

Über Erepsin im normalen Harn und über dessen Beziehung zu anderen Proteasen.

Von

S. G. Hedin und Y. Masai.

(Der Redaktion zugegangen am 21. August 1917.)

Inhalt.

1. Einleitung. — 2. Allgemeines über die neuen Versuche. —
3. Direkte Einwirkung des Harnenzym auf Eiweiß. — 4. Direkte proteolytische Wirkung von Fibrin. — 5. Aus Fibrin bereitete Enzymlösung. — 6. Harnenzym und Fibrin. — 7. Harnenzym und gelöstes Fibrinenzym. — 8. Harnenzym und Globulinenzym. — 9. Analyse mit verschiedenen Fällungsmitteln. — 10. Wirkung auf dasselbe Substrat von Globulin- und Harnenzym nach einander. — 11. Abhängigkeit der Enzymwirkung von den zugesetzten Enzymmengen. — 12. Globulinenzym und Erepsin. — 13. Einwirkung von Harnenzym und Globulinenzym auf Wittes Pepton. — 14. Kann das eine Enzym in der Form von Zymogen vorhanden sein? — 15. Bedeutung der Reaktion für die Enzymwirkung. — 16. Schlußworte.

1. Einleitung.

Vor mehreren Jahren hat der eine von uns (Hedin) nachweisen können, daß normales Serum ein proteolytisches Enzym enthält, das einerseits bei $\frac{1}{3}$ -Sättigung des Serums mit Ammoniumsulfat, andererseits beim Ausfällen des Globulins durch Dialyse oder durch Verdünnen des Serums und Zugabe von Essigsäure im Niederschlage erhalten wurde. Der bequemste Weg, das Enzym aus dem Serum abzuscheiden, war, das verdünnte Serum mit einer schwach alkalischen Caseinlösung zu versetzen und dann das Casein samt dem Globulin mit Essigsäure auszufällen.¹⁾ Das Vermögen des ausfallenden Eiweißes, etwa vorhandenes Enzym mitzureißen, wurde auch durch Ausfällen von Casein im Harn geprüft. Wenn eine schwach alkalische Caseinlösung zum verdünnten Harn gesetzt wird, und das Casein dann durch vorsichtigen Zusatz von Essigsäure ge-

¹⁾ Journ. of Physiol. (engl.) Bd. 30, S. 195 (1903).

fällt wird, so zeigt der entstandene Niederschlag unter Umständen ein auffallendes Vermögen, Fibrin bei schwach alkalischer Reaktion aufzulösen. Die bei dieser Digestion entstandenen Produkte wurden in Hedins Laboratorium von Cathcart untersucht, und es ergab sich dabei, daß die Aufspaltung des Eiweißes ebensoweit geht wie mit irgend welchem bisher untersuchten Enzym. Es wurden folgende Produkte isoliert: Histidin, Lysin, Tyrosin, Leucin, Valin, Prolin, Glutaminsäure und Tryptophan.¹⁾

In bezug auf die Frage nach dem Ursprung des hierbei wirksamen Enzyms waren aber diese Versuche nicht eindeutig, da es einerseits seit lange bekannt ist, daß das Fibrin unter Umständen proteolytische Wirkung zeigen kann, andererseits die Möglichkeit auch vorliegt, daß das Casein aus dem Harn ein proteolytisches Enzym habe mitreißen können. Deshalb veranlaßte Hedin vor einigen Jahren Filip Johansson, weitere Versuche über diese Frage anzustellen. Dieser versuchte quantitative Bestimmungen in der Weise auszuführen, daß zu einer gegebenen Menge verdünnten Harnes eine gewisse Menge Caseinlösung zugesetzt wurde, worauf mit Essigsäure gefällt wurde. Der Niederschlag zusammen mit einer gegebenen Menge Fibrin wurde dann mit einer größeren Menge alkalischer Caseinlösung digeriert; beim Abbrechen der Enzymwirkung wurde mit einer gemessenen Menge Gerbsäurelösung gefällt und in einem gegebenen Volumen des Filtrates der Stickstoff bestimmt. Da der durch Gerbsäure nicht fällbare Stickstoff bei der Proteolyse zunimmt, wird die stattgefundene Enzymwirkung gewissermaßen durch die fragliche Stickstoffmenge repräsentiert. Durch Erhitzen des Caseinniederschlages oder des Fibrins vor der eigentlichen Proteolyse konnte die Wirkung des erhitzten Stoffes ausgeschlossen werden. Aus Johanssons Versuchen ging hervor, daß die proteolytische Wirkung, welche durch den Caseinniederschlag und das Fibrin hervorgerufen wird, durch beide bedingt ist. Wohl zeigt jede der beiden Substanzen für sich eine schwache Wirkung, aber

¹⁾ Salkowski-Festschrift, 1904.

wenn beide zugleich in Wirkung sind, wird die Proteolyse meistens entschieden größer als die Summe der Wirkungen beider für sich.¹⁾

2. Allgemeines über die neuen Versuche.

Im Herbst 1916 haben wir die Versuche über diesen Gegenstand wieder aufgenommen. Zunächst sind wir bemüht gewesen, die wirksame Substanz im Harn und die auf dem Fibrin jede für sich gewissermaßen zu isolieren und in genau meßbare Form zu bringen.

Dies gelang uns in bezug auf den Harn in der Weise, daß wir, anstatt zugesetztes Casein aus dem Harn auszufällen, den Harn mit Ammoniumsulfat sättigten. Hierbei entsteht ein Niederschlag, welcher je nach der Reaktion des Harnes der Menge und Zusammensetzung nach verschieden sein dürfte. Außer etwa vorhandenen kolloiden Substanzen, z. B. Farbstoffen, dürften wohl auch Salze im Niederschlage enthalten sein und bei alkalischer Reaktion besonders viel Phosphate. Wird der mit Ammoniumsulfat erhaltene Niederschlag mit Wasser angerührt der Dialyse unterworfen, bis das Ammoniumsulfat entfernt ist, so zeigt die filtrierte Lösung dieselbe Wirkung wie der vorher von Johansson untersuchte Caseinniederschlag. Der bei unseren Versuchen benutzte Harn war Menschenharn.

Die wirksame Substanz auf dem Fibrin in Lösung zu bringen ist uns in der Weise gelungen, daß wir das Fibrin mit schwach alkalischer Caseinlösung einige Tage bei 37° behandelt haben. Dabei wird das Fibrin zum Teil aufgelöst und auch das Casein wird ziemlich stark aufgespalten. Die nach dieser Behandlung abfiltrierte Lösung zeigt für sich eine deutliche proteolytische Wirkung und zusammen mit der mit Ammoniumsulfat erhaltenen Harnenzymlösung zeigt dieselbe die nämliche Wirkung wie das Fibrin selbst. Es sei aber sofort bemerkt, daß die Wirkung des Fibrins, sowie die der aus demselben mit Casein erhaltenen Lösung ganz verschieden ausfallen kann, je nach der Art und Weise, in welcher das Fibrin hergestellt wurde. Wenn das Fibrin vom Rinde, unter

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. 85, S. 72 (1913).

Schlagen des Blutes erhalten, nur einen oder ein paar Tage mit Wasser gewaschen wird, kann man gelegentlich mit demselben eine nur sehr schwache Wirkung erhalten. Wird aber das Waschen in einem hohen Glaszylinder durch Einleiten von fließendem Wasser bis zum Boden des Zylinders eine Woche oder mehr fortgesetzt, wird nachher eine viel kräftigere Wirkung erhalten, sowohl mit dem Fibrin selbst, wie mit der aus demselben mit Casein bereiteten Enzymlösung. Zweckmäßig setzt man am Anfang des Waschens etwas Chloroform zu dem Fibrin, um Fäulnis zu verhindern. Während des Waschens schwillt das Fibrin deutlich auf und möglicherweise werden gewisse Bestandteile desselben mehr oder weniger vollständig aufgelöst. Wenn das Fibrin nach dem Auswaschen nicht sofort angewandt wird, kann dasselbe zweckmäßig unter Glycerin mit etwas Toluol aufbewahrt werden.¹⁾

Wie wir weiter unten sehen werden, kann man beim Ausziehen des Fibrinenzym auch andere Eiweißkörper als das Casein benützen, z. B. schwach alkalische Lösungen von gekochtem Serumalbumin oder Conglutin. Dagegen gelang es uns nicht, mit schwach alkalischem Wasser nennenswerte Mengen Enzym in Lösung zu bringen. Möglicherweise ist dies so zu erklären, daß das Alkali ohne die Gegenwart von gelöstem Eiweiß etwa aufgelöstes Enzym sofort zerlegt.

Bei der Prüfung der proteolytischen Enzymwirkung haben wir als Substrat fast nur schwach alkalische Caseinlösung benutzt, da das Casein viel leichter von proteolytischen Enzymen angegriffen wird als irgend einer der übrigen von uns angewandten Eiweißkörper. Die Caseinlösung wurde in der Weise bereitet, daß 20 g Casein (Kahlbaums nach Hammarsten hergestelltes Präparat) mit 100 ccm 0,1 n-NaOH und 400 ccm Wasser auf dem Wasserbade so lange erhitzt wurde, bis nur einige Körnchen ungelöst zurückblieben. Dann wurde heiß filtriert und mit Toluol aufbewahrt. Die so bereitete Lösung reagiert gegen Lackmus schwach, aber deutlich alkalisch. Bei der Ausführung der Versuche wurden gegebene Mengen der

¹⁾ In ein paar Fällen haben wir beobachtet, daß auch so aufbewahrtes Fibrin nach $\frac{1}{2}$ Jahr bei Zimmertemperatur aufgelöst wird.

Enzymlösungen mit meistens 50 ccm Caseinlösung versetzt und öfters außerdem etwas Alkali zugegeben. Als Antiseptikum bei den Versuchen wurde Toluol angewandt. Nach einer gegebenen Zeit bei 37° wurde die Enzymwirkung in den meisten Fällen durch Zusatz von Gerbsäurelösung abgebrochen. Diese enthielt auf 1 Liter 100 g Gerbsäure, 50 g NaCl, 50 g Natriumazetat und 50 ccm Eisessig. Die Menge Gerbsäurelösung, welche für vollständige Fällung nötig ist, kann in einer besonderen nicht bei 37° aufbewahrten Probe bestimmt werden. Nach einigen Stunden wurde die gefällte Flüssigkeit filtriert und in einem gegebenen Volumen des völlig klaren Filtrates der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt.

In einer besonderen Kontrollprobe, welche $\frac{1}{2}$ Stunde auf dem Wasserbade erhitze Enzymlösungen enthielt, wurden die in den Enzym- und Caseinlösungen vor der Enzymwirkung vorhandenen durch Gerbsäure nicht fällbaren Stickstoffmengen, sowie die in den Reagentien befindlichen auf einmal bestimmt. Die in der Kontrollprobe erhaltene Stickstoffmenge muß folglich in Abzug gebracht werden.

3. Direkte Einwirkung des Harnenzym auf Eiweiß.

Hier sowie im folgenden wird mit Harnenzym (H. E.) die durch Sättigung von Menschenharn mit Am_2SO_4 und Dialysieren des in Wasser verteilten Niederschlages erhaltene, filtrierte Lösung gemeint. Für die Sättigung von 1 Liter Harn wird zweckmäßig 640 g Ammoniumsulfat verwendet. Wenn das Salz stark saure Reaktion zeigen sollte, muß die Säure beim Auflösen des Salzes im Harn abgestumpft werden. Auf 1 Liter Harn wird rund 100 ccm filtrierte Enzymlösung erhalten.

In bezug auf die Wirkung dieser Enzymlösung konnte zunächst konstatiert werden, daß die Lösung auf Eiweiß in salzsaurer Lösung eine ausgesprochene Wirkung zeigt, was wohl mindestens zum größten Teil von dem Vorhandensein von dem Harnpepsin herrühren dürfte. Dann wurde aber gefunden, daß das Harnenzym auch in schwach alkalischer Lösung auf verschiedene Eiweißkörper eine sehr schwache, aber meistens deutliche Wirkung zeigt. Dies war z. B. in folgenden zwei Versuchen der Fall.

Casein als Substrat.

1. 25 ccm Casein + 25 ccm H. E.
2. 25 „ „ + 25 „ „ „ erhitzt.

Nach 5 Tagen bei 37° 15 ccm Gerbsäure; 30 ccm Filtrat.

- Nr. 1 ergab NH₃ entsprechend 3,1 ccm 0,1 n-Säure
 „ 2 „ NH₃ „ 2,3 „ 0,1 „

Die Enzymwirkung entsprach folglich 0,8 ccm Säure.

Mit einer sehr schwach alkalischen, auf dem Wasserbade erhitzten Serumalbuminlösung wurden folgende Proben bereitet:

1. 50 ccm Serumalbumin + 40 ccm H. E. + 10 ccm H₂O
2. Kontrolle mit erhitztem H. E.

Nach 4 Tagen bei 37° 15 ccm Gerbsäure; 50 ccm Filtrat.

- Nr. 1 ergab 2,4 ccm Säure,
 „ 2 „ 1,3 „ „

Die Wirkung entsprach 1,1 ccm Säure.

Auch aus den meisten der im folgenden angeführten Versuchsserien über die kombinierte Wirkung von H. E. und anderen Enzymen (Abschn. 6—8) ist eine schwache Wirkung von dem Harnenzyme allein zu ersehen.

4. Direkte proteolytische Wirkung von Fibrin.

1. 50 ccm Caseinlösung + 5 g gepreßtes feuchtes Fibrin,
2. Kontrolle mit auf Wasserbad erhitztem Fibrin.

Nach 5 Tagen bei 37° 30 ccm Gerbsäure; 50 ccm Filtrat.

- Nr. 1 19,3 ccm Säure,
 „ 2 5 „ „ ; Enzymwirkung 14,3.

Ohne die Gegenwart von Casein war die Wirkung viel geringer, was offenbar mindestens zum Teil auf die geringere Menge Substrat zurückzuführen ist:

1. 5 g feuchtes Fibrin + 50 ccm 0,1%ige Na₂CO₃-Lösung,
2. Kontrolle mit erhitztem Fibrin.

Nach 5 Tagen bei 37° 20 ccm Gerbsäure; 40 ccm Filtrat.

- Nr. 1 3,7 ccm Säure,
 „ 2 1,5 „ „ ; Wirkung = 2,2.

Die Wirkung des Fibrins geht am besten bei schwach alkalischer Reaktion vor sich:

1. 50 ccm Caseinlösung + 5 g Fibrin + 30 ccm H₂O + 4 ccm H₂O.
2. 50 ccm Caseinlösung + 5 g Fibrin + 30 ccm H₂O + 2 ccm H₂O + 2 ccm 5%iges Na₂CO₃.

3. 50 ccm Caseinlösung + 5 g Fibrin + 30 ccm H₂O + 4 ccm 5%iges Na₂CO₃.

Nach 3 Tagen bei 37° 30 ccm Gerbsäure; 50 ccm Filtrat.

Nr. 1	8,1 ccm Säure,		
» 2	10,8	»	»
» 3	5,6	»	»

In einem anderen Versuche mit anderem Fibrin wurden die Alkalimengen folgendermaßen variiert:

1. 50 ccm Caseinlösung + 5 g Fibrin + 30 ccm H₂O + 4 ccm H₂O.

2. 50 ccm Caseinlösung + 5 g Fibrin + 30 ccm H₂O + 3 ccm H₂O + 1 ccm 5%iges Na₂CO₃.

3. 50 ccm Caseinlösung + 5 g Fibrin + 30 ccm H₂O + 2 ccm H₂O + 2 ccm Na₂CO₃.

4. 50 ccm Caseinlösung + 5 g Fibrin + 30 ccm H₂O + 1 ccm H₂O + 3 ccm Na₂CO₃.

5. 50 ccm Caseinlösung + 5 g Fibrin + 30 ccm H₂O + 4 ccm Na₂CO₃.

Nach 4 Tagen bei 37° 35 ccm Gerbsäure; 50 ccm Filtrat.

Nr. 1	11,5 ccm Säure,		
» 2	16,7	»	»
» 3	16,6	»	»
» 4	10,8	»	»
» 5	10,7	»	»

Weiteres über die Wirkung des auf dem Fibrin vorhandenen Enzymes allein ist aus Abschnitt 6 zu ersehen.

5. Aus Fibrin bereitete Enzymlösung.

Bei der Herstellung der Enzymlösung aus Fibrin wurde 35 g feuchtes Fibrin mit 250 ccm Caseinlösung (wie S. 4 angegeben bereitet) 2—4 Tage in Gegenwart von Toluol bei 37° behandelt; darauf wurde das Gemenge filtriert und in einigen Fällen das Filtrat zur Entfernung gewisser Spaltungsprodukte des Eiweißes der Dialyse während einiger Tage unterworfen:

1. 50 ccm Enzymlösung + 20 ccm Caseinlösung (ohne Enzym) + 1 ccm 5%iges Na₂CO₃.

2. 50 ccm Enzymlösung + 20 ccm Caseinlösung (ohne Enzym) + 1 ccm 5%ige Essigsäure.

3. Kontrolle wurde sofort mit Gerbsäure gefällt.

In der Probe 2 entstand bei dem Zusatz von Essigsäure ein Niederschlag von Casein und die Reaktion war gegen Lackmus deutlich sauer.

Nach 4 Tagen bei 37° 60 ccm Gerbsäure; 75 ccm Filtrat.

Nr. 1	46,8 ccm Säure;	Enzymwirkung	23,6,
› 2	35,2 › › ;	›	12,0,
› 3	23,2 › › .		

Die in angegebener Weise bereitete Enzymlösung wirkt folglich auch bei saurer Reaktion. Andere Versuche, aus welchen die Wirkung der wie oben bereiteten Enzymlösung zu ersehen ist, werden im Abschnitt 7 angeführt.

Um zu prüfen, ob eine schwach alkalische Lösung von anderen Eiweißkörpern als Casein das Fibrinenzym in Lösung zu bringen imstande ist, haben wir eine Lösung von Conglutin folgendermaßen bereitete und auf Fibrin einwirken lassen: 20 g Conglutin + 50 ccm 0,1 n-NaOH + 450 ccm H₂O wurden auf dem Wasserbade erhitzt, bis das Conglutin fast vollkommen aufgelöst war. Darauf wurde filtriert und 40 g feuchtes Fibrin mit 200 ccm der Conglutinlösung ein paar Tage bei 37° behandelt. Nach Filtrieren wurde die Einwirkung der so bereiteten Enzymlösung auf wie eben angegeben bereitete Conglutinlösung als Substrat geprüft:

1. 15 ccm Enzymlösung + 50 cm Conglutinlösung + 20 ccm H₂O,
2. Kontrolle mit erhitzter Enzymlösung.

Nach 4 Tagen bei 37° 40 ccm Gerbsäure; 50 ccm Filtrat.

Nr. 1	13,55 ccm Säure,		
› 2	10,5 › › ;	Enzymwirkung	3,05.

Eine Lösung von Serumalbumin wurde folgendermaßen behandelt: von einer mit Hilfe von Am₂SO₄ aus Rinderserum bereiteten und stark dialysierten Serumalbuminlösung wurden 250 ccm genommen und mit 5 ccm 5%iger Na₂CO₃ auf dem Wasserbade 1 Stunde erhitzt; darauf wurde 50 g Fibrin zugesetzt und alles 3 Tage bei 37° gehalten, worauf von nicht aufgelöstem Fibrin abfiltriert wurde. Die Einwirkung der so erhaltenen Lösung auf erhitzte Serumalbuminlösung wurde wie folgt geprüft:

1. 10 ccm Enzymlösung + 50 ccm Serumalbuminlösung + 20 ccm H₂O,
2. Kontrolle mit erhitzter Enzymlösung.

Nach 5 Tagen bei 37° 50 ccm Gerbsäure; 75 ccm Filtrat.

Nr. 1	7,1 ccm Säure,		
› 2	3,7 › › ;	Enzymwirkung	3,4.

6. Harnenzym und Fibrin.

Die Wechselwirkung zwischen dem Harnenzym und anderen Enzymen wurde in der Weise untersucht, daß zugleich vier Proben bereitet wurden, welchen allen außer dem Substrate beide Enzyme zugesetzt wurden. In der Probe A waren beide Enzyme nicht erhitzt und folglich wirksam; in der Probe B war das Harnenzym erhitzt und folglich unwirksam und eine etwaige Wirkung rührte folglich von dem anderen Enzym her; in der Probe C war letzteres erhitzt, und eine in dieser Probe etwa auftretende Wirkung rührte demnach von dem Harnenzym her. In der Probe D waren beide Enzyme durch Erhitzen zerstört und diese Probe diente deshalb als Kontrolle, welche zugleich die in den angewandten Lösungen und in den Reagentien enthaltenen, mit Gerbsäure nicht fällbaren N-Mengen ergab. Die in der Probe D erhaltene N-Menge wurde folglich von den in A, B und C erhaltenen, mit Gerbsäure nicht fällbaren N-Mengen abgezogen, und der Rest entspricht folglich in A der Wirkung beider Enzyme, wenn sie zugleich wirken, in B der Wirkung des mit dem Harnenzym zu vergleichenden Enzyms allein und in C der Wirkung des Harnenzyms allein. In den Versuchen mit dem Harnenzym und dem Enzym auf dem Fibrin waren die vier Proben folgendermaßen zusammengesetzt:

- A. 5 g Fibrin + 40 ccm H. E. + 50 ccm Caseinlösung,
- B. 5 » » + 40 » H. E. erhitzt + 50 ccm Caseinlösung,
- C. 5 » » erh. + 40 ccm H. E. + 50 ccm Caseinlösung,
- D. (Fibrin + H. E.) erhitzt + 50 ccm Caseinlösung.

Ein Versuch mit eben diesen Mengen wurde nach 2 Tagen bei 37° abgebrochen; 30 ccm Gerbsäure; 75 ccm Filtrat.

- A. 29,5 ccm Säure; reduzierter Wert = 26,4
- B. 12,3 » » ; » » = 9,2
- C. 3,6 » » ; » » = 0,5
- D. 3,1 » » .

In einem anderen Versuch mit nur 30 ccm H. E. und 65 ccm Filtrat wurden folgende Ziffern erhalten:

- A. 29,7 ccm Säure; reduzierter Wert = 27,4
- B. 15,0 » » ; » » = 12,7

C. 2,6 ccm Säure; reduzierter Wert = 0,3

D. 2,3 „ „

In noch anderen Versuchen, wo gelegentlich eine geringe Alkalimenge den vier Proben zugegeben wurde, wurden insofern die gleichen Resultate wie oben erhalten, als die Summe der reduzierten Werte in B und C den reduzierten Wert von A bei weitem nicht erreichte. Wir lassen hier die fraglichen Ziffern folgen:

A.	29,25	33,3	18,2
B.	11,85	21,3	12,45
C.	0,15	1,65	1,1

In einem Versuche, wo kein Casein zugesetzt wurde und das Fibrin folglich als einziges Substrat vorhanden war und wo die Proben die folgende Zusammensetzung besaßen, 5 g Fibrin + 40 ccm H. E. + 50 ccm 0,1%iges Na_2CO_3 , wurden folgende reduzierte Ziffern erhalten:

A.	4,3 ccm Säure,
B.	2,6 „ „
C.	0,0 „ „

Unsere Versuche mit Harnenzym und feuchtem Fibrin bestätigen folglich vollauf die Resultate, wozu Johansson mit dem im Harn erzeugten Caseinniederschlage und Fibrin gelangte. Die Anordnung unserer Versuche war insofern eine günstigere, als wir das Harnenzym in der Form von Lösung gebrauchten und folglich eine genauere Dosierung erzielen konnten. Dasselbe haben wir in bezug auf das Fibrin in der Weise erreichen können, daß wir mit Hilfe von Eiweißkörpern in Lösung gebrachtes Fibrinenzym in Anwendung gezogen haben, wie aus dem folgenden Abschnitt zu ersehen ist.

7. Harnenzym und gelöstes Fibrinenzym.

Die Anordnung der Versuche war dieselbe wie oben S. 271 angegeben. Nur wurde anstatt des Fibrins ein gegebenes Volumen der aus Fibrin bereiteten meistens dialysierten Enzymlösung angewandt.

A. 10 ccm Enzymlösung + 25 ccm H. E. + 50 ccm Caseinlösung + 2 ccm 5%iges Na_2CO_3 .

- B. 10 ccm Enzymlösung + 25 ccm H. E., erhitzt + 50 ccm Caseinlösung + 2 ccm 5%iges Na_2CO_3 .
- C. 10 ccm Enzymlösung erh. + 25 ccm H. E. + 50 ccm Caseinlösung + 2 ccm 5%iges Na_2CO_3 .
- D. (Enzymlösung + H. E.) erhitzt + 50 ccm Caseinlösung + 2 ccm 5%iges Na_2CO_3 .

Nach 4 Tagen bei 37° 50 ccm Gerbsäure; 75 ccm Filtrat.

- | | | |
|----|----------------------------------|------|
| A. | 8,35 ccm Säure; reduzierter Wert | 6,90 |
| B. | 2,70 | 1,25 |
| C. | 1,95 | 0,5 |
| C. | 1,45 | |

Wie ersichtlich ergab das Fibrinenzym für sich die Ziffer 1,15 und das Harnenzym für sich die Zahl 0,5. Die Summe beider Wirkungen wird folglich 1,75. Andererseits wurde bei der gleichzeitigen Wirkung beider Enzyme die Ziffer 6,90 erhalten, welche bei weitem die Ziffer 1,75 übertrifft. Bei gleichzeitiger Wirkung der beiden Enzyme wird folglich ein Resultat erhalten, das entschieden größer ist als die Summe beider Wirkungen, wenn sie unter den gleichen Bedingungen jede für sich von statten gehen. Dasselbe wurde bei allen mit Harnenzym und Lösungen des Fibrinenzym angestellten Versuchen gefunden. Zwei andere Versuche mit Enzym, das mit Hilfe von Caseinlösungen aus Fibrin erhalten worden war und bei welchen Caseinlösung als Substrat diente, ergaben folgende reduzierte Ziffern:

A.	9,65	23,8
B.	3,25	11,8
C.	0,75	1,7.

Dasselbe wurde bei einem Versuche gefunden, wo mit Hilfe von erhitztem Serumalbumin bereitete Enzymlösung angewandt wurde und alkalisches Serumalbumin ebenfalls als Substrat zur Anwendung kam (S. 270):

- A. 10 ccm Enzymlösung + 20 ccm H. E. + 50 ccm erhitzte Serumalbuminlösung.
- B. 10 ccm Enzymlösung + 20 ccm H. E. erhitzt + 50 ccm erhitzte Serumalbuminlösung.
- C. 10 ccm Enzymlösung erhitzt + 20 ccm H. E. + 50 ccm erhitzte Serumalbuminlösung.
- D. (Enzymlösung + H. E.) erhitzt + 50 ccm erhitzte Serumalbuminlösung.

Nach 5 Tagen bei 37° 50 ccm Gerbsäure; 75 ccm Filtrat.

A.	9,8 ccm Säure; reduzierter Wert	6,1
B.	7,1 » » ; » »	3,4
C.	3,8 » » ; » »	0,1
D.	3,7 » »	

8. Harnenzym und Globulinenzym.

Wie bereits (S. 263) erwähnt, hat der eine von uns vorher gefunden, daß das bei $\frac{1}{3}$ -Sättigung des Blutserums mit AmSO_4 ausfallende Globulin ein proteolytisches Enzym enthält. Wir haben es deshalb angemessen gefunden, zu untersuchen, wie sich dieses Enzym zu dem Harnenzym verhält. Das Globulin wurde wie angegeben aus dem Serum gefällt und abfiltriert, darauf in Gegenwart der im Niederschlage zurückgebliebenen Salzmenge in viel Wasser aufgelöst und noch einmal durch $\frac{1}{3}$ -Sättigung mit Am_2SO_4 gefällt, was gelegentlich noch einmal wiederholt wurde. Schließlich wurde das Salz durch Dialyse entfernt. Das Volumen der so erhaltenen Globulinsuspension war etwa die Hälfte des angewandten Serums. Nach Hedins bereits zitierten Untersuchungen zeigt das bei $\frac{1}{3}$ -Sättigung erhaltene Globulin proteolytische Wirkung, während die zwischen $\frac{1}{3}$ - und $\frac{1}{2}$ -Sättigung ausfallende Globulinfraction, sowie noch mehr die zwischen $\frac{1}{2}$ und voller Sättigung erhaltene Serumalbuminfraction die erwähnte Enzymwirkung entschieden hemmen, auf jeden Fall, wenn Casein als Substrat angewandt wird.

Für unsere Versuche wurde Globulin aus Rindsserum, sowie aus Pferdeserum angewandt. Da die fragliche Globulinfraction in dialysiertem Zustande zum größten Teile in Wasser unlöslich war, haben wir meistens das Globulin in der Weise in Lösung gebracht, daß 100 ccm der Globulinsuspension mit 5 ccm 0,1 n-NaOH versetzt wurde. Eine solche Lösung wurde für die Versuche angewandt und die angeführten Volumina Globulin beziehen sich auf diese alkalische Lösung.

Hedins früherer Befund, daß das Globulinenzym nur oder vorzugsweise bei alkalischer Reaktion wirksam ist, hat sich bewährt, wie aus folgenden Versuchen ersichtlich. Es sei daran erinnert, daß sowohl die in den folgenden Versuchen ange-

wandte Globulinlösung wie auch die Caseinlösung alkalische Reaktion besaßen:

1. 15 ccm Glob. + 50 ccm Casein + 35 ccm H₂O + 5 ccm H₂O.
 2. 15 ccm Glob. + 50 ccm Casein + 35 ccm H₂O + 4 ccm H₂O
+ 1 ccm 0,1 n-NaOH.
 3. 15 ccm Glob. + 50 ccm Casein + 35 ccm H₂O + 3 ccm H₂O
+ 2 ccm 0,1 n-NaOH.
 4. 15 ccm Glob. + 50 ccm Casein + 35 ccm H₂O + 2 ccm H₂O
+ 3 ccm 0,1 n-NaOH.
 5. 15 ccm Glob. + 50 ccm Casein + 35 ccm H₂O + 1 ccm H₂O
+ 4 ccm 0,1 n-NaOH.
 6. 15 ccm Glob. + 50 ccm Casein + 35 ccm H₂O + 5 ccm NaOH.
- Nach 4 Tagen bei 37° 40 ccm Gerbsäure; 75 ccm Filtrat.

Nr. 1	6,0 ccm Säure,
› 2	6,3 › ›
› 3	6,8 › ›
› 4	7,5 › ›
› 5	8,3 › ›
› 6	8,9 › ›

Ein anderer Versuch war folgendermaßen angeordnet:

1. 10 ccm Glob. + 50 ccm Casein + 4 ccm H₂O,
2. 10 › › + 50 › › + 2 › H₂O + 2 ccm 0,1 n-NaOH,
3. 10 › › + 50 › › + 4 › NaOH.

Nach 4 Tagen bei 37° 50 ccm Gerbsäure; 75 ccm Filtrat.

Nr. 1	13,6 ccm Säure,
› 2	15,45 › ›
› 3	15,95 › ›

In einem dritten Versuche waren die Mengen die folgenden:

1. 10 ccm Pferdeglob. + 50 ccm Casein + 30 ccm H₂O + 10 ccm H₂O.
2. 10 ccm Pferdeglob. + 50 ccm Casein + 30 ccm H₂O + 6 ccm H₂O
+ 4 ccm 0,1 n-NaOH.
3. 10 ccm Pferdeglob. + 50 ccm Casein + 30 ccm H₂O + 3 ccm
H₂O + 7 ccm NaOH.
4. 10 ccm Pferdeglob. + 50 ccm Casein + 30 ccm H₂O + 10 ccm NaOH.

Nach 4 Tagen bei 37° 40 ccm Gerbsäure; 100 ccm Filtrat.

Nr. 1	10,9 ccm Säure,
› 2	15,2 › ›
› 3	14,9 › ›
› 4	3,5 › ›

Die gleichzeitige Bestimmung der Wirkungen des Globulinzynms und des Harnenzynms für sich, sowie der kom-

binierten Wirkung beider geschah nach dem S. 271 angegebenen Schema, wie aus folgendem Versuch hervorgeht.

A. 10 ccm Rinderglob. + 30 ccm H. E. + 50 ccm Casein + 2 ccm 5%iges Na_2CO_3 .

B. 10 ccm Rinderglob. + 30 ccm H. E. erhitzt + 50 ccm Casein + 2 ccm 5%iges Na_2CO_3 .

C. 10 ccm Glob. erhitzt + 30 ccm H. E. + 50 ccm Casein + 2 ccm 5%iges Na_2CO_3 .

D. (Glob. + H. E.) erhitzt + 50 ccm Casein + 2 ccm 5%iges Na_2CO_3 .

Nach 4 Tagen bei 37° 50 ccm Gerbsäure; 75 ccm Filtrat.

A. 12,55 ccm Säure; reduzierter Wert 11,0

B. 2,55 » » ; » » 1,0

C. 1,90 » » ; » » 0,35

D. 1,55 » »

In einem anderen Versuche waren die Bestandteile der Probe A folgende:

25 ccm Rinderglob. + 40 ccm H. E. + 50 ccm Casein.

Außer dem in den Globulin- und Caseinlösungen vorhandenen Alkali wurde also keines zugegeben.

Nach 4 Tagen 50 ccm Gerbsäure; 75 ccm Filtrat.

A. 11,9 ccm Säure; reduzierter Wert 8,9

B. 3,0 » » ; » » 0,0

C. 3,0 » » ; » » 0,0

D. 3,0 » »

Zu diesem Versuche wurde nur der im Wasser nicht aufgelöste Teil der Globulinfraktion angewandt.

Ein anderer Versuch mit denselben Mengen, aber mit Rinderglobulin und Harnenzym von anderer Bereitung ergab folgende Ziffern:

A. 21,2 ccm Säure; reduzierter Wert 19,5

B. 3,7 » » ; » » 2,0

C. 3,2 » » ; » » 1,5

D. 1,7 » »

Ein Versuch mit Pferdeglobulin und folgender Zusammensetzung der Probe A:

10 ccm Glob. + 30 ccm H. E. + 50 ccm Casein + 2 ccm 5%iges Na_2CO_3 ergab nach 4 Tagen bei 37° mit 50 ccm Gerbsäure und 75 ccm Filtrat folgende Ziffern:

A.	26,0	ccm Säure; reduzierter Wert	24,6
B.	11,2	» » ; » »	9,8
C.	1,75	» » ; » »	0,35
D.	1,4	» »	

Einmal haben wir eine schwach alkalische Conglutinlösung als Substrat benutzt (S. 270) und zwar war die Zusammensetzung der Probe A die folgende:

20 ccm Rinderglob, + 40 ccm H. E. + 50 ccm Conglutin.

Nach 4 Tagen 40 ccm Gerbsäure; 50 ccm Filtrat.

A	19,4	ccm Säure; reduzierter Wert	14,9
B	4,9	» » ; » »	0,4
C	4,9	» » ; » »	0,4
D	4,5	» »	

9. Analyse mit verschiedenen Fällungsmitteln.

Nach allen den angeführten Versuchen mit der bei $\frac{1}{3}$ -Sättigung mit Am_2SO_4 ausfallenden Fraktion der Serumglobuline ist also zu schließen, daß das in dieser Fraktion vorhandene proteolytische Enzym zu dem Harnenzym in der gleichen Weise sich verhält wie das vorher untersuchte Fibrinenzym. Die Wirkung beider wird durch das Harnenzym sehr stark vergrößert, mindestens wenn die Enzymwirkung durch Fällung mit Gerbsäure untersucht wird. Bei der Proteolyse wird der durch Gerbsäure fällbare Eiweißstickstoff allmählich in solche Verbindungen übergeführt, welche nicht gefällt werden. Immerhin wird aber ein großer Teil von den primären, dem Eiweiß nahestehenden Spaltungsprodukten durch Gerbsäure gefällt, während die Aminosäuren, sowie die diesen nahestehenden Polypeptide nicht gefällt werden. Wo die Grenze zwischen den fällbaren und nicht fällbaren Produkten geht, läßt sich nicht genau sagen; für den praktischen Gebrauch der Gerbsäuremethode ist es aber genug, wenn die Grenze immer die gleiche bleibt.

Da es aber immerhin nützlich sein muß, den Zustand der Eiweißspaltung auch mit Anwendung einer anderen Analyse-methode zu prüfen, haben wir zu diesem Zweck auch die Fällung mit SnCl_2 + CaCl_2 benutzt. Diese Methode wurde zuerst von Schjerning angewandt.¹⁾ Die Zinnchlorürlösung

¹⁾ Zeitschr. f. anal. Chem., Bd. 37, S. 416 (1898).

wurde in der Weise bereitet, daß 50 g Zinn in rauchender HCl unter Zugabe von einem Tropfen gelösten Platinchlorids aufgelöst wurde; dann wurde das Ganze bis zu 130 g eingedampft, auf 1 Liter mit Wasser verdünnt und filtriert. Die Lösung muß in kleinen Flaschen aufbewahrt werden. Die angewandte CaCl_2 -Lösung war 10%ig. Nach unserer Erfahrung ist für die gute Fällung die Gegenwart von ziemlich großen Mengen CaCl_2 nützlich und wir haben deshalb gleiche Volumina der zwei Lösungen — SnCl_2 und CaCl_2 — angewandt. Die Mengen, welche für die vollständige Fällung einer gegebenen Eiweißlösung nötig sind, müssen in einer besonderen Probe bestimmt werden.

Eine vergleichende Untersuchung der Mengen von den Spaltungsprodukten des Eiweißes, welche durch SnCl_2 und durch Gerbsäure gefällt werden, ist bereits von Sörensen bei der Pepsindigestion ausgeführt worden.¹⁾ Dabei stellte sich heraus, daß SnCl_2 bedeutend geringere Mengen der Spaltungsprodukte ausfällt als die Gerbsäure. Dasselbe haben auch wir bei der Wirkung des Globulinenzyms gefunden:

1. 20 ccm Rinderglob. + 50 ccm Casein + 30 ccm H_2O + 1 ccm 0,1 n-NaOH.

2. Kontrolle mit erhitztem Globulin.

Nach 4 Tagen bei 37° wurde mit 50 ccm CaCl_2 + 50 ccm SnCl_2 gefällt. Zwei gleiche Proben 3 und 4 wurden in der gleichen Weise behandelt; nur wurde die Fällung nach 4 Tagen bei 37° mit 50 ccm Gerbsäurelösung unter Zusatz von 50 ccm Wasser bewerkstelligt. Die 4 Proben enthielten folglich alle die gleichen Volumina Flüssigkeit. Nach 6 Stunden bei Zimmertemperatur wurde filtriert und von den Filtraten je 100 ccm für Stickstoffbestimmung genommen. Das Erhitzen der mit SnCl_2 + CaCl_2 erhaltenen Filtrate muß anfangs sehr vorsichtig geschehen infolge des beim Zugeben der Schwefelsäure entstandenen Niederschlages von CaSO_4 , der leicht Stoßen verursacht. Die Analysenresultate waren wie folgt:

Nr. 1	15,3 ccm Säure; reduzierter Wert 13
› 2	2,3 › › ;
› 3	4,6 ccm Säure; reduzierter Wert 3,5
› 4	1,1 › ›

¹⁾ Biochem. Zeitschr., Bd. 21, S. 288 (1909).

Aus Nr. 1 verglichen mit Nr. 2, sowie aus Nr. 3 verglichen mit Nr. 4 geht hervor, daß gewisse Produkte der Enzymwirkung durch SnCl_2 bzw. Gerbsäure nicht gefällt werden. Die Menge der nicht gefällten Produkte ist aber beim Gebrauch von SnCl_2 viel größer als beim Gebrauch von Gerbsäure. Die primären dem Eiweiße nahestehenden Spaltungsprodukte werden offenbar durch Gerbsäure in einer größeren Ausdehnung gefällt als durch SnCl_2 . Die beiden Fällungsmittel geben uns gleichsam über die gebildeten Mengen verschiedener Spaltungsprodukte einen gewissen Aufschluß. Man könnte sagen, daß SnCl_2 eine bessere Kenntnis der gebildeten Mengen primärer Spaltungsprodukte gewährt, da eben diese in geringerem Umfang als durch Gerbsäure gefällt werden. Die weitere Spaltung der nicht fällbaren Spaltungsprodukte wird aber durch SnCl_2 nicht registriert, da die dabei gebildeten Produkte alle nicht gefällt werden. Diese letzteren Prozesse werden dagegen besser durch die Analyse mit Gerbsäure studiert, während diese Analyse keinen Unterschied macht zwischen gewissen der primären Spaltungsprodukte und dem Eiweiß selbst.

Eine Bestätigung dieser Ansicht ist in der Tatsache zu ersehen, daß $\text{SnCl}_2 + \text{CaCl}_2$ in einer Lösung von Wittes Pepton keinen Niederschlag erzeugt, während Gerbsäure einen nicht unbedeutenden Teil davon ausfällt.

Um uns dieser Tatsachen auch für das Studium der Wirkung des Harnenzym, sowie für das Klarlegen der gleichzeitigen Wirkung des Globulinenzymes und des Harnenzymes zu bedienen, haben wir den Versuch mit der gewöhnlichen Reihe von Proben folgendermaßen ausgeführt:

A. 10 ccm Rinderglob. + 30 ccm H. E. + 50 ccm Casein + 2 ccm 5%iges Na_2CO_3 .

B. 10 ccm Rinderglob. + 30 ccm H. E. erhitzt + 50 ccm Casein + 2 ccm 5%iges Na_2CO_3 .

C. 10 ccm Glob. erhitzt + 30 ccm H. E. + 50 ccm Cas. + 2 ccm 5%iges Na_2CO_3 .

D. (Glob. + H. E.) erhitzt + 50 ccm Casein + 2 ccm 5%iges Na_2CO_3 .

Nach 4 Tagen bei 37° wurde mit 50 ccm $\text{CaCl}_2 + 50$ ccm SnCl_2 gefällt.

Eine gleiche Reihe von Proben A', B', C' und D' wurde nach 4 Tagen bei 37° mit 50 ccm Gerbsäure unter Zugabe von 50 ccm Wasser gefällt. Von allen Proben wurden 100 ccm Filtrat für N-Bestimmung genommen.

A.	ergab 31,7 ccm Säure; reduzierter Wert	29,5
B.	» 12,15 » » ; » »	9,95
C.	» 3,6 » » ; » »	1,4
D.	» 2,2 » »	
A'.	ergab 14,7 ccm Säure; reduzierter Wert	13,15
B'.	» 2,4 » » ; » »	0,85
C'.	» 2,15 » » ; » »	0,6
D'.	» 1,55 » »	

Aus den Ergebnissen ist zunächst zu ersehen, daß das Globulinzym (B und B') einen viel größeren Wert ergibt mit SnCl₂ als mit Gerbsäure; dies stimmt vollauf mit den vorher angeführten Versuchen (S. 278 u. 279). Das Harnenzym zeigt auch einen größeren Wert mit SnCl₂ als mit Gerbsäure (1,4 und 0,6 in C bzw. C'), aber das Verhältnis zwischen den beiden Ziffern ist lange nicht so groß wie beim Globulinzym (9,95 : 0,85). Wenn also das Globulinzym vorzugsweise den Anfang der Eiweißspaltung besorgt, so kann dies nicht in demselben Grade der Fall sein mit dem Harnenzym. Noch deutlicher tritt dies hervor, wenn wir die Resultate der gleichzeitigen Wirkung der beiden Enzyme ins Auge fassen (A und A' oder 29,5 bzw. 13,5) und das Verhältnis 29,5 : 13,5 mit dem Verhältnis 9,95 : 0,85 vergleichen. Außerdem ist zu verzeichnen, daß die Summe der Wirkungen der beiden Enzyme, wenn sie jedes für sich wirksam sind, auch bei der Analyse mit SnCl₂ den Erfolg der beiden Enzyme, wenn sie zusammen wirken, nicht erreicht.

Prinzipiell die gleichen Ergebnisse wie im letzten Versuche, obwohl mit kleineren Ziffern erhielten wir mit nicht erhitztem Pferdeglobulin als Substrat. Eine Emulsion von Pferdeglobulin, erhalten durch $\frac{1}{3}$ -Sättigung mit Am₂SO₄, wurde mit NaOH in folgendem Verhältnis versetzt: 100 ccm Globulin + 5 ccm 0,1 n-NaOH.

Dann wurden Proben wie folgt bereitet:

- A. 25 ccm Glob. + 20 ccm H. E. + 2 ccm 0,1 n-NaOH,
- B. 25 » » + 20 » H. E. erhitzt + 2 ccm 0,1 n-NaOH,

- C. 25 ccm Glob. erhitzt + 20 ccm H. E. + 2 ccm 0,1 n-NaOH,
 D. (Glob. + H. E.) erhitzt + 2 ccm 0,1 n-NaOH.

Nach 8 Tagen bei 37° wurde mit 25 ccm CaCl₂ + 25 ccm SnCl₂ gefällt. Eine gleiche Reihe A', B', C', D' wurde nach der gleichen Behandlung mit 25 ccm Gerbsäure gefällt und mit 25 ccm Wasser verdünnt; zur Analyse wurden 50 ccm Filtrat genommen.

A.	5,55 ccm Säure; reduzierter Wert	2,5
B.	4,8 » » ; » »	1,75
C.	3,15 » » ; » »	0,1
D.	3,05 » »	

A'.	3,55 ccm Säure; reduzierter Wert	1,5
B'.	2,4 » » ; » »	0,35
C'.	2,3 » » ; » »	0,25
D'.	2,05 » »	

Die Enzymwirkung auf das Globulin ist also auch nach 8 Tagen bei 37° sehr gering, aber immerhin deutlich ausgesprochen. Übrigens ist die Wirkung des Globulinenzyms (B und B') viel größer, wenn sie mit SnCl₂ bestimmt wird als mit Gerbsäure. Mit dem Harnenzym ist das Verhältnis eher das entgegengesetzte; doch dürfte hier die erhaltene Wirkung kaum die Versuchsfehler übersteigen. Für die gleichzeitige Wirkung der beiden Enzyme wurde wie bei der Spaltung des Caseins mit SnCl₂ eine größere Ziffer erhalten als mit Gerbsäure. Aus diesem Versuche ist auch zu schließen, daß die Aufspaltung des Globulins unter dem Einflusse der gebrauchten Enzyme eine sehr geringe sein muß im Vergleich mit der Aufspaltung des Caseins, und deshalb kann bei den Versuchen mit Casein als Substrat die Gegenwart von Globulin (in der Form von Globulinenzym) vernachlässigt werden.

Schließlich haben wir den Versuch mit der gewöhnlichen Reihe von Proben auch mit erhitztem Eierklar als Substrat ausgeführt und die Enzymwirkung einerseits mit SnCl₂, andererseits mit Gerbsäure untersucht. Das Eierklar von 4 Hühneriern wurde mit 400 ccm Wasser geschlagen, 1/2 Stunde auf dem Wasserbade erhitzt und filtriert. Die so erhaltene Lösung wurde als Substrat benutzt:

A. 5 ccm Pferdeglob. + 20 ccm H. E. + 30 ccm Eierklar + 2 ccm 0,1 n-NaOH.

B. 5 ccm Pferdeglob. + 20 ccm H. E. erhitzt + 30 ccm Eierklar + 2 ccm 0,1 n-NaOH.

C. 5 ccm Glob. erhitzt + 20 ccm H. E. + 30 ccm Eierklar + 2 ccm 0,1 n-NaOH.

D. (Glob. + H. E.) erhitzt + 30 ccm Eierklar + 2 ccm 0,1 n-NaOH.

Nach 9 Tagen bei 37° wurde mit 15 ccm CaCl₂ + 15 ccm SnCl₂ gefällt. Eine gleiche Reihe von Proben A', B', C', D' wurde nach 9 Tagen bei 37° mit 30 ccm Gerbsäure gefällt. Nach 6 Stunden bei Zimmertemperatur wurde filtriert und in 50 ccm Filtrat der Stickstoff bestimmt:

A. ergab 14,8 ccm Säure; reduzierter Wert 9,2

B. > 13,7 > > ; > > 8,1

C. > 5,8 > > ; > > 0,2

D. > 5,6 > >

A'. ergab 6,35 ccm Säure; reduzierter Wert 5,15

B'. > 3,70 > > ; > > 2,50

C'. > 1,3 > > ; > > 0,1

D'. > 1,2 > >

Auch hier finden wir somit dieselben Verhältnisse zwischen den mit SnCl₂ und Gerbsäure erhaltenen Ziffern wie vorher. Die in A erhaltene Ziffer (9,2) übersteigt die Summe der in B und C erhaltenen Werte (8,3) nur um einen unbedeutenden Betrag, während die entsprechenden Verhältnisse in A', B' und C' viel mehr ausgesprochen sind.

Es läßt sich nun sagen, daß mit allen untersuchten Substraten bei der Analyse mit Gerbsäure die bei gleichzeitiger Wirkung der beiden Enzyme erhaltenen Werte um einen verhältnismäßig größeren Betrag die Summe der Wirkungen der beiden Enzyme für sich übersteigen als bei der Analyse mit SnCl₂. Da außerdem das Globulinenzym mit SnCl₂ einen verhältnismäßig größeren Wert ergibt als mit Gerbsäure, während der Unterschied beim Harnenzym weniger ausgesprochen ist, so liegt die bereits ausgesprochene (S. 280) Vermutung sehr nahe, daß das Globulinenzym den Anfang der Eiweißspaltung besorgt, während das Harnenzym vielleicht am besten die Fortsetzung des Prozesses übernimmt.

10. Wirkung auf dasselbe Substrat von Globulin- und Harnenzym nacheinander.

Um die Richtigkeit der am Ende des vorangehenden Abschnittes ausgesprochenen Vermutung zu prüfen, haben wir die Wirkung der beiden Enzyme untersucht einerseits auf nicht gespaltenes Casein, andererseits auf Casein, das bereits durch vorangegangene Einwirkung von Globulinenzym bis zu einem gewissen Grade aufgespalten war. Sonst waren die Bestandteile der beiden Digestionsmischungen ganz dieselben; die Anordnung der Versuche war die folgende:

Drei Proben 1, 2, 3, welche alle 5 ccm Globulin + 50 ccm Casein + 4 ccm 0,1 n-NaOH enthielten, wurden 5 Tage bei 37° gehalten. Dann wurde zu Nr. 1 20 ccm H. E., zu Nr. 2 5 ccm Globulin und zu Nr. 3 5 ccm Globulin + 20 ccm H. E. gegeben, worauf alle Proben 20 Minuten auf dem Wasserbade erhitzt wurden. Darauf wurde zu Nr. 1 5 ccm Globulin und zu Nr. 2 20 ccm H. E. zugesetzt und die drei Proben wiederum 5 Tage bei 37° gehalten. Die Zusammensetzung und Behandlung der drei Proben kann folgendermaßen veranschaulicht werden:

1. [(50 ccm Casein + 5 ccm Glob. + 4 ccm 0,1 n-NaOH) 5 Tage bei 37° + 20 ccm H. E.] erhitzt + 5 ccm Glob.

2. [(50 ccm Casein + 5 ccm Glob. + 4 ccm 0,1 n-NaOH) 5 Tage bei 37° + 5 ccm Glob.] erhitzt + 20 ccm H. E.

3. [(50 ccm Casein + 5 ccm Glob. + 4 ccm 0,1 n-NaOH) 5 Tage bei 37° + 5 ccm Glob. + 20 ccm H. E.] erhitzt.

Zur selben Zeit wie die so zusammengesetzten Proben wurden andere 3 Proben 4, 5 und 6 fünf Tage bei 37° gehalten; diese waren folgendermaßen zusammengesetzt:

4. (50 ccm Casein + 5 ccm Glob. + 20 ccm H. E.) erhitzt + 4 ccm 0,1 n-NaOH + 5 ccm Glob.

5. (50 ccm Casein + 5 ccm Glob. + 5 ccm Glob.) erhitzt + 4 ccm 0,1 n-NaOH + 20 ccm H. E.

6. (50 ccm Casein + 5 ccm Glob. + 5 ccm Glob. + 20 ccm H. E.) erhitzt + 4 ccm 0,1 n-NaOH.

Die Proben 1 und 4 waren also gleich zusammengesetzt; nur war das Casein in 1 vor der schließlichen Digestion 5 Tage mit Globulinenzym vorbehandelt. Derselbe Unterschied existiert

zwischen den Proben 2 und 5, sowie zwischen 3 und 6. Das schließlich wirksame Enzym war in 1 und 4 das Globulinenzym und in 2 und 5 das Harnenzym, während 3 und 6 als Kontrolle dienten. Nach 5 Tagen bei 37° wurde zu allen Proben 50 ccm Gerbsäure gegeben und 75 ccm Filtrat für die Analyse genommen. Die erhaltenen Ziffern:

Nr. 1	20,65 ccm Säure;	reduzierter Wert	4,95
› 2	23,3 › › ;	›	› 7,60
› 3	15,7 › › ;		
› 4	15,6 › › ;	›	› 12,85
› 5	4,8 › › ;	›	› 2,05
› 6	2,75 › ›		

Zunächst ist zu verzeichnen, daß das Harnenzym mit vorbehandeltem Casein, das bereits verschiedene während der Vorbehandlung mit dem Globulinenzym entstandene Spaltungsprodukte enthielt, einen viel größeren Umsatz ergab als mit nicht vorbehandeltem. Die entsprechenden Ziffern waren nämlich 7,60 (Nr. 2) bzw. 2,05 (Nr. 5). Mit den Ziffern, welche die Wirkung des Globulinenzym repräsentieren, war der Fall der entgegengesetzte. Die Ziffern waren nämlich 4,95 (Nr. 1) bzw. 12,85 (Nr. 4). Aus den angeführten Ziffern geht auch hervor, daß bei der Einwirkung der beiden Enzyme auf nicht vorbehandeltes Casein das Globulinenzym kräftiger wirkte als das Harnenzym ($12,85 > 2,05$), während das umgekehrte eintraf bei der Einwirkung auf vorbehandeltes Casein ($4,95 < 7,70$).

Ein anderer Versuch wurde in der gleichen Weise ausgeführt; nur waren die angewandten Enzyme von anderer Bereitung, und von dem Gerbsäurefiltrat wurden für die Stickstoffbestimmung 100 ccm genommen. Die erhaltenen Ziffern waren:

Nr. 1	30,1 ccm Säure;	reduzierter Wert	7,05
› 2	30,7 › › ;	›	› 7,65
› 3	23,05 › › ;		
› 4	23,55 › › ;	›	› 19,2
› 5	7,45 › › ;	›	› 3,1
› 6	4,35 › ›		

In einem dritten in der gleichen Weise ausgeführten Versuche war die Harnenzymmenge 40 ccm und die zugesetzte

Alkalimenge 3 ccm 0,1 n-NaOH. 100 ccm Gerbsäurefiltrat für die Stickstoffbestimmung. Die Resultate waren:

Nr. 1	28,8	ccm Säure; reduzierter Wert	5,4
› 2	35,1	› › ;	› › 11,7
› 3	23,4	› › ;	
› 4	21,8	› › ;	› › 8,1
› 5	16,5	› › ;	› › 2,8
› 6	13,7	› ›	

Die Ergebnisse der zwei letzterwähnten Versuche sind also dieselben wie die des ersten Versuches über denselben Gegenstand und dieselben können kurz so zusammengefaßt werden, daß das Harnenzym eine kräftigere Wirkung ausübt, wenn es auf Casein einwirkt, das bereits durch vorangegangene Behandlung mit Globulinenzym etwas aufgespalten worden ist, als wenn es auf nicht vorhandeltes Casein einwirkt. Das Globulinenzym verhält sich in umgekehrter Weise.

Es liegt auf der Hand, daß dieser Befund eine sehr gute Stütze ausmacht für die S. 282 ausgesprochene Vermutung, daß das Globulinenzym den Anfang der Eiweißspaltung besorgt, während das Harnenzym besser die Fortsetzung des Prozesses übernimmt. Daß die Globulinwirkung während der ersten Periode von 5 Tagen in den drei Versuchen überall bedeutend größer ausgefallen ist als in dem Laufe der zweiten Periode von 5 Tagen — die Ziffern sind im ersten Versuche 12,85 bzw. 4,95, im zweiten 19,2 bzw. 7,05 und im dritten 8,1 bzw. 5,4 —, liegt wahrscheinlich zum Teil daran, daß die während der Vorbehandlung gebildeten primären Spaltungsprodukte des Caseins in dem Laufe der zweiten Periode die Wirkung des Globulinenzyms hemmend beeinflusst hat.

Wir haben also die Ergebnisse diskutiert, welche erhalten werden, wenn Casein zunächst mit Globulinenzym und nach Zerstörung dieses Enzyms mit neuem Globulinenzym bzw. Harnenzym behandelt wird. Nach dem dabei hervortretenden Befunde schien es von geringerem Belang zu sein, zu untersuchen, wie die Eiweißaufspaltung sich gestaltet für den Fall, daß das Casein zunächst mit Harnenzym und dann nach Zer-

störung dieses Enzyms mit Globulinenzym bzw. neuem Harnenzym behandelt wird. Trotzdem wurde ein derartiger Versuch ausgeführt. Prinzipiell war die Anordnung des Versuches dieselbe wie die S. 283 angegebene. In Proben Nr. 1 und 2 mit zugehöriger Kontrolle wurde Casein also zunächst mit H. E. behandelt und dann nach Aufkochen zu der Probe 1 Globulinenzym und zu 2 Harnenzym gegeben und bei 37° 4 Tage gehalten. Parallel damit wurden zwei andere Proben Nr. 4 und 5 ohne vorangegangene Behandlung mit Harnenzym, die eine mit Globulinenzym und die andere mit Harnenzym 4 Tage bei 37° behandelt. Die zugesetzten Bestandteile, sowie die Alkalimenge waren in den vier Proben die gleichen, was in einer Weise erreicht wurde, die mit der S. 283 angewandten völlig analog war.

Die gehörig reduzierten Werte, welche die im Laufe der vier Tage stattgefundene Spaltung repräsentieren, waren:

Nr. 1	16	ccm Säure,
› 2	0,8	› ›
› 4	15,5	› ›
› 5	2,6	› ›

Zunächst ergibt sich, daß die Wirkung des Globulinenzyms praktisch die gleiche bleibt, unabhängig davon, ob Vorbehandlung mit Harnenzym stattgefunden hat oder nicht (Nr. 1 und 4). Die Wirkung des Harnenzymes ist dagegen, obwohl immer schwach, entschieden stärker ohne Vorbehandlung mit Harnenzym als nach Vorbehandlung (Nr. 5 bzw. 2).

11. Abhängigkeit der Enzymwirkung von den zugesetzten Enzymmengen.

Nach den bereits besprochenen Ergebnissen unserer Versuche ist der mit Gerbsäure bestimmte Umsatz, welcher mit einem Gemenge von Globulinenzym bzw. Fibrinenzym und Harnenzym erhalten wird, größer als die Summe der Wirkungen der beiden Enzyme — Globulinenzym oder Fibrinenzym einerseits und Harnenzym andererseits —, wenn sie unter den gleichen Bedingungen jedes für sich wirken. Für das volle Verständnis der Ausführungen in den vorangehenden Abschnitten ist es folglich von Belang zu wissen, wie die Enzymwirkung, mit der

Gerbsäuremethode ermittelt, von der zugegebenen Enzymmenge abhängt. Bei der Untersuchung dieser Frage wollen wir zunächst den Fall behandeln, daß zu verschiedenen Proben desselben Versuches verschiedene Mengen desselben Enzymes zugesetzt werden. Nach früheren Erfahrungen von Hedin ist bei der Trypsinwirkung die Stickstoffmenge im Gerbsäurefiltrate der gebrauchten Enzymmenge proportional, wenn nur das Substrat in genügender Menge vorhanden ist.¹⁾ Mit 25 ccm 25%iger Caseinlösung in 0,25%iger Na_2CO_3 -Lösung als Substrat und 20 ccm (Trypsinlösung + Wasser) wurden folgende Werte erhalten:

Trypsinmenge	Anzahl Kubikzentimeter 0,1 n-Säure bei der N-Bestimmung
0,5 ccm	2,9
1 >	5,8
2 >	10,35.

So lange das Substrat in Überschuß vorhanden ist, herrscht Proportionalität; folglich trifft es früher oder später ein, daß bei zunehmender Trypsinmenge die Stickstoffmenge im Gerbsäurefiltrate unter die für die Proportionalität erforderlichen Zahlen sinkt. Dies traf im obigen Versuche bereits bei einer Trypsinmenge von 2 ccm ein. Bei dem Vorhandensein von größeren Caseinmengen dauert die Proportionalität länger. In keinem Falle steigt die Stickstoffmenge rascher als die Trypsinmenge.

Unter den in dieser Arbeit angewandten Enzymen haben wir in bezug auf die Frage nach der Beziehung zwischen Enzymmenge und Stickstoffmenge im Gerbsäurefiltrate das Harnenzym und das Globulinenzym untersucht.

Das Harnenzym wirkt nach dem oben Gesagten am besten auf Eiweiß, das bereits bis zu einem gewissen Grade aufgespalten ist. Auf nicht gespaltenes Eiweiß ist die Wirkung nur eine sehr schwache. Wir haben diese Wirkung auf Casein untersucht:

1. 20 ccm H. E. + 40 ccm H. E. erhitzt + 50 ccm Casein + 2 ccm 0,1 n-NaOH.

2. 40 ccm H. E. + 20 ccm H. E. erhitzt + 50 ccm Casein + 2 ccm 0,1 n-NaOH.

¹⁾ Journ. of Physiol., Bd. 32, S. 468 (1905).

3. 60 ccm H. E. + 50 ccm Casein + 2 ccm 0,1 n-NaOH.

4. 60 ccm H. E. erh. + 50 ccm Casein + 2 ccm 0,1 n-NaOH.

Nach 4 Tagen bei 37° 30 ccm Gerbsäure; 100 ccm Filtrat.

Nr. 1 9,6 ccm Säure; reduzierter Wert 2,7

› 2 12,3 › › ; › › 5,4

› 3 15,0 › › ; › › 8,1

› 4 6,9 › ›

Wir finden also mit den angewandten Enzymmengen eine strenge Proportionalität zwischen Stickstoffmenge im Gerbsäurefiltrate und zugesetzter Enzymmenge. Wahrscheinlich gilt dies aber nur für geringe Enzymmengen.

Das Globulinenzym zeigt auch mit steigenden Enzymmengen eine vermehrte Wirkung, aber hier ist es uns nicht möglich gewesen durch Verminderung der Enzymmenge strenge Proportionalität zu erreichen. Für die folgenden zwei Versuche wurde Pferdeglobulin gebraucht.

Verdünnung: 1 ccm Globulin : 75 ccm H₂O.

1. 5 ccm Glob. + 15 ccm Glob. erhitzt + 50 ccm Casein + 3 ccm 0,1 n-NaOH.

2. 10 ccm Glob. + 10 ccm Glob. erhitzt + 50 ccm Casein + 3 ccm 0,1 n-NaOH.

3. 15 ccm Glob. + 5 ccm Glob. erhitzt + 50 ccm Casein + 3 ccm 0,1 n-NaOH.

4. 20 ccm Glob. + 50 ccm Casein + 3 ccm 0,1 n-NaOH.

5. 20 ccm Glob. erhitzt + 50 ccm Casein + 3 ccm 0,1 n-NaOH.

Nach 4 Tagen bei 37° 50 ccm Gerbsäure; 75 ccm Filtrat.

Nr. 1 3,05 ccm Säure; reduzierter Wert 1,05

› 2 3,9 › › ; › › 1,9

› 3 4,6 › › ; › › 2,6

› 4 5,2 › › ; › › 3,2

› 5 2,0 › ›

Da die zugesetzten Enzymmengen wie 1 : 2 : 3 : 4 sich verhielten, finden wir hier keine Proportionalität.

Noch weniger existiert die Proportionalität im folgenden Versuch, wo die Verdünnung 1 ccm Glob. : 3 ccm H₂O war. Sonst waren die Volumina die gleichen wie im vorangehenden Versuche. Die Digestionszeit war doch nur 3 Tage und das angewandte Volumen an Gerbsäurefiltrat 90 ccm. Die Ergebnisse waren:

Nr. 1	11,05 ccm Säure;	reduzierter Wert	9,05
› 2	15,6 › › ;	› ›	13,6
› 3	18,25 › › ;	› ›	16,25
› 4	20,00 › › ;	› ›	18
› 5	2,0 › ›		

Für Rinderglobulin sind ähnliche Verhältnisse in Geltung. In einem Versuche, der wie die mit Pferdeglobulin angeordnet war, wurden mit Enzymmengen, die wie 1 : 4 sich verhielten, folgende reduzierten Werte bekommen:

Nr. 1	4,8 ccm Säure,
› 2	7,8 › ›

Wir haben sodann den Fall zu behandeln, daß verschiedene Enzyme auf dieselbe Substratmenge einwirken, und zu untersuchen, wie der Erfolg dieses Verlaufs sich stellt im Vergleich mit der Einwirkung jedes Enzyms für sich auf dasselbe Substrat.

Zunächst sei erwähnt, daß, wenn Pferdeglobulin und Rinderglobulin zugleich auf Casein einwirken, die Stickstoffmenge im Gerbsäurefiltrate geringer ausfällt als die Summe der Werte, welche erhalten werden, wenn jedes Enzym für sich einwirkt, wie aus folgendem Versuch zu ersehen ist.

A. 5 ccm Pferdeglob. + 5 ccm Rinderglob. + 50 ccm Casein + 3 ccm 0,1 n-NaOH.

B. 5 ccm Pferdeglob. + 5 ccm Rinderglob. erh. + 50 ccm Casein + 3 ccm 0,1 n-NaOH.

C. 5 ccm Pferdeglob. erhitzt + 5 ccm Rinderglob. + 50 ccm Casein + 3 ccm 0,1 n-NaOH.

D. (Pferdeglob. + Rinderglob.) erhitzt + 50 ccm Casein + 3 ccm 0,1 n-NaOH.

Nach 4 Tagen bei 37° 50 ccm Gerbsäure; 75 ccm Filtrat.

A. 8,05 ccm Säure; reduzierter Wert 5,9

B. 7,55 › › ; › › 5,4

C. 5,00 › › ; › › 2,85

D. 2,15 › ›

} 8,25

Dieses Ergebnis steht ohne Zweifel mit der Tatsache in Beziehung, daß nach dem eben Gesagten bei beiden Globulinenzymen die Stickstoffmenge des Gerbsäurefiltrates nicht der Enzymmenge proportional zunimmt, sondern langsamer.

In anderen von uns untersuchten Fällen haben zwei Enzyme

zusammen eine Wirkung ergeben, welche etwa die Summe der beiden Enzymwirkungen, wenn jedes Enzym für sich wirkte, ausmachte. Ein solcher Versuch wurde mit Globulinenzym vom Rind und einem Enzym ausgeführt, das aus Rindermilz durch Waschen mit Wasser und Behandeln mit Caseinlösung erhalten worden war. Die Anordnungen beim Versuche waren dieselben wie eben beim Versuche mit Globulinenzym vom Pferd und Rind erwähnt. Die Zusammensetzung der Probe A war:

10 ccm Glob. + 25 ccm Milzenzym + 50 ccm Casein + 1,5 ccm 5%iges Na_2CO_3 .

Nach 4 Tagen bei 37° 40 ccm Gerbsäure; 75 ccm Filtrat.

A.	9,15 ccm Säure; reduzierter Wert	5,05	} 4,95
B.	5,15 » » ; » »	1,05	
C.	8,0 » » ; » »	3,9	
D.	4,1 » »		

Ein anderer Versuch, wobei Globulinenzym vom Rind und mit Casein bereitetes Fibrinenzym zur Anwendung kamen, wurde in der gleichen Weise ausgeführt und ergab folgende Ziffern:

A.	5,7 ccm Säure; reduzierter Wert	2,9	} 2,6
B.	3,1 » » ; » »	0,3	
C.	5,1 » » ; » »	2,3	
D.	2,8 » »		

Mehrere derartige Versuche haben zu denselben Ergebnissen geführt, aber es hat keinen Zweck, die Ziffern anzuführen.

Viel mehr Interesse erheischen ohne Zweifel die Versuche, wo zwei Enzyme, wenn sie zugleich und zusammen wirken, einen größeren Umsatz ergeben als die Summe der Wirkungen, wenn sie für sich tätig sind. Nach den Ergebnissen unserer Arbeit ist dies der Fall, wenn Globulinenzym oder ein proteolytisches Enzym auf das Fibrin zusammen mit Harnenzym auf Eiweiß einwirkt. Über die Bedeutung der Mengenverhältnisse der beiden Enzyme bei solchen Versuchen haben wir einige Beobachtungen gemacht. Zunächst wurde eine gegebene Harnenzymmenge mit wechselnden Mengen Globulin vermischt, und zwar waren solche Mengen gekochtes Globulin immer vorhanden, daß die Summe gekochtes + nicht gekochtes Globulin in allen Proben der Versuchsreihe immer die gleiche war. Eine solche Reihe war folgendermaßen angeordnet:

1. 5 ccm Glob. erh. + 0 ccm Glob. (nicht erh.) + 30 ccm H. E. + 50 ccm Cas.
2. 4 > > > + 1 > > (> >) + 30 > H. E. + 50 > >
3. 3 > > > + 2 > > (> >) + 30 > H. E. + 50 > >
4. 2 > > > + 3 > > (> >) + 30 > H. E. + 50 > >
5. 1 > > > + 4 > > (> >) + 30 > H. E. + 50 > >
6. 0 > > > + 5 > > (> >) + 30 > H. E. + 50 > >
7. 5 > > > + 30 > H. E. erhitzt + 50 Casein.

Nach 4 Tagen bei 37° 30 ccm Gerbsäure; 50 ccm Filtrat.

Nr. 1	2,7 ccm Säure; reduzierter Wert	1,5
> 2	5,0 > > ; > >	3,8
> 3	6,7 > > ; > >	5,5
> 4	7,7 > > ; > >	6,5
> 5	8,6 > > ; > >	7,4
> 6	8,9 > > ; > >	7,7
> 7	1,2 > >	

Die Ziffer 1,5 (Nr. 1) entspricht der Wirkung des Harnenzymes allein; die folgenden Ziffern, in welchen die Wirkung des Globulinenzym mit einbegriffen ist, steigen mit der Globulinmenge, obwohl sie keineswegs der Globulinmenge proportional sich verhalten.

Zu etwa den gleichen Ergebnissen führten Versuche, bei welchen die Globulinmenge konstant gehalten wurde, während die Harnenzymmenge variiert wurde. Ein derartiger Versuch wurde wie folgt ausgeführt:

1. 20 ccm Glob. + 0 ccm H. E. + 60 ccm H₂O + 50 ccm Casein,
2. 20 > > erhitzt + 60 > H₂O + 50 > >
3. 20 > > + 10 ccm H. E. + 50 > H₂O + 50 > >
4. (20 > > + 10 > H. E.) erhitzt + 50 ccm H₂O + 50 ccm Cas.,
5. 20 > > + 20 > H. E. + 40 ccm H₂O + 50 ccm Casein,
6. (20 > > + 20 > H. E.) erhitzt + 40 ccm + 50 > >
7. 20 > > + 40 > H. E. + 20 ccm H₂O + 50 > >
8. (20 > > + 40 ccm H. E.) erhitzt + 20 ccm H₂O + 50 ccm Cas.,
9. 20 > > + 60 > H. E. + 50 > Casein,
10. (20 > > + 60 > H. E.) erhitzt + 50 > >

Wie ersichtlich, waren die Proben 2, 4, 6, 8, 10 Kontrollproben zu 1, 3, 5, 7, 9.

Nach 4 Tagen 50 ccm Gerbsäure; 100 ccm Filtrat.

Nr. 1	5,9 ccm Säure; reduzierte Zahl	5,0
> 2	0,9 > > ; > >	
> 3	13,8 > > ; > >	12,8
> 4	1,0 > >	

Nr. 5	16,7 ccm Säure ;	reduzierte Zahl	15,6
› 6	1,1 › ›		
› 7	22,5 › › ; › ›		21,2
› 8	1,3 › ›		
› 9	28,4 › › ; › ›		26,9
› 10	1,5 › ›		

Die Ziffer 5 ergibt folglich die Wirkung des Globulinenzym allein, während die folgenden Ziffern der kombinierten Wirkung beider Enzyme entsprechen.

Ein ähnlicher Versuch wurde mit Fibrin anstatt des Globulinenzym ausgeführt:

1.	5 g Fibrin	+ 0 ccm H. E.	+ 40 ccm H ₂ O	+ 50 ccm Casein,
2.	5 › ›	erhitzt	+ 40 › H ₂ O	+ 50 › ›
3.	5 › ›	+ 5 ccm H. E.	+ 35 › H ₂ O	+ 50 › ›
4.	(5 › ›	+ 5 › H. E.)	erhitzt	+ 35 ccm H ₂ O + 50 ccm Cas.,
5.	5 › ›	+ 10 › H. E.	+ 30 › H ₂ O	+ 50 › ›
6.	(5 › ›	+ 10 › H. E.)	erhitzt	+ 30 › H ₂ O + 50 › ›
7.	5 › ›	+ 20 › H. E.	+ 20 › H ₂ O	+ 50 › ›
8.	(5 › ›	+ 20 › H. E.)	erhitzt	+ 20 › H ₂ O + 50 › ›
9.	5 › ›	+ 40 › H. E.	+ 50 ccm Casein,	
10.	(5 › ›	+ 40 › H. E.)	erhitzt	+ 50 › ›

Nach 3 Tagen bei 37° 30 ccm Gerbsäure; 75 ccm Filtrat.

Nr. 1	10,7 ccm Säure; reduzierter Wert	6,6,
› 2	4,1 › ›	
› 3	23,25 › › ; › ›	19,0
› 4	4,25 › ›	
› 5	27,2 › › ; › ›	22,7
› 6	4,5 › ›	
› 7	32,2 › › ; › ›	27,2
› 8	5,0 › ›	
› 9	40,0 › › ; › ›	34,3
› 10	5,7 › ›	

12. Globulinenzym und Erepsin.

Wir haben im vorangehenden gezeigt, daß das Globulinenzym und das Harnenzym, wenn sie zugleich und zusammen wirken, einen größeren Ausschlag der Wirkung ergeben als die Summe der Wirkungen, welche die Enzyme jedes für sich unter denselben Bedingungen erzeugen. Wir glauben auch gezeigt zu haben, daß dies daran liegt, daß die beiden Enzyme verschiedene Stadien der Eiweißspaltung besorgen, indem das

Globulinzym die Spaltung beginnt, aber nicht gut fortsetzen kann, während das Harnenzym den Anfang der Spaltung nur schlecht übernehmen kann, wohl aber imstande ist, die Spaltung fortzusetzen, wenn dieselbe durch andere Enzyme bereits angefangen ist. Das Harnenzym würde folglich wie ein sogenanntes Erepsin sich verhalten, und es war folglich von großem Belang zu untersuchen, ob bereits bekannte ereptische Enzyme mit dem Globulinzym in der gleichen Weise zu arbeiten imstande sind, wie das Harnenzym. Zu dem Zweck haben wir einerseits das Darmerepsin vom Rinde, andererseits Hefeerepsin der Prüfung unterzogen.

Darmerepsin haben wir aus dem oberen Teil des Rindsdarmes in der Weise herzustellen versucht, daß die sorgfältig gewaschene Schleimhaut in der Gegenwart von Toluol und Chloroform eine Nacht bei 37° mit Wasser behandelt wurde, dem etwas CaCO₃ zugesetzt worden war, um die Entstehung saurer Reaktion möglichst zu vermeiden. Danach wurde filtriert und einige Tage dialysiert. Die wenn nötig noch einmal filtrierte Lösung wurde in passender Verdünnung ohne weitere Behandlung für die Versuche verwendet:

A. 1 ccm Pferdeglob. + 10 ccm Erepsin + 40 ccm H₂O + 50 ccm Casein + 2 ccm 0,1 n-NaOH.

B. 1 ccm Pferdeglob. + 10 ccm Erepsin erhitzt + 40 ccm H₂O + 50 ccm Casein + 2 ccm 0,1 n-NaOH.

C. 1 ccm Glob. erhitzt + 10 ccm Erepsin + 40 ccm H₂O + 50 ccm Casein + 2 ccm 0,1 n-NaOH.

D. (Glob. + Ereps.) erhitzt + 40 ccm H₂O + 50 ccm Casein + 2 ccm 0,1 n-NaOH.

Nach 4 Tagen bei 37° 30 ccm Gerbsäure; 100 ccm Filtrat.

A. 8,5 ccm Säure; reduzierter Wert 6,5

B. 4,3 „ „ ; „ „ 2,3

C. 2,6 „ „ ; „ „ 0,6 } 2,9

D. 2,0 „ „

Die Wirkung des Globulinzyms allein entspricht der Ziffer 2,3 und die des Erepsins der Zahl 0,6. Beide zusammen machen 2,9, welcher Wert lange nicht die Wirkung der vereinigten Enzyme (6,5) erreicht. In einem anderen Versuche mit Globulinzym und Darmerepsin wurden folgende Ziffern erhalten:

A.	Reduzierter Wert	8,1	} 5,2
B.	»	3,6	
C.	»	1,6	

Das Darmerepsin verhält sich folglich zu dem Globulin wie das Harnenzym.

Daß die Hefe ein Erepsin enthält, wurde wohl zuerst von Vines¹⁾ behauptet, und die peptolytische oder polypeptidspaltende Fähigkeit desselben ist seither einerseits von Abderhalden und Fodor,²⁾ andererseits von Dernby³⁾ hervorgehoben worden. Wir haben versucht, das Enzym in der Weise zu erhalten, daß dicker Hefebrei zunächst nach Zusatz von ziemlich viel Toluol (50 ccm auf 1 Liter Brei) und etwas CaCO₃ 3 Tage bei Zimmertemperatur autolysiert wurde. Darauf wurde filtriert und eine Woche gegen fließendes Wasser dialysiert. Nach Filtrieren wurde etwas von dem Filtrate mit 10 Volumen Wasser verdünnt und für den Versuch verwendet:

A. 5 ccm Pferdeglob. + 5 ccm Hefeenzym + 50 ccm Casein + 1 ccm 0,1 n-NaOH.

B. 5 ccm Pferdeglob. + 5 ccm Hefeenzym erhitzt + 50 ccm Casein + 2 ccm 0,1 n-NaOH.

C. 5 ccm Glob. erhitzt + 5 ccm Hefeenzym + 50 ccm Casein + 2 ccm 0,1 n-NaOH.

D. (Glob. + Hefeenzym) erhitzt + 50 ccm Casein + 2 ccm 0,1 n-NaOH.
Nach 2 Tagen bei 37° 50 ccm Gerbsäure; 75 ccm Filtrat.

A.	16,8 ccm Säure; reduzierter Wert	14,95	} 11,1
B.	12,15 »	10,3	
C.	2,65 »	0,8	
D.	1,85 »		

In einem anderen Versuche mit Globulinenzym und Hefeerepsin waren die reduzierten Werte folgende:

A.	8,8	} 4,8
B.	3,7	
C.	1,1	

Auch in diesen zwei Versuchen erreicht die Summe der beiden Enzymwirkungen, wenn jedes Enzym für sich wirkt, nicht die Wirkung der vereinigten Enzyme und wir finden folg-

¹⁾ Annal. of Bot., Bd. 18, S. 289 (1904); Bd. 23, S. 1 (1909).

²⁾ Fermentforschung, Bd. 1, S. 533 (1916).

³⁾ Biochem. Zeitschr., Bd. 81, S. 107 (1916).

lich dieselbe Beziehung zwischen Hefeerepsin und Globulinenzym wie zwischen Harnenzym und Globulinenzym.

13. Einwirkung von Harnenzym und Globulinenzym auf Wittes Pepton.

Da aus den bereits angeführten Untersuchungen hervorzugehen scheint, daß das Harnenzym eine Art von Erepsin ist, haben wir auch dessen Vermögen, Wittes Pepton weiter aufzuspalten, untersucht und in ein paar Fällen auch die Wirkung von Globulinenzym auf dasselbe Substrat geprüft. Die Spaltung haben wir zunächst mit Hilfe von Sörensens Formoltitrationsverfahren verfolgt.¹⁾ Da die zu titrierenden Lösungen in solchen Fällen immer schwach gelblich gefärbt sind, haben wir als Vergleichsflüssigkeit bei der Titration in gewöhnlicher Weise hergestellte Kontrollösung mit erhitzten Enzymlösungen angewandt. In gehöriger Verdünnung wurde also zunächst diese bis zu stark roter Farbe (Phenolphthalein) mit 0,2 n-NaOH versetzt, worauf die übrigen Lösungen in der gleichen Verdünnung bis zur gleichen Färbung titriert wurden. Die angeführten Ziffern sind die dabei angewandten Kubikzentimeter 0,2 n-NaOH, nachdem die in der Vergleichslösung angewandte NaOH-Menge in Abzug gebracht worden war.

4%iges Wittes Pepton wurde mit HCl möglichst neutralisiert und dann für die Bereitung folgender Proben verwendet:

1. 40 ccm H. E. + 25 ccm Pept. + 1,5 ccm 0,1 n-NaOH,
2. 40 „ H. E. erhitzt + 25 ccm P-pt. + 1,5 ccm 0,1 n-NaOH.

Nach 6 Tagen bei 37° wurde 25 ccm Lösung auf 100 ccm verdünnt und 40 ccm der verdünnten Lösung für die Titration gebraucht. Der Umsatz in der titrierten Menge entsprach 1,6 ccm 0,2 n-NaOH.

In einem anderen Versuche wurde die Einwirkung des Harnenzymes und die des Globulinenzymes zugleich bestimmt. Dabei wurde die gewöhnliche Reihe von 4 Proben bereitet (S. 271) und zwar so große Volumina von den Lösungen, daß die Formoltitration zu verschiedenen Zeiten mit herausgenommenen kleineren Proben ausgeführt werden konnte. Mit wie oben neutralisiertem Wittes Pepton wurden also folgende Lösungen bereitet:

¹⁾ Biochem. Zeitschr., Bd. 21, S. 131 (1909); Bd. 25, S. 1 (1910).

A. 15 ccm Rinderglob. + 40 ccm H. E. + 50 ccm Pepton + 2 ccm 0,1 n-NaOH.

B. 15 ccm Rinderglob. + 40 ccm H. E. erhitzt + 50 ccm Pepton + 2 ccm 0,1 n-NaOH.

C. 15 ccm Rinderglob. erhitzt + 40 ccm H. E. + 50 ccm Pepton + 2 ccm 0,1 NaOH.

D. (Glob. + H. E.) erhitzt + 50 ccm Pepton + 2 ccm 0,1 n-NaOH.

Die Lösungen wurden bei 37° aufbewahrt; nach unten angegebenen Zeiten wurden von jeder Probe 25 ccm herausgenommen, auf 100 ccm verdünnt und für die Titration verwendet. Die Ergebnisse waren folgende:

	Nach 1 Tage	5 Tagen	7 Tagen
A.	1,1	2,2	2,7
B.	0,7	0,7	0,7
C.	0,4	1,5	2,0.

In B, welche Probe die Wirkung des Globulinenzymes wiedergibt, finden wir nur im Laufe des ersten Tages eine geringe Änderung; dagegen ist eine ausgesprochene Aufspaltung des Peptons unter dem Einflusse des Harnenzym zu verzeichnen (Probe C). Die Analysen der Probe A zeigen überall eine Ziffer, welche eben die Summe der entsprechenden Ziffern für B und C ausmacht und nicht mehr als diese Summe, wie wir vorher bei der Aufspaltung von Eiweiß und Analyse durch Gerbsäurefällung gefunden haben. Dies liegt offenbar daran, daß bei der Spaltung von Pepton beide Enzyme, wenn überhaupt wirksam, unabhängig voneinander arbeiten, während bei deren Einwirkung auf z. B. Casein das Globulinenzym das Eiweiß für die Einwirkung des Harnenzym präpariert.

In einem dritten Versuche, wo Pferdeglobulin angewandt wurde, wurden Proben hergestellt, welche den Proben B, C und D im obigen Versuche entsprachen:

B. 5 ccm Glob. + 75 ccm H. E. erhitzt + 250 ccm 4%iges neutr. Pepton + 10 ccm 0,1 n-NaOH.

C. 5 ccm Glob. erhitzt + 75 ccm H. E. + 250 ccm 4%iges neutr. Pepton + 10 ccm 0,1 n-NaOH.

D. (Glob. + H. E.) erhitzt + 250 ccm 4%iges neutr. Pepton + 10 ccm 0,1 n-NaOH.

Bei der Analyse wurde 50 ccm Flüssigkeit für die Titrierung

angewandt. Nach Abzug des Kontrollwertes waren die Ergebnisse:

	Sofort	Nach 1 Tage	2 Tagen	4 Tagen	6 Tagen	8 Tagen
B.	0	0,5	0,7	1,1	1,3	1,5
C.	2	0,0	1,1	2,3	3,1	3,9.

In diesem Falle wirkte also auch das Globulin auf das Pepton ein.

Schließlich haben wir in einem Versuche mit Wittes Pepton und Harnenzym die Analyse mit Gerbsäure ausgeführt. Um die Hauptmasse der in dem Pepton vorhandenen mit Gerbsäure nicht fällbaren Stickstoffmenge zu entfernen, wurde eine 4%ige Peptonlösung zunächst 3 Tage dialysiert. Die auch nach der Dialyse alkalisch reagierende Lösung wurde mit HCl möglichst neutralisiert und dann für die Bereitung folgender Proben verwendet:

1. 25 ccm H. E. + 50 ccm Pepton + 5 ccm 0,1 n-NaOH,
2. 25 „ H. E. erh. + 50 ccm Pept. + 5 ccm 0,1 n-NaOH.

Nach 4 Tagen bei 37° 40 ccm Gerbsäure; 75 ccm Filtrat.

Nr. 1 23,35 ccm Säure; reduzierter Wert 4,05

„ 2 19,3 „ „

Auch mit dieser Methode ergibt sich folglich eine deutliche Wirkung des Harnenzymes. Über einen anderen Versuch, wo Gerbsäure für die Analyse verwendet wurde, wird S. 299 berichtet.

14. Kann das eine Enzym in der Form von Zymogen vorhanden sein?

Aus unseren ersten Versuchen über die Beziehung zwischen dem Fibrinenzym bzw. dem Globulinenzym einerseits und dem Harnenzym andererseits könnte man den Eindruck bekommen, daß die eine der zwei Substanzen vielleicht ein Zymogen sein könnte, das durch die Einwirkung der anderen aktiviert werde. Wenn dies der Fall wäre, so würde wahrscheinlich eine solche Aktivierung stattfinden, wenn die zwei Substanzen aufeinander einzuwirken instand gesetzt würden, bevor das Substrat zugesetzt wird und die eigentliche Enzymwirkung einsetzt. Nach einer solchen vorangehenden Einwirkung der beiden Substanzen würde also, wenn Aktivierung dabei stattfände, nach Zugabe des Substrates eine kräftigere Enzymwirkung stattfinden als

ohne vorangehende Behandlung. Alle daraufhin gerichteten Versuche haben zu dem Ergebnis geführt, daß die gleiche Enzymwirkung erhalten wurde, gleichgültig ob Vorbehandlung stattgefunden hatte oder nicht. Dies deutet nach dem oben Gesagten darauf hin, daß kein Zymogen vorhanden sein dürfte. Von den ausgeführten Versuchen soll nur einer hier beschrieben werden.

1. 5 g feuchtes Fibrin + 20 ccm H. E. wurden eine Nacht bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Darauf wurde 50 ccm Caseinlösung zugesetzt und alles 3 Tage bei 37° gehalten.

2. Eine Kontrolle wurde sofort nach der Zugabe von Casein mit Gerbsäure gefällt.

3. Zwei andere Proben wurden in der gleichen Weise bereitet; nur wurden das Fibrin und das Harnenzym nicht zusammen aufbewahrt, sondern sofort mit Casein versetzt; darauf wurde die eine Probe 3 Tage bei 37° gehalten.

4. Die andere (Kontrollprobe) wurde sofort mit Gerbsäure gefällt.

Die Gerbsäuremenge war 25 ccm und von dem Filtrat wurde 40 ccm für die Analyse genommen.

Nr. 1 ergab 26,1 ccm Säure; reduzierter Wert 23,6

› 2 › 2,5 › › ,

› 3 › 25,7 › › ; › › 23,7

› 4 › 2,0 › ›

15. Bedeutung der Reaktion für die Enzymwirkung.

Wie bereits erwähnt wurde, wirken sowohl das proteolytische Enzym des Fibrins wie auch das Globulinenzym am besten bei schwach alkalischer Reaktion (S. 268, 269 u. 274, 275). Bei den bereits angeführten Versuchen wurde eine schwach alkalische Caseinlösung als Substrat angewandt, aber die Enzymwirkung stieg ein wenig, wenn etwas mehr Alkali zugefügt wurde. Das Harnenzym verhält sich bei dessen Einwirkung auf das Casein in der gleichen Weise, wie aus folgendem Versuche zu ersehen ist:

1. 40 ccm H. E. + 50 ccm Casein + 5 ccm H₂O + 5 ccm H₂O.

2. 40 ccm H. E. + 50 ccm Casein + 5 ccm H₂O + 4 ccm H₂O + 1 ccm 0,1 n-NaOH.

3. 40 ccm H. E. + 50 ccm Casein + 5 ccm H₂O + 2 ccm H₂O + 3 ccm NaOH.

4. 40 ccm H. E. + 50 ccm Casein + 5 ccm H₂O + 5 ccm NaOH.

5. Kontrolle mit erhitztem H. E.

Nach 4 Tagen bei 37° 30 ccm Gerbsäure; 100 ccm Filtrat.

Nr. 1	9,1 ccm Säure; reduzierter Wert	3,3
› 2	9,3 › › ; › ›	3,5
› 3	9,4 › › ; › ›	3,6
› 4	9,0 › › ; › ›	3,2
› 5	5,8 › ‹	

In einem anderen Versuche wurde Wittes Pepton als Substrat benutzt. Eine 4%ige Lösung von dem Pepton wurde zwei Tage dialysiert, mit HCl möglichst neutralisiert, filtriert und für die Bereitung folgender Proben verwendet:

1. 25 ccm H. E. + 50 ccm Pepton + 5 ccm H₂O.

2. 25 › H. E. + 50 › › + 2 › 0,1 n-NaOH + 3 ccm H₂O.

3. 25 › H. E. + 50 › › + 3 › 0,1 n-NaOH + 2 › H₂O.

4. 25 › H. E. + 50 › › + 4 › 0,1 n-NaOH + 1 › H₂O.

5. 25 › H. E. + 50 › ‹ + 5 › 0,1 n-NaOH.

6. Kontrolle mit erhitztem H. E.

Nach 4 Tagen bei 37° 40 ccm Gerbsäure; 100 ccm Filtrat.

Nr. 1	48,75 ccm Säure; reduzierter Wert	12,15
› 2	49,6 › › ; › ›	13,0
› 3	50,1 › › ; › ›	13,5
› 4	50,25 › › ; › ›	13,65
› 5	50,05 › › ; › ›	13,45
› 6	36,6 › ›	

Auch hier finden wir also die beste Wirkung bei schwach alkalischer Reaktion. Die Proben 2—5 reagierten deutlich alkalisch gegen Lackmus.

Auch die kombinierte Wirkung von Fibrin bzw. Globulinenzym und Harnenzym geht am besten bei schwach alkalischer Reaktion vor sich und steigt gewöhnlich beim Gebrauch der alkalischen Caseinlösung als Substrat, wenn etwas mehr Alkali zugesetzt wird. Im folgenden Versuch wurde einerseits Fibrin allein als Enzymquelle benutzt, andererseits Fibrin + H. E. und zwar mit verschiedenen Mengen zugesetzten Alkalis:

5 g Fibrin + 30 ccm H₂O + 50 ccm Casein + 5 ccm H₂O.

5 › › + 30 › H. E. + 50 › › + 5 › H₂O.

5 › › + 30 › H₂O + 50 › › + 3,5 ccm H₂O

+ 1,5 ccm 5%iges Na₂CO₃.

5 g Fibrin + 30 ccm H.E. + 50 ccm Casein + 3,5 ccm H₂O
+ 1,5 ccm 5% iges Na₂CO₃.

5 g Fibrin + 30 ccm H₂O + 50 „ „ + 1 „ H₂O
+ 3 ccm Na₂CO₃.

5 g Fibrin + 30 „ H.E. + 50 „ „ + 1 „ H₂O
+ 3 ccm Na₂CO₃.

5 g Fibrin + 30 ccm H₂O + 50 ccm Casein + 5 ccm Na₂CO₃.

5 „ „ + 30 „ H.E. + 50 „ „ + 5 „ Na₂CO₃.

Nach 3 Tagen bei 37° 35 ccm Gerbsäure; 50 ccm Filtrat.

Die Ergebnisse waren:

	Mit Fibrin	Mit Fibrin + H. E.
Ohne Na ₂ CO ₃	7,9 ccm Säure	12 ccm Säure
1,5 ccm Na ₂ CO ₃	7,9 „ „	14,3 „ „
3 „ Na ₂ CO ₃	11,3 „ „	18 „ „
5 „ Na ₂ CO ₃	5,4 „ „	6,7 „ „

In diesem Versuch war sowohl die Wirkung des Fibrins allein wie die von Fibrin + H. E. am stärksten mit 3 ccm Na₂CO₃.

In einem andern Versuche wurde mit Fibrin und Harnenzym die S. 271 angegebene Serie von Proben bereitet, einerseits ohne Zugabe von Alkali, andererseits mit Zusatz von 2 ccm 0,1 n-NaOH:

- A. 5 g Fibrin + 30 ccm H. E. + 50 ccm Casein + 2 ccm H₂O
 B. 5 „ „ + 30 „ H. E. erh. + 50 „ „ + 2 „ H₂O
 C. 5 „ „ erh. + 30 „ H. E. + 50 „ „ + 2 „ H₂O
 D. (Fibrin + H. E.) erh. + 50 ccm Casein + 2 ccm H₂O.

Die andere Serie war wie diese bereitet, nur enthielt dieselbe 2 ccm 0,1 n-NaOH anstatt 2 ccm H₂O. Nach 3 Tagen bei 37° 30 ccm Gerbsäure; 50 ccm Filtrat. Die Resultate waren:

Wirkende Enzyme	Ohne zugesetztes Alkali	Mit 2 ccm NaOH
Fibrin + H. E.	7,5 ccm Säure	11,7 ccm Säure
Fibrin	4,9 „ „	4,7 „ „
H. E.	0,3 „ „	0,5 „ „

Hier ist die kombinierte Wirkung von Fibrin und Harnenzym durch die Zugabe von Alkali entschieden gestiegen, ohne daß die Wirkung von Fibrin oder Harnenzym besonders beeinflußt waren.

Obwohl die in dieser Arbeit abgehandelten Enzyme am besten bei schwach alkalischer Reaktion ihre Wirksamkeit ent-

fallen, so werden sie, mindestens wenn Eiweißkörper nicht in genügender Menge vorhanden sind, durch Alkali geschädigt. In bezug auf das Harnenzym scheint dies aus folgendem Versuch hervorzugehen:

1. (30 ccm H. E. + 1 ccm 0,1 n-NaOH) wurden 16 Stunden bei Zimmertemperatur aufbewahrt; darauf wurde
10 ccm Glob. + 50 ccm Casein + 1 ccm NaOH
zugegeben.

2. (30 ccm H. E. + 2 ccm NaOH) wurden 16 Stunden bei Zimmertemperatur aufbewahrt und dann mit
10 ccm Glob. + 50 ccm Casein
versetzt.

Die 2 Proben, samt einer Probe, wo alle Bestandteile auf einmal vermischt wurden (3), wurden 4 Tage bei 37° aufbewahrt und dann mit 50 ccm Gerbsäure gefällt; 100 ccm Filtrat.

Nr. 1	32,25 ccm Säure,
› 2	31,6 › ›
› 3	32,6 › ›

Mit Pferdeglobulin wurde folgender Versuch ausgeführt:
100 ccm Globulin + 5 ccm 0,1 n-NaOH wurden 3 Tage bei 37° gehalten. Dann wurden folgende Gemengen bereitet:

1. 10 ccm Glob. + 50 ccm Casein + 4 ccm 0,1 n-NaOH,
2. Kontrolle mit erhitztem Glob.

Zur selben Zeit wurden zwei andere Proben bereitet, welche nicht mit Alkali vorbehandeltes Globulin enthielten:

3. 10 ccm Glob. + 50 ccm Casein + 4 ccm 0,1 n-NaOH
4. Kontrolle mit erhitztem Glob.

Nach 4 Tagen bei 37° 50 ccm Gerbsäure; 75 ccm Filtrat.

Nr. 1	10,6 ccm Säure; reduzierter Wert	7,8
› 2	2,8 › ›	,
› 3	21,7 › ›	; › › 19,2
› 4	2,5 › ›	

Die Probe 1 mit Alkali behandeltem Globulinenzym ergab einen geringeren Umsatz als die mit nichtbehandeltem Enzym.

Säure wirkt auf das Harnenzym entschieden zerstörend ein, wie aus mehreren Versuchen hervorgeht, bei welchen das Harnenzym vor der eigentlichen Enzymwirkung mit Säure behandelt wurde.

16. Schlußworte.

Es ergibt sich somit, daß normaler Harn ein Enzym enthält, das beim Sättigen des Harnes mit Am_2SO_4 mindestens zum Teil ausfällt und die Fähigkeit besitzt, bei alkalischer Reaktion Peptone und derartige Substanzen weiter zu spalten. Es wäre also als ein ereptisches Enzym zu betrachten. Die aus Menschenharn durch Sättigung mit Am_2SO_4 und Dialysieren des Niederschlages erhaltene Lösung wirkt sehr schwach auf Casein, sowie auf gewisse andere Eiweißkörper ein. Ob dies dem ereptischen Enzyme zuzuschreiben ist oder durch geringe Mengen eines anderen Enzymes bedingt ist, muß dahingestellt bleiben.

Ferner hat es sich herausgestellt, daß es auch Enzyme gibt, welche hauptsächlich den Anfang der Eiweißspaltung zu besorgen imstande sind. Als solche Enzyme sind das proteolytische Enzym auf dem Blutglobuline, sowie ein proteolytisches Enzym auf dem Fibrin anzusprechen. Beide Enzyme wirken am besten bei alkalischer Reaktion. Die Wirkung solcher Enzyme wird gewissermaßen durch die Wirkung ereptischer Enzyme ergänzt. Hieraus ergibt sich die bequemste Weise, das Harnerepsin nachzuweisen.

Wenn nämlich Harnenzymlösung zusammen mit Globulinenzym oder dem proteolytischen Enzym auf dem Fibrin auf Casein einwirkt, so fällt der Erfolg der vereinigten Enzyme größer aus, als die Summe der Wirkungen beider Enzyme, wenn sie jedes für sich unter den gleichen Bedingungen auf dieselbe Substratmenge einwirken. Am besten wird dabei der Umfang des Umsatzes durch Fällung mit Gerbsäure bestimmt. Gewisse der bei der Einwirkung von Globulinenzym oder Fibrinenzym auf das Casein gebildeten Produkte werden noch durch Gerbsäure gefällt. Andererseits ist die direkte Einwirkung der Harnenzymlösung auf Casein nur eine sehr schwache. Wirken aber beide zugleich, so werden die durch das Globulinenzym oder das Fibrinenzym erzeugten Produkte unter dem Einfluß des Harnerepsins weiter aufgespalten in Produkte, welche durch Gerbsäure nicht gefällt werden. Die Einwirkung des Harnerepsins könnte man sich auch in einer anderen Weise denken, nämlich so, daß es durch Aufspaltung der primären

Spaltungsprodukte deren hemmenden Einfluß auf die Weiterwirkung des Globulinenzyms oder Fibrinenzyms beseitigt.

Eine Stütze für die obige Ansicht bezüglich der Verteilung der Enzymarbeit ist darin zu erblicken, daß das Harnenzym besser wirkt auf bereits mit Globulinenzym behandeltes Casein als auf nicht gespaltenes, während das Globulinenzym in umgekehrter Weise sich verhält. Schließlich ist hervorzuheben, daß Darmerepsin und Hefeerepsin gegen das Globulinenzym in derselben Weise sich verhalten wie das Harnenzym.

Berichtigung.

Band 99, Seite 222, Zeile 14 von oben lies: 0,0967, statt 0,967.
