

Über die fermentative Hydroperoxydzersetzung.

V. Mitteilung.

Von

P. Waentig und O. Steche.

(Mitteilung aus dem Laboratorium für angewandte Chemie der Universität Leipzig.)

(Der Redaktion zugegangen am 28. Oktober 1914.)

Um die chemische Natur der Katalase zu charakterisieren, wurden zunächst noch weitere Versuche darüber angestellt, durch welche Fermente die Aktivität der Katalaselösung zerstört werden könnte. Bisher war festgestellt worden,¹⁾ daß sicherlich Trypsin die Katalase vernichte, während die Wirkung des Pepsins wegen der sauren Reaktion, bei der es nur zur Wirkung gelangt, unsicher bleibt. Es wurde aus dem Verhalten des Trypsins der Wahrscheinlichkeitsschluß gezogen, daß die Katalase entgegen anderen Auffassungen²⁾ eine eiweißartige Substanz sei, da sie dem Angriff proteolytischer Fermente unterläge.

Es war nun von Interesse, auch die Wirkung des Erepsins zu untersuchen. Der Unterschied zwischen tryptischer und ereptischer Funktion liegt bekanntlich darin, daß, während durch erstere genuine Eiweißkörper angegriffen werden, letztere nur «Pepton» abbaut. Es wäre also durch entsprechende Versuche mit Katalase möglich, Anhaltspunkte darüber zu erhalten, ob die Katalase den Charakter eines genuinen Eiweißes oder polypeptidähnlichen Charakter besäße.

Die Entscheidung wird nur dadurch erschwert, daß weder die unter dem Namen «Trypsin» zusammengefaßten Ferment-

¹⁾ Waentig und Steche, Diese Zeitschr., Bd. 83 (1913) S. 315.

²⁾ Vgl. a. a. O.

präparate, noch die Extrakte der Dünndarmschleimhaut, welche das Erepsin enthalten, die tryptische bezw. ereptische Funktion in reiner Form zeigen, vielmehr Anhaltspunkte¹⁾ dafür vorhanden sind, daß die Trypsinpräparate des Handels eine peptolytische Komponente enthalten und daß andererseits Darmschleimhautextrakte, wenigstens wenn sie nicht besonders gereinigt sind,²⁾ auch tryptische Wirkung zeigen, d. h. native Eiweißkörper, wenn auch nur in geringem Maße, angreifen.

Es war daher nicht verwunderlich, daß zunächst festgestellt werden konnte, daß auch wässrige Extrakte aus der Schleimhaut des Dünndarmes von Schwein und Katze zerstörend auf Katalase wirkten. (Über diese Versuche wird an anderer Stelle³⁾ ausführlich berichtet, weshalb Belegprotokolle hier nicht angeführt werden sollen. Es ist dort die Wirkung für eine ganze Reihe Katalaseextrakte sehr verschiedener Herkunft erwiesen.) Denn da sich zeigte, daß der Extrakt auch Kasein und Fibrin neben Pepton angriff, so konnte die Wirkung auf eine solche der tryptischen Komponente des Erepsins zurückzuführen sein. Es konnte aber durch einige gleich zu schildernde Differenzialversuche gezeigt werden, daß wahrscheinlich doch das Erepsin selbst bezw. seine peptolytische Komponente es ist, welche in diesem Falle die Zerstörung der Katalase bedingt.

Zunächst benutzten wir dazu die von Gläbner und Stauber⁴⁾ gefundene Tatsache, daß die Wirkung von käuflichem Trypsinpräparat und von der tryptischen Komponente des Erepsins auf eine Fibrinflocke durch Blutserum aufgehoben werden kann. Worauf diese Schutzwirkung beruht, ist nicht

¹⁾ Vgl. Oppenheimer, Die Fermente, IV. Aufl., Bd. I, S. 441.

²⁾ Bei der Herstellung des erepsinhaltigen Extrakts hielten wir uns streng an die Vorschrift von Cohnheim. Diese Zeitschrift, Bd. 33, S. 454 (1901).

³⁾ K. Winkler, Dissertation, Leipzig 1914.

⁴⁾ Biochem. Zeitschr., Bd. 25, S. 210 (1910). s. ferner auch Jahresbericht f. Tierchemie 1911. S. 150, und M. Jakoby, Biochem. Zeitschr., Bd. 10 (1908), S. 232.

völlig aufgeklärt, doch konnte sie von uns bestätigt werden.¹⁾ Es ließ sich nun zeigen, daß ein Gemisch von Darmextrakt und Serum, welches sich gegen ein Fibrinlocke indifferent verhielt, sich auf Katalaselösung noch fast ebenso wirksam erwies, wie der Darmextrakt allein. Das sprach dafür, daß hier die peptolytische Komponente in Wirksamkeit getreten war (vgl. Tabelle 1).²⁾

Tabelle 1.

Vorbemerkung: Als Serum kam frisches Pferdeblutserum zur Verwendung. Die Erepsinlösung war Katzendarmextrakt. Die Trypsinlösung war eine Lösung von dem Merkschen Präparat. Bei Gegenwart von Serum wurde eine Fibrinlocke weder durch die Erepsin- noch durch die Trypsinlösung angegriffen. Pepton wird von Erepsin auch bei Gegenwart von Serum merklich angegriffen. Versuchstemperatur hier wie bei den weiteren Versuchen 35°.

	Versuch I		Versuch II	
	K-Werte		K-Werte	
	Anfangs	Nach 49 Std.	Anfangs	Nach 23 Std.
Katalaselösung	4250	2692	4399	4481
Katalase + Erepsinlösung .	4837 ³⁾	204	5080	837
Katalase + Serum	4446	2446	—	—
Katalase + Erepsin + Serum	4354	804	3994	1183
Serumlösung	270	inaktiv	—	—

Weiter konnte gezeigt werden, daß Schweinedarmextrakt, welches Pepton rasch spaltete, Kasein jedoch nicht angriff, auf Katalaselösung stärker einwirkte als eine Lösung von käuflichen Trypsin,⁴⁾ welche eine Kaseinlösung in der gleichen Zeit

¹⁾ Vgl. Oppenheimer, Die Fermente usw., IV. Auflage, Bd. I, S. 474 ff.

²⁾ Über die Versuchsanordnung, vgl. Waentig und Steche, Diese Zeitschr., Bd. 83, S. 315 (1913).

³⁾ Die hohen Werte erklären sich durch eine Aktivität des Schweinedarmerepsins, die jedoch bei hoher Temperatur durch Selbstverdauung(?) rasch verschwindet (vgl. die Versuche mit Hefekatalase).

⁴⁾ Verwendet wurden die käufl. Präparate von Merck und C. F. Kahlbaum.

Tabelle 2.

Vorbemerkung: Erepsinlösung aus Schweinedarm, Trypsinlösung wie oben. Die Trypsinlösung verdaut Casein, die Erepsinlösung nicht.

	Versuch I			Versuch II	
	Anfangs	K-Werte		Anfangs	Nach 22 Std.
Nach 16 Std.		Nach 2 Tagen			
Katalaselösung . .	3867	3501	3308	4149	3893
Katalase + Erepsin	4708	2106	1133	6432	3436
Katalase + Trypsin	3663	2631	2297	4325	3181
Erepsinlösung . .	—	—	—	1536	inaktiv

vollständig hydrolysierte (vgl. Tabelle 2). — Dies kann nicht anders gedeutet werden, als daß der Stoff, welcher im Trypsin die Zerstörung des Caseins bedingt, die Zerstörung der Katalase durch Erepsin nicht veranlassen kann.

Bei Katzendarmextrakt, der, wie sich herausstellte, auch Casein angriff, mußte zum Beweise, daß auch hier die peptolytische Funktion bei der Katalasezerstörung in Aktion trat, etwas anderes verfahren werden. Durch successive Verdünnung von käuflicher Trypsinlösung konnten nämlich Bedingungen geschaffen werden, bei denen die Wirkung der Trypsinlösung auf Fibrin immer noch diejenige des Erepsins deutlich übertraf, während die Wirkung auf Katalase hinter der des Darmextraktes zurücktrat. (Vgl. Tabelle 3.)

Tabelle 3.

Vorbemerkung: Erepsinlösung aus Katzendarm. Trypsinlösung: 0,014 g Trypsin (Merck) + 10 ccm H₂O. Nach 19 stündiger Einwirkung ist Peptonlösung nur von der Erepsinlösung angegriffen, Fibrin nur von der Trypsinlösung gelöst. Katalaselösung Fl.

	K-Werte	
	Anfangs	Nach 21 Stunden
2 ccm Katalase + 2 ccm H ₂ O	3949	3182
2 ccm > + 2 ccm Erepsinlösung .	4074	1344
2 ccm > + 2 ccm Trypsinlösung .	4195	546

Tabelle 3 (Fortsetzung).

Vorbemerkung: Erepsinlösung wie oben. Trypsinlösung I: 0,014 g Trypsin + 20 ccm H₂O, Trypsinlösung II: 0,014 g Trypsin + 40 ccm H₂O. Beide greifen Fibrin in 18 Stunden bedeutend stärker an, als die Erepsinlösung. Katalaselösung EI.

	K-Werte	
	Anfangs	Nach 18 Stunden
3 ccm Katalaselg. + 3 ccm H ₂ O	5952	6197
3 „ „ + 3 ccm Erepsinlösung	5535	3292
3 „ „ + 3 ccm Trypsinlg. I .	6131	4347
3 „ „ + 3 ccm Trypsinlg. II .	6085	5447

Die Empfindlichkeit gegen Trypsin besteht auch bei Katalasen pflanzlicher Herkunft, wie die folgenden Versuche zeigen, die zum Teil mit einem direkt erhaltenen wässrigen Hefeextrakt, zum Teil mit dem Extrakt der Alkoholfällung des letzteren ausgeführt wurden. (Vgl. Tabelle 4.) Das Resultat der Versuche wird etwas beeinträchtigt durch die Tatsache, daß die Hefeextrakte für sich beim Stehen bei Zimmertemperatur auch ohne Trypsin allmählich inaktiv werden. Die Erklärung hierfür ergibt sich daraus, daß die Extrakte, und zwar auch die Extrakte der Alkoholfällung, sich als endo-

Tabelle 4.

Wirkung von Trypsin auf Hefekatalase

I. Versuch. Mit direktem wässrigem Extrakt der Hefe

	K-Werte	
	Anfangs	Nach 24 Stunden
Katalaselösung . . .	2826	1469
Katalase + Trypsin .	2969	550

II. Versuch. Mit dem Extrakt der Alkoholfällung

	K-Werte	
	Anfangs	Nach 21 Stunden
Katalaselösung . . .	4715	2988
Katalase + Trypsin .	4607	1295

tryptasehaltig¹⁾ erwiesen, da sie eine Fibrinflocke in kurzer Zeit lösten. Offenbar zerstört diese beim Stehen die Katalase und bedingt so die scheinbar spontane Inaktivierung der Hefekatalase. Immerhin läßt sich feststellen, daß ein Zusatz von Trypsin die Zerstörung ganz wesentlich beschleunigt.

Aus allen diesen Versuchen wäre also wiederum zu schließen, daß die Katalase ein eiweißartiger Körper ist, wenn man nur annimmt, daß sie selbst es ist, die der Zerstörung unterliegt. Es wäre nach Obigem nur noch weiter zu folgern, daß die Katalase sich in einem Zustande befinden muß, welcher den Angriff auch durch sog. peptolytische Fermente ermöglicht. Die weitere Folgerung, daß, weil bei der Wirkung des Erepsins auf Katalase offenbar die sog. peptolytischen Komponente hauptsächlich im Spiele ist, auch beim Trypsin, daß, wie oben angedeutet, wahrscheinlich nicht als ein einheitliches Ferment zu betrachten ist, nur seine peptolytische Komponente zur Wirkung kommt, soll nicht gezogen werden, obgleich gewisse Anhaltspunkte dafür vorliegen, die in der erwähnten Untersuchung von Winkler²⁾ erörtert sind. Dagegen spricht der Umstand, daß eine Trypsinlösung, die eine Katalaselösung schnell zerstört, Wittesches Pepton und auch Glycyl-Tryptophan nicht angreift, während eine auf Katalase nur wenig stärker wirkende Erepsinlösung das Pepton und Polypeptid rasch spaltet (vgl. Tabelle 5).

Tabelle 5.

Vorbemerkung: Erepsinlösung aus Katzendarm. Trypsinlösung wie oben. Die Erepsinlösung greift sowohl Casein als Pepton an, die Trypsinlösung Pepton überhaupt nicht, Casein etwas langsamer als die Erepsinlösung, Glycyl-1-Tryptophan ebenfalls nicht.

	K-Werte	
	Anfangs	Nach 22 Stunden
Katalaselösung . . .	4691	3187
Katalase + Erepsin .	5321	630
Katalase + Trypsin .	4925	2412

¹⁾ Vgl. Oppenheimer, l. c. Bd. II, S. 611.

²⁾ a. a. O.

Man darf bei allen diesen Versuchen nicht außer acht lassen, daß Reaktions- und Temperaturoptimum nicht nur für jede proteolytische Teilfunktion verschieden zu sein scheint, sondern daß vielleicht auch noch je nach der Art des Substrates Unterschiede in der Wirkungsweise¹⁾ auftreten, die sich nicht bei einer so einfachen Methodik übersehen lassen.

¹⁾ Vgl. hierüber Oppenheimer, l. c., S. 451 ff.