akzeptierte, ging ich bei meinen eigenen Untersuchungen von der Vorstellung aus, daß das Ferment von demjenigen Receptor des Eiweißmoleküls gebunden wird, von dem aus eventuell die zymophore Gruppe ihre Wirkung entfaltet, und daß diese Bindung im Laufe der Digestion zu einer besonders festen, schwer zu lösenden wird. Man kann sich nun einerseits vorstellen, daß die fest gebundenen Fermentmoleküle für eine Wirkung auf andere Eiweißmoleküle nicht mehr in Betracht kommen, andererseits, daß das Ferment auch auf das Eiweißmolekül, mit dem es in so schwerlöslichem Konnex steht, keine Wirkung ausüben kann und sich so die Abnahme der verdauenden Kraft erklären. Natürlich ist es möglich, auch andere spezifische Reaktionen zur Erklärung des Phänomens heranzuziehen, wie Antifermente oder andere ablenkende Atomgruppierungen, und gewiß liegt den dargelegten

¹⁾ a. a. O.

²⁾ Roy, On the solvent action of papaya juice on the nitrogenous articles of food, *Glasg. Med. Journ.*, Bd. VI, S. 33 (1874).

³⁾ Woodbury, On the digestive ferment of the *Carica papaya* in gastro-intestinal disorders, *New-York Med. Journ.*, Bd. LVI, S. 115 (1892).

⁴⁾ Kilmer, The Story of the Papain, *Amer. Journ. of Pharmacy*, Bd. LXXIII (1901), zitiert nach Windmüller, a. a. O.

⁵⁾ a. a. O.

Vorstellungen nur eine Annahme zugrunde, nämlich, daß das Ferment mit dem Substrat vorübergehend mittels einer haptophoren Gruppe in Verbindung tritt, eine allerdings landläufige Annahme, welche aber besonders nach den Ausführungen von Jacoby¹⁾ keineswegs zwingend erscheint. Immerhin ist sie sehr wohl diskutierbar, und es schien mir nicht ungeeignet, sie bei einem Studium der hier zu behandelnden Erscheinungen als Grundlage zu betrachten. Wenn auch meine Versuche nicht imstande sind, den Mechanismus des merkwürdigen Phänomens aufzuklären, so will ich doch über einige Befunde berichten, die ich erheben konnte, und die wohl einiges Interesse bieten dürften.

Zunächst glaubte ich einige anderweitige eventuell in Betracht kommende Faktoren ausschalten zu müssen: Es wäre denkbar, daß die Papainlösungen an und für sich beim Stehen an Wirksamkeit verlieren. Dies konnte ich in der Tat gelegentlich beobachten, allerdings nicht regelmäßig, und auch dann, wenn eine Abnahme konstatiert wurde, erreichte sie nicht den Grad, wie er sich bei Eiweiß-Papaingemischen fand, die gleich lange Zeit vor dem Erhitzen gestanden hatten. Sodann wäre es möglich, daß das Alkali der angewandten Eiweißlösungen einen schädigenden Einfluß auf das Ferment²⁾ ausübte. Ich setzte daher Papainlösungen, bevor ich sie mit dem Eiweiß zusammenbrachte, der Einwirkung von Alkalien aus. Wie in diesen Versuchen, so arbeitete ich während des ganzen Verlaufs meiner Untersuchungen mit frischem Hühnereiweiß und dem Merckschen Präparat «Papain». In jeder Versuchsprobe wurden 20 ccm einer mit physiologischer Kochsalzlösung auf das 3fache verdünnten filtrierten Eiweißlösung (1 Vol. Eiweiß: 2 Vol. Kochsalzlösung) der Einwirkung von 2,5 ccm einer 2⁰/₁₀-igen filtrierten Papainlösung (ebenfalls in physiologischer Kochsalzlösung) unterworfen, also dasselbe Verhältnis, das Delezenne, Mouton, Pozerski und Jonescu angewandt haben. Der Grad der verdauenden Wirkung wurde in den ersten Versuchen durch Gewichtsbestimmungen des durch Hitze bei schwach

¹⁾ M. Jacoby, Immunität und Disposition. Wiesbaden 1906, S. 92.

²⁾ Die frisch bereiteten Papainlösungen reagieren schwach sauer.

saurer Reaktion gefällten Koagulums gemessen, später, da sich dies in jeder Beziehung als vorteilhafter erwies, durch Stickstoffbestimmungen in aliquoten Teilen des Filtrates. Die Digestionsgemische ließ ich in 50 ccm-Meßkölbchen entsprechende Zeit lang bei Zimmertemperatur stehen ohne Anwendung eines Desinfektionsmittels, da es sich um nicht mehr als 5–6 Stunden handelte. — Übrigens bewirkte Zusatz von Chloroform oder Brutschranktemperatur, wie ich mich überzeigte, keinen Unterschied. — Danach wurde mit ca. 3 Tropfen 30%iger Essigsäure angesäuert, im Wasserbade auf 95° erhitzt, nach dem Erkalten bis zur Marke (50 ccm) aufgefüllt, filtriert und von dem Filtrat immer 25 ccm (entsprechend 10 ccm der Eiweißlösung) mit Pipette zur Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl entnommen. Zur Bestimmung der Gesamtmenge des Eiweißes wurde stets in 10 ccm der Eiweißlösung direkt eine Stickstoffbestimmung ausgeführt. Außerdem wurde eine Probe der Eiweißlösung (20 ccm) unter Zusatz von 2,5 ccm physiologischer Kochsalzlösung, resp. durch Erhitzen vollkommen unwirksam gemachter Fermentlösung auf 95° erwärmt und entsprechend weiter verarbeitet. Der so gefundene N-Wert (Ovomucoid-N) wurde bei der Berechnung der übrigen Proben in Abzug gebracht. Die so erhaltenen Zahlen wurden dann durch Multiplikation mit 6,25 auf Eiweiß umgerechnet und werden auch in dieser Form hier aufgeführt werden. Der Stickstoffgehalt der angewandten Fermentlösung wurde nicht berücksichtigt, er beträgt für 2,5 ccm ca. 0,0028 g = 0,0175 g Eiweiß und hätte, falls er mitverrechnet worden wäre, die Ausschläge ein wenig verschärft.

Um nun die Wirkung des Alkalis zu prüfen, stellte ich folgende Versuche an:

1. 10 ccm Eiweißlösung direkt nach Kjeldahl verarbeitet.

$$\text{Gesamteiweiß} = 0,2769 \text{ g.}$$

2. Zu 20 ccm Eiweißlösung 2,5 ccm Papainlösung. Nach 1 Min. mit 3 Tropfen Essigsäure angesäuert, auf 95° erhitzt, dann, wie beschrieben, weiter verarbeitet.

$$\text{Verdautes Eiweiß} = 0,1287 \text{ g.}$$

3. Zu 20 ccm Eiweißlösung 2,5 ccm Papainlösung. Nach

5¹/₄ Stunden mit 3 Tropfen Essigsäure angesäuert, auf 95° erhitzt und weiter, wie oben.

Verdautes Eiweiß = 0,0681 g.

4. Eiweiß- und Papainlösung getrennt aufgestellt. Nach 5³/₄ Stunden zu 20 ccm Eiweißlösung 2,5 ccm Papainlösung. Nach 1 Min. langer Digestion wiederum 3 Tropfen Essigsäure zugesetzt und auf 95° erhitzt.

Verdautes Eiweiß = 0,1050 g.

5. Es werden getrennt angesetzt: 20 ccm Eiweißlösung und 20 ccm Papainlösung, letztere mit 0,5 ccm $n_{/1}$ -Na₂CO₃ versetzt.¹⁾ Nach 5³/₄ Stunden zur Papainlösung 0,5 ccm $n_{/1}$ -HCl, darauf 2,5 ccm der so vorbehandelten Papainlösung zur Eiweißlösung. Nach 1 Min. langer Digestion 3 Tropfen Essigsäure dazu, auf 95° erhitzt.

Verdautes Eiweiß = 0,0825 g.

Man sieht aus diesem Versuch, daß der Zusatz des Alkalis einen deutlich schädigenden Einfluß auf das Ferment ausgeübt hat. Ähnliche Resultate erhielt ich durch Zusatz von Natronlauge. Trotzdem der Alkalitätsgrad wohl mehr als noch einmal so groß war wie in den Eiweißpapaingemischen, blieb die Schädigung hinter der bei diesen in noch etwas kürzerer Zeit beobachteten zurück. Zudem wird sie bei diesen auch nicht geringer, wenn man während der Digestionszeit neutrale Reaktion herstellt, wie der folgende Versuch lehrt:

1. 10 ccm Eiweißlösung direkt zur Stickstoffbestimmung verarbeitet.

Gesamteiweiß = 0,3375 g.

2. Zu 20 ccm Eiweißlösung 2,5 ccm Papainlösung. Nach 1 Min. mit 3 Tropfen Essigsäure angesäuert, auf 95° erhitzt.

Verdautes Eiweiß = 0,1381 g.

3. Zu 20 ccm Eiweißlösung 2,5 ccm Papainlösung. Nach 5 Stunden 3 Tropfen Essigsäure dazu, auf 95° erhitzt.

Verdautes Eiweiß = 0,0675 g.

¹⁾ Es sei bemerkt, daß sowohl in diesem Versuch, wie in allen in Betracht kommenden Fällen stets durch Auffüllen mit physiologischer Kochsalzlösung eine in allen Proben gleichmäßige Verdünnung hergestellt wurde.

4. 20 ccm Eiweißlösung, angesetzt mit 2,5 ccm Papainlösung. Gemisch mit 0,2 ccm n_{1} -HCl neutralisiert. Nach $5\frac{1}{2}$ Stunden 0,2 ccm n_{1} -NaOH + 3 Tropfen Essigsäure dazu, auf 95° erhitzt.

Verdautes Eiweiß = 0,0681 g.

Wenn somit auch außer Zweifel ist, daß das Papain durch Alkali geschädigt wird, so spielt dies doch für die uns interessierende Hemmung durch flüssiges Hühnereiweiß und Serum höchstens eine untergeordnete Rolle. Vielmehr muß der Grund für diese in andern Umständen gesucht werden.

Indem ich von der oben auseinandergesetzten Vorstellung einer sich während der Digestion verfestigenden Bindung zwischen Ferment und Substrat ausging, versuchte ich nunmehr einen anderen Weg.

Im Sinne Ehrlichs gehen die mit den Fermenten des öfteren mit mehr oder weniger Recht verglichenen Toxine mit den spezifischen Antitoxinen feste Verbindungen ein, welche man früher zu trennen außerstande war. Nun ist es neuerdings Morgenroth¹⁾ gelungen, das Cobrahämolyisin und -Neurotoxin durch Behandlung mit Salzsäure in Formen überzuführen, in denen sie die Fähigkeit, ihre spezifischen Antitoxine zu binden, nicht mehr besitzen. Diese Umwandlung gelingt auch nach stattgehabter Bindung, sodaß es möglich ist, durch Salzsäurezusatz eine Spaltung der Toxin-Antitoxinverbindung herbeizuführen. Dasselbe Verhalten wies Jacoby²⁾ für ein Ferment und sein entsprechendes Antiferment nach. Er konnte zeigen, daß schon ein sehr minimaler Säuregrad die Wirkung des Antilabs auf das Lab hemmt und daß auch in einem unwirksamen Lab-Antilabgemisch ein Säurezusatz die Labwirkung wieder hervorrufen kann. Es sei auch bemerkt, daß es nach

¹⁾ Morgenroth. Über die Wiedergewinnung von Toxin aus seiner Antitoxinverbindung, Berl. klin. Wochenschrift, 1905, Nr. 50.

Morgenroth. Weitere Beiträge zur Kenntnis der Schlangengifte und ihrer Antitoxine, Arbeiten aus dem Pathologischen Institut, Berlin 1906.

²⁾ M. Jacoby. Über die Beziehungen der Verdauungswirkung und der Labwirkung. Bioch. Zeitschr., Bd. I, S. 53 (1906).

Jacoby¹⁾ gelingt, Trypsin, das von Fibrinflocken absorbiert ist, durch Salzsäure von ihnen wieder abzulösen. Nach derartigen Befunden schien es nicht aussichtslos, ausgehend von unserer Annahme, daß die Abnahme der Papainwirkung durch eine zu feste Bindung an das Eiweiß bedingt sei, zunächst einmal den Versuch zu machen, diese Bindung durch einen Salzsäurezusatz zu verhindern. Dies bezweckte der folgende Versuch: Die Menge des Gesamteiweißes betrug hier 0,3644 g. Es wurden angesetzt:

1. 20 ccm Eiweißlösung mit 2,5 ccm Papainlösung. Nach 1 Min. mit 3 Tropfen Essigsäure angesäuert, auf 95° erhitzt.

Verdautes Eiweiß = 0,1594 g.

2. 20 ccm Eiweißlösung mit 2,5 ccm Papainlösung. Nach 5³/₄ Stunden 3 Tropfen Essigsäure dazu, auf 95° erhitzt.

Verdautes Eiweiß = 0,0887 g.

3. 20 ccm Eiweißlösung mit 2,5 ccm Papainlösung und 0,6 ccm n_{1} -HCl. Nach 6 Stunden 0,6 ccm n_{1} -NaOH und 3 Tropfen Essigsäure dazu, auf 95° erhitzt.

Verdautes Eiweiß = 0,1550 g.

Wie aus diesem Versuche hervorgeht, war die Salzsäure in der Tat imstande, das hindernde Moment zu beseitigen. Denn nach 6stündiger Digestion unter Salzsäurezusatz betrug die Menge der nicht koagulablen Verdauungsprodukte annähernd ebensoviel wie nach 1 Min. langem Zusammensein von Eiweiß mit Ferment ohne einen Zusatz. Dieses Resultat wurde häufig bestätigt. Salzsäure, in geringerer Konzentration als in dem eben beschriebenen Versuche angewandt, z. B. 0,25 ccm n_{1} -HCl auf 22,5 ccm Eiweißpapaingemisch, ebenso Essigsäurezusatz, auch bei stärkerer Konzentration, übten einen wesentlich schwächeren Einfluß in derselben Richtung aus, während neutrale Reaktion, wie schon erwähnt, das Phänomen der Abnahme der Verdauungskraft absolut nicht beeinträchtigte.

Nun wurde versucht, ob es auch gelingt, nach Ablauf der üblichen Digestionsdauer (ca. 5 Stunden bei Zimmertem-

¹⁾ M. Jacoby, Zur Kenntnis der Fermente und Antifermente, Bioch. Zeitschr., Bd. II, S. 144 (1906).

peratur) bei der ursprünglichen Reaktion durch nachträgliche Salzsäureeinwirkung (ca. 20 Stunden im Eisschrank) die ursprüngliche Verdauungskraft wiederherzustellen. Dies glückte nicht. Jedoch war von Beginn der Salzsäureeinwirkung an keine weitere Abnahme zu bemerken, während sie in den Kontrollversuchen ohne Salzsäurezusatz auch im Verlaufe der weiteren 20 Stunden deutlich zu verfolgen war. Ließ man die Verdauungsgemische auch die ganzen 25 Stunden von vornherein bei salzsaurer Reaktion stehen, so war die Verdauungskraft etwa ebenso groß wie bei den Proben, die nur 5 Stunden mit Salzsäurezusatz digeriert hatten, resp. wie bei den Proben ohne vorangegangene Digestion.

Vorbehandlung der Papainlösungen durch Salzsäurezusatz oder Herstellung neutraler Reaktion für einige Stunden, verstärkte weder die eigentliche Fermentwirkung, noch erhöhte sie die Widerstandskraft des Fermentes gegenüber den schädigenden Einflüssen beim Kontakt mit der Eiweißlösung. Manchmal wurde auch nach einer derartigen Vorbehandlung, namentlich bei neutraler Reaktion, eine geringe Schwächung beobachtet, die ja auch, wie wir oben sahen, in Fermentlösungen, die ohne jeden Zusatz einige Stunden gestanden haben, sich zeigt. Daß Vorbehandlung mit Alkalien deutlich schädigt, haben wir ebenfalls schon gesehen.

Eine Eiweißlösung, die vor dem Zusammenbringen mit dem Papain für ca. 20 Stunden der Einwirkung von Salzsäure ausgesetzt war, zeigte auch in ihrer Verdaulichkeit nach 1 Min. oder 5 Stunden langer Digestion mit dem Ferment keinen wesentlichen Unterschied gegenüber einer unbehandelten.

Das positive Resultat all dieser Versuche ist, daß es durch Zusatz einer gewissen Menge Salzsäure zu dem Eiweißpapaingemisch gelingt, die Wirksamkeit des Fermentes den unbekanntem schädigenden Einflüssen gegenüber in ihrer ursprünglichen Größe zu erhalten.

Aus den Untersuchungen von Delezenne, Mouton, Popperski und denen von Jonescu geht hervor, daß das Papain auf flüssiges Hühnereiweiß bei Zimmer- oder Brutschrank-

temperatur während einer Beobachtungszeit von 5 Stunden bis 7 Tagen gar keine spaltende Wirkung ausübt. Die genannten Autoren ließen jedenfalls ihre Verdauungsgemische stets bei der ursprünglichen alkalischen Reaktion digerieren. Es war nun möglich, daß der von mir beschriebene Einfluß der Salzsäure doch auf einer durch sie bedingten Verdauung bei Zimmertemperatur beruhte, eine Vermutung, welche sich tatsächlich durch den folgenden Versuch bestätigt fand. Um die aktivierende Wirkung der Hitze zu umgehen, bediente ich mich nach dem Vorgange Delezennes und seiner Mitarbeiter zur Fällung der unverdauten Eiweißkörper der Trichloressigsäure. Diese fällt das Eiweiß, sowie einen kleinen Teil der Albumosen. Man kocht nach der Fällung auf, wobei auch die etwa mit ausgefallenen Albumosen in Lösung gehen, und filtriert das Gemisch heiß. Eine Aktivierung durch die Hitze findet bei Anwendung von Trichloressigsäure nicht statt, da, wie Delezenne, Mouton und Pozerski gezeigt haben, durch ihre Anwesenheit jegliche verdauende Wirkung des Pappäins auch beim Aufkochen aufgehoben ist. Nach Ablauf der Digestionszeit wurden die Eiweißpapaingemische mit dem gleichen Volumen 10%iger Trichloressigsäure versetzt, sogleich aufgekocht und filtriert. Der Niederschlag wurde mit heißer Trichloressigsäure solange gewaschen, bis die Waschflüssigkeit keine Biuretreaktion mehr gab, dann samt Filter in einen Oxydationskolben gespült und sein Stickstoffgehalt nach Kjeldahl bestimmt. Die gefundenen Werte, welche die Menge der unverdauten Substanz angeben, wurden auch hier auf Eiweiß umgerechnet. In dieser Weise wurden folgende Proben verarbeitet:

1. 10 ccm Eiweißlösung direkt mit dem gleichen Volumen 10%iger Trichloressigsäure gefällt.

Gesamteiweiß = 0,3475 g.

2. 10 ccm Eiweißlösung versetzt mit 1,25 ccm Pappainlösung. Nach 1 Minute mit dem gleichen Volumen 10%iger Trichloressigsäure gefällt.

Unverdautes Eiweiß = 0,3492 g.

3. 10 ccm Eiweißlösung mit 1,25 ccm Papainlösung versetzt. Nach $5\frac{1}{4}$ Stunden mit dem gleichen Volumen 10%iger Trichloressigsäure gefällt.

Unverdautes Eiweiß = 0,3463 g.

4. 10 ccm Eiweißlösung mit 1,25 ccm Papainlösung + 0,3 ccm n_{11} -HCl versetzt. Nach $5\frac{1}{2}$ Stunden 0,3 ccm n_{11} -NaOH dazu, mit Trichloressigsäure gefällt.

Unverdautes Eiweiß = 0,2925 g.

Wie der Versuch lehrt, werden bei Zimmertemperatur und salzsaurer Reaktion von 3,5 deg Gesamteiweiß innerhalb 5 Stunden ca. 5 cg verdaut (das Filtrat gab intensive Biuretreaktion mit roter Farbe), während bei der ursprünglichen alkalischen Reaktion die Menge der Verdauungsprodukte nur ca. 1 mg betrug, also verschwindend klein war. Dieser geringe Wert mag übrigens wohl innerhalb der Fehlergrenze liegen. Salzsäure ohne Anwesenheit von Ferment bewirkte natürlich keine Verdauung. Die Größe der Verdauung durch Papain bei Zimmertemperatur unter Gegenwart von Salzsäure entspricht, wie ein besonderer Versuch gezeigt hat, ungefähr der Abnahme der bei hoher Temperatur und Abwesenheit von Trichloressigsäure sich einstellenden Verdauungskraft, welche das Papain im Kontakt mit den Eiweißlösungen bei alkalischer, resp. neutraler Reaktion in demselben Zeitraum erfährt. Nach diesen Ergebnissen ist die einfache Vorstellung, daß die Salzsäure eine zu feste Verbindung von Eiweißmolekül und Ferment verhindert, und somit größere Fermentmengen disponibel werden, wohl etwas zu modifizieren.

Aus dem Umstande, daß die Verdauungsgröße bei salzsaurer Reaktion und Zimmertemperatur ungefähr gleich ist ihrer Abnahme bei alkalischer Reaktion, wäre ich geneigt, zu schließen, daß zwischen ersterer und letzterer eine gewisse kausale Beziehung besteht, derart, daß die Salzsäure gerade an den zu fester Bindung disponierten Molekülen ihre Verdauung auslösende Wirkung entfaltet. Man könnte sich vorstellen, daß beim Zerfall des Substrates auch eine Loslösung des Fermentes eintritt, eine Ansicht, welche gerade für die Papain-

verdauungⁿ von Wurtz¹⁾ auf Grund seiner Fibrinabsorptionsversuche vertreten wurde, und daß hier in unserem Falle unter dem Einfluß der Salzsäure zugleich mit der Verdauung das Papain nach vorgängiger Bindung wieder frei würde. Fuld²⁾ konnte in Mischungen von Lab und Milch bei erneuten Prüfungen der Labwirkung zunächst eine Abnahme derselben, mit Vollendung des Labungsvorganges aber wieder eine Zunahme konstatieren.

Ich versuchte daher, ob ich nach der bei Gegenwart von Salzsäure (bei Zimmertemperatur) eingetretenen Papainwirkung an einem neuen Substrat eine stärkere Wirkung feststellen konnte, als da, wo bei alkalischer Reaktion der Eiweißpapaingemische der eigentliche Verdauungsvorgang unterdrückt war. Ich benutzte dazu 8%ige Gelatine. Nach Windmüller³⁾ wird diese durch geringe Mengen Papain (Witte) im Gegensatz zu Agar-Agar verflüssigt. Auch ich fand die Wirkung des Papains (Merck) sehr stark: 1 mg verflüssigte innerhalb 2 Stunden bei Brutschranktemperatur 5 ccm 8%ige Gelatine. Möglicherweise muß man im Papain auch eine besondere Gelatinase annehmen. Nach Vorbehandlung mit Hühnereiweißlösungen konnte ich zwar eine geringe Abnahme der Wirkung auf Gelatine konstatieren, aber dieselbe war nicht so bedeutend, wie sie nach der Verdauungshemmung in den Eiweißpapaingemischen hätte erwartet werden müssen. Salzsäurezusatz verhinderte diese Abnahme nicht. Es scheint sogar, daß die Gelatine verflüssigende Wirkung des Papains durch Salzsäure beeinträchtigt würde.

Ein gewisses Interesse bot des weiteren die Frage, ob nach 5-stündiger Digestion der Eiweißpapaingemische ein erneuter Zusatz von Ferment die Verdauungskraft auf ihre ursprüngliche Größe zu bringen imstande wäre. Dies ist der

¹⁾ a. a. O. Wurtz konnte, wenn er mit Papain beladene Fibrinflocken, von denen das Ferment durch gründliches Waschen nicht abgelöst werden konnte, bei 40° in Wasser digerieren ließ, nach eingetretener Lösung derselben das Papain im Wasser wieder nachweisen.

²⁾ Fuld, Vortrag in der Berliner Physiolog. Gesellsch., 18. Januar 1907. Ref. in Deutsch. Med. Wochenschr., 1907, S. 321.

³⁾ a. a. O.

Fall. Setzte ich nach 5stündigem Kontakt von Ferment und Eiweiß (in der gewohnten Konzentration) noch einmal dieselbe Menge Ferment hinzu und erhitze das angesäuerte Gemisch auf 95°, so überschritt die Menge der Spaltungsprodukte sogar bedeutend diejenige, welche nach sofortigem Erhitzen erhalten worden war. Diese Beobachtung steht im Widerspruch zu einer Angabe Osswalds,¹⁾ welcher bei seinen Versuchen mit Papain-Reuss bei schwächerer Fermentkonzentration (0,1 : 100) bessere Wirkung fand, als bei stärkerer.

Im folgenden soll uns nun noch die in der Hitze brüsk eintretende Verdauung von gelöstem Hühnereiweiß ein wenig beschäftigen. Nach Harlay²⁾ hebt eine Temperatur von 82,5° die Papainwirkung völlig auf. Jonescu fand, daß die Hitzeverdauung zwischen 80 und 90° ihr Maximum erreicht. Ich erhitze eine 2%ige Papainlösung 20 Minuten lang auf 83° und fand sowohl für die brüske Verdauung in der Hitze, wie auch für die Verdauung in der Kälte bei Salzsäuregegenwart nur eine geringe Abnahme der Wirkung. Dagegen wird durch einmaliges Erhitzen auf 95° das Ferment völlig zerstört.

In den bisherigen Versuchen wurde vor dem Erhitzen, d. h. vor dem Inkrafttreten der Verdauung, mit Essigsäure angesäuert. Über den Verlauf der brüsken Verdauung bei der ursprünglichen alkalischen und bei neutraler Reaktion sind von den früheren Untersuchern keine Versuche angestellt worden. Ich hielt es daher für angebracht, auch diese Verhältnisse einer Prüfung zu unterziehen. Das Ergebnis zeigt der folgende Versuch:

1. 10 ccm Eiweißlösung zur Stickstoffbestimmung verarbeitet.

Gesamteiweiß = 0,2763 g.

2. Zu 20 ccm Eiweißlösung 2,5 ccm Papainlösung. Nach 1 Minute mit 3 Tropfen Essigsäure angesäuert, auf 95° erhitzt.

Verdautes Eiweiß = 0,1169 g.

¹⁾ a. a. O.

²⁾ Harlay, Über eine eigentümliche Reaktion der Produkte der Papainverdauung und über die Wirkung der Hitze auf Papain. C. R. de la Société de Biologie, Bd. LII, S. 112. Zitiert nach Malys Jahrb., 1900, S. 380.

3. 20 ccm Eiweißlösung mit 2,5 ccm Papainlösung angesetzt. Nach $4\frac{3}{4}$ Stunden 3 Tropfen Essigsäure zugefügt, auf 95° erhitzt.

Verdautes Eiweiß = 0,0712 g.

4. Zu 20 ccm Eiweißlösung 2,5 ccm Papainlösung + 0,6 ccm $\frac{n}{1}$ -HCl. Nach $5\frac{1}{2}$ Stunden 0,6 ccm $\frac{n}{1}$ -NaOH + 3 Tropfen Essigsäure dazu, auf 95° erhitzt.

Verdautes Eiweiß = 0,1187 g.

5. 20 ccm Eiweißlösung mit 2,5 ccm Papainlösung versetzt. Nach 1 Minute ohne Ansäuern auf 95° erhitzt, erkalten gelassen, jetzt mit 3 Tropfen Essigsäure angesäuert, wiederum auf 95° erhitzt.

Verdautes Eiweiß = 0,1869 g.

6. Gemisch von 20 ccm Eiweißlösung und 2,5 ccm Papainlösung nach 5stündiger Digestion wie 5 verarbeitet.

Verdautes Eiweiß = 0,1537 g.

7. 20 ccm Eiweißlösung mit 2,5 ccm Papainlösung + 0,6 ccm $\frac{n}{1}$ -HCl versetzt. Nach $5\frac{1}{4}$ Stunden 0,6 ccm $\frac{n}{1}$ -NaOH dazu, dann weiter wie 5 und 6 behandelt.

Verdautes Eiweiß = 0,1869 g.

Dasselbe Resultat, wie in diesem Versuche, wo das Erhitzen bei alkalischer Reaktion vorgenommen wurde, erhielt ich auch bei Herstellung neutraler Reaktion. Es ist also im Gegensatz zu der Papainverdauung in der Kälte für die bruske Hitzeverdauung alkalische und neutrale Reaktion bedeutend vorteilhafter als saure. Das Phänomen der Verdauungshemmung durch vorhergehende Digestion bei Zimmertemperatur sowie der Erfolg des Salzsäurezusatzes treten auch hier ungefähr in demselben Umfange zutage, wie in den Fällen, wo die nachfolgende Erhitzung bei saurer Reaktion vorgenommen wurde.

Es war zu erwägen, ob diese auffallend starke Steigerung der Fermentwirkung nicht etwa vorgetäuscht würde durch eine sich beim Erhitzen bei alkalischer oder neutraler Reaktion vollziehende Umwandlung des Albumins in einen globulin-, resp. alkalialbuminatähnlichen Körper, wie sie ja, allerdings

für verdünntere Albuminlösungen, bekannt ist.¹⁾ Man müßte dann annehmen, daß der nachträgliche Zusatz von 3 Tropfen Essigsäure einen Überschuß darstellte, in dem ein Teil des Eiweißes gelöst bliebe. Diese Bedenken wurden indessen durch einen Kontrollversuch behoben, in dem zwei gleiche Eiweißlösungen ohne Fermentzusatz, die eine sofort angesäuert, die andere erst bei alkalischer Reaktion und nach dem Erkalten noch einmal bei saurer Reaktion auf 95° erhitzt wurden. Daß es sich nicht etwa um eine Addition der Wirkungen durch 2maliges Erhitzen handelt, geht daraus hervor, daß, wie ich mich überzeugte, das Papain durch einmaliges Erhitzen auf 95° zerstört wird. Vielleicht liegt die Erklärung darin, daß beim erstmaligen Erhitzen ohne Ansäuern die Ausfällung weniger vollständig geschieht und somit ein Teil des Eiweißes der Fermentwirkung besser zugänglich bleibt.

Am Schlusse der vorliegenden Arbeit sage ich Herrn Geheimrat Salkowski für die Anregung zu diesen Untersuchungen, sowie seine mir stets gebotene liebenswürdige Unterstützung meinen herzlichsten Dank.

¹⁾ Conf. Starke, Über Transformation von Albumin in Globulin, Zeitschr. f. Biol., Bd. XL, S. 494 (1900), und Moll, Über künstliche Umwandlung von Albumin in Globulin, Beitr. zur chem. Physiol. u. Pathol., Bd. IV, S. 563 (1904), Bd. VII, S. 311 (1906).