

Die Einwirkung einiger kolloiden Substanzen auf die Hemmung der Enzymwirkungen.

Von

G. Jahnson-Blohm.

(Aus dem medizinisch-chemischen Institut der Universität Upsala.)

(Der Redaktion zugegangen am 21. September 1912.)

Die Untersuchungen, über welche im folgenden berichtet wird, waren hauptsächlich darauf eingerichtet, auszufinden, ob die Entstehung der Verbindung zwischen Enzymen und hemmenden Substanzen durch die Gegenwart von kolloiden Substanzen, auf welche das Enzym nicht einzuwirken vermag, verhindert werden kann; ebenfalls wurde untersucht, ob die bereits fertige Verbindung Hemmungskörper-Enzym durch die genannten Substanzen aufgehoben und das Enzym somit in aktive Form übergeführt werden kann. Die gebrauchten Enzyme waren Lab und Trypsin. Als hemmende Substanzen wurden für das Lab Kohle, Normal- und Immunserum, für das Trypsin Kohle und Serumalbumin angewandt. Daneben ist die Beziehung des Saponins zu Labzymogen in Untersuchung gekommen. Die kolloiden Stoffe, deren Einwirkung auf die Verbindung Hemmungskörper-Enzym geprüft wurde, waren Saponin, Cholesterin und salzsäurebehandeltes Eierklar. Das Saponin war von Kahlbaum bezogen und war mit gegen Lackmus neutraler Reaktion leicht und vollständig in Wasser löslich. Es gab die für Saponine charakteristischen Reaktionen. Bekanntlich dialysieren die Saponine nicht oder wenigstens sehr schwer. Um mich zu überzeugen, daß nicht dialysable Stoffe, die eventuell als Verunreinigung vorkamen, für meine Resultate verantwortlich waren, wandte ich dialysiertes Saponin bei einigen Versuchen an und bekam mit diesem dieselben Resultate.

Das Cholesterin ist in Form einer Wassersuspension benutzt worden, dessen Herstellung unten angegeben wird.

Lab, Kohle und Saponin.

Bei diesen Versuchen wurden eine 1%ige Kohlesuspension und eine 1%ige Saponinlösung angewandt. Zur Gerinnungsprobe, die immer bei 37° stattfand, wurden 10 ccm Milch, die vorher auf 37° erwärmt worden war, genommen. Die Volumina der für Vergleichung abgesehenen Proben waren der Beschreibung gemäß immer gleich.

Versuch 1.

A. 2 ccm Kohlesuspension wurden mit 2 ccm Saponinlösung gemischt und in einem Wasserbad von 37° 10 Minuten lang aufbewahrt. Darauf wurden 2 ccm Lablösung zugesetzt; die Kohle wurde durch Zentrifugieren entfernt. Von der klaren Flüssigkeit wurden 3 ccm für die Bestimmung der Gerinnungszeit genommen.

B. Anstatt Saponinlösung wurde Wasser genommen; im übrigen war das Verfahren dasselbe wie in A.

C. Kontrollprobe mit Wasser anstatt der Kohlesuspension und der Saponinlösung.

Folgende Gerinnungszeiten wurden erhalten:

Mit A (Kohle-Saponin)	14 Minuten.
» B (Kohle-Wasser)	78 »
» C	14 »

In diesem Falle hat also die Gegenwart von Saponin die Aufnahme von Lab durch die Kohle vollständig verhindert. Saponin ist nach folgendem Versuche ohne Einwirkung auf das Lab.

Versuch 2.

(Saponin-Lab) 9 Minuten.

(Wasser-Lab) 9 »

Die Einwirkung des Saponins auf die Kohle geschieht sehr schnell. Wenn auch das Zusetzen von Kohle, Saponin

und Lab rasch nacheinander stattfindet, wird die Kohle vollständig verhindert, ihre Hemmung auszuüben.

In guter Übereinstimmung mit obenerwähnter Beobachtung steht das Ergebnis folgender Versuche, nach welchen Saponin das Vermögen besitzt, Lab, das schon durch Kohle aufgenommen ist, von der Kohle zum Teile abzulösen.

Versuch 3.

A. Je 1 ccm von der Kohlesuspension und der Lablösung wurde gemischt und 1 Stunde lang bei 37° aufbewahrt. 2 ccm Saponinlösung wurden darauf zugesetzt; nach 15 Minuten wurde zentrifugiert und mit 2 ccm der klaren Flüssigkeit die Gerinnungszeit ermittelt.

B. Zur Kohle-Labmischung wurde anstatt Saponin Wasser zugesetzt; im übrigen wie in A.

C. Kontrollprobe mit Wasser anstatt Kohle und Saponin. Die Gerinnungszeiten waren:

Mit A (Kohle-Lab-Saponin)	59 Minuten.
» B (Kohle-Lab-Wasser)	225 »
» C	12 »

Praktisch genommen war alles Lab durch Kohle gebunden worden, aber dann zum großen Teile durch den Einfluß des Saponins abgelöst worden. Dabei spielt eine längere Zeit für die Einwirkung des Saponins auf die Kohle-Labverbindung eine große Rolle, wie es der folgende Versuch zeigt.

Versuch 4.

A. Wie in Versuch 3 wurde eine Mischung von gleichen Teilen Kohlesuspension und Lablösung 1 Stunde lang bei 37° gehalten; eine mit dieser Mischung gleich große Menge Saponinlösung wurde zugesetzt; das Ganze wurde bei einer Temperatur von 37° gehalten. Nach den unten angegebenen Zeiten wurden davon Proben genommen, die zentrifugiert wurden, worauf die Gerinnungszeiten mit 2 ccm festgestellt wurden.

B. Wasser wurde anstatt Saponin zugesetzt. Die Behandlung war im übrigen wie in A.

C. Kontrollprobe.

Der Versuch ergab folgende Gerinnungszeiten:

Mit A (Kohle-Lab-Saponin)	5 Minuten	135 Minuten.
» » »	10 »	80 »
» » »	20 »	58 »
» » »	40 »	43 »
» » »	60 »	39 »
» » »	90 »	32 »
» » »	150 »	27 »
» » »	210 »	24 »
» » »	270 »	23 »
Mit B (Kohle-Lab-Wasser)	5 Min.	Keine Gerinnung in 6 Std.
» » »	90 »	»
» » »	270 »	»
Mit C		2 ¹ / ₂ Minuten.

Versuch 5.

Bei diesem Versuche wurden die Gemenge wie in Versuch 4 bereitet. Die Gerinnungszeiten waren:

Mit A (Kohle-Lab-Saponin)	5 Minuten	31 Minuten
» » »	10 »	25 »
» » »	20 »	21 »
» » »	40 »	18 »
» » »	60 »	15 ¹ / ₂ »
» » »	90 »	15 »
» » »	120 »	15 »
Mit B (Kohle-Lab-Wasser).	Keine Gerinnung in 3 Stunden.	
Mit C		2 Minuten.

Wie aus den Versuchen 4 und 5 ersichtlich, dauert es eine gewisse Zeit, bis das Lab von dem Saponin freigemacht wird; nach einer Zeit, die in verschiedenen Fällen verschieden ist, wird kein Lab mehr frei.

Folgender Versuch wurde gemacht, um den Einfluß verschiedener Temperaturen festzustellen.

Versuch 6.

A. Zu einer 1 Stunde lang bei 37° erhitzten Kohle-Labmischung wurde die Saponinlösung zugesetzt; davon wurden 2 Proben genommen, von welchen die eine bei einer Tempe-

ratur von 37° und die andere bei 15° gehalten wurde. Danach wurde im übrigen wie in Versuch 4 A verfahren.

B. Der Kohle-Labmischung wurde Wasser anstatt Saponin zugesetzt.

C. Kontrollprobe.

Folgende Gerinnungszeiten wurden erhalten:

		Bei 37°	15°
Mit A (Kohle-Lab-Saponin)	5 Min.	$23\frac{1}{2}$ Min.	59 Min.
» » »	10 »	20 »	54 »
» » »	20 »	16 »	$45\frac{1}{2}$ »
» » »	40 »	$14\frac{1}{2}$ »	39 »
» » »	60 »	$14\frac{1}{2}$ »	$34\frac{1}{2}$ »
» » »	90 »	$13\frac{1}{2}$ »	33 »
» » »	120 »	$13\frac{3}{4}$ »	31 »
» » »	150 »	13 »	$29\frac{1}{2}$ »

Mit B (Kohle-Lab-Wasser) 5 Min. Keine Gerinnung in 3 Std.

» » » 60 »

» » » 150 »

Mit C

2 Minuten.

Aus diesem Versuche geht hervor, daß das Saponin bei einer höheren Temperatur eine kräftigere Wirkung ausübt. Die Zeit, nach welcher die Einwirkung auf die Kohle-Labverbindung endet, ist bei einer höheren Temperatur bedeutend kürzer als bei niederer. Bei 15° wurde er nicht einmal nach einer 6 Stunden langen Behandlung erreicht, wie andere Versuche ergaben.

Eine größere Menge Saponin hat nach folgendem Versuche größere Einwirkung als eine kleinere.

Versuch 7.

Zu der 1 Stunde lang bei 37° erhitzten Kohle-Labmischung wurde in der einen Probe eine 1%ige Saponinlösung und in der anderen eine 3%ige zugesetzt. Im übrigen war die Behandlung wie im vorigen Versuche. Die Mischungen B und C wurden hierbei nicht hergestellt.

Es ergaben sich folgende Gerinnungszeiten:

Mit A	6 ¹ / ₂	Minuten.
» B	6 ¹ / ₂	»
» C	6 ³ / ₄	»

Versuch 9.

Bei einem anderen Versuche mit anderen Mengen derselben Bestandteile ergaben sich folgende Gerinnungszeiten:

Mit A	37 ¹ / ₂	Minuten.
» B	36	»
» C	38	»

Aus den zwei letzten Versuchen geht hervor, daß die Wassermenge bei der Einwirkung des Saponins auf die Kohle-Labmischung bedeutungslos ist. Möglich ist, daß die Wassermenge bei sehr kurzer Einwirkung des Saponins einen Einfluß auf die Reaktionsgeschwindigkeit haben kann; der Endzustand wird aber nicht durch die Menge des Wassers beeinflusst.

Aus den Versuchen 1—9 geht hervor, daß das Saponin dem hemmenden Einfluß der Kohle auf die Labwirkung entgegenwirkt, und daß das Saponin einen Teil des durch Kohle gebundenen Labs frei macht, wobei Zeit, Temperatur und Saponinmenge eine wesentliche Rolle spielen. Daß die Kohle das Saponin aufnimmt und an sich bindet in der Weise, daß dasselbe nicht durch Wasser gewaschen werden kann, zeigt folgender Versuch.

Versuch 10.

A. 2 ccm Kohlesuspension und 2 ccm Saponinlösung wurden gemischt und 10 Minuten lang bei 37° gehalten; 2 ccm Lablösung wurden darauf zugesetzt. Die Mischung wurde zentrifugiert und die Gerinnungszeit mit 3 ccm ermittelt.

B. 2 ccm Kohlesuspension und 2 ccm Saponinlösung wurden 10 Minuten lang bei 37° gehalten, wonach die Mischung zentrifugiert wurde. Die klare Flüssigkeit wurde abgossen; die zurückgebliebene Kohle wurde durch Aufguß von Wasser, Umschüttelung und neues Zentrifugieren gewaschen. Nachdem die Kohle auf diese Weise dreimal gewaschen worden war, wurde sie mit 4 ccm Wasser und 2 ccm Lab versetzt. Die

Kohle wurde wegcentrifugiert und die Gerinnungszeit mit 3 cem ermittelt.

C. Wie in A, aber mit Wasser anstatt Saponin.

D. Kontrollprobe mit Wasser anstatt Kohlesuspension und Saponinlösung.

Die Gerinnungszeiten waren folgende:

Mit A (Kohle-Saponin-Lab)	18 Minuten.
» B ([Kohle-Saponin] gewaschen -Lab)	19 1/2 »
» C (Kohle-Wasser-Lab)	134 »
» D	18 »

In C konnte die Kohle die Labwirkung hemmen. In A und B wurde die Hemmung durch die Gegenwart des Saponins aufgehoben. In B wurde, nachdem die Kohle Saponin aufgenommen hatte, die Kohle wiederholt mit Wasser gewaschen; dessen ungeachtet wurde das Saponin durch die Kohle zurückgehalten und hinderte also die Kohle, das Lab aufzunehmen. Die beiden Gerinnungszeiten mit A und B sind fast gleich, und daraus geht hervor, daß nur das Saponin, das von der Kohle aufgenommen wird, wirkt, und nicht das, welches in der Flüssigkeit sich befindet.

Lab, Normalserum und Saponin.

Die hemmende Einwirkung des Serums auf Lab, auf welche zuerst Hammarsten und Rödén¹⁾ aufmerksam machten, ist eingehend von Hedin²⁾ untersucht worden. Er fand unter anderem dabei, daß die Hemmungswirkung nach vorangegangener Behandlung des Serums mit HCl nicht zustande kommt, und ferner daß die Säure das Lab aus seiner Verbindung mit Serum frei macht. In den folgenden Versuchen habe ich den Einfluß des Saponins auf die Fähigkeit des Serums, die Labwirkung aufzuheben, untersucht.

Neutralisiertes und verdünntes Serum vom Pferde (in einigen Fällen vom Ochsen) wurde angewandt. Wie in den vorigen Versuchen war die Saponinlösung, wenn nicht anderes angegeben wird, 1^o/₁₀ig.

¹⁾ Upsala Läkaref. förh., Bd. 22, S. 546, 1887.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 60, S. 85, 1909.

Versuch 11.

A. Zu 1 ccm Serum wurde 1 ccm Saponinlösung zugesetzt und die Mischung 10 Minuten lang bei 37° aufbewahrt; danach wurde 1 ccm Lab zugegeben und das Ganze 5 Minuten lang bei 37° gehalten. Danach wurden die Gerinnungsversuche ausgeführt.

B. Wie in A, aber mit Wasser anstatt Saponinlösung.

C. Kontrollprobe.

Folgende Gerinnungszeiten wurden erhalten:

Mit A (Serum-Saponin-Lab)	26 ¹ / ₂ Minuten.
» B (Serum-Wasser-Lab)	135 »
» C	11 »

Das Serum ist also zum großen Teile gehindert worden, seinen hemmenden Einfluß auf die Labwirkung auszuüben. Das Saponin ist, wie vorher Versuch 2 zeigt, ohne Einfluß auf das Lab.

Der Einfluß verschiedener Zeiten für die Einwirkung des Saponins auf das Serum ist in folgendem Versuche untersucht worden.

Versuch 12.

A. Gleiche Teile von Serum und Saponinlösung wurden gemischt und bei 37° gehalten. Nach unten angegebenen Zeiten wurden von der Mischung jedesmal 2 ccm genommen; das Lab wurde zu diesen zugesetzt, die Mischung 10 Minuten lang bei 37° gehalten, wonach die Gerinnungszeiten auf gewöhnliche Weise ermittelt wurden.

B. Eine Mischung von 1 ccm Serum, 1 ccm Wasser und 1 ccm Lab wurde 10 Minuten lang bei 37° gehalten; danach wurde die Milch zugesetzt.

C. Kontrollprobe.

Die Gerinnung fand nach folgenden Zeiten statt:

Mit A (Serum-Saponin)	unmittelbarer Zusatz von Lab	14 Minuten.
» »	» nach 3 Minuten	14 »
» »	» 6 »	13 »
» »	» 9 »	13 »
» »	» 15 »	13 ¹ / ₂ »

Mit A (Serum-Saponin) nach 25 Minuten	12 ¹ / ₂ Minuten
» » » » 40 »	13 »
» » » » 60 »	13 »
Mit B (Serum-Wasser)	39 »
Mit C	8 »

Aus diesem geht hervor, daß eine längere Zeit für die Einwirkung des Saponins auf das Serum ohne erwähnenswerte Bedeutung ist. Die Reaktion findet also sehr schnell statt.

Der Einfluß verschiedener Saponinmengen geht aus folgendem Versuche hervor.

Versuch 13.

A. Zu 1 ccm Serum wurden, wie die unten angegebene Tabelle zeigt, verschiedene Mengen Saponinlösung und Wasser zugesetzt, so daß die Volumina immer gleich wurden; das Lab wurde darauf zugegeben.

B. Anstatt Saponin wurde Wasser genommen.

C. Kontrollprobe.

Folgende Gerinnungszeiten wurden ermittelt:

Mit A (Serum + ¹ / ₂ ccm Saponinlös. + 1 ¹ / ₂ cm H ₂ O)	47 Minuten.
» » (» + 1 » » + 1 » H ₂ O)	33 »
» » (» + 1 ¹ / ₂ » » + ¹ / ₂ » H ₂ O)	27 »
» » (» + 2 » » kein Wasser)	23 »
Mit B (Serum + 2 ccm Wasser)	56 »
Mit C	15 »

Wie ersichtlich, hat eine größere Menge Saponin eine kräftigere Wirkung.

Die Einwirkung des Saponins auf das schon gebundene Lab wurde in folgendem Versuche untersucht.

Versuch 14.

A. Eine Mischung von Serum und Lab wurde 2 Stunden lang bei 37° gehalten. Ein dieser Mischung gleich großes Volumen Saponinlösung wurde zugesetzt, und nach unten angegebenen Zeiten wurden 2 ccm für die Bestimmung der Gerinnungszeit davon genommen.

B. Wie in A, aber mit Wasser anstatt Saponin.

C. Kontrollprobe.

Die Gerinnungszeiten waren:

Mit A (Serum-Lab-Saponin)	unmittelbar	97 Minuten
» »	nach 1 Stunde	78 »
» »	» 2 Stunden	71 »
» »	» 3 »	70 »
» »	» 5 »	63 »
» »	» 7 »	57 »
Mit B (Serum-Lab-Wasser)	unmittelbar	112 »
» »	nach 1 Stunde	108 »
» »	» 3 Stunden	110 »
» »	» 7 »	111 »
Mit C	11 »

Mit einem anderen Versuche wurden folgende Zeiten erhalten:

Versuch 15.

Mit A	unmittelbar	81 Minuten
» »	nach 30 Minuten	72 »
» »	» 60 »	63 »
» »	» 120 »	57 »
Mit B	unmittelbar	83 »
» »	nach 60 Minuten	90 »
» »	» 120 »	96 »
Mit C	7 »

Aus den beiden letzten Versuchen geht hervor, daß das Saponin das Lab freimacht, das schon an Serum gebunden worden ist. Je länger die Zeit der Einwirkung des Saponins dauert, desto mehr Lab wird freigemacht.

Die Versuche 11—15 ergeben also einerseits, daß das Saponin das Serum an der Hemmung der Labwirkung verhindert, andererseits, daß es auch die Fähigkeit hat, das schon gebundene Lab abzulösen. Dies stimmt sehr gut mit den Resultaten in den Versuchen 1—10 überein. Doch ist die Einwirkung des Saponins auf die Kohle bedeutend kräftiger als auf Serum. Es hinderte vollständig die Kohle, die Labwirkung zu hemmen; nicht so mit Serum. Das Saponin vermag bedeutende Mengen Lab, das an

Kohle gebunden ist, zu verdrängen. Dagegen wurden verhältnismäßig kleine Mengen aus der Lab-Serumverbindung freigemacht.

Labzymogen und Saponin.

Aus den Versuchen, die Hedin¹⁾ mit Hinsicht auf das Labzymogen gemacht hat, geht hervor, daß dieses als eine Verbindung zwischen Enzym und Hemmungskörper betrachtet werden kann. Hemmungskörper und Lab können durch Behandlung mit schwachem Ammoniak bezw. Säure zerlegt werden, wodurch die nicht zerlegte, in das Zymogen eingehende Komponente frei und wirksam wird. Bei Untersuchungen, die bei derselben Gelegenheit mit Normalserum als hemmender Stoff gemacht wurden, fand Hedin, daß die Lab-Serumverbindung sich wie das Labzymogen verhält. Bei Zusatz von HCl wurde das Lab aktiviert und mit H₂N trat eine bedeutende Hemmungswirkung ein. Wie oben gezeigt worden ist, wird in der Verbindung zwischen Lab und Serum das Lab durch das Saponin aktiviert, und es wäre darum von Interesse, zu erfahren, wie das Saponin sich zu dem Labzymogen verhält. Bezüglich dieser Frage wurden folgende Versuche gemacht.

Das Zymogen wurde, wie Hedin beschreibt, hergestellt. Ein Teil frischer Schleimhaut von Kalbsmagen mit fünf Teilen Wasser, etwas CaCO₃ und Toluol wurde bei niedrigerer Temperatur einen Tag aufbewahrt; darauf wurde filtriert. Die auf diese Weise erhaltene Zymogenlösung zeigte immer eine schwache Labwirkung, wie aus den Versuchen hervorgeht.

Versuch 16.

A. 1 ccm Zymogen wurde mit 9 ccm Wasser und 5 ccm Saponinlösung gemischt und bei 37° aufbewahrt. Nach unten angegebenen Zeiten wurden mit 2 ccm die Gerinnungszeiten auf die gewöhnliche Weise bestimmt.

B. Anstatt Saponinlösung wurde Wasser genommen. Im übrigen wie in A.

Die Gerinnung fand nach folgenden Zeiten statt:

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 72, S. 187, 1911.

Mit A (Zymogen-Saponin)	sogleich	14 Minuten
» »	nach 15 Minuten	12 »
» »	» 30 »	12 ¹ / ₂ »
» »	» 60 »	12 »
» »	» 120 »	10 »
» »	» 300 »	9 ¹ / ₂ »
» »	» 360 »	8 »
Mit B (Zymogen-Wasser)	sogleich	14 ¹ / ₂ »
» »	nach 60 Minuten	13 »
» »	» 300 »	13 ¹ / ₂ »

Versuch 17.

Ein anderer Versuch gab folgende Zeiten:

Mit A	sogleich	74 Minuten
» »	nach 5 Minuten	69 »
» »	» 10 »	66 ¹ / ₂ »
» »	» 20 »	63 »
» »	» 45 »	62 »
» »	» 60 »	60 »
» »	» 90 »	58 ¹ / ₂ »
» »	» 120 »	59 »
» »	» 240 »	58 »
Mit B	sogleich	73 »
» »	nach 60 Minuten	71 »
» »	» 240 »	72 »

Das Saponin aktiviert also das Zymogen, und dabei spielt die Zeit eine wesentliche Rolle, indem, wenigstens bis zu einer gewissen Grenze, um so mehr Lab aktiviert wird, je länger das Saponin einwirkt.

In folgendem Versuche wurde die Bedeutung der Temperatur untersucht.

Versuch 18.

A. In der einen Probe wurde das Zymogen mit Saponin bei einer Temperatur von 37° und in der anderen bei 15° gehalten. Im übrigen wie im Versuch 16.

B. Kontrollprobe mit Wasser anstatt Saponinlösung.

Die Gerinnung fand bei folgenden Zeiten statt:

		37°	15°
Mit A (Zymogen-Saponin)	sogleich	58 Min.	59 Min.
» » »	nach 5 Min.	56 1/2 »	57 »
» » »	» 20 »	49 1/2 »	57 »
» » »	» 45 »	45 »	53 »
» » »	» 60 »	44 »	52 »
» » »	» 120 »	40 »	48 »
Mit B (Zymogen-Wasser)	sogleich	58 »	58 »
» » »	nach 60 Min.	57 »	59 »
» » »	» 120 »	60 »	58 »

Daraus geht hervor, daß bei der höheren Temperatur das Saponin mehr Lab freimacht als bei der niederen.

Durch folgenden Versuch wurde der Einfluß verschiedener Mengen Saponin ermittelt.

Versuch 19.

In der einen Probe wurde zu 10 ccm Labzymogen 10 ccm Saponinlösung zugesetzt, in der anderen 5 ccm Saponinlösung und 5 ccm Wasser. Danach wurde wie in dem vorigen Versuch verfahren.

Folgende Gerinnungszeiten wurden gefunden:

Mit 10 ccm Saponinlös.		5 ccm Saponinlös. + 5 ccm H ₂ O.	
sogleich	55 Min.		55 Min.
nach 5 Min.	49 »		48 »
» 10 »	47 »		45 1/2 »
» 20 »	44 »		44 »
» 30 »	44 1/2 »		42 »
» 60 »	41 »		41 »
» 90 »	41 »		42 1/2 »
» 120 »	41 1/2 »		42 »

Die größere Saponinmenge hat nicht wesentlich mehr Lab als die kleinere freigemacht. Ungefähr gleichzeitig ist das Maximum für die Einwirkung des Saponins erreicht worden.

Aus den Versuchen 16—19 geht hervor, daß das Saponin das Labzymogen aktiviert; es hat, obgleich in einem geringeren

Grade, dieselbe Einwirkung wie HCl. Nach dem oben Gesagten kommt diese Einwirkung des Saponins ganz wahrscheinlich durch die Entstehung einer Art von Vereinigung zwischen Saponin und Hemmungskörper zustande.

Lab, Immunserum und Saponin.

Das in folgenden Versuchen angewandte Immunserum war von Kaninchen nach Einspritzen von Lab erhalten worden. Seine hemmende Einwirkung war bedeutend kräftiger als die des Normalserums; es mußte in höherem Grade verdünnt werden. Die Versuche wurden wie die mit Normalserum ausgeführt.

Versuch 20.

Das Immunserum wurde 10 Minuten lang bei 37° in der einen Probe mit Saponin (A) und in der anderen mit Wasser (B) erhitzt. Nach dem Zusatz des Labes wurden die Gerinnungszeiten auf gewöhnliche Weise bestimmt. Folgende Zeiten wurden gefunden:

Mit A (Immunserum-Saponin)	78 Minuten
» B (Immunserum-Wasser)	68 »
» C Kontrollprobe	26 »

Versuch 21.

In diesem Versuche wurden folgende Ergebnisse erhalten:

Mit A	43 Minuten
» B	27 »
» C	12 »

Aus diesen zwei Versuchen geht hervor, daß die Hemmungswirkung des Immunserums vermehrt worden war, anstatt, wie man erwarten konnte, vermindert zu werden. Dieses Resultat war im hohen Grade überraschend. Einige Versuche mit Normalserum von Kaninchen ergaben, daß das Saponin die Hemmungswirkung des Normalserums beeinträchtigt — vollkommen so, wie es mit dem Normalserum vom Pferde der Fall war. Beim Immunserum ergibt das Saponin eine geringe Steigerung der Hemmung. Wie das zu erklären ist, steht noch dahin.

Trypsin, Kohle und Saponin.

Die Hemmung der Trypsinwirkung durch Kohle ist eingehend von Hedin¹⁾ untersucht worden. Ich habe einige Versuche betreffs des Verhältnisses des Saponins zu dieser Hemmung ausgeführt. Die Trypsinlösung, die hier zur Anwendung kam, ist auf folgende Weise hergestellt worden. Gleiche Teile zerkleinerte Pankreassubstanz und Wasser wurden einen Tag lang im Thermostat bei 37° aufbewahrt. Um Fäulnis zu verhindern, wurden Toluol und Chloroform zugesetzt. Danach wurde filtriert; nachdem die Flüssigkeit einige Tage dialysiert worden war, wurde sie einige Zeit im Thermostat gehalten, wonach erneutes Dialysieren stattfand. Die auf diese Weise gewonnene Trypsinlösung enthielt verhältnismäßig kleine Mengen Eiweiß. Als Digestionsmaterial wurde eine 4%ige Caseinlösung angewandt, die durch Auflösung von 40 g Casein in 1 Liter Wasser, das 2% Normal-NaOH enthielt, erhalten worden war. Die Lösung zeigte gegen Lackmus neutrale Reaktion. Zu jeder Verdauungsprobe wurden davon 50 ccm genommen. Die Kohlesuspension war 3%ig und die Saponinlösung 2%ig. Die Digestion fand 12 Stunden lang bei 37° statt. Für die Bestimmung der Größe der Verdauung wurde die von Sörensen²⁾ angegebene Methode mit Formoltitrierung benutzt. $\frac{1}{5}$ -NaOH mit Phenolphthalein als Indikator wurde angewandt. Die Menge der Flüssigkeit, die titriert wurde, war in allen Proben 25 ccm.

Versuch 22.

A. 6 ccm Kohlesuspension wurden mit 6 ccm Saponinlösung versetzt, und die Mischung wurde 30 Minuten lang bei 37° gehalten. Danach wurden 6 ccm Trypsinlösung zugeführt; nachdem die Mischung 1 Stunde lang bei 37° gehalten worden war, wurde zentrifugiert, und von der klaren Flüssigkeit wurden 15 ccm für die Digestion des Caseins genommen.

B. Wie in A; aber mit Wasser anstatt Saponinlösung.

C. Kontrollprobe mit Wasser anstatt Kohlesuspension und Saponinlösung.

¹⁾ Bio-Chemical Journal, Bd. 1, S. 484, 1906.

²⁾ Biochemische Zeitschrift, Bd. 7, S. 45, 1908.

Bei der Formoltitrierung wurden verbraucht:

Mit A (Kohle-Saponin-Trypsin)	5,75 ccm NaOH
» B (Kohle-Wasser-Trypsin)	3,00 » »
» C	6,50 » »

Versuch 23.

Dieser Versuch ging auf dieselbe Weise, aber mit andern Mengen vor sich.

Mit A	5,40 ccm NaOH
» B	3,80 » »
» C	9,30 » »

Aus diesen beiden Versuchen geht hervor, daß die Kohle durch das Saponin in ihrer Hemmung auf das Trypsin verhindert worden ist. Daß das Saponin ohne Einfluß auf das Trypsin ist, wird durch folgenden Versuch gezeigt.

Versuch 24.

A. Eine Mischung von 5 ccm Saponinlösung und 5 ccm Trypsin wurde 1 Stunde lang bei 37° gehalten. Danach wurde mit dem Casein digeriert.

B. Anstatt Saponinlösung wurde Wasser genommen. Die Titrierung fiel auf folgende Weise aus:

Mit A (Saponin-Trypsin)	5,20 ccm NaOH
» B (Wasser-Trypsin)	5,25 » »

Im folgenden Versuche wurde geprüft, ob die Zeit für die Einwirkung des Saponins auf die Kohle irgend einen Einfluß hatte.

Versuch 25.

A. Gleiche Teile Kohlesuspension und Saponinlösung wurden gemischt und bei 37° aufbewahrt. Nach den unten angegebenen Zeiten wurden 12 ccm davon genommen, zu welchen 6 ccm Trypsinlösung zugesetzt wurden, und das Ganze wurde 1 Stunde lang bei 37° gehalten; darauf wurde zentrifugiert und die Verdauung mit 15 ccm ausgeführt.

B. Je 6 ccm Kohlesuspension, Wasser und Trypsinlösung wurden gemischt und 1 Stunde lang bei 37° gehalten. Nach dem Zentrifugieren wurden zur Caseinlösung 15 ccm zugesetzt.

C. Kontrollprobe mit Wasser anstatt Kohle und-Saponin.

Die Titrierung gab folgendes Resultat:

Mit A (Kohle-Saponin) unmittelbarer Zusatz von Trypsin	5,70 ccm NaOH,
» » » nach 15 Minuten	5,65 » »
» » » » 30 »	5,70 » »
» » » » 60 »	5,75 » »
» » » » 90 »	5,75 » »
mit B (Kohle-Wasser)	4,10 » »
mit C	6,50 » »

Aus diesem Versuche sehen wir, daß eine vermehrte Zeit für die Einwirkung des Saponins auf die Kohle ohne Bedeutung ist. Die Aufnahme des Saponins durch die Kohle scheint sehr schnell einzutreten.

Der Einfluß der Menge des Saponins geht aus folgendem Versuch hervor.

Versuch 26.

A. Zu der Kohlesuspension wurden die unten angegebenen verschiedenen Mengen Saponinlösung und Wasser zugesetzt, wobei, wie ersichtlich, gleiche Volumina in den verschiedenen Proben immer erhalten wurden. Danach wurde Trypsin zugegeben, und die Digestion fand wie gewöhnlich statt.

B. Wie in B im vorigen Versuche.

C. Kontrollprobe.

Titrierung:

Mit A (Kohle + 1 ccm Sap.-Lös. + 5 ccm H ₂ O)	4,45 ccm NaOH
» (» + 2 » » + 4 » »)	4,60 » »
» (» + 4 » » + 2 » »)	4,80 » »
» (» + 6 » » kein Wasser)	5,00 » »
mit B (Kohle + 6 ccm Wasser)	3,10 » »
mit C	5,60 » »

Die Fähigkeit des Saponins, die Kohle daran zu verhindern, die Trypsinwirkung zu hemmen, nimmt also, wenn auch nicht besonders viel, mit einer steigenden Saponinmenge zu.

Aus den jetzt erwähnten Versuchen geht hervor, daß das Saponin zu einem nicht geringen Teile dem hemmenden Einfluß

der Kohle auf die Trypsinwirkung entgegenwirkt. Die folgenden Versuche wurden unternommen, um festzustellen, ob schon an die Kohle gebundenes Trypsin durch Saponin freigemacht werden konnte.

Versuch 27.

Zu 55 ccm Trypsinlösung wurde 1,5 g Kohlepulver zugesetzt und die Mischung wurde 5 Stunden lang bei 37° gehalten.

A. 40 ccm von dieser erhitzten Mischung wurden mit 20 ccm Saponinlösung versetzt. Nach unten angegebenen Zeiten wurden 20 ccm ausgenommen und zentrifugiert, zur Caseinlösung wurden von der klaren Flüssigkeit 15 ccm zugesetzt, welche also 10 ccm Trypsinlösung und 5 ccm Saponinlösung enthielten.

B. 15 ccm der obenerwähnten Trypsin-Kohlemischung wurden zentrifugiert; hiervon wurden 10 ccm und außerdem 5 ccm Wasser dem Casein zugeführt.

C. Kontrollprobe, die 10 ccm Trypsinlösung zusammen mit 5 ccm Wasser enthielt.

Bei der Titrierung wurden folgende Zahlen erhalten:

Mit A (Kohle-Tryp.-Sap.)	Zentrifugieren sogleich	4,50 ccm NaOH		
»	»	nach 60 Min.	4,60	»
»	»	» 120	4,70	»
mit B (Kohle-Trypsin-Wasser)			4,45	»
mit C			14,40	»

Versuch 28.

Folgender Versuch wurde auf ähnliche Weise ausgeführt.

Mit A	Zentrifugieren sogleich	3,30 ccm NaOH
»	»	nach 60 Minuten
»	»	» 180
Mit B		3,30
Mit C		8,20

Diese beiden Versuche zeigen, daß das Saponin nicht in erwähnenswertem Grade das Trypsin aus der Verbindung mit der Kohle abzulösen vermag.

Aus den Versuchen 22—28 geht hervor, daß das Saponin zum Teile die Kohle verhindert, die Trypsinwirkung zu hemmen, wobei eine größere Menge Saponin eine etwas kräftigere Wirkung als eine kleinere hat. Dagegen vermag das Saponin nur sehr kleine Mengen von schon gebundenem Trypsin freizumachen. Werden diese Resultate mit denen von der Einwirkung des Saponins auf die Hemmung der Labwirkung durch Kohle, welche in den Versuchen 1—10 angegeben sind, verglichen, so finden wir, daß die Ergebnisse in den beiden Fällen insofern mit einander übereinstimmen, als die Kohle durch die Gegenwart des Saponins verhindert wird, die Enzymwirkungen zu hemmen. Inzwischen unterscheiden sich die Ergebnisse dadurch, daß das Saponin die Fähigkeit hat, bedeutende Mengen durch Kohle gebundenes Lab freizumachen, wogegen es auf die Kohle-Trypsinverbindung nur die oben erwähnte geringe Einwirkung hat. Dieses kann möglicherweise darauf beruhen, daß die Kohle-Trypsinverbindung fester als die Kohle-Labverbindung ist.

Trypsin. Serumalbumin und Saponin.

Die Hemmung der Trypsinwirkung durch Serumalbumin ist von Hedin¹⁾ untersucht worden. Wie sich Saponin zu dieser Hemmung verhält, geht aus folgenden Versuchen hervor. Das Serumalbumin ist auf folgende Weise hergestellt worden. Neutralisiertes Ochsen Serum wurde mit einem gleich großen Volumen gesättigter $(\text{H}_4\text{N})_2\text{SO}_4$ -Lösung versetzt. Das niedergeschlagene Globulin wurde wegfiltriert. Das Filtrat wurde mit dem genannten Salze gesättigt. Das ausgeschiedene Serumalbumin wurde wegfiltriert und in etwas Wasser gelöst. Die Lösung wurde danach 4—5 Tage lang gründlichem Dialysieren unterworfen. Die Trypsin- und Saponinlösungen waren dieselben wie bei der Hemmung durch Kohle.

Versuch 29.

A. 5 ccm Serumalbuminlösung wurden 1 Stunde lang bei 37° mit 5 ccm Saponinlösung gehalten. 10 ccm Trypsin-

¹⁾ Journ. of physiol., Bd. 32, S. 390, 1905.

lösung wurden danach zugegeben; die Mischung wurde zwei Stunden lang bei 37° aufbewahrt und danach dem Casein zugesetzt.

B. Anstatt Saponinlösung wurde Wasser genommen.

C. Kontrollprobe mit Wasser anstatt Saponin und Serumalbumin.

Bei der Titrierung wurden folgende Ziffern erhalten:

Mit A (Albumin-Saponin-Trypsin)	3,90 ccm NaOH
› B (Albumin-Wasser-Trypsin)	3,85 › ›
› C	10,05 › ›

Versuch 30.

Dieser Versuch gab folgendes Resultat:

Mit A	3,45 ccm NaOH
› B	3,55 › ›
› C	8,40 › ›

Diese beiden Versuche zeigen, daß das Saponin ohne Einfluß auf das Serumalbumin bei der Hemmung der Trypsinwirkung ist.

Lab, Kohle und Cholesterin.

Die Cholesterinsuspension, die in diesen Versuchen zur Anwendung kam, wurde auf folgende Weise hergestellt. Eine Lösung von 0,25 g Cholesterin in ungefähr 15 ccm Aceton wurde in kleinen Mengen in einen Becher mit kochendem Wasser gegossen. Nach jedem neuen Eingießen wurde das Aceton der gebildeten Cholesterinsuspension auf dem Wasserbad verdampft; verbrauchtes Wasser wurde immer durch neues ersetzt. Nachdem auf diese Weise die ganze Cholesterinlösung in das Wasser gebracht worden war, und das Aceton verdampft war, wurde die Suspension filtriert und Wasser bis zu 100 ccm aufgegossen. Bei dem Abgießen der Cholesterinlösung in das Wasser fand starkes Schäumen von dem im Anfang sich schnell verflüchtigen Aceton statt; hierbei sammelte sich etwas Cholesterin auf die Blasen in größeren Partikeln, die danach auf dem Filtrum blieben. Infolgedessen wurde die Stärke der Cholesterinsuspension auf etwa 0,20% berechnet. Die Suspension hatte ein milchähn-

liches Aussehen und konnte mit Toluol lange aufbewahrt werden, ohne sich zu ändern.

Die Versuche wurden wie die mit Saponin und Lab ausgeführt, und sie werden darum weniger ausführlich beschrieben.

Versuch 31.

A. Die Kohle- und Cholesterinsuspensionen wurden gemischt und 10 Minuten lang bei 37° gehalten; das Lab wurde zugesetzt, und Zentrifugieren fand statt. Die Gerinnungszeit wurde auf gewöhnliche Weise bestimmt.

B. Mit Wasser anstatt Cholesterinsuspension.

C. Kontrollprobe.

Folgende Gerinnungszeiten wurden gefunden:

Mit A (Kohle-Cholesterin)	18 Minuten
» B (Kohle-Wasser)	59 »
» C	4 $\frac{1}{2}$ »

Das Cholesterin hat also die Kohle zum Teil gehindert, die Labwirkung zu hemmen. Es ist, wie folgender Versuch zeigt, ohne Einwirkung auf das Lab.

Versuch 32.

(Lab-Wasser)	9 $\frac{1}{4}$ Minuten
(Lab-Cholesterin)	9 »

Versuch 33.

A. Die Kohle- und Cholesterinsuspensionen wurden bei 37° während unten angegebener Zeiten zusammen aufbewahrt, ehe das Lab zugesetzt wurde. Danach wurde verfahren, wie oben angegeben.

B. Wasser anstatt der Cholesterinsuspension.

C. Kontrollprobe.

Die Gerinnung fand nach folgenden Zeiten statt:

Mit A (Kohle-Cholesterin)	5 Min.	13 Minuten
» » »	15 »	12 $\frac{3}{4}$ »
» » »	30 »	13 $\frac{1}{2}$ »
» » »	60 »	12 »
» B (Kohle-Wasser)		30 »
» C		2 »

Die Einwirkung des Cholesterins findet sehr schnell statt, denn sie wird, wie ersichtlich, mit einer längeren Zeit nicht vermehrt.

Der Einfluß verschiedener Mengen des Cholesterins geht aus folgendem Versuche hervor.

Versuch 34.

A. Die Kohlesuspension wurde mit verschiedenen Mengen Cholesterinsuspension und Wasser, wie es unten angegeben wird, versetzt. In den verschiedenen Proben blieben doch immer, wie ersichtlich, die Volumina gleich. Das Lab wurde danach zugegeben, und die Gerinnung fand statt.

B. Wasser anstatt der Cholesterinsuspension.

C. Kontrollprobe.

Die Gerinnungszeiten waren:

Mit A (Kohle + $\frac{1}{2}$ ccm Chol.-Susp. + $1\frac{1}{2}$ ccm Wasser)	17 Min.
» » » + 1 » » + 1 » »	$8\frac{1}{2}$ »
» » » + 2 » » kein Wasser)	$5\frac{1}{2}$ »
» B (Kohle + 2 » Wasser)	31 »
» C	$2\frac{1}{2}$ »

Hieraus geht also hervor, daß eine größere Cholesterinmenge eine kräftigere Wirkung als eine kleinere hat.

Versuch 35.

In diesem Versuche wurden die Kohlesuspension und das Lab gemischt und 1 Stunde lang bei 37° gehalten. Gleiche Mengen dieser Mischung wurden in der einen Probe (A) mit der Cholesterinsuspension und in der andern (B) mit Wasser versetzt. Nach unten angegebenen Zeiten wurden davon Proben genommen, die zentrifugiert wurden, und die Gerinnungszeiten mit 2 ccm genommen.

Mit A (Kohle-Lab-Cholesterin)	5 Min.	$15\frac{1}{2}$ Minuten
» » »	15 »	16 »
» » »	30 »	$18\frac{1}{2}$ »
» » »	60 »	21 »
Mit B (Kohle-Lab-Wasser)	5 »	$15\frac{1}{2}$ »
» » »	15 »	21 »
» » »	30 »	26 »
» » »	60 »	28 »

Versuch 36.

Wie der vorige wurde dieser Versuch ausgeführt.

Mit A nach 5 Minuten	122 Minuten
» » » 30	130 »
» » » 60	138 »
» B » 5	128 »
» » » 30	150 »
» » » 60	163 »

Aus diesen beiden Versuchen sehen wir also, daß das Cholesterin nicht vermag, durch die Kohle schon gebundenes Lab freizumachen.

Werden die in Versuchen 31—36 gewonnenen Resultate, daß das Cholesterin die Kohle in ihre Hemmung auf die Labwirkung zum Teile zu verhindern vermag, mit denen verglichen, welche mit dem Saponin erhalten wurden, so geht daraus hervor, daß das Saponin eine bedeutend kräftigere Wirkung hat. Das Saponin hinderte vollkommen die Kohle, die Labwirkung zu hemmen, was das Cholesterin nicht vermochte, und das Saponin machte im Gegensatz zu dem Cholesterin bereits gebundenes Lab frei.

Lab, Normalserum und Cholesterin.

Diese Versuche wurden wie die mit Lab, Normalserum und Saponin ausgeführt, und sie werden deshalb nicht ausführlich besprochen.

Versuch 37.

A. Das Serum wurde zunächst mit der Cholesterinsuspension gemischt und 10 Minuten lang bei 37° gehalten. Dann wurde wie gewöhnlich mit Lab geprüft.

B. Mit Wasser anstatt Cholesterin.

C. Kontrollprobe.

Mit A (Serum-Cholesterin)	32 Minuten
» B (Serum-Wasser)	10 »
» C	6½ »

Versuch 38.

Mit diesem Versuche wurden folgende Gerinnungszeiten gefunden:

Mit A	49 Minuten
» B	15 »
» C	8 »

Hieraus geht hervor, daß das Cholesterin nicht vermag, die Kohle zu verhindern, die Labwirkung aufzuheben. Anstatt dessen ist die Hemmung vermehrt.

Wir sahen, daß das Saponin Lab aus der Verbindung mit Normalserum freimacht. Um zu ergründen, wie sich Cholesterin in dieser Hinsicht verhielte, wurde folgender Versuch gemacht.

Versuch 39.

A. Lab und Serum wurden gemischt und zwei Stunden lang bei 37° gehalten; die Cholesterinsuspension wurde zugesetzt, und nach unten angegebenen Zeiten wurden Proben davon genommen. Die Gerinnung wurde wie gewöhnlich ausgeführt.

B. Wie in A, aber mit Wasser anstatt Cholesterin.

Die Gerinnung geschah in folgenden Zeiten:

Mit A (Serum-Lab-Cholesterin) sogleich	46 Minuten
» » » nach 10 Min.	50 »
» » » » 20 »	51 »
» » » » 30 »	52 »
» » » » 45 »	54 »
» » » » 60 »	55 »
» » » » 90 »	63 »
» B (Serum-Lab-Wasser) sogleich	46 »
» » » nach 10 »	52 »
» » » » 20 »	54 »
» » » » 30 »	58 »
» » » » 60 »	63 »

Wie ersichtlich, vermag das Cholesterin nicht das Lab von der Kohle abzulösen. Und dies war, wenn man das Resultat der zwei vorigen Versuche ins Auge faßt, nicht überraschend; den man konnte nicht erwarten, daß das Chole-

sterin, welches die Hemmung nicht hinderte, irgend eine Wirkung in der obenerwähnten Richtung haben könnte.

Trypsin, Kohle und Cholesterin.

Diese Versuche sind wie die mit Trypsin, Kohle und Saponin ausgeführt worden.

Versuch 40.

Die Kohlesuspension und die Cholesterinsuspension wurden 1 Stunde lang bei 37° zusammen gehalten. Das Trypsin wurde zugegeben, und nachdem die Mischung 2 Stunden lang bei 37° gehalten worden war, wurde zentrifugiert. Auf die gewöhnliche Weise fand die Verdauung mit dem Casein statt.

Die Formoltitrierung gab folgendes Resultat:

(Kohle-Cholesterin-Trypsin)	3,65 ccm NaOH
(Kohle-Wasser-Trypsin)	3,80 » »
(Wasser-Trypsin)	9,30 » »

Versuch 41.

Dieser Versuch, auf dieselbe Weise ausgeführt, gab folgende Ziffern:

(Kohle-Cholesterin)	4,00 ccm NaOH
(Kohle-Wasser)	4,00 » »
Kontrollprobe	8,40 » »

Diese beiden Versuche zeigen, daß das Cholesterin ohne Einfluß auf die Hemmung der Trypsinwirkung durch Kohle ist, wie auch nach folgendem Versuche auf das Trypsin selbst.

Versuch 42.

(Cholesterin-Trypsin)	9,05 ccm NaOH
(Wasser-Trypsin)	9,10 » »

Nach Versuch 31 hindert das Cholesterin die Hemmung der Labwirkung durch Kohle, aber nicht nach den Versuchen 40 und 41 die der Trypsinwirkung. Dieses kann möglicherweise darauf beruhen, daß die Kohle-Trypsinverbindung fester als die Kohle-Labverbindung ist.

Trypsin, Serumalbumin und Cholesterin.

Wie die Versuche 29 und 30, die das Verhältnis des Saponins zu der Hemmung der Trypsinwirkung durch Serumalbumin beschreiben, wurde folgender Versuch ausgeführt.

Versuch 43.

Die Cholesterinsuspension wurde mit der Serumalbuminlösung während unten angegebener Zeiten bei 37° aufbewahrt. Das Trypsin wurde zugesetzt und die Mischung 2 Stunden lang bei 37° gehalten. Danach die Verdauung wie gewöhnlich.

Folgende Ziffern wurden erhalten:

(Serumalbumin-Cholesterin)	15 Minuten	3,85 ccm NaOH
»	60 »	3,90 » »
»	120 »	3,80 » »
(Serumalbumin-Wasser)		3,80 » »
Kontrollprobe		10,65 » »

Das Cholesterin vermag also nicht die Hemmung der Trypsinwirkung durch Serumalbumin zu verhindern, und ist im übrigen ohne Einfluß auf dieselbe.

Lab, Serum und Eierklar.

Aus den Versuchen, welche Hedin¹⁾ betreffs der Einwirkung des Eierklars auf die Hemmung der Labwirkung durch Kohle gemacht hat, geht hervor, daß Eierklar, mit HCl behandelt, die Kohle zu hemmen hindert und schon gebundenes Lab freimacht. Bei folgenden Versuchen ist anstatt Kohle Normalserum als hemmende Substanz angewandt worden. Das Eierklar wurde folgendermaßen behandelt: das Eierklar eines Hühnereies wurde mit etwa 100 ccm Wasser ausgerührt; die Lösung wurde filtriert, neutralisiert und gegen destilliertes Wasser dialysiert. 10 ccm davon wurden 2 Stunden lang bei 37° mit 1 ccm $n/10$ -HCl gehalten und danach neutralisiert und filtriert. Das Serum war neutralisiertes Normalserum vom Pferde.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 63, S. 143, 1909.

Versuch 44.

A. 1 ccm Eierklar wurde mit 1 ccm Serum 10 Minuten lang bei 37° gehalten; das Lab wurde danach zugesetzt und die Gerinnung auf die gewöhnliche Weise ausgeführt.

B. Wie in A, aber mit Wasser anstatt Eierklar.

C. Kontrollprobe.

Die Gerinnungszeiten waren:

Mit A (Serum-Eierklar)	21 Minuten
» B (Serum-Wasser)	34 »
» C	8 »

Das Eierklar hat also das Serum gehindert, die Labwirkung zu hemmen.

Es war nach folgendem Versuche ohne Einfluß auf das Lab.

Versuch 45.

(Eierklar-Lab)	6 Minuten
(Wasser-Lab)	6 »

Versuch 46.

In diesem Versuche wurde der Einfluß der Zeit untersucht. Eierklar und Serum wurden zunächst gemischt und während unten angegebener Zeiten bei 37° gehalten; darauf wurde das Lab zugesetzt und die Gerinnungszeit beobachtet.

(Serum-Eierklar)	5 Minuten	19 Minuten
»	15 »	21 ¹ / ₂ »
»	30 »	18 ¹ / ₂ »
(Serum-Wasser)		45 »
Kontrollprobe		10 »

Eine längere Zeit für die Einwirkung des Eierklars auf das Serum ist also ohne Bedeutung. Die Reaktion zwischen den zwei Substanzen findet folglich sehr schnell statt. Dagegen spielt die Eierklarmenge nach folgendem Versuche eine gewisse Rolle.

Versuch 47.

Verschiedene Mengen von Eierklar und Wasser, wie untenstehende Tabelle angibt, wurden mit Serum gemischt, darauf wurde wie gewöhnlich mit Lab geprüft.

(Serum + 1/2 ccm Eierklar + 1 1/2 ccm H ₂ O)	30 Minuten
(„ + 1 „ „ + 1 „ „)	26 „
(„ + 1 1/2 „ „ + 1/2 „ „)	22 „
(„ + 2 „ „ kein Wasser)	19 „
(Serum + 2 „ Wasser)	63 „
Kontrollprobe	6 „

Eine größere Menge Eierklar vermindert in höherem Grade als eine kleinere das hemmende Vermögen des Serums.

Um zu ergründen, inwiefern Eierklar durch Serum gebundenes Lab freizumachen vermag, wurde folgender Versuch unternommen.

Versuch 48.

Gleiche Teile einer Lab-Serummischung, die 2 Stunden lang bei 37° gehalten worden war, wurden in der einen Probe (A) mit Eierklar und in der anderen (B) mit Wasser versetzt. Nach unten angegebenen Zeiten wurde die Gerinnung ausgeführt.

Mit A (Serum-Lab-Eierklar)	sogleich	29 Min.
„ „ „	nach 15 Min.	31 „
„ „ „	„ 30 „	32 „
„ „ „	„ 60 „	32 1/2 „
„ „ „	„ 120 „	34 „
Mit B (Serum-Lab-Wasser)	sogleich	29 1/2 „
„ „ „	nach 60 Min.	33 „
„ „ „	„ 120 „	38 „

Aus diesem Versuch geht hervor, daß Eierklar nicht vermag, das Lab von der Kohle loszumachen. Dasselbe Ergebnis gaben auch andere Versuche.

Die in den Versuchen 44—48 gewonnenen Resultate stimmen mit denen, die das Verhältnis des Eierklars zu der Hemmung der Labwirkung durch Kohle angeben, darin überein, daß sowohl Kohle als Serum zum Teil gehindert werden, die Enzymwirkung zu hemmen. Inzwischen vermag Eierklar nicht die Lab-Serumverbindung zu aktivieren, was es mit der Lab-Kohleverbindung tat. Es scheint, als ob die letztere weniger fest wäre.

Zusammenfassung.

Aus den vorstehenden Versuchen ergibt sich:

1. Das Saponin verhindert in genügender Menge vollständig die Hemmung der Labwirkung durch Kohle und wirkt der Hemmung durch Normalserum zum Teil entgegen. Die Reaktion zwischen Saponin und Hemmungskörper scheint sehr schnell einzutreten, da eine längere Zeit den genannten Einfluß des Saponins nicht vermehrt. Dagegen übt eine größere Menge Saponin eine kräftigere Wirkung als eine kleinere aus. Das Saponin macht Lab, das mit obenerwähnten Substanzen inaktiv geworden ist, wieder zum Teil frei. Hierbei spielt die Zeit eine wesentliche Rolle, indem um so mehr Lab aktiviert wird, je länger das Saponin einwirkt. Bei einer höheren Temperatur wird aus der Verbindung mit Kohle mehr Lab als bei einer niederen freigemacht, wie auch eine größere Menge Saponin kräftiger als eine geringere wirkt. Die Einwirkung des Saponins auf Kohle und Lab liegt daran, daß das Saponin durch die Kohle aufgenommen wird. Das Saponin scheint die Hemmungswirkung des Immunserums auf Lab etwas zu vermehren.

2. Das Saponin aktiviert zum Teil eine Labzymogenlösung. Zeit und Temperatur für seine Einwirkung spielen dabei eine große Rolle.

3. Das Saponin hindert die Kohle an der Hemmung der Trypsinwirkung, wobei es eine etwas kräftigere Wirkung mit steigender Menge entwickelt. Es vermag nicht in erwähnenswertem Grade das Trypsin aus der Verbindung mit Kohle abzulösen. Es ist ohne Einfluß auf die Hemmung der Trypsinwirkung durch Serumalbumin.

4. Das Cholesterin verhindert die Kohle, die Labwirkung zu hemmen; hierbei übt eine größere Menge von Cholesterin eine kräftigere Einwirkung als eine kleinere aus. Es ist nicht imstande, die Verbindung zwischen Kohle und Lab zu lösen. Es vermehrt die Hemmung der Labwirkung durch Normalserum.

5. Das Cholesterin hat keinen Einfluß auf die Hemmung der Trypsinwirkung durch Kohle und Serumalbumin.

6. Eierklar, mit HCl behandelt und neutralisiert, wirkt der Hemmung der Labwirkung durch Normalserum zum Teil entgegen, und eine größere Menge Eierklar vermindert in höherem Grade als eine kleinere die hemmende Fähigkeit des Serums. Eierklar ist ohne Einwirkung auf die Lab-Serum-Verbindung.

Mehrere der obenerwähnten Ergebnisse geben eine gute Stütze für die Ansicht ab, daß die Hemmungswirkung mehrerer Stoffe durch eine Reaktion zwischen Hemmungskörper und Enzym verursacht wird. Die Hemmung bleibt aus, wenn der Hemmungskörper selbst andere Stoffe aufnimmt. Aus dem gleichen Grunde können diese Stoffe auch das bereits gebundene Enzym zum Teil aus der Verbindung mit dem Hemmungskörper verdrängen und dadurch aktivieren. Wir sehen auch, daß die Hemmungskörper Enzyme mit verschiedener Stärke an sich festhalten; so kann z. B. Saponin Lab, aber nicht Trypsin aus der Verbindung mit Kohle losmachen. Da auch dasselbe Enzym mit verschiedener Stärke von verschiedener Hemmungskörpern festgehalten wird, so vermag Saponin Lab aus der Verbindung mit Normalserum, aber nicht aus der mit Immunserum abzulösen. Aus den Versuchen geht auch hervor, daß das Saponin eine bedeutend kräftigere Wirkung als das Cholesterin entwickelt.
