

Zur elektrischen Überführung des Pepsins.

Von

C. A. Pekelharing und W. E. Ringer.

(Der Redaktion zugegangen am 18. September 1911.)

Von mehreren Forschern ist in letzter Zeit das Verhalten von Eiweißstoffen und Enzymen in verschieden zusammengesetzten Lösungen im elektrischen Felde studiert worden. Besonders L. Michaelis hat in einer Reihe von Arbeiten verschiedene Eiweißstoffe und einige Enzyme genau untersucht. So hat er in Gemeinschaft mit H. Davidsohn¹⁾ das «elektrische Verhalten» des Pepsins studiert. Für die isoelektrische Konstante wurde $5,5 \times 10^{-5}$ gefunden.

Die genannten Autoren haben dabei mit dem Pepsin Gräublers gearbeitet. Dieses Pepsin ist aber sicher nicht rein, sondern mit Albumosen und Peptonen verunreinigt. Derartige Verunreinigungen haben aber, wie sich weiter unten zeigen wird, auf das elektrische Verhalten einen großen Einfluß. Es war also erwünscht, mit auf verschiedenen Wegen dargestellten Pepsinpräparaten die Versuche zu wiederholen.

Nach den Arbeiten des einen von uns hatten wir Grund, das nach seiner Methode dargestellte Enzym als besser gereinigt zu betrachten. Diese Darstellung beruht wesentlich auf der geringen Löslichkeit des Enzyms bei sehr kleinem Säuregrade; die pepsinhaltige Lösung wird dialysiert gegen reines Wasser, bis dieser Säuregrad erreicht ist, es scheidet sich dabei das Enzym zum Teil aus.²⁾ Zur Darstellung von reinem Pepsin eignet sich am besten der Magensaft aus dem Magen eines nach Pawlow operierten Hundes. Da wir aber zurzeit nicht über einen derartigen Hund verfügten, haben wir unsere Pepsinpräparate aus Schweinemagenschleimhaut dargestellt. Dabei verhalten sich, wie der eine von uns schon früher betont hat, die so hergestellten Präparate nicht immer gleichartig. Die Darstellungsmethode gestattet nicht, alle das Pepsin verunreinigenden

¹⁾ Biochem. Zeitschrift, Bd. 28, S. 1 (1910).

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 22, S. 233; Bd. 35, S. 8.

Bestandteile des Magenschleimhautextraktes zu entfernen. Einige Präparate, die wir für die gleich zu beschreibenden Versuche verwendeten, betrachteten wir ihres elektrischen Verhaltens wegen als die reinsten. Das waren die Präparate, die bei niedriger Temperatur und unter sonstigen günstigen Umständen dargestellt worden waren.

Unsere Versuche müssen fortgesetzt werden, aber da wir in nächster Zeit vielleicht dazu nicht in der Lage sein werden, sehen wir uns veranlaßt, einige unserer Versuche schon jetzt kurz mitzuteilen.

Michaelis und Davidsohn haben bei ihrer Arbeit die erforderlichen Wasserstoffionenkonzentrationen mittels Acetatmischungen (bis zu $C_H = 2 \times 10^{-4}$), Essigsäure oder Milchsäure ($C_H = 5 \times 10^{-4}$ bis 2×10^{-3}) oder mittels Salzsäure dargestellt. Die Elektrolyse wurde im von Michaelis¹⁾ angegebenen Apparat mit 100 Volt 4—12 Stunden fortgesetzt. Dabei ergab sich, daß bei starken Salzsäurekonzentrationen (0,1—0,05 n) das Pepsin nach beiden Seiten wanderte. Bei einer Salzsäurekonzentration von 0,02 n war es kathodisch, bei 0,01 n wanderte es wieder nach beiden Seiten, bei 0,005 n war es anodisch. Das eigentümliche Verhalten bei hohem Salzsäuregehalt erklären Michaelis und Davidsohn durch die Annahme, daß dabei die Dissoziation des Pepsiniumchlorids zurückgedrängt und die Pepsinienkonzentration dabei kleiner wird. So würde es sich auch erklären, daß bei hohem Säuregehalt die Enzymwirkung geschädigt wird, wenn man annimmt, daß die Pepsinien proteolytisch wirksam sind; dazu kommt dann noch die zerstörende Wirkung der Säure.

Bei unseren Versuchen brachten wir in die Seitengefäße destilliertes Wasser, wodurch die Stromstärke eine sehr geringe wird. Wir haben uns davon überzeugt, daß während der Elektrolyse die Acidität der Pepsinlösung sich nicht merklich änderte; die Lösung wurde dazu nach Ablauf des Versuchs titriert.

Das von uns verwendete Pepsin war aus Schweinemagenschleimhaut nach der früher beschriebenen Methode²⁾ dar-

¹⁾ Biochem. Zeitschrift, Bd. 16, S. 81 (1909).

²⁾ l. c.

gestellt. Die getrockneten und fein zerriebenen Präparate zeigten einen Stich ins graugelbliche.

Solches Pepsin ist sicher nicht rein. Es enthält nicht nur Farbstoff, sondern auch mehr oder weniger Phosphor, im Gegensatz zum Pepsin, welches aus bei Scheinfütterung erhaltenem Magensaft des Hundes dargestellt werden konnte und rein weiß und phosphorfrei war, wie das früher hervorgehoben ist. Unser aus der Magenschleimhaut dargestelltes Pepsin ist aber sehr viel weniger verunreinigt als das Grublersche und als, soweit uns bekannt ist, alle anderen Handelspräparate, wie in erster Linie aus der sehr viel größeren Wirksamkeit hervorgeht.

Um nach Ablauf der Versuche die stattgefundene Bewegung des Pepsins zu untersuchen, wurden die Seitenflüssigkeiten mit Salzsäure bis zu 0,2% versetzt und in denselben die Mettschen Röhrchen 24 Stunden digeriert. Die ursprüngliche Lösung wurde gleichfalls nach Mett auf ihre digerierende Wirkung untersucht und dazu mit 9 Volumen 0,2%iger Salzsäure vermischt.

Bei unseren Versuchen tauchte die Silberelektrode (Anode) in Salzsäure, die mit Wasser überschichtet war; die Kupferelektrode in etwas Kupferchloridlösung, auf die wir gleichfalls Wasser gegeben hatten. Es wurde dafür Sorge getragen, daß die Seitengefäße nicht mit Salzsäure oder Kupferchlorid verunreinigt wurden. Selbstverständlich wurde während der Elektrolyse allmählich etwas Salzsäure in die Seitengefäße überführt.

Wir verwendeten für unsere unten beschriebenen Versuche sehr verdünnte Pepsinlösungen. 10 mg des trocknen Enzyms wurden während einiger Zeit mit etwas Salzsäure (0,2%) bei Zimmertemperatur eingeweicht, sodann wurde das Volumen durch Zugabe der benötigten Menge Wasser oder Salzsäure auf 50 ccm gebracht und während kurzer Zeit erwärmt (37°), bis das Pepsin gelöst war.

Bei dieser kleinen Pepsinkonzentration konnte von einer Säurebindung abgesehen und die Wasserstoffionenkonzentration sofort aus der Säurekonzentration abgeleitet werden. Bei dieser kleinen Konzentration des Enzyms ist auch die Gefahr der

Diffusion gering. Beim Anstellen der Versuche wurde peinlichst darauf geachtet, daß nicht leichte Erschütterungen das Resultat entstellen könnten.

Wir lassen hier in einigen Tabellen die Ergebnisse einiger unserer Versuche folgen.

Tabelle I.

Versuche mit Pepsinpräparat a.

Für jeden Versuch 10 mg Pepsin in 50 ccm verdünnter Säure gelöst. Die Salzsäurekonzentration ist in der zweiten Vertikalreihe angegeben; die Säurekonzentration nach Ablauf der Versuche findet man in der nächsten Reihe. Dann folgen die digerierende Wirkung der ursprünglichen Lösung und die der Seitenlösungen nach dem Ansäuern mit Salzsäure.

| Ver- such | Normali- tät der ursprüng- lichen Lösung | Normali- tät nach Ablauf des Versuchs | Digerierende Wirkung der ursprünglichen Lösung, mit 9 Volumina Salzsäure von 0,2% verdünnt mm nach Mett | Digerierende Wirkung der Flüssigkeit an der | | Dauer der Elektro- lyse Stunden |
|--------------|--|---|--|--|----------------------------------|---|
| | | | | Kathoden- seite mm nach Mett | Anoden- seite mm nach Mett | |
| 1 | 0,0238 | — | 3,3 | 0 | 1,8 | etwa 24 |
| 2 | 0,0238 | — | — | 0 | 1,7 | id. |
| 3 | 0,0238 | — | — | 0 | 1,8 | > |
| 4 | 0,0238 | 0,0216 | — | 0 | 1,8 | > |
| 5 | 0,0473 | — | 4,3 | 0 | 1,6 | > |
| 6 | 0,0473 | — | — | 0 | 1,4 | etwa 20 |
| 7 | 0,0473 | 0,0418 | — | 0 | 2,8 | > 24 |
| 8 | 0,0964 | — | 3,5 | 0 | 3,6 | > 48 |
| 9 | 0,0964 | 0,0754 | — | 0 | 3,7 | > 36 |

Die Säurekonzentration hatte nach Ablauf des 9. Versuchs, und also auch wohl am Ende des 8. Versuchs, merklich abgenommen, hier war auch lange elektrolysiert. Bei allen Versuchen hat das Pepsin rein anodische Wanderung gezeigt.

Wir haben dann zu Lösungen dieses Pepsins kleinere bzw. größere Mengen einer Caseinlösung gegeben: das Pepsin wanderte dabei weniger oder mehr zur Kathode. Wir gehen hier aber auf diese Versuche nicht weiter ein, weil wir die Caseinkonzentration nicht bestimmten und weil weiter unten

Versuche mit Albuminlösungen beschrieben werden, wobei der Einfluß des zugesetzten Eiweißstoffes deutlich zutage tritt.

Tabelle II.

Versuche mit Pepsinpräparat b.
Pepsinkonzentration wie oben.

| Ver- such | Normalität der ursprüng- lichen Lösung | Digerierende Wirkung der ursprünglichen Lösung, mit 9 Volumina Salzsäure von 0,2% verdünnt mm nach Mett | Digerierende Wirkung der Flüssigkeit an der | | Dauer der Elektrolyse Stunden |
|--------------|--|--|---|----------------------------------|--|
| | | | Kathoden- seite mm nach Mett | Anoden- seite mm nach Mett | |
| 1 | 0,0061 | 4.6 | 0 | 2.2 | etwa 2½ |
| 2 | 0,0283 | — | 0 | 3,2 | id. |
| 3 | 0,0601 | — | 0 | 3,2 | » |
| 4 | 0,1271 | — | 0 | 2.8 | » |

Auch dieses Präparat zeigte also rein anodische Wanderung. Zu Lösungen dieses Pepsinpräparates b haben wir dann verschiedene Mengen einer dialysierten Lösung von krystallisiertem Serumalbumin zugesetzt. Die Albuminlösung war 5,9% ig.

Tabelle III.

Versuche mit Pepsinpräparat b unter Zugabe von Serumalbumin.

Für jeden Versuch 10 mg Pepsin in 50 ccm Salzsäure 0,0544 n gelöst. Hierzu a ccm Serumalbuminlösung + (10-a) ccm Wasser. Gesamtvolumen also 60 ccm.

| Ver- such | Zugesetzte ccm | | Digerierende Wirkung der ursprünglichen Lösung, mit 9 Volumina 0,2% iger Salz- säure verdünnt mm nach Mett | Digerierende Wirkung der Flüssigkeit an der | | Dauer der Elektro- lyse Stunden |
|--------------|------------------------------|--------|---|--|----------------------------------|---|
| | Serum- albumin- lösung | Wasser | | Kathoden- seite mm nach Mett | Anoden- seite mm nach Mett | |
| 1 | 1 | 9 | 5,2 | Spur | 1,2 | etwa 2½ |
| 2 | 2 | 8 | — | 1,34 | 0,48 | id. |
| 3 | 3 | 7 | — | 1,50 | 0,4 | » |
| 4 | 4 | 6 | 4,8 | 1,38 | 0 | » |
| 5 | 5 | 5 | 4,8 | 1,70 | 0,36 | » |
| 6 | 6 | 4 | 5,2 | 1,76 | 0,36 | » |

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß das anfangs anodische Pepsin nach Zugabe von Serumalbumin stets mehr kathodisch wird, obgleich die H-Ionenkonzentration infolge Säurebindung seitens des Albumins stark abnimmt. Das Serumalbumin nimmt bei seiner Wanderung zur Kathode das Pepsin mit sich.

Dasselbe wurde gefunden bei Zugabe einer gegen 0,0549 n-Salzsäure dialysierten Pepton-Witte-Lösung. Hier hatte die Peptonlösung nahezu dieselbe H-Ionenkonzentration wie die Pepsinlösung. Die Versuche wurden so ausgeführt, daß 10 mg Pepsin mit wechselnden Mengen der Peptonlösung und einer Salzsäurelösung von 0,0544 n auf ein Gesamtvolumen von 50 ccm gebracht wurde. Die Peptonlösung hatte 3,9% organischen Trockenrückstand.

Tabelle IV.

| Ver- such | Zugesetzte ccm | | Digerierende Wirkung der ursprünglichen Lösung, mit 9 Volumina 0,2% iger Salz- säure verdünnt mm nach Mett | Digerierende Wirkung der Flüssigkeit an der | | Dauer der Elektro- lyse Stunden |
|--------------|---------------------------|---------------------------|---|--|----------------------------------|---|
| | Albu- mosen- lösung | Salz- säure- lösung | | Kathoden- seite mm nach Mett | Anoden- seite mm nach Mett | |
| 1 | 0,1 | 49,9 | — | 0,5 | 0,4 | etwa 24 |
| 2 | 0,3 | 49,7 | — | 1,4 | 0,6 | id. |
| 3 | 0,3 | 49,7 | — | 0,74 | 0,5 | „ |
| 4 | 1,0 | 49,0 | 4,8 | 0,90 | 0,96 | „ |
| 5 | 5,0 | 45,0 | — | 1,1 | 0,6 | „ |
| 6 | 10,0 | 40,0 | 5,0 | 1,2 | 0,34 | „ |
| 7 | 20,0 | 30,0 | 4,9 | 1,62 | 0,5 | „ |

Wir sehen aus diesen Versuchen, daß schon bei sehr geringen Mengen der Albumosenlösung die Pepsinwanderung sehr wesentlich beeinflußt wird; bei steigenden Mengen hat das Pepsin immer mehr Neigung, zur Kathode zu wandern, ohne aber rein kathodisch zu werden.

Dieser Einfluß von minimalen Mengen Albumosen zeigt, wie sehr das Verhalten des Pepsins von geringen Mengen Verunreinigungen auf deutlichste verändert werden kann.

Nachdem wir mit diesen Präparaten die beschriebenen Überführungsversuche zu Ende geführt hatten, wollten wir weitere Versuche mit andern Pepsinpräparaten und mit anderen Enzymkonzentrationen anstellen. Die dazu dargestellten Pepsinpräparate zeigten aber nicht dasselbe Verhalten, wie die früheren. Weil sie aber unter weniger günstigen Bedingungen der Temperatur (es war Frühling) angefertigt waren, glauben wir ihr Verhalten Verunreinigungen zuschreiben zu müssen. Sie verhielten sich wie das Pepsin im Versuch I, Tabelle IV, und wanderten also bei einer Salzsäurekonzentration von 0,054 n sowohl nach der Kathode, wie nach der Anode, aber nach beiden Richtungen schwach.

Wir haben von einem dieser Präparate die H-Ionenkonzentration, bei der die Löslichkeit des Enzyms am geringsten war (Flockungsoptimum) bestimmt und dafür $C_{\text{H}} = 4,78 \times 10^{-4}$, $p_{\text{H}} = 3,32$, gefunden.

Von den Präparaten, die sich stets anodisch verhielten, haben wir, wegen Materialmangels, das Flockungsoptimum noch nicht bestimmt.

Wir glauben, aus den mitgeteilten Versuchen schließen zu müssen, daß man nicht ohne weiteres die von Michaelis und Davidsohn angegebene isoelektrische Konstante auf das reinste Enzym anwenden darf.

Bei weiteren Versuchen wird es erwünscht sein, zwischen der Pepsinlösung und den Gefäßen mit destilliertem Wasser noch zwei Räume mit derselben H-Ionenkonzentration wie diejenige der Pepsinlösung einzuschalten. Dabei bleibt die geringe Stromstärke infolge des hohen Widerstandes erhalten und kommt doch das Pepsin beim Austritt aus seiner Lösung nicht sofort in eine Lösung viel geringeren Säuregehalts. Wir bemerken aber, daß in unseren Versuchen die anodische Bewegung des Pepsins nicht dadurch erklärt werden kann, daß die Seitengefäße mit destilliertem Wasser gefüllt waren. Bei den schwachen Salzsäurekonzentrationen von etwa 0,02 n hätte das Pepsin sich doch von der Trennungsfläche mit dem destillierten Wasser an der Anodenseite zur Kathode fortbewegen müssen, wenn die von Michaelis und Davidsohn ange-

gebene isoelektrische Konstante auch für unser Enzym Geltung hätte.

Zum Schluß sei bemerkt, daß wir niemals eine Trennung auf dem Wege der Überführung von labendem (Chymosin) und proteolytischem Enzym (Pepsin) beobachtet haben. Mit Versuchen mit Pepsin aus Kalbsmageninfusionen sind wir noch beschäftigt.