

Über die Specificität der Glutinasen.

Von

Privatdozenten Dr. A. Ascoli und Dr. B. Neppi.

(Aus dem serotherapeutischen Institute in Mailand.)

(Der Redaktion zugegangen am 11. Mai 1908.)

Die streng spezifische Auffassung der Wirkungsweise der Fermente ist in neuester Zeit derartig erschüttert worden, daß vor kurzem der eine von uns¹⁾ mit Nachdruck die Notwendigkeit betonte, unsere Anschauungen über die Spezifität der Enzyme, vom Standpunkte der Lehre von der Reaktionsbeschleunigung durch Fremdstoffe aus, einer Sichtung und Richtigstellung zu unterziehen. Es ist nämlich eine unbestrittene Tatsache, daß die kolloidalen Katalysatoren nicht nur oberflächliche Analogien mit den Enzymen aufweisen, vielmehr durch ihre Modelleigenschaften als anorganische Fermente²⁾ uns das Verständnis und das Studium der komplizierteren eigentlichen Fermente wesentlich erleichtern. Es soll ja damit nur eine Übereinstimmung in den wesentlichsten Zügen angestrebt und ein Einblick in die allzu empirische Fermentlehre ermöglicht werden, wobei freilich in den Einzelheiten noch gar manche unüberbrückte Kluft bestehen dürfte. Aber gerade die jüngsten stereochemischen Ansätze³⁾ in der Lehre von der Katalyse geben uns einen Wink dafür, daß die vermuteten Gegensätze bei einem tieferen Studium sich als unhaltbar erweisen dürften.

¹⁾ Ascoli, Concetto odierno di fermento. Rassegna di bacterio-opo e sieroterapia. Anno III, fasc. 6—8 Juni-August 1907, Seite 26 und folg.

²⁾ Bredig, Die Elemente der chemischen Kinetik mit besonderer Berücksichtigung der Katalyse und der Fermentwirkungen. Ergebnisse der Physiologie, Bd. I, S. 134, 1902.

³⁾ Bredig u. Fajans, Zur Stereochemie der Katalyse. Berl. Ber., J. 41, Nr. 4, S. 752.

Namentlich aber eine Eigenart der Enzyme, ihre spezifische Wirkung, ist es, welche zu ihrer Sonderstellung als spezifische Katalysatoren geführt hat, und gerade der Begriff der Specificität scheint dem Gebiete der Fermentlehre ein besonderes Gepräge zu verleihen. Demgegenüber muß hervorgehoben werden, daß die Fermentwirkungen nicht immer streng spezifisch sind, da ein und dasselbe Enzym verschiedene Reaktionen auszulösen vermag, wie das Emulsin, welches Arbutin, Helicin, Salicin, Phloridzin, Coniferin und Aeskulin zu spalten vermag,¹⁾ oder die Laccase, welche eine ganze Reihe mehrwertiger Phenole oxydiert,²⁾ oder Pepsin und Trypsin, welche verschiedene Polypeptide³⁾ angreifen. Immerhin ist die Möglichkeit nicht von der Hand zu weisen, daß in den chemisch nicht näher bekannten Extrakten, die wir Emulsin, Laccase oder Trypsin nennen, ebensoviele Fermente vorkommen mögen, als sie Fermentwirkungen auszulösen vermögen. Der Grund für die in dieser Frage herrschende Unsicherheit liegt eben in der Mangelhaftigkeit unserer Kenntnisse über die chemische Zusammensetzung der Fermente, weil die zu ihrer Charakterisierung angestellten Untersuchungen insgesamt als nicht einwandfrei sich erwiesen haben, sondern bei einer strengen Kritik⁴⁾ mit zahlreichen und unkontrollierbaren Fehlerquellen behaftet erscheinen. Mit Recht betont deshalb Emil Fischer,⁵⁾ daß die Lösung der Frage nach der chemischen Natur der Fermente erst durch deren Synthese möglich sein wird. Bis

¹⁾ Oppenheimer, Die Fermente und ihre Wirkungen. Leipzig 1903.

²⁾ Bertrand, Sur les rapports qui existent entre la constitution chimique des composés organiques et leur oxydabilité sous l'influence de la laccase. Compt. rend., t. 122, 1896.

³⁾ Fischer u. Bergell, Über die Derivate einiger Dipeptide und ihr Verhalten gegen Pankreasfermente. Berl. Ber., Bd. XXXVI, S. 2592. Spaltung einiger Dipeptide durch Pankreasferment. Berl. Ber., Bd. XXXVII, S. 3103. Siehe auch Abderhalden, Diese Zeitschrift, Bd. XLVI.

⁴⁾ Ascoli, Dissertazione di libera docenza. Milano, Tipo-litografia Ceriani e Cesana 1907, pag. 65.

⁵⁾ Fischer, Die Chemie der Proteine und ihre Beziehungen zur Biologie. Sitzungsberichte der K. preuß. Akad. der Wissensch., 24. Januar 1907.

dahin werden wir aber in keiner Weise ausschließen können, daß in der Lösung, die wir auf Grund ihrer Wirkungsweise mit einem bestimmten Namen belegen, neben der aktiven Substanz anderweitige fremde Körper sich vorfinden. Eben-sowenig darf aber auch auf die Abwesenheit eines Fermentes dort geschlossen werden, wo dessen Wirkung ausbleibt, weil letztere irgendwie maskiert oder gehemmt sein kann, wie dies z. B. Hafner¹⁾ beim Invertin beobachtete, welches durch Ammoniak leicht vergiftet werden kann und bei der einfachen Dialyse sich schnell wieder erholt.

Mit diesen Fehlerquellen sind aber leider auch die Untersuchungen behaftet, auf Grund welcher bestimmten Fermenten eine strenge Specificität zuerkannt wurde.

Einen glänzenden Beleg dafür bieten uns die schönen Untersuchungen von Pawlow und Parastschuk²⁾ über Pepsin und Labferment, durch welche bewiesen wurde, daß die von Hammarsten³⁾ auf chemischem Wege bewerkstelligte Trennung der beiden Fermente auf einer Täuschung beruht, insofern mit der Methode von Hammarsten bloß eine Maskierung oder Hemmung einer der beiden Fermentwirkungen erzielt wurde: sobald nämlich durch Ansäuern oder Dialyse die hemmenden Faktoren beseitigt waren, gelang es, sowohl die labende als die proteolytische Wirkung mit der erforderlichen Proportionalität in allen jenen Präparaten nachzuweisen, die als labfreies Pepsin oder umgekehrt als pepsinfreies Lab angesprochen wurden.

Es soll damit selbstverständlich der Begriff der Specificität bloß innerhalb seiner natürlichen Grenzen verwiesen werden und nur davor gewarnt sein, künstliche Laboratoriumsprodukte als spezifisch anzusprechen, ohne vorher den Einfluß der zu ihrer Darstellung verwendeten Reagenzien genau ausprobiert zu

¹⁾ Hafner, Einige Beiträge zur Kenntnis des Invertins der Hefe. Diese Zeitschrift, Bd. XLII, S. 27.

²⁾ Pawlow u. Parastschuk, Über die ein und demselben Eiweißfermente zukommende proteolytische und milchkoagulierende Wirkung verschiedener Verdauungssäfte. Diese Zeitschrift, Bd. XLII, S. 415, 1904.

³⁾ Hammarsten, Lehrbuch der physiologischen Chemie. Wiesbaden, Bergmann, 1907.

haben; es kann nämlich die Specificität dadurch vorgetäuscht sein, daß die Wirkung ein und derselben Substanz verschieden erscheinen kann, weil einfach das Medium, in dem sie sich abspielt, verändert ist.

Die oben aufgeworfene Frage, inwiefern ein natürlich vorkommendes Ferment als polyvalent oder als streng spezifisch zu betrachten sei, bleibt also offen. Man kann ebensogut mit Emil Fischer¹⁾ annehmen, daß bei der Spaltung chemisch einander nahestehender Körper ein und dasselbe Enzym tätig sei, trotzdem gerade die Forschungen Fischers über die Beziehungen zwischen stereo-chemischer Konfiguration und Vergärbarkeit für eine strenge Specificität der Fermente sprechen; mit demselben Rechte kann man aber auch die Ansicht vertreten, daß für jede Spaltung ein besonderes Enzym vorkommt, ohne daß es bei dem heutigen Stande unserer Kenntnisse möglich sei, eine Entscheidung in dieser Frage zu treffen.

Anders bei den durch chemische Eingriffe künstlich geschaffenen Specificitäten, wo der Verdacht berechtigt ist, daß bei der Darstellung unbeachtete Nebenfaktoren eine ursprünglich nicht existierende Specificität vorzutäuschen imstande seien. In diesem Sinne dürfte es wünschenswert erscheinen, alle chemischen Trennungsmethoden von Fermenten, bei denen die erwähnten Fehlerquellen nicht genügend berücksichtigt worden sind, einer strengen Nachprüfung zu unterwerfen, um derartige Kunstprodukte richtig beurteilen zu können.

Im folgenden wurde der Versuch gemacht, von diesem Gesichtspunkte aus die Frage nach der einheitlichen und spezifischen Natur des Pankreastrypsins wieder aufzuwerfen und in das richtige Geleise zu bringen. Es bietet nämlich die Frage, ob die proteolytische Wirkung des Pankreas auf die verschiedenen Eiweißkörper durch mehrere Fermente oder durch ein einziges polyvalentes ausgelöst wird, nicht nur ein theoretisches, sondern auch ein praktisches Interesse, insofern es für die Physiopathologie der Verdauung nicht gleichgültig sein kann, ob den verschiedenen mit der Nahrung eingeführten Eiweiß-

¹⁾ Fischer, Bedeutung der Stereochemie für die Physiologie. Diese Zeitschrift. Bd. XXVI.

körpern eine ganze Reihe von Fermenten entsprechen, wie man auf Grund des klassischen Vergleiches Emil Fischers von Schloß und Schlüssel und der glänzenden beim Studium der Vergärbarkeit von Polysacchariden und Polypeptiden erzielten Resultate a priori anzunehmen berechtigt wäre. Die vielfach angestellten Versuche, um aus dem Pankreas Fermente zu gewinnen, die ihre Wirkung bloß gegenüber bestimmten Eiweißkörpern zu entfalten imstande wären, wurden aber nur in einzelnen Fällen von Erfolg gekrönt. Mithin ist es erklärlich, daß Mays,¹⁾ trotz zahlreicher Untersuchungen, in der Frage, ob für die ereptische Wirkung der Pankreasextrakte ein Erepsin gefordert werden müsse, keine definitive Entscheidung zu treffen sich getraut. Ebenso berechtigt erscheinen uns auch die Zweifel, welche Sachs²⁾ bezüglich der Berechtigung äußert, die Nuclease als ein besonderes Enzym zu betrachten, obwohl er sich schließlich für letztere Annahme entscheidet. Derlei Zweifel sind umsomehr angebracht, als ja auch die Ansicht, daß die milchkoagulierende und die proteolytische Wirkung des Pankreas verschiedenen Fermenten angehören — erstere der Casease,³⁾ letztere dem Trypsin —, auf Grund der Pawlowschen Versuche⁴⁾ wohl als widerlegt betrachtet werden kann.

Speziell für die Gelatine, welche durch das Fehlen des Tyrosins und des Tryptophans unter ihren Spaltungsprodukten in ihrem chemischen Bau von den gewöhnlichen Proteinen abweicht, ist die Existenz eines besonderen Fermentes im Pankreas angenommen worden und ist diese sogenannte Glutinasen als ein spezifisches, vom Trypsin verschiedenes Enzym in die Hand- und Lehrbücher⁵⁾ übergegangen.

Von den Gesichtspunkten ausgehend, die oben eingehend erörtert wurden, schien es uns wünschenswert, dieses besondere

¹⁾ Mays, Beiträge zur Kenntnis der Trypsinwirkung. Diese Zeitschrift, Bd. XLIX.

²⁾ Sachs, Ist die Nuclease mit dem Trypsin identisch? Dissert., Heidelberg 1905. Über die Nuclease. Diese Zeitschrift, Bd. XLVI.

³⁾ Duclaux, Traité de microbiologie, Tome II, pag. 622.

⁴⁾ Pawlow u. Parastschuk, l. c., S. 425.

⁵⁾ Euler, Allgemeine Chemie der Enzyme. Ergebnisse der Physiologie, Bd. VI, S. 187, 1907. Siehe auch das Lehrbuch von Hammarsten.

im wesentlichen durch seine Widerstandsfähigkeit gegen Säuren charakterisierte Enzym näher zu studieren, um festzustellen, inwiefern seine Auffassung als spezifisches, vom Trypsin verschiedenes Enzym berechtigt sei.

Die zur Darstellung der Glutrinase¹⁾ empfohlene Methode besteht in Zusatz von Normalsalzsäure zum Pankreasextrakt und Neutralisierung mit Normalnatronlauge, nachdem die Säure je nach der zugesetzten Menge verschieden lange eingewirkt hatte. Durch diese Behandlung soll der Pankreasauszug sein Verdauungsvermögen für Pferdeserum und Eiklar einbüßen, während die verdauende Wirkung auf die Gelatine in geringerem Maße geschwächt wird und deutlich nachweisbar bleibt. Die Wirkung auf Fibrin ist nicht in allen auf koaguliertes Serum unwirksamen Präparaten völlig geschwunden und es entfaltet die Glutrinase auch eine schwache tryptische Wirkung auf Edestin.

Der Begriff der Specificität erweist sich also bezüglich der Glutrinase als ziemlich elastisch, da der mit Säure vorbehandelte Pankreasauszug außer der Gelatine auch Fibrin und Edestin in geringerem Grade zu hydrolysieren vermag; immerhin dürfte der Name Glutrinase bis zu einem gewissen Punkte durch den Verlust der proteolytischen Wirkung auf das Serumeiweiß und Eiklar gerechtfertigt sein.

Wenn sich aber dieser Verlust als ein bloß scheinbarer erweist und es gelingt, das Verdauungsvermögen für letztere Eiweißkörper mittels einfacher Eingriffe, ähnlich den von Pawlow bei seinen schönen Untersuchungen über das Labferment verwendeten, wiederherzustellen, so dürfte kein Grund mehr vorliegen, die Glutrinase als ein spezifisches vom Trypsin verschiedenes Ferment anzusprechen. Inwieweit es uns geglückt ist, die Unhaltbarkeit der Glutrinase nachzuweisen, sollen die unten mitgeteilten Versuche lehren.

Die Darstellung der Glutrinase nach dem erwähnten Verfahren bereitete uns anfänglich einige Schwierigkeiten, weil Pollak keine allgemein gültigen Angaben über die Menge und Einwirkungszeit der Säure macht, sondern rät, in jedem beson-

¹⁾ Pollak, Zur Frage der einheitlichen und spezifischen Natur des Pankreastrypsins. Beiträge z. chem. Physiol. und Pathol., Bd. VI, S. 95.

deren Falle die geeignetsten Werte für Säuremenge und Einwirkungszeit erst auszuprobieren.¹⁾)

Zur Isolierung der Glutinase gingen wir in unseren ersten Versuchen immer von Trypsin «Grübler» aus, um ein auch von Pollak benutztes Präparat zu verwenden, wobei wir das vom Verfasser empfohlene Verfahren genau einhielten; wir nahmen davon Abstand, die andere von Pollak vorgeschlagene Methode anzuwenden, weil sie noch weniger sicher zum Ziele zu führen scheint. Später verwendeten wir mit gleich gutem Resultate Pankreasauszüge, die durch Extraktion des fein zerriebenen Organs mittels schwach angesäuerten Wassers bereitet wurden.

Da in der Arbeit von Pollak²⁾) genauere Angaben über das Verhalten der Trypsinlösung gegenüber den zur Bereitung der Glutinase verwendeten Reagenzien fehlen, so mögen einige Bemerkungen darüber hier eingeschaltet werden. Der Zusatz von Salzsäure zur Trypsinlösung ruft einen reichlichen Niederschlag hervor, über dem eine milchige trübe Flüssigkeit steht, die schwer zu filtrieren ist; sobald aber die Säure mittels Lauge auch nur teilweise abgestumpft wird, setzt sich der Niederschlag gut ab und die darüberstehende Flüssigkeit klärt sich und läßt sich leicht abfiltrieren. Bevor die ganze, der verwendeten Normal-salzsäure entsprechende Normallauge zugesetzt worden, reagiert zu einem bestimmten Zeitpunkte die Flüssigkeit gegenüber Methylorange neutral, während sie bei der Prüfung mit Lackmus saure Reaktion zeigt; um neutrale Reaktion gegen Lackmus zu erhalten, ist weiterer Zusatz von Natronlauge erforderlich. Dieses verschiedene Verhalten gegenüber den beiden Indikatoren wird von Pollak nicht erwähnt, sondern er pflegte stets mit der entsprechenden Menge Normalnatronlauge zurückzutitrieren. Vielleicht hat aber gerade die Vernachlässigung dieser Details nicht wenig dazu beigetragen, die Angaben Pollaks so unsicher und seine Resultate so wechselnd zu gestalten. Tatsächlich scheiterten unsere ersten auf die Darstellung der Glutinase gerichteten Versuche, weil wir diesen Faktor nicht genügend be-

¹⁾ Pollak, l. c., S. 100.

²⁾ Pollak, l. c., S. 99.

rücksichtigten: ebenso wie es Pollak oft passierte, daß ihm die Vernichtung der proteolytischen Wirkung auf die anderen Eiweißkörper mißlang, in analoger Weise wollte es auch uns nicht glücken, eine Glutinasen darzustellen, solange wir Alkali bis zur Neutralisierung gegenüber Lackmus hinzufügten.

Sobald wir aber, durch geeignete Versuche aufmerksam gemacht, die Neutralisierung in dem Zeitpunkte abubrechen begannen, in welchem die Flüssigkeit gegen Methylorange neutral reagierte, gelang es uns fast regelmäßig, eine bloß für die Gelatine wirksame Lösung, also die sogenannte Glutinasen darzustellen, gleichgültig ob wir von Trypsin Grübler oder von unseren Pankreasextrakten ausgingen, mit denen wir hierauf die Mehrzahl unserer Versuche anstellten.

Die Darstellung der Glutinasen gestaltete sich demnach etwa folgendermaßen.

Zu 100 ccm Pankreasextrakt oder Trypsinlösung werden 50 ccm Normalsalzsäure hinzugefügt, die man ungefähr 36 Stunden einwirken läßt; daraufhin wird die Lösung mit Normalnatronlauge versetzt, bis sie gegen Methylorange neutral reagiert, wozu gewöhnlich 46—47 ccm Normal-lauge genügen. Man filtriert vom entstandenen Niederschlag und erhält so eine leicht gelbliche klare Flüssigkeit, die keine proteolytische Wirkung, weder auf Pferdeserum noch auf Eiklar und Fibrin besitzt, Gelatine hingegen leicht zu lösen vermag.

Zur Bestimmung des Verdauungsvermögens wurde die Methode von Mett verwendet, welche zu vergleichenden Bestimmungen, deren viele notwendig sind, besonders geeignet erscheint. Die Gelatinelösungen waren 10%ig und waren anfänglich mit Methylviolett, später durchwegs mit Karmin gefärbt, weil letzteres sich nicht löst und daher das Abmessen der verdauten Säule von der unverdauten besser gestattet. Die Verdauung von Eiweiß, Fibrin und Milch ging im Brutschrank, jene der Gelatine bei Zimmertemperatur zwischen 15—20° vor sich. Die Resultate wurden in der Regel nach 16 Stunden abgelesen. Die Verdauungslösungen wurden stets auf dasselbe Volumen gebracht. Um eine etwaige lösende Wirkung der Salze auf die Gelatine nicht zu übersehen, wurden Parallelproben mit denselben Verdauungslösungen angestellt, nachdem letztere vorher zum Sieden gebracht worden waren.

In der folgenden Tabelle (Tab. I) sind einige Ergebnisse zusammengestellt, die bei Einwirkung von Trypsin einerseits und von der entsprechenden, nach der oben mitgeteilten Methode dargestellten Glutinasen andererseits auf die verschiedenen

Eiweißarten erzielt wurden. Die angeführten Zahlen sind Mittelwerte mehrerer Bestimmungen; außer den von Pollak herangezogenen Eiweißsorten wurde von uns auch die verdauende Wirkung der beiden Lösungen gegenüber der Milch nach der Methode von Bierry und Henri¹⁾ studiert.

Tabelle I.

Nr.	Wirkung von	Auf Pferdeserum mm	Auf Eiklar mm	Auf Fibrin	Auf Milch	Auf Gelatine mm
1	Trypsin	7	—	komplette Verdauung	komplette Verdauung	15
	Glutinasen	0	—	keine	partielle	10
2	Trypsin	4	—	komplette	komplette	8
	Glutinasen	0	—	keine	partielle	5
3	Trypsin	7	—	komplette	komplette	10
	Glutinasen	0	—	keine	partielle	8
4	Trypsin	5	10	—	komplette	11
	Glutinasen	0	0	—	partielle	9
5	Trypsin	9	8	—	komplette	16
	Glutinasen	0	0	—	partielle	13

Aus der Tabelle geht hervor, daß das Pankreasextrakt tatsächlich nach Vorbehandlung mit Salzsäure und Neutralisierung in der angegebenen Weise weder Pferdeserum noch Eiklar noch Fibrin mehr zu verdauen vermag, während es die Gelatine noch zu lösen imstande ist. Sein Verdauungsvermögen für Milch ist ebenfalls abgeschwächt, da die Glutinasen die Eiweißkörper der Milch nur teilweise anzugreifen vermag. Am Boden der Gefäße, in denen die Verdauung vorgenommen wurde, blieben nämlich stets einige Flöckchen unverdauter Substanz zurück, wenn auch noch so viel Ferment zugesetzt und die Einwirkungs-

¹⁾ Bierry und Henri, Lait réactif sensible du suc pancréatique. Compt. rendus, Soc. biol., Bd. LIV, 1902.

dauer verlängert wurde; die darüberstehende Flüssigkeit hingegen wies die für verdaute Milch charakteristische gelblich-grüne Opalescenz auf.

Es fragt sich aber nun weiter, ob angesichts der von Pollak und uns erzielten Resultate die Auffassung der Glutrinase als eines vom Trypsin verschiedenen und für die Gelatine spezifischen Fermentes gerechtfertigt ist.

Vor allem mag hervorgehoben werden, daß schon Pollak eine proteolytische Wirkung der Glutrinase auf das Edestin und manchmal auch auf das Fibrin feststellen konnte, und daß wir ihr Verdauungsvermögen für die Milch zwar abzuschwächen, aber nicht vollständig aufzuheben vermochten. Weitere Untersuchungen führten aber zu viel beweiskräftigeren Ergebnissen, welche es außer Zweifel setzen, daß man nach dem beschriebenen Verfahren das Trypsin nicht zerstört, sondern dessen Wirkung auf einige Eiweißkörper bloß hemmt, indem man das Milieu verändert; es genügt nämlich, wie unten näher auseinandergesetzt wird, die Reaktion der Lösung zu verändern, um die proteolytische Wirkung, welche verschwunden zu sein schien, wiederherzustellen. Durch genaue Titrierung der zugesetzten Säure und Natronlauge brachten wir es so weit, daß die Umwandlung von Trypsin in Glutrinase und umgekehrt durch abwechselnden Zusatz von Säure und Alkali in bestimmter Menge bewerkstelligt werden konnte.

Wie schon erwähnt, reagiert nämlich unsere Glutrinase gegen Methylorange neutral und die Neutralisierung wird schon vor Zusatz der ganzen Alkalimenge erreicht, welche der zur Zerstörung der tryptischen Wirkung verwendeten Säure entsprechen würde. Sobald nun zu der gegen Methylorange neutral reagierenden Lösung neues Alkali hinzugefügt wurde, so daß neutrale Reaktion gegenüber Lackmustinktur erreicht wurde — es reichten gewöhnlich dazu 3—4 ccm Normalalkali auf je 50 ccm Glutrinase aus —, kam die vorher vermißte tryptische Wirkung wieder zum Vorschein. Durch Zusatz von so viel Normalsäure (ca. 3—4 ccm auf 50 ccm Glutrinase) zu dieser Lösung, bis neutrale Reaktion gegenüber Methylorange wiederhergestellt war, konnte die tryptische Wirkung wieder zum

Verschwinden gebracht werden, während sie bei leicht alkalischer Reaktion gegenüber Lackmus bestehen blieb.

In der folgenden Tabelle (Tab. II) sind die Resultate zusammengestellt, welche erzielt wurden, als wir a) die wahre Glutinasen n. M., b) die neutrale Reaktion gegen Lackmus aufweisende Glutinasen n. L., c) die gegen Lackmus alkalisch reagierende Glutinasen und d) die nach voraufgegangener Neutralisierung gegenüber Lackmus wieder auf neutrale Reaktion gegenüber Methylorange eingestellte Glutinasen n. M₂ auf Pferdeserum, Eiklar, Fibrin, Milch und Gelatine einwirken ließen.

Die Tabelle zeigt, daß die Glutinasen n. M. und n. M₂, d. h. jene, die gegen Methylorange neutral reagierten, nur die Gelatine zu verdauen vermochten und überdies ein schwaches Verdauungsvermögen für Milch aufwiesen. Sowohl letzteres als auch die proteolytische Wirkung auf Pferdeserum, Eiklar und Fibrin ließen sich aber durch einfachen Zusatz von Alkali oder die Dialyse, welche gleichfalls die Acidität der Lösung herabsetzt, wiederherstellen.

Läßt sich jedoch aus der Tatsache, daß unter bestimmten Bedingungen einer Lösung die proteolytische Wirkung auf einige Eiweißkörper zu fehlen scheint, während sie gegenüber einem einzigen Eiweißkörper wirksam bleibt, ohne weiteres der Schluß ziehen, daß die Trennung eines für letzteren spezifischen Fermentes geglückt ist?

Bei der Leichtigkeit, mit der es gelingt, das proteolytische Vermögen wiederherzustellen, darf man sich wohl fragen, ob nicht die Auffassung mehr für sich hat, es handle sich um ein und dasselbe Ferment, welches je nach den Eigenschaften der Proteine, auf die es wirkt, und des Mediums, in dem es seine Tätigkeit entfaltet, solche Verschiedenheiten aufweist, daß seine Agnoszierung leicht zu Täuschungen Veranlassung geben kann.

Es ist ja bekannt, was für einen immensen Einfluß manchmal der Zusatz kleiner Mengen von Säuren, Alkalien und Salzen auf Fermentreaktionen ausüben kann, sowohl in der Richtung einer Aktivierung als in jener einer Hemmung der enzymatischen Tätigkeit.

Tabelle II.

Nr.	Wirkung von	Auf Pferde- serum mm	Auf Eiklar mm	Auf Fibrin	Auf Milch	Auf Gelatine mm	
1	Glutrinase (n. M.)	0	0	keine Verdauung	partielle Verdauung	12	
	„ (n. L.)	5	9	—	komplette „	15	
	„ (gegen Lackmus alkalisch)	3	—	—	„ „	15	
	„ (n. M ₂)	0	0	keine Verdauung	partielle „	12	
	Nach der Dialyse (Innenflüssigkeit).	3	—	—	—	13	
	„ „ (Außenflüssigkeit).	0	—	—	—	0	
	2	Glutrinase (n. M.)	0	0	keine Verdauung	partielle Verdauung	9
		„ (n. L.)	3	6	komplette „	komplette „	11
		„ (gegen Lackmus alkalisch)	1,5	—	—	„ „	10
		„ (n. M ₂)	0	0	keine Verdauung	partielle „	8
Nach der Dialyse (Innenflüssigkeit).		5	—	—	—	10	
„ „ (Außenflüssigkeit).	0	—	—	—	—		
3	Glutrinase (n. M.)	0	0	keine Verdauung	partielle Verdauung	6	
	„ (n. L.)	2	—	komplette „	komplette „	9	
	„ (gegen Lackmus alkalisch)	1	—	—	„ „	8	
	„ (n. M ₂)	0	0	keine Verdauung	partielle „	5	
	Nach der Dialyse (Innenflüssigkeit).	—	—	—	—	—	
	„ „ (Außenflüssigkeit).	—	—	—	—	—	

So hebt z. B. Bertrand,¹⁾ um bloß eine erst vor kurzem mitgeteilte Beobachtung zu erwähnen, hervor, daß ganz geringe Unterschiede des Säuregrades bei Pflanzensäften genügen, um das Resultat der auf das Studium ihres Oxydationsvermögens gerichteten Untersuchungen zu fälschen; deshalb betont auch dieser Forscher die Notwendigkeit, die Reaktion des Mediums, in dem sich die Fermentprozesse abspielen, sorgfältig qualitativ und quantitativ zu studieren, wenn man sich vor Trugschlüssen hüten will.

Zur richtigen Deutung der erzielten Resultate ist es wohl rationell, entsprechend der Auffassung der Enzyme als Katalysatoren, zwischen dem spezifischen Hauptfaktor der Katalyse und den die letztere aktivierenden oder paralyisierenden Einflüssen zu unterscheiden. Der Lehre von der Katalyse gemäß kann nämlich die Beschleunigung eines chemischen Prozesses durch einen Katalysator oder ein Ferment in Gegenwart von bestimmten Substanzen eine Steigerung resp. eine Hemmung erfahren; diese Substanzen, welche als Aktivatoren resp. Paralyisatoren der Enzymwirkungen bezeichnet werden, entfalten ihre Wirkung durch Verbindung teils mit dem Substrat, teils mit dem Enzym.

Es geht daraus hervor, daß die Beschleunigung nicht nur vom Katalysator, sondern auch vom Substrat und dem Medium abhängig sein wird, in dem der katalysierte Prozeß sich abspielt. In der Tat hatten auch neulich Berg und Gries,²⁾ beim Studium des Einflusses der Säuren auf die peptische und tryptische Verdauung verschiedener Eiweißkörper, Gelegenheit, die Bedeutung der Natur der einzelnen Eiweißkörper auf den Verlauf der Proteolyse hervorzuheben, und gerade für die Gelatine hatte schon vorher Fermi³⁾ eine außerordentliche Empfindlichkeit gegenüber der tryptischen Wirkung nachgewiesen.

¹⁾ Bertrand, Recherche sur l'influence paralysante exercée par certains acides sur la laccase. Annales de l'Institut Pasteur, Tome XXI, Nr. 9, Sept. 1907.

²⁾ Berg and Gries, Studies of the effects of ions on catalysis, with particular reference to peptolysis and tryptolysis. Journ. of Biol. Chem., Bd. II, S. 489, 1907.

³⁾ Fermi, Metodi vecchi e nuovi nella ricerca e nello studio degli enzimi proteolitici. Giorn. d. Reale Soc. di Igiene, Ann. XXVII, Nr. 10—12.

Demnach scheint uns folgende Deutung der bezüglich der Glutrinase erhobenen Befunde am einfachsten. In den Pankreas-extrakten ist wohl ein einziges für die Proteolyse der verschiedenen Eiweißkörper spezifisches Enzym vorhanden, nämlich das Trypsin; die Salzsäure wirkt als Paralytiker der proteolytischen Wirkung und diese Hemmung tritt gegenüber den verschiedenen Eiweißkörpern in verschiedenem Maße zutage, so daß bei einem bestimmten Säuregrad die Hemmung für Pferdeserum, Eiklar und Fibrin schon vollständig ist, während eine gewisse Wirkung auf Gelatine und Milch erhalten bleibt.

Daß unsere Deutung tatsächlich zutrifft, wird durch folgende Versuchsreihe bestätigt, welche den letzten Ring zur Kette liefert, die den Zyklus der Zerstörung und Wiederherstellung der tryptischen Wirkung veranschaulicht. Es gelang uns nämlich in der sogenannten Glutrinase, d. h. in der gegen Methylorange neutral reagierenden Lösung auch die Wirkung auf die Gelatine durch Zusatz kleiner Säuremengen zu hemmen und durch nochmalige Neutralisierung gegen Methylorange wiederherzustellen.

So erhielten wir z. B. in einer Versuchsreihe bei der Bestimmung des Verdauungsvermögens a) der gegen Methylorange neutralen Lösung, d. h. der Glutrinase, b) der gegen Methylorange sauren Lösung und c) der gegen Lackmus neutralen Lösung folgende Werte:

	Verdauung der Gelatine mm	Verdauung des Pferde- serums mm	Verdauung des Eiklars mm
Gegen Methylorange neutrale Lösung (Glutrinase)	4	0	0
Gegen Methylorange saure Lösung (schwach angesäuerte Glutrinase)	0	0	0
Gegen Lackmus neutrale Lösung (mit Alkali versetzte Glutrinase)	7	3	6

Auf diese Weise ist man demnach in der Lage, das Pankreasextrakt derart zu verwandeln, daß es, je nach der Reaktion, bald als Trypsin bald als Glutrinase wirkt und sein Verdauungsvermögen durch einfachen Zusatz von Säure oder Alkali einbüßt und wiedergewinnt.

Wenn wir von einer gegen Lackmus neutral oder schwach alkalisch reagierenden Lösung ausgehen, welche alle verwendeten Eiweißkörper zu verdauen vermag, können wir, durch Zusatz von Säure (als Paralysator) bis zur neutralen Reaktion gegen Methylorange, die proteolytische Wirkung auf Pferdeserum, Eiklar oder Fibrin hemmen, während das Lösungsvermögen für Gelatine bestehen bleibt und die Wirkung auf Milch bloß abgeschwächt wird; bei stärkerem Ansäuern verschwindet auch dieser Rest der proteolytischen Wirkung. Umgekehrt sieht man, wenn man von einer gegen Methylorange sauer reagierenden Lösung, die keine proteolytische Wirkung entfaltet, ausgeht, bei Neutralisierung gegenüber diesem Indikator zuerst das Lösungsvermögen für die Gelatine wieder auftreten; und bei weiterem Zusatz von Alkali bis zur neutralen oder schwach alkalischen Reaktion gegen Lackmus erholen sich auch die übrigen dem Trypsin zustehenden proteolytischen Wirkungen.

Aus unseren Untersuchungen geht demnach hervor, daß auch in dem vorliegenden Falle Nebenfaktoren, die wohl nicht als spezifisch angesehen werden können, eine echte Specificität vorzutauschen vermochten. Diese scheinbaren Specificitäten werden selbstverständlich, wie der eine von uns (Ascoli, l. c., Seite 30 resp. 36) schon hervorhob, um so leichter auftreten, je größer die Zahl der bei der Katalyse mitspielenden Faktoren ist: bei den Fermentreaktionen sind die denkbar günstigsten Verhältnisse zur Vortäuschung derartiger Specificitäten vorhanden, wodurch ihre Klassifizierung zweifellos erschwert wird.

Unser mehr negativer Standpunkt, welcher künstlich geschaffene Schranken niederreißt, besteht wohl auch für andere auf chemischem Wege durchgeführte Trennungen von Fermentreaktionen zu Recht.

Wir dürfen die Hoffnung hegen, daß die mitgeteilten Befunde zu einer richtigen Beurteilung jener Specificitäten führen werden, welche bestimmten, im Laboratorium ohne Berücksichtigung des natürlichen Mediums, in dem die katalytisch beeinflusste Fermentreaktion sich abspielt, hergestellten Kunstprodukten zugewiesen wurden.