

# Über die proteolytischen Verhältnisse im Serum vom Pferd und Rind.

Von

S. G. Hedin.

(Der Redaktion zugegangen am 8. August 1918.)

## Inhalt.

1. Einleitung. 2. Allgemeines über die neuen Versuche. 3. Direkte proteolytische Wirkung vom Serum. 4. In welchen Eiweißfraktionen erscheint das Erepsin? 5. Primäre und sekundäre Proteasen. 6. Hemmende Substanzen. 7. In welcher Weise beeinflusst Erhitzen des Serums auf 56° während 30 Minuten die nachher daraus hergestellten Enzyme und hemmenden Substanzen? 8. Behandlung des Serums bzw. des Albumins mit Chloroform, Äther, Toluol. 9. Zusammenfassung.

### 1. Einleitung.

Vor einiger Zeit haben ich und Masai in dieser Zeitschrift über Versuche berichtet, aus welchen der Schluß gezogen wurde, daß im normalen Harn ein Enzym vorhanden ist, das die Eiweißspaltung nicht gut anzufangen imstande ist, aber wohl dieselbe fortsetzen kann, wenn sie durch ein anderes Enzym bereits angefangen worden ist.<sup>1)</sup> Das Enzym verhält sich folglich wie ein Erepsin. Dasselbe fällt bei der Sättigung des Harnes mit  $\text{Am}_2\text{SO}_4$  mindestens zum Teil aus. Zugleich ging aus unseren Versuchen hervor, daß es auch Enzyme gibt, welche imstande sind, die Eiweißspaltung in alkalischer Lösung einzuleiten, aber dieselbe nicht so gut wie das Harnenzym fortzusetzen vermögen. In der Weise verhielten sich in der Tat ein Enzym, das an der Globulinfraktion des Blutserums haftet, sowie ein Enzym auf dem Fibrin. Da also z. B. das Globulinenzym und das Harnerepsin gleichsam verschiedene Phasen der Eiweißspaltung besorgen, so ergab sich, daß die

<sup>1)</sup> Diese Zeitschr., Bd. 100, S. 263 (1917).

mit Gerbsäure nicht fällbaren Spaltungsprodukte bei gleichzeitiger Wirkung der beiden Enzyme in größerer Menge auftreten, als dem Gesamtbetrag dieser Produkte entspricht für den Fall, daß die Enzyme jedes für sich unter den gleichen Verhältnissen auf die gleiche Substratmenge einwirken. Dies war eigentlich der Weg, auf welchen die Aufmerksamkeit auf das Vorkommen von Erepsin im normalen Harn hingelenkt wurde. Indessen wurden die ereptischen Eigenschaften des Harnenzym auch in anderen Weisen untersucht und besonders ist zu erwähnen, daß das Darmerepsin sowie das Hefeerepsin zu dem Globulinenzym in der gleichen Weise sich verhielten wie das Harnerepsin. Zugleich war zu erwarten, daß das Harnerepsin besser auf Casein einwirken würde, das bereits mit Globulinenzym behandelt war, als auf Casein, das nicht im voraus etwas peptonisiert war. Dies wurde auch experimentell bestätigt.

Andererseits ist zu erwähnen, daß nach noch nicht veröffentlichten Untersuchungen von Masai das Pankreastrypsin zu dem Harnenzym in der gleichen Weise sich verhält wie das Globulinenzym, obwohl der Unterschied in der Wirkungsweise des Trypsins und des Harnenzym nicht so ausgesprochen zu sein scheint wie der zwischen dem Globulinenzym und dem Harnenzym. Das Trypsin und das Harnenzym haben also, wenn sie zugleich wirken, einen größeren Erfolg, als wenn sie jedes für sich tätig sind. Dies würde also beweisen, daß das Trypsin für den Anfang der Eiweißspaltung mehr geeignet ist als für die Fortsetzung.

In bezug auf das Harnerepsin interessiert uns besonders die Frage, ob dasselbe im Blute vorhanden ist. Aus meinen vorigen Untersuchungen über proteolytische Enzyme im Blutserum geht hervor, daß das Globulin, erhalten durch Dialysieren und Zugabe von Essigsäure, sowie das bei  $\frac{1}{3}$  Sättigung mit  $\text{Am}_2\text{SO}_4$  ausfallende, eine ausgesprochene Einwirkung auf Casein zeigt, während die übrigen Eiweißfraktionen und besonders die zwischen  $\frac{1}{2}$  und voller Sättigung ausfallende die Digestion von Casein durch das Globulinenzym hemmt.<sup>1)</sup> An-

<sup>1)</sup> Journ. of Physiol., Bd. 30, S. 195 (1903).

derseits war nach dem eben Gesagten die bei  $\frac{1}{3}$  Sättigung ausfallende Globulinfraction eben die, welche das Enzym enthält, das die Caseinspaltung einzuleiten vermag. Da die zwischen  $\frac{1}{2}$  und voller Sättigung ausfallende Eiweißfraction (Serumalbuminfraction) die Wirkung des Globulinenzyms hemmt, war es kaum zu erwarten, daß diese Eiweißfraction selbst ein proteolytisches Enzym enthalten würde. Indessen hat es sich herausgestellt, daß eine proteolytische Wirkung hervortritt, wenn man nur die Serumalbuminfraction auf ein geeignetes Substrat einwirken läßt. Wie wir sofort ersehen werden, wird sowohl mit Wittes Pepton wie mit Casein, das bereits mit Hilfe von Globulinenzym etwas aufgespalten worden ist, eine entschiedene Wirkung erhalten.

## 2. Allgemeines über die neuen Versuche.

Die bei meinen Versuchen angewandten Caseinlösungen waren alle 4-prozentig und zwar in der Weise bereitet, daß 20 g von Kahlbaums Casein (nach Hammarsten) mit 100 ccm 0,1 n-NaOH + 400 ccm Wasser auf dem Wasserbade so lange erhitzt wurde, bis nur einige Körnchen ungelöst waren, worauf filtriert und mit Toluol für die Versuche aufbewahrt wurde. Die Peptonlösungen wurden durch Auflösen von 20 g Wittes Pepton in 500 ccm Wasser unter Erhitzen auf dem Wasserbade erhalten. Dann wurde neutralisiert, worauf ich, um die meisten nicht durch Gerbsäure fällbaren Produkte los zu werden, die Lösung einer 3-tägigen Dialyse gegen fließendes Wasser unterwarf. Darauf wurde filtriert und mit Toluol aufbewahrt.

Die Zusammensetzung der Verdauungsflüssigkeiten wird bei den besonderen Versuchen angegeben. Die dabei angeführten Ziffern beziehen sich alle auf Kubikzentimeter der angegebenen Lösungen; der Kürze wegen habe ich deshalb überall ccm nach den Ziffern auslassen können. Um wo möglich in allen Proben derselben Versuchsreihe dieselbe Alkalinität zu erzielen, habe ich zu allen Proben die gleiche Menge der verschiedenen Substanzen zugesetzt, aber in der Weise, daß diejenige Substanz oder diejenigen Substanzen, welche in einer

gegebenen Probe unwirksam sein sollten, vor der Zugabe der übrigen in der Flasche 30 Min. auf dem Wasserbade erhitzt wurden. Nach der angegebenen Zeit bei  $37^{\circ}$  wurde mit der angegebenen Menge ccm Gerbsäure gefällt, wobei auch ccm ausgelassen wird.<sup>1)</sup> Danach folgt die Anzahl ccm Filtrat, welche für die Stickstoffbestimmung angewandt wurde. Diese Anzahl war für alle Proben in derselben Versuchsreihe die gleiche. Die Ergebnisse der Analysen werden durch die Anzahl ccm 0,1 n-Säure, welche die gebildete  $\text{NH}_3$ -Menge neutralisierte, angegeben. Zu den meisten Versuchsreihen gehört eine Kontrollprobe (mit während 30 Min. auf dem Wasserbade erhitztem Enzym). Als reduzierter Analysenwert wird die durch Titrierung erhaltene Anzahl ccm Säure nach Abzug des Kontrollwertes angegeben.

Da angeblich gewisse Peptone durch Gerbsäure zunächst gefällt und dann beim Zusatz von mehr Gerbsäure aufgelöst werden, habe ich diese Frage sowie die über den Einfluß der zwischen der Zugabe der Gerbsäurelösung und dem Filtrieren verfloßenen Zeit in folgenden Versuchen untersucht.

Ein Gemenge von Peptonen wurde zunächst mit Globulinenzym digeriert und dann wie folgt mit Gerbsäure gefällt:

- |    |    |               |   |    |           |   |    |                      |
|----|----|---------------|---|----|-----------|---|----|----------------------|
| 1. | 60 | Peptongemenge | + | 30 | Gerbsäure | + | 20 | $\text{H}_2\text{O}$ |
| 2. | 60 | "             | + | 40 | "         | + | 10 | $\text{H}_2\text{O}$ |
| 3. | 60 | "             | + | 50 | "         |   |    |                      |

Nach 16 Stunden wurde filtriert und von den Filtraten gleiche Volumina (80 ccm) für die Stickstoffbestimmung genommen. Die Ergebnisse waren:

- |        |      |           |
|--------|------|-----------|
| Nr. 1. | 18,9 | ccm Säure |
| " 2.   | 18,9 | " "       |
| " 3.   | 19,5 | " "       |

Hieraus ist ersichtlich, daß sogar, so verschiedene Gerbsäuremengen wie in diesem Versuche angewandt wurden, keine irgendwie bedeutende Differenzen der Stickstoffmengen ergaben. Da bei meinen Versuchen für alle Proben derselben Versuchsreihe die gleiche Menge Gerbsäure angewandt wurde, können

<sup>1)</sup> Die Gerbsäurelösung enthielt auf 1 Liter 100 g Gerbsäure, 50 g NaCl, 50 g Natriumacetat und 50 ccm Eisessig.

durch Auflösung von Pepton keine nennenswerten Fehler zustande gekommen sein.

Die Bedeutung der Zeit, die zwischen dem Zusatz der Gerbsäure und dem Filtrieren verfließt, wird durch folgenden Versuch etwas beleuchtet. Zwei Proben von 15 ccm Pepton wurden mit 15 ccm Gerbsäure gefällt. Die eine wurde nach 5 Stunden filtriert und die andere nach 30 Stunden. Von beiden wurde 25 ccm Filtrat für die Stickstoffbestimmung genommen.

Erstere Probe	ergab	4,5 ccm Säure
Letztere	»	4,3 »

Die Ziffern deuten darauf hin, daß die Ausfällung mit der Zeit wahrscheinlich ein wenig vollständiger wird. Deshalb habe ich mindestens nach der Ausfällung von Peptonlösungen im allgemeinen die gefällten Proben vor dem Filtrieren über eine Nacht stehen lassen.

### 3. Direkte proteolytische Wirkung vom Serum.

Ob man eine proteolytische Wirkung vom Serum nachweisen kann, hängt wahrscheinlich in hohem Grade von der angewandten Analysenmethode ab. Die Methode, deren ich in dieser Arbeit mich bedient habe, die Fällung mit Gerbsäure, gibt innerhalb eines gewissen Gebietes der Verdauung sehr genaue Resultate. Aber die zuerst gebildeten Verdauungsprodukte werden wie das nicht angegriffene Eiweiß durch Gerbsäure gefällt, und wenn die Aufspaltung über solche Produkte nicht hinauskommt, zeigt also die Gerbsäuremethode überhaupt keine Spaltung. In solchen Fällen gibt z. B. die Fällung mit  $\text{SnCl}_2 + \text{CaCl}_2$  bessere Resultate, wie ich und Masai jüngst nachweisen konnten.<sup>1)</sup>

Mit der Gerbsäuremethode habe ich eine direkte Einwirkung von Serum auf Casein nicht bestimmt nachweisen können. Wahrscheinlich würde eine solche Wirkung bei der Anwendung von größeren Mengen an Serum hervortreten. In einem Versuche über diese Frage waren die Mengen:

1.	20 Rindsserum	+ 25 Casein
2.	20 »	erh. + 25 »

<sup>1)</sup> Diese Zeitschr., Bd. 100, S. 277 (1917).

- 3 Tage bei 37°; 20 Gerbsäure; 15 Filtrat.  
 Nr. 1. 1,35; red. Wert 0,1 ccm Säure  
 > 2. 1,25.

Die Differenz 0,1 ccm übersteigt nicht den Versuchsfehler.

Dagegen ließ sich leicht dartun, daß das Serum auf Wittes Pepton einwirkt:

1. 20 Rindsserum + 50 Wittes Pepton  
 2. 20 Serum erh. + 50 „ „  
 4 Tage bei 37°; 30 Gerbsäure; 50 Filtrat.  
 Nr. 1. 17,6; red. Wert 7,7 ccm Säure  
 > 2. 9,9.

Ein anderer Versuch mit Rindsserum wurde folgendermaßen angestellt:

1. 15 Serum + 25 Casein  
 2. 15 „ erh. + 25 „  
 3. 10 „ + 25 Wittes Pepton  
 4. 10 „ „ + 25 „ „  
 4 Tage bei 37°; 20 Gerbsäure + 20 H<sub>2</sub>O; 30 Filtrat.  
 Nr. 1. 1,7; red. Wert 0,6 ccm Säure  
 > 2. 1,1  
 > 3. 7,85; „ „ 3,25 „ „  
 > 4. 4,6.

Ein dritter Versuch mit Rindsserum und Casein und mit den gleichen Mengen wie im vorangehenden Versuche ergab:

- Nr. 1. 1,6; red. Wert 0,4 ccm Säure  
 > 2. 1,2.

Ein Versuch mit Pferdeserum wurde folgendermaßen angeordnet:

1. 15 Serum + 25 Casein  
 2. 15 „ erh. + 25 „  
 4 Tage bei 37°; 25 Gerbsäure + 20 H<sub>2</sub>O; 40 Filtrat.  
 Nr. 1. 2,25; red. Wert 0,15 ccm Säure  
 > 2. 2,1.

Und die Proben mit Pepton

- Nr. 3. 10 Serum + 25 Pepton  
 > 4. 10 „ erh. + 25 „  
 4 Tage bei 37°; 20 Gerbsäure; 30 Filtrat.  
 Nr. 3. 9,3; red. Wert 4,1  
 > 4. 5,2.

Aus allen diesen Versuchen geht also hervor, daß die Einwirkung des Serums auf Casein, wenn überhaupt vorhanden,

sehr schwach sein muß; da in diesen Versuchen außer dem Casein auch alle die Eiweißkörper des Serums zugegen waren, kann auch von diesen behauptet werden, daß sie von den Enzymen im Serum höchstens spärlich angegriffen werden. In allen Fällen wurde dagegen eine ausgesprochene Einwirkung auf Wittes Pepton erhalten, was auf die Gegenwart eines Erepsins hindeutet. Wenn das Casein durch das Serum nur so weit gespalten würde, daß nur durch Gerbsäure fällbare peptonartige Produkte entstünden, würde folglich dieses Erepsin diese Produkte weiter spalten und in nicht fällbare Substanzen überführen. Da dies nach den obigen Versuchen nur in sehr geringen Mengen geschieht, können wir also schließen, daß eine Aufspaltung des Caseins in nicht fällbare peptonartige Produkte nicht in nennenswerten Mengen stattfindet.

In welcher Beziehung das von mir beobachtete Erepsin zu dem von Abderhalden und Mitarbeitern gefundenen polypeptidspaltenden Enzym des Blutserums<sup>1)</sup> steht, läßt sich gegenwärtig nicht entscheiden.

#### 4. In welchen Eiweißfraktionen erscheint das Erepsin?

Die fraktionierte Fällung des Serums habe ich folgendermaßen bewerkstelligt. Zunächst wurde etwa  $\frac{1}{3}$  Sättigung mit  $\text{Am}_2\text{SO}_4$  dadurch erzielt, daß 20 g Salz auf je 100 ccm Serum zugesetzt wurde. Der Niederschlag wurde abfiltriert, feucht vom Filter genommen und durch Zugabe eines gegebenen Volumens an Wasser aufgelöst. Die Lösung wurde wieder durch Zusatz von 20 g Salz auf je 100 ccm des zugegebenen Wassers auf  $\frac{1}{3}$  Sättigung gebracht. Nach einiger Zeit wurde wieder filtriert und dasselbe Fällungsverfahren noch 2 mal wiederholt. Schließlich wurde der Niederschlag mit so wenig Wasser wie möglich in den Dialysierschlauch gebracht und gegen fließendes Wasser so lange dialysiert, bis mit  $\text{BaCl}_2$  praktisch kein Niederschlag entstand. Das Globulin war in der so erhaltenen Suspension zum Teil ausgefällt, zum Teil in Lösung. Vor dem Gebrauch wurde auf je 100 ccm 5 ccm 0,1 n-NaOH

<sup>1)</sup> Diese Zeitschr., Bd. 53, S. 294, 308 (1907); Bd. 55, S. 371 (1908).

zugegeben. Das Volumen der Suspension war rund  $\frac{2}{3}$  von dem Volumen des Serums.

Das Filtrat vom ersten Globulinniederschlag wurde durch Zugabe von 10 g  $\text{Am}_2\text{SO}_4$  auf je 100 ccm auf etwa halbe Sättigung gebracht. Der dabei gebildete Niederschlag wurde weggeworfen. Das beim Filtrieren erhaltene Filtrat wurde durch allmählichen Zusatz von  $\text{Am}_2\text{SO}_4$  gesättigt, wozu wohl nie mehr als 30 g Salz auf je 100 ccm gebraucht wurde. Der Niederschlag wurde abfiltriert und mit Hilfe von so wenig Wasser wie möglich in den Dialysierschlauch gebracht. Nach Entfernung des Salzes entsprach das Volumen der Serumalbuminlösung rund  $\frac{3}{4}$  des Volumens des ursprünglichen Serums. Der Kürze wegen werde ich diese Lösung im folgenden mit Alb. bezeichnen.

Daß die Alb. Fraktion auf Pepton einwirkt, läßt sich leicht mit Gerbsäure nachweisen. Das im folgenden Versuche angewandte Alb. war aus Pferdeserum bereitet.

- |    |           |             |                          |
|----|-----------|-------------|--------------------------|
| 1. | 25 Alb.   | + 50 Pepton | + 5 NaOH 0,1 n           |
| 2. | 25 >      | + 50 >      | + 5 $\text{H}_2\text{O}$ |
| 3. | 25 > erh. | + 50 >      | + 5 $\text{H}_2\text{O}$ |
- 4 Tage bei  $37^\circ$ ; 40 Gerbsäure; 75 Filtrat.
- |        |                                 |
|--------|---------------------------------|
| Nr. 1. | 22,35; red. Wert 3,85 ccm Säure |
| > 2.   | 22,2 ; > > 3,7 > >              |
| > 3.   | 18,5.                           |

Im folgenden Versuch wurde die Einwirkung von Alb. auf Casein untersucht, das einerseits mit Globulinzym vorbehandelt war, andererseits keiner solchen Vorbehandlung unterworfen war. Von der Mischung

250 Casein + 25  $\text{H}_2\text{O}$  + 25 Pferdeglobulin + 15 NaOH 0,1 n  
 wurde die eine Hälfte (A) zunächst 3 Tage bei  $37^\circ$  gehalten und dann zur Zerstörung des Enzyms auf dem Wasserbade 30 Min. erhitzt. Die andere Hälfte (B) wurde ohne vorangegangene Enzymwirkung sofort erhitzt. Nach dem Erhitzen von A wurden folgende Proben bereitet:

- |    |          |               |
|----|----------|---------------|
| 1. | 60 ccm A | + 10 Alb.     |
| 2. | 60 >     | A + 10 > erh. |
| 3. | 60 >     | B + 10 >      |
| 4. | 60 >     | B + 10 > erh. |

4 Tage bei 37°; 50 Gerbsäure; 75 Filtrat.

Nr. 1. 18,5; red. Wert 2,1

› 2. 16,4

› 3. 3,3; › › 0,8

› 4. 2,5.

Derselbe Versuch wurde mit Globulinzym und Alb. vom Rind folgendermaßen ausgeführt:

Das ursprüngliche Gemenge bestand aus 210 Cas. + 50 Glob. + 10 NaOH 0,1 n und die schließlichen Verdauungsproben waren:

1. 60 ccm A + 15 Alb.

2. 60 › A + 15 › erh.

3. 60 › B + 15 ›

4. 60 › B + 15 › erh.

4 Tage bei 37°; 50 Gerbsäure; 65 Filtrat.

Nr. 1. 7,45; red. Wert 2,2 ccm Säure

› 2. 2,25

› 3. 2,7; › › 0,75 › ›

› 4. 1,95.

Aus diesen zwei Versuchen ergibt sich also, daß das Alb. bereits mit Globulinzym etwas aufgespaltenes Casein besser angreift als Casein, das nicht im voraus etwas peptonisiert war. Freilich ist die Erepsinwirkung nicht sehr stark, aber immerhin ist sie deutlich ausgesprochen.

Dasselbe geht auch aus folgendem Versuch hervor; derselbe zeigt zur selben Zeit, daß die Einwirkung des Globulinzymes auf das unveränderte Casein durch Alb. gehemmt wird, während dessen Einwirkung auf bereits etwas gespaltenes Casein mit der Gerbsäuremethode gemessen unter Umständen sogar eine Begünstigung erfahren kann.

Von dem Gemenge 450 Cas. + 50 Pferdeglob. + 25 NaOH 0,1 n wurde die eine Hälfte (A) 4 Tage bei 37° gehalten und dann erhitzt, während die andere (B) sofort erhitzt wurde. Nach dem Erhitzen von A wurden folgende Verdauungsproben bereitet:

1. 60 ccm A + 5 Pferdeglob. + 15 Pferdealb.

2. 60 › A + 5 › + 15 Alb. erh.

3. 60 › A + 5 Glob. erh. + 15 ›

4. (60 › A + 5 Glob. + 15 › ) erh.

Mit B wurden entsprechende Proben 5, 6, 7, 8 bereitet.

4 Tage bei 37°; 50 Gerbsäure; 70 Filtrat.

Nr. 1.	21,7	; red. Wert	4,6	ccm Säure	(Glob. + Albuminwirkung)
> 2.	20,65	; >	>	3,55	> > (Globulinwirkung)
> 3.	20,2	; >	>	3,1	> > (Albuminwirkung)
> 4.	17,1				
> 5.	11,0	; >	>	8,45	> > (Glob. + Albuminwirkung)
> 6.	13,55	; >	>	11,0	> > (Globulinwirkung)
> 7.	3,25	; >	>	0,70	> > (Albuminwirkung)
> 8.	2,55				

Durch Vergleichung der in den Proben Nr. 4 und Nr. 8 erhaltenen Zahlen bekommt man zunächst eine Vorstellung von dem Umfang der Aufspaltung des Caseins bei der Vorbehandlung von der Mischung A.

Ferner ist aus Nr. 3 und Nr. 7 zu ersehen, daß die Alb.-Wirkung auf bereits etwas peptonisiertes Casein (Nr. 3) viel mehr ausgesprochen ist als die auf nicht peptonisiertes (Nr. 7). Die Globulinwirkung (Nr. 2 und Nr. 6) verhielt sich in umgekehrter Weise.

Schließlich ergibt sich aus Nr. 5 und Nr. 6, daß die Zugabe von wirksamem Albumin zu dem Globulin eine Hemmung der Globulinwirkung mit sich bringt. Dies liegt daran, daß die Albuminfraktion, wie wir weiter unten ersehen werden, außer dem Erepsin auch eine Substanz enthält, welche die Wirkung des Globulinzyns gewissermaßen hemmt. Diese Hemmung ist in diesem Falle zwar nicht stark, aber doch deutlich ausgesprochen (2,55 ccm Säure). Wenn das Casein ohne Vorbehandlung mit Globulinzynm als Substrat angewandt wird, tritt also eine gewisse Hemmung des Globulinzyns durch Albumin hervor. In Nr. 1 und Nr. 2 finden wir dagegen nicht nur keine Hemmung, sondern sogar eine geringe Begünstigung der Globulinzynmwirkung durch das Albumin. In diesem Falle war das als Substrat benutzte Casein mit Globulinzynm vorbehandelt und enthielt folglich gewisse primäre durch Gerbsäure fällbare Spaltungsprodukte des Caseins. Diese wurden bei der nachfolgenden Zugabe von Albumin durch das darin vorhandene Erepsin gespalten unter Bildung von nicht fällbaren Produkten. Die Aufspaltung des unveränderten Caseins durch

das Globulinenzym wird wahrscheinlich auch in diesem Falle durch das Albumin zum Teil gehemmt, aber dieser Prozeß kann mehr oder weniger vollständig durch die angedeutete Einwirkung des Erepsins verdeckt werden und zwar in diesem Versuche mit dem Erfolge, daß eine Begünstigung der Globulinenzymwirkung resultierte. Für den Fall, daß primäre Spaltungsprodukte im Substrate vorhanden sind, kann also die begünstigende Wirkung des Erepsins zum Vorschein kommen, während die Hemmung besser hervortritt, wenn nicht vorher angegriffenes Casein gespalten wird. Dies bedeutet, daß der Hemmungskörper wohl die Aufspaltung des unveränderten Caseins zu hemmen imstande ist, aber nicht oder mindestens nicht in dem gleichen Grade die Weiterspaltung der dabei gebildeten Produkte. (Siehe Abschnitt 6).

##### 5. Primäre und sekundäre Proteasen.

Es ergibt sich somit nach den bereits angeführten Versuchen, daß das Blutserum einerseits ein Enzym enthält, das die Eiweißdigestion einleiten, aber nicht ebensogut fortsetzen kann, anderseits ein Enzym, das die Eiweißdigestion nicht gut anfangen kann, aber wohl die bereits eingeleitete Spaltung fortzusetzen vermag. Ersteres fällt bei etwa  $\frac{1}{3}$  Sättigung mit  $\text{Am}_2\text{SO}_4$  mit dem Globulin zusammen aus, letzteres findet sich in der Serumalbuminfraktion ( $\frac{1}{2}$  bis voller Sättigung mit  $\text{Am}_2\text{SO}_4$ ). Der Kürze wegen möchte ich diese zwei Arten von Enzymen primäre und sekundäre Proteasen nennen. Zu den primären würde außer dem Globulinenzym auch das (möglicherweise mit dem Globulinenzym identische) Enzym auf dem Fibrin sowie auch (obwohl weniger ausgesprochen) das Trypsin zu rechnen sein. Als sekundäre Proteasen wären das oben besprochene Harnenzym und Blutserumerepsin sowie das Erepsin des Darmes und das der Hefe anzusprechen. Freilich lassen sich auch solche Enzyme oder zum mindesten Gemenge von Enzymen denken, die weder zu den primären noch zu den sekundären Proteasen hingeführt werden können.

Wie bereits oben auseinandergesetzt wurde, bekommt man mit Globulinenzym und Harnerepsin, wenn sie zugleich

auf Casein einwirken, eine kräftigere Wirkung, als dem Gesamtbetrag der Wirkungen entspricht für den Fall, daß sie jedes für sich auf die gleiche Caseinmenge einwirken. In nicht komplizierten Fällen dürfte man auch in der Weise mit Hilfe von Globulinzym entscheiden können, ob ein anderes Enzym zu den sekundären Proteasen hinzuführen sei, und mit Hilfe von Harnerepsin, ob es zu den primären Proteasen gehört. Mit dem Globulinzym und dem Erepsin der Albuminfraktion des Serums werden aber die eben genannten Ergebnisse nicht erhalten und zwar aus dem Grunde, daß das Alb. eine Substanz enthält, die das Globulinzym in seiner Wirkung hemmt. Daß das in dem Alb. vorhandene wirksame Enzym zu den sekundären Proteasen gehört, ging aber aus der Tatsache hervor, daß es auf bereits etwas aufgespaltenes Casein besser einwirkt als auf nicht angegriffenes. Derselbe Schluß ist aber auch aus der Tatsache zu ziehen, daß das Albumin Pepton in ausgesprochener Weise angreift, während die direkte Einwirkung auf Casein sehr schwach ist.

Prüft man in eben angedeuteter Weise mit der Serumalbuminfraktion und Harnerepsin, ob erstere primäre Protease enthält, so zeigen die Ergebnisse, daß keine irgendwie erhebliche Mengen der Protease vorhanden sein können. Folgender Versuch wurde mit Rinderalbumin ausgeführt:

1.	25 Alb.	+ 15 H. E.	+ 25 Cas.	+ 2 NaOH 0,1 n
2.	25 >	+ 15 H. E. erh.	+ 25 >	+ 2 NaOH 0,1 n
3.	25 > erh.	+ 15 H. E.	+ 25 >	+ 2 NaOH 0,1 n
4.	(25 >	+ 15 H. E.)	+ 25 >	+ 2 NaOH 0,1 n

4 Tage bei 37°; 40 Gerbsäure; 50 Filtrat.

Nr. 1.	1,1	; red. Wert	0,25
> 2.	1,3	; >	0,45
> 3.	1,25	; >	0,40
> 4.	0,85		

0,85

Nr. 1 ergab eine Ziffer, welche keineswegs größer war als der Gesamtbetrag von Nr. 2 und Nr. 3, sondern im Gegenteil entschieden geringer. Andererseits zeigte folgender Versuch mit Pepton als Substrat, daß das Albumin Erepsin enthielt:

1.	25 Alb.	+ 15 H <sub>2</sub> O	+ 25 Pept.	+ 2 NaOH 0,1 n
2.	25 > erh.	+ 15 >	+ 25 >	+ 2 NaOH 0,1 n

4 Tage bei 37°; 40 Gerbsäure; 75 Filtrat.

Nr. 1. 10,55; red. Wert 3,3

› 2. 7,25.

Läßt man zwei verschiedene Globulinenzyme, z. B. vom Pferd und vom Rind, znsammen auf Casein einwirken, so ergibt sich für die Wirkung eine Ziffer, welche entschieden kleiner ist als die Gesamtwirkung der beiden Enzyme für den Fall, daß sie jedes für sich einwirken, wie ich und Masai bereits vorher zeigen konnten.<sup>1)</sup> Wahrscheinlich hängt dies von der hemmenden Einwirkung der sich anhäufenden peptonartigen Substanzen ab.

Prüft man mit dem Harnenzym und dem Enzym der Albuminfraktion des Blutserums die Einwirkung auf Pepton, so ergibt sich der Betrag der gleichzeitigen Einwirkung der beiden Enzyme auf dieselbe Substratmenge etwas geringer als die Summe der Wirkungen, wenn jedes für sich unter den gleichen Bedingungen einwirkt, wie aus folgenden Versuchen zu ersehen ist.

Alb. vom Rind wurde in der Verdünnung 1 : 5 H<sub>2</sub>O angewandt. Das Harnenzym war in der von mir und Masai beschriebenen Weise erhalten.<sup>2)</sup>

1. 10 Alb.	+ 20 H. E.	+ 50 Pept.	+ 2 NaOH 0,1 n
2. 10 ›	+ 20 H. E. erh.	+ 50 ›	+ 2 NaOH 0,1 n
3. 10 › erh.	+ 20 H. E.	+ 50 ›	+ 2 NaOH 0,1 n
4. (10 ›	+ 20 H. E. ›	+ 50 ›	+ 2 NaOH 0,1 n

4 Tage bei 37°; 30 Gerbsäure; 90 Filtrat.

Drei solche Versuchsreihen wurden mit verschiedenen Bereitungen von Alb. ausgeführt. Die Probe 4 ergab in den drei Reihen die Ziffern 18,9, 19,4 und 12,65. Nach Abzug dieser Zahlen waren die Ergebnisse wie folgt:

	Reihe 1	Reihe 2	Reihe 3	
Nr. 1	9,0	7,95	8,35	
› 2	1,25	0,9	1,2	} 9,25.
› 3	8,8	8,1	8,05	
	} 10,05		9,0	

Wie ersichtlich, ergibt die Probe Nr. 1 die gleichzeitige Wirkung beider Enzyme, während Nr. 2 die Wirkung des

<sup>1)</sup> Diese Zeitschr., Bd. 100, S. 289 (1917).

<sup>2)</sup> Diese Zeitschr., Bd. 100, S. 267 (1917).

Albuminenzymes und Nr. 3 die des Harnenzymes repräsentiert. Der Gesamtbetrag von Nr. 2 und 3 ist überall etwas größer als der Betrag von Nr. 1. Irgend welche Hemmung der Harnenzymwirkung seitens des Serumalbumins ist nicht aus den Versuchen zu ersehen, da eine solche nur für den Fall dargetan wäre, daß Nr. 1 eine entschieden geringere Ziffer ergäbe als Nr. 3, was nicht eintritt.

Daß die beiden Serumenzyme verschieden sind, geht bereits daraus hervor, daß dieselben in verschiedenen Fraktionen des Serumeiweißes auftreten. Hiermit soll nicht behauptet werden, daß dieselben in den beiden Eiweißfraktionen von einander frei auftreten. Zwar dürfte wohl die sekundäre Protease der Serumalbuminfraktion von wirksamer primärer Protease annähernd frei sein, da das Alb. auf Casein praktisch keine Wirkung ausübt (siehe die obigen Versuche), aber wenn man die Globulinfraktion auf Pepton einwirken läßt, bekommt man eine stark ausgesprochene Wirkung, und es scheint außer Zweifel zu sein, daß entweder die primäre Protease der Globulinfraktion auch auf Pepton einwirkt, oder daß neben der primären Protease auch eine sekundäre in der Globulinfraktion vorhanden ist. Für die letztere Ansicht spricht die Tatsache, daß, wie wir weiter unten lernen werden (Abschnitt 7), nach Erhitzen des Rinderserums auf  $56^{\circ}$  die daraus bereitete Globulinfraktion auch in der Gegenwart von Harnenzym keine Einwirkung auf Casein aufweist, während die Einwirkung auf Pepton zum Teil erhalten bleibt. Dies scheint darauf hinzudeuten, daß das peptonspaltende Enzym der Globulinfraktion mindestens zum Teil von der primären Protease dieser Fraktion verschieden ist. Hier soll nur ein Versuch mit Pferdeglobulin angeführt werden, aus welchem hervorgeht, daß eine ausgesprochene Einwirkung auf Pepton stattfindet.

Ein Gemenge von

350 Pepton + 75 Glob. + 20 NaOH 0,1 n

wurde sofort und nach verschiedenen Zeiten bei  $37^{\circ}$  analysiert und zwar einerseits mit  $\text{SnCl}_2 + \text{CaCl}_2$ <sup>1)</sup>, andererseits mit

<sup>1)</sup> Diese Zeitschr., Bd. 100, S. 277 (1917).

Gerbsäure. Zu den angegebenen Zeiten wurden ausgenommene 30 ccm des Gemenges einerseits mit 30 SnCl<sub>2</sub> + 30 CaCl<sub>2</sub> gefällt, andererseits mit 30 Gerbs. + 30 H<sub>2</sub>O versetzt. Für die Stickstoffbestimmung wurde 50 Filtrat gebraucht.

	Sofort	Nach 2 Tagen	Nach 4 Tagen
Mit SnCl <sub>2</sub>	33,85	34,3	35,15
› Gerbsäure	7,1	15,15	17,5

In den mit SnCl<sub>2</sub> nicht fällbaren Stickstoffmengen finden wir nur eine unbedeutende Zunahme mit der Zeit, offenbar weil SnCl<sub>2</sub> in dem ursprünglichen Gemenge nur wenig fällt und die von der Spaltung betroffenen Produkte sowohl vor wie nach der Reaktion durch SnCl<sub>2</sub> nicht fällbar sind. Um so deutlicher wird die Spaltung durch Gerbsäure angezeigt, weil Gerbsäure am Anfang des Versuches sehr viel von denjenigen Produkten ausfällt, welche später gespalten und deshalb nicht weiter gefällt werden.

Die Globulinfraktion wirkt also auf Casein und auf Pepton ein, die Albuminfraktion praktisch nur auf Pepton. Das Erepsin, das in beiden Fraktionen vorkommt, ist wohl wahrscheinlich dasselbe. Andererseits ist es wohl zu vermuten, daß dieses Erepsin mit dem Harnenzym identisch ist. Nach alledem würde die primäre Protease des Blutserums praktisch nur mit dem Globulin zusammen ausgefällt werden, während die sekundäre in beiden Fraktionen vorkommt. Eigentlich scheint die zuerst mit dem Globulin zusammen ausgefällte Erepsinmenge an dem Globulin hartnäckig zu haften, da es mir auch durch 5—6 malige Auflösung und Wiederfällung des Globulins nicht gelungen ist, das Enzym zu entfernen. Für eine solche Entfernung ist wahrscheinlich die Gegenwart von schwerer fällbaren Eiweißstoffen bei den wiederholten Fällungen des Globulins erforderlich. Bei der ersten Ausfällung des Globulins war das schwerer fällbare Serumalbumin zugegen und ich sehe in dieser Tatsache die Ursache dazu, daß ein Teil des Erepsins nicht mit dem Globulin zusammen ausgefällt wurde.

Das Globulin enthält nach dem Gesagten primäre und sekundäre Protease und es ist folglich imstande, die Aufspaltung des Eiweißes anzufangen und fortzusetzen. Offenbar wird aber

der Anfang in größerem Umfang betrieben; sonst wäre es nicht zu erklären, daß Zugabe von Harnerepsin die durch Gerbsäure fällbaren Produkte in so hohem Grade vermehrt. Je nach der Menge der im Globulin vorhandenen sekundären Protease wird die Zunahme der genannten Produkte unter dem Einfluß des zugesetzten Harnenzym verschieden ausfallen, indem dasselbe eine um so größere Wirkung zeigen wird, je weniger sekundäre Protease in dem Globulin im voraus vorhanden war. So wird es wohl zum Teil zu erklären sein, daß das Harnerepsin eine ziemlich wechselnde Effektivität gezeigt hat.<sup>1)</sup>

In den Versuchen, über welche oben berichtet wurde, wurden Lösungen der Serumenzyme angewandt, welche beträchtliche Mengen Globulin oder Albumin enthielten, und trotzdem habe ich stillschweigend angenommen, daß die stattgefundenen Spaltungen nur die zugesetzten Eiweißkörper — Casein oder Pepton — betreffen. Bezüglich der Einwirkung des Globulinenzym auf das Globulin geht aus bereits publizierten Versuchen von mir und Masai hervor, daß dieselbe im Vergleich mit der Einwirkung auf das Casein vernachlässigt werden kann.<sup>2)</sup> Noch weniger wird das Serumalbumin angegriffen, da dasselbe die Wirkung des Globulinenzym hemmt: diese Hemmung ist in der Tat wahrzunehmen, auch wenn die Verdauungsergebnisse in der Gegenwart von Albumin mit den Ergebnissen ohne Albumin verglichen werden.<sup>3)</sup>

#### 6. Hemmende Substanzen.

Daß Blutserum die Wirkung von Pankreastrypsin hemmt, ist schon lange bekannt. Die hemmende Substanz kommt wesentlich in der Albuminfraktion vor. Die Wirkung derselben wird am besten mit Casein als Substrat studiert. Daß es um die Bildung irgendwelcher Verbindung zwischen dem Trypsin und der hemmenden Substanz sich handelt, scheint aus dem Grunde wahrscheinlich, daß die Hemmung um so auf-

<sup>1)</sup> Siehe hierüber Hedin und Masai, Diese Zeitschr., Bd. 100. S. 263 und besonders S. 286 (1917).

<sup>2)</sup> Diese Zeitschr., Bd. 100, S. 280, 281.

<sup>3)</sup> Hedin, Journ. of Physiol., Bd. 30. S. 195 (1903).

fallender wird, eine je längere Zeit die hemmende Substanz und das Trypsin aufeinander einwirkten, bevor das Substrat (Casein) zugegeben wird. Von Bedeutung ist auch die Temperatur, bei welcher das Gemenge von Trypsin und hemmende Substanz aufbewahrt wird, indem die Hemmung kräftiger ausfällt, je höher bis zu einem gewissen Grade diese Temperatur war.<sup>1)</sup> Aus dem Gesagten folgt, daß es von großer Bedeutung für den Umfang der Hemmung ist, ob die Trypsinlösung Eiweiß enthält oder nicht. In der Gegenwart von viel Eiweiß wird die Hemmung geringer als mit nur wenig Eiweiß. Meine bei den folgenden Versuchen angewandten Trypsinlösungen wurden in der Weise erhalten, daß frische Pankreasdrüse mit Wasser (1 Liter auf 1 Kilo-Drüse) 24 Stunden bei 37° in der Gegenwart von Chloroform und Toluol autolytisch wurde. Darauf wurde vom Ungelösten filtriert und das Filtrat mehrtägiger Dialyse gegen fließendes Wasser unterworfen. Die so erhaltene, filtrierte Lösung besaß eine so kräftige Trypsinwirkung, daß dieselbe vor den Verdauungsversuchen mit 50—400 Vol. Wasser verdünnt werden konnte. Die so verdünnte Trypsinlösung ergab mit Gerbsäure nur eine ebensichtbare Trübung. Die Hemmung ist auch mit stark verdünntem Albumin sehr kräftig. Doch hat es sich bei meinen früheren Untersuchungen herausgestellt, daß es auch mit sehr großen Mengen an Albumin unmöglich ist, eine vollkommene Hemmung zu erzielen.<sup>2)</sup> Dies mag wohl mindestens zum Teil daran liegen, daß das Serumalbumin an sich eine geringe Einwirkung auf Casein ausübt (S. 9 u. 10), die offenbar mit der zugesetzten Albuminmenge zunehmen muß.

Wie ich bereits vorher gezeigt habe, wird auch die primäre Protease der Globulinfraction durch die Albuminfraction in ihrer Wirkung gehemmt.<sup>3)</sup> Diese Hemmung ist aber lange nicht so ausgesprochen wie die Trypsinhemmung. Die Ursachen dazu können verschieden sein. Einmal ist das Globulinenzym mit dem Pankreastrypsin wahrscheinlich nicht identisch.

<sup>1)</sup> Hedin, Journ. of Physiol., Bd. 32, S. 390 (1905).

<sup>2)</sup> Biochem. Journ., Bd. 1, S. 474 (1906).

<sup>3)</sup> Journ. of Physiol. (engl.), Bd. 30, S. 195 (1903).

was an sich eine genügende Erklärung des verschiedenen Verhaltens bei der Hemmung sein könnte. Zweitens enthält die angewandte Globulinenzymlösung immer große Mengen an Eiweiß, was nach dem eben Gesagten mindestens beim Trypsin die Hemmung schwächt. Dazu kommt noch, daß die Albuminfraktion außer dem Hemmungskörper noch wirksames Erepsin enthält, welches bestrebt sein muß, die Hemmung herabzusetzen, und dessen Einfluß um so auffallender wird, je geringer die Hemmung überhaupt ist. Und besonders muß sich dies in solchen Fällen zeigen, wo das Substrat von vornherein etwaige durch Gerbsäure fällbare peptonartige Substanzen enthält, welche durch das Erepsin in nicht fällbare gespalten werden können (S. 8 u. 9). Schließlich muß Rücksicht darauf genommen werden, daß die Wirkung des Globulinenzyms mit der Gerbsäuremethode bestimmt, keineswegs der zugesetzten Enzymmenge proportional ist, sondern viel langsamer zunimmt als diese.<sup>1)</sup> Hieraus folgt, daß die Gerbsäureanalyse auf eine etwaige, durch Hemmung hervorgerufene bedeutende Abnahme der wirksamen Enzymmenge durch eine verhältnismäßig geringe Abnahme in den Analyseresultaten antworten kann. Beim Trypsin dagegen, wo die Wirkung innerhalb eines großen Intervalles der Trypsinmenge proportional oder annähernd proportional sich zeigt, muß eine etwa vorhandene Abnahme der wirksamen Enzymmenge sich leichter nachweisen lassen.

Irgend welche artspezifische Hemmung habe ich bei der Hemmung des Globulinenzyms durch das Albumin ebensowenig wie beim Trypsin finden können. Im Gegenteil habe ich mit Rindsalbumin im allgemeinen eine stärkere Hemmung auf Pferdeglobulinenzym als auf Rindsenzym gefunden. Bei den Versuchen über die Hemmung wurde in der Kontrollprobe auf dem Wasserbade während 30 Min. erhitzte Lösung der hemmenden Substanz benutzt.

Die Abhängigkeit des Hemmungsbetrags von der Alkalinität der Lösung wird durch folgenden Versuch etwas beleuchtet. Für den Versuch wurde Globulin und Albumin vom Pferd benutzt. Zu 100 ccm Globulinsuspension wurde vor der

<sup>1)</sup> Hedin und Masai, Diese Zeitschr., Bd. 100, S. 286 (1917).

Zubereitung der Proben wie immer 5 ccm 0,1 n-NaOH zugesetzt. Die Caseinlösung enthielt auch die gewöhnliche Menge Alkali:

1.	10 Glob.	+ 5 Alb.		+ 50 Casein	+ 4 H <sub>2</sub> O
2.	10	> + 5	erh.	+ 50	> + 4 H <sub>2</sub> O
3.	10	> + 5		50 Cas.	+ 2 H <sub>2</sub> O + 2 NaOH 0,1 n
4.	10	> + 5		50	> + 2 H <sub>2</sub> O + 2 NaOH 0,1 n
5.	10	> + 5		50	> + 4 NaOH 0,1 n
6.	10	> + 5		50	> + 4 NaOH 0,1 n.

4 Tage bei 37°; 50 Gerbsäure; 75 Filtrat.

Nach Abzug des Kontrollwertes mit Globulin und Albumin erhitzt waren die reduzierten Werte

Nr. 1.	10,2	; Hemmung	3,4
> 2.	13,6		
> 3.	10,55	; >	4,9
> 4.	15,45		
> 5.	10,75	; >	5,2
> 6.	15,95		

Die Versuche Nr. 2, 4, 6 mit erhitztem Albumin, wo keine Hemmung stattfand, ergaben also mit steigender Alkalinität steigenden Umsatz, was mit früheren Versuchen von mir und Masai übereinstimmt.<sup>1)</sup> Andererseits ergibt sich auch, daß die Hemmung mit der Alkalinität in diesem Versuche zunahm.

Um den Einfluß der Zeit, während welcher das Enzym und die hemmende Substanz vor der Zugabe des Caseins zusammen aufbewahrt werden, zu prüfen, wurde folgender Versuch angestellt. Globulin und Albumin vom Pferd

1.	(10 Glob. + 5 Alb.)	6 Std. Zimmertemp.	+ 50 Cas.	+ 3 NaOH
2.	10 > + 5 >		+ 50 Cas.	+ 3 NaOH
3.	10 > + 5	erh.	+ 50 >	+ 3 NaOH.

4 Tage bei 37°; 50 Gerbsäure; 75 Filtrat.

Nr. 1.	15,5	; Hemmung	6,75
> 2.	16,4	; >	5,75
> 3.	22,15		

In der Probe 2 wurde das Casein sofort nach dem Zusammenmischen von Globulin und Albumin zugesetzt. Aus den Analysen ist zu ersehen, daß die Hemmung auch hier mit der Zeit zunimmt; dies geschieht aber länger nicht in dem Umfange,

<sup>1)</sup> Diese Zeitschr., Bd. 100, S. 298 (1917).

wie bei meinen bereits zitierten Versuchen mit Trypsin der Fall war.

Dasselbe wurde auch in folgendem Versuche gefunden, wo die Analyse mit  $\text{SnCl}_2 + \text{CaCl}_2$  in vorher beschriebener Weise<sup>1)</sup> ausgeführt wurde. Das Globulin rührte vom Pferd und das Albumin vom Rinde her.

1. (5 Glob. + 2 Alb.) 2 Std. Zimmertemp. + 25 Cas. + 1 NaOH 0,1 n
2. 5 » + 2 » + 25 Cas. + 1 NaOH 0,1 n
3. 5 » + 2 » erh. + 25 » + 1 NaOH 0,1 n
4. (5 » + 2 » ) » + 25 » + 1 NaOH 0,1 n

4 Tage bei 37°; 25  $\text{SnCl}_2$  + 25  $\text{CaCl}_2$ ; 50 Filtrat.

Nr. 1.	11,8	;	red. Wert	10,2	;	Hemmung	9,9
» 2.	12,55	;	»	10,95	;	»	9,15
» 3.	21,7	;	»	20,1			
» 4.	1,6						

Die Analyse mit Zinnchlorür hat vor der mit Gerbsäure den Vorzug, daß der Umsatz größer ausfällt, da das Zinnsalz weniger von den Spaltungsprodukten ausfällt als die Gerbsäure. Die Gerbsäureanalyse ist aber viel bequemer auszuführen und scheint mir zuverlässiger zu sein. Da der Einfluß der Zeit nach diesen zwei Versuchen zwar gut nachweisbar, aber immerhin sehr gering ist, habe ich in allen Versuchen, wo das Gegenteil nicht ausdrücklich angegeben wird, das Substrat sofort zu dem Gemenge von Enzym und hemmender Substanz zugesetzt.

Folgender Versuch mit Pferdeglobulin und Rindsalbumin wurde mit Zinnchlorür analysiert:

1. 10 Glob. + 5 Alb. + 50 Cas. + 2 NaOH
  2. 10 » + 5 » erh. + 50 » + 2 NaOH
  3. (10 » + 5 » ) » + 50 » + 2 NaOH
- 4 Tage bei 37°; 50  $\text{SnCl}_2$  + 50  $\text{CaCl}_2$ ; 100 Filtrat.

Nr. 1.	21,1	;	red. Wert	18,4	;	Hemmung	22,3
» 2.	43,4	;	»	40,7			
» 3.	2,7						

Im folgenden Versuch wurde die Analyse einerseits mit Zinnchlorür, andererseits mit Gerbsäure ausgeführt. Das Globulin rührte vom Pferd, das Albumin vom Rind her.

<sup>1)</sup> Diese Zeitschr., Bd. 100, S. 277 (1917).

1. 5 Glob. + 2 Alb. + 25 Cas. + 2 NaOH 0,1 n
2. 5 » + 2 » erh. + 25 » + 2 NaOH 0,1 n
3. (5 » + 2 » ) » + 25 » + 2 NaOH 0,1 n

4 Tage bei 37°; 25 SnCl<sub>2</sub> + 25 CaCl<sub>2</sub>; 50 Filtrat.

3 gleiche Proben Nr. 4, 5, 6 wurden in der gleichen Weise behandelt; nur wurde am Ende der Enzymwirkung mit 25 Gerbsäure + 25 H<sub>2</sub>O versetzt und wie oben 50 Filtrat für die Stickstoffbestimmung genommen.

Nr. 1.	9,8 ;	red. Wert	6,55;	Hemmung	10,85
» 2.	20,65;	»	»	17,4	
» 3.	3,25				
» 4.	3,95;	»	»	2,9 ;	» 5,85
» 5.	9,8 ;	»	»	8,75	
» 6.	1,05.				

In anderen Fällen habe ich eine viel geringere Hemmung bekommen, z. B. im folgenden Versuch, welcher mit der Absicht angestellt wurde, zu eruieren, ob irgend welcher Unterschied zwischen den auf dem ungelösten und dem gelösten Globulin vorhandenen Teilen des Enzyms vorhanden ist. 150 ccm 4 mal mit Am<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> durch  $\frac{1}{3}$  Sättigung gefällte und dann dialysierte Globulinemulsion vom Pferd wurde filtriert. Das ungelöste (A) und das gelöste (B) wurden beide mit 4 ccm 0,1 n-NaOH versetzt und die Lösungen auf dasselbe Volumen aufgefüllt.

1. 20 A + 5 Alb. + 50 Cas. + 3 NaOH 0,1 n
2. 20 A + 5 » erh. + 50 » + 3 NaOH 0,1 n
3. 20 B + 5 » + 50 » + 3 NaOH 0,1 n
4. 20 B + 5 » » + 50 » + 3 NaOH 0,1 n

4 Tage bei 37°; 40 Gerbsäure; 75 Filtrat.

Nr. 1.	10,7 ;	Hemmung	2,85
» 2.	13,55		
» 3.	15,5 ;	»	3,15
» 4.	18,65.		

Beide Enzymlösungen wurden also in etwa dem gleichen Grade gehemmt.

Im folgenden Versuch wurden Globulinenzyme vom Pferd und vom Rind mit Albumin vom Rind geprüft. Um eine stärkere Aufspaltung des Substrats zu erzielen, wurde in allen Proben 20 ccm Harnerepsin (H. E.) zugesetzt.

1.	20	Pferdeglob.	+ 20	H. E.	+ 10	Alb.	+ 25	Cas.	+ 2	NaOH 0,1 n
2.	20	›	+ 20	H. E.	+ 10	› erh.	+ 25	›	+ 2	NaOH 0,1 n
3.	20	Rindsglob.	+ 20	H. E.	+ 10	›	+ 25	›	+ 2	NaOH 0,1 n
4.	20	›	+ 20	H. E.	+ 10	› erh.	+ 25	›	+ 2	NaOH 0,1 n

4 Tage bei 37°; Gerbsäure; 65 Filtrat.

Nr. 1. 10,6; Hemmung 7,4

› 2. 18,0

› 3. 9,4; › 2,6

› 4. 12,0.

Wie ersichtlich wurde das Pferdeenzym stärker gehemmt als das Rindsenzym.

In der Albuminfraktion des Blutserums finden sich also Substanzen, welche einerseits die Wirkung von Pankreastrypsin stark hemmen und andererseits auch die des Globulinenzyms beeinträchtigen, obwohl in geringerem Grade. Ob die beiden Substanzen identisch sind, läßt sich, so viel ich finden kann, zurzeit nicht entscheiden. Eine andere Frage, die sich nur schwierig beantworten läßt, ist die, ob das Erepsin in der Albuminfraktion durch irgend welche Substanz in derselben Fraktion gehemmt wird. Offenbar läßt sich diese Frage durch direkte Versuche nicht entscheiden. Aus gewissen Gründen glaube ich aber schließen zu können, daß das Erepsin wenigstens schwächer als die primäre Protease der Globulinfraktion gehemmt wird. Wie ich oben erwähnt habe, zeigt nämlich das Blutserum nur eine sehr schwache Einwirkung auf Casein, wenn die Einwirkung mit Gerbsäure geprüft wird; andererseits ist die Einwirkung von Serum auf Wittes Pepton ganz deutlich ausgesprochen. Da nun die aus dem Serum bereitete Globulinfraktion eine deutliche Einwirkung auf Casein zeigt, so liegt die Unwirksamkeit des Serums dem Casein gegenüber wahrscheinlich daran, daß die Wirkung der darin vorhandenen primären Protease gehemmt wird. Eine solche Hemmung kommt bezüglich der sekundären Protease nicht oder zum mindesten nicht in dem gleichen Maße zustande, da diese auch im Serum deutlich nachweisbar ist.

Wenn die Frage, ob das in der Albuminfraktion vorhandene Erepsin durch irgend welche Substanz in derselben Fraktion gehemmt wird, der direkten Prüfung nicht unterworfen

werden kann, so läßt sich vielleicht doch prüfen, ob das Erepsin in der Globulinfraction durch die Albuminfraction gehemmt wird. Mit Rücksicht auf diese Frage können folgende Versuche angeführt werden, wo das Globulin und das Albumin beide vom Rind herrührten.

1. 10 Glob. + 5 Alb. + 50 Pept. + 2 NaOH 0,1 n
2. 10 » + 5 » erh. + 50 » + 2 NaOH 0,1 n
3. (10 » + 5 » ) » + 50 » + 2 NaOH 0,1 n

4 Tage bei 37°; 30 Gerbsäure; 75 Filtrat.

- Nr. 1. 28,3 ; red. Wert 12,3  
 » 2. 28,75; » » 12,85  
 » 3. 15,9.

1. 10 Glob. + 10 Alb. + 50 Pept. + 2 NaOH 0,1 n
2. 10 » + 10 » erh. + 50 » + 2 NaOH 0,1 n
3. (10 » + 10 » ) » + 50 » + 2 NaOH 0,1 n

4 Tage bei 37; 30 Gerbsäure; 75 Filtrat.

- Nr. 1. 37,5; red. Wert 23,0  
 » 2. 37,5; » » 23,0  
 » 3. 14,5.

Beim Wiederholen des Versuches wurden folgende reduzierte Werte erhalten:

- Nr. 1. 22,9  
 » 2. 22,0.

Bei diesen Versuchen ist man nur für den Fall berechtigt, eine Hemmung für bewiesen anzusehen, daß Nr. 1 einen unzweifelhaft geringeren Umsatz ergeben hat als Nr. 2, was nicht eintraf. Immerhin muß man aber daran denken, daß in Nr. 1 auch das Albuminerepsin das Pepton muß aufgespalten haben, wodurch eine etwaige Hemmung verdeckt werden könnte. Ich glaube also, daß es wohl möglich sein dürfte, daß das Globulinerepsin des Rinderserums durch das Albumin etwas gehemmt wird, aber immerhin muß eine solche Hemmung sehr gering sein. Die Einwirkung der Globulinenzyme des Pferdeserums auf Pepton wird entschieden durch Rindsalbumin gehemmt, wie aus folgendem Versuch hervorgeht.

1. 10 Pferdeglob. + 10 Rindsalb. + 50 Pept. + 2 NaOH 0,1 n
2. 10 » + 10 Alb. erh. + 50 » + 2 NaOH 0,1 n
3. (10 Glob. + 10 Alb.) erh. + 50 » + 2 NaOH 0,1 n

4 Tage bei 37°; 30 Gerbsäure; 70 Filtrat.

- Nr. 1. 23,7; red. Wert 9,2; Hemmung 10,3  
 > 2. 34 ; > > 19,5  
 > 3. 14,5.

Die Hemmung ist hier unzweifelhaft, aber es fällt schwierig zu entscheiden, ob diese Hemmung die Wirkung der primären oder die der sekundären Protease trifft.

Ich habe auch untersucht, ob das aus Menschenharn erhaltene Erepsin durch Rindsalbumin gehemmt wird, aber hier ebensowenig, wie beim Rindsglobulinerepsin irgend welche Hemmung nachweisen können. Das Rindsalbumin war im Verhältnis 1 Alb. : 5 H<sub>2</sub>O verdünnt. Die Versuche wurden mit folgenden Volumina ausgeführt:

1. 25 H. E. + 10 Alb. . . . + 50 Pept. + 2 NaOH 0,1 n  
 2. 25 H. E. + 10 > erh. + 50 > + 2 NaOH 0,1 n  
 4 Tage bei 37°; 30 Gerbsäure; 100 Filtrat.

Bei drei solchen Versuchen wurden folgende Ergebnisse erhalten:

	Vers. 1	Vers. 2	Vers. 3
Nr. 1	9,0	7,95	8,35
	8,8	8,1	8,05

Wenn nun das Erepsin nicht oder nur sehr schwach gehemmt wird, während die primäre Protease des Serums jedenfalls stärker gehemmt wird, so könnte man sich wohl denken, daß beide Enzyme in der Albuminfraktion vorhanden sein könnten, daß aber die primäre Protease in der Gegenwart der hemmenden Substanz sich nicht deutlich nachweisen ließe, während die Erepsinwirkung deutlich hervorträte. Gegen eine solche Ansicht kann ich keine triftigen Gründe angeben; die selbständige Existenz der sekundären Protease wäre aber auch mit einer solchen Deutung der Verhältnisse sichergestellt.

**7. In welcher Weise beeinflusst Erhitzen des Serums auf 56° während 30 Minuten die nachher daraus hergestellten Enzyme und hemmenden Substanzen?**

Frisch hergestelltes Pferdeserum wurde einerseits ohne vorangehende Erhitzung in oben angegebener Weise für die

Bereitung von Globulin und Serumalbumin, angewandt, anderseits nach Erhitzung auf  $56^{\circ}$  während 30 Minuten. Die so aus je 500 ccm Serum erhaltenen Globulinfractionen wurden auf 500 ccm, die Serumalbuminfractionen auf 300 ccm aufgefüllt. Die aus nicht erhitztem Serum erhaltenen Fractionen werden unten mit A bezeichnet, die aus erhitztem mit B.

Zunächst wurde die Einwirkung der Globulinfractionen auf Casein zusammen mit Harnenzym wie gewöhnlich untersucht und zwar mit folgenden Mengen:

1.	10 Glob.	+ 20 H. E.	+ 50 Cas.	+ 3 NaOH 0,1 n
2.	10 >	+ 20 H. E. erh.	+ 50 >	+ 3 NaOH 0,1 n
3.	10 > erh.	+ 20 H. E. >	+ 50 >	+ 3 NaOH 0,1 n
4.	(10 >	+ 20 H. E.) >	+ 50 >	+ 3 NaOH 0,1 n

4 Tage bei  $37^{\circ}$ ; 40 Gerbsäure; 70 Filtrat.

	Mit Glob. A	Mit Glob. B.
Nr. 1.	17,2 ; red. Wert 15,55	2,15; red. Wert 0,55
> 2.	5,7 ; > > 4,05	1,6 ; > > 0,0
> 3.	2,3 ; > > 0,65	2,3 ; > > 0,7
> 4.	1,65;	1,6

Wie ersichtlich wurden mit Glob. A die gewöhnlichen Verhältnisse gefunden: die Wirkung in Nr. 1 ist größer als die in Nr. 2 und 3 zusammen. Mit Glob. B wurde dagegen keine Wirkung erhalten (Nr. 2) und auch mit dem Harnerepsin zusammen (Nr. 1) ergab dasselbe kaum so viel Wirkung wie mit H. E. allein. Die primäre Protease der Globulinfraction B war folglich vollkommen zerlegt.

Ferner wurde geprüft, ob die sekundäre Protease in der Albuminfraction beim Erhitzen des Serums auf  $56^{\circ}$  zerstört worden war. Die Mengen waren:

1.	25 Alb.	+ 50 Pept.	+ 3 NaOH 0,1 n
2.	25 > erh.	+ 50 >	+ 3 NaOH 0,1 n

5 Tage bei  $37^{\circ}$ ; 40 Gerbsäure; 75 Filtrat.

	Mit Alb. von A.	Mit Alb. von B.
Nr. 1.	13,65; red. Wert 1,5	12,40; red. Wert 0,4
> 2.	12,15	12,0.

Der Versuch zeigt also zunächst, daß die Erepseinwirkung bereits in A ziemlich schwach war; immerhin war aber dieselbe entschieden geringer in B, obwohl sie auch in B nicht völlig ausgelöscht zu sein scheint.

Die Substanzen, welche die Wirkung des Trypsins und die des Globulinzyns hemmen, wurden beim Erhitzen des Serums auf 56° zerstört, wie aus folgenden Versuchen zu ersehen ist. Globulin und Alb. vom Pferd. Alb. nicht verdünnt.

1.	15 Glob. + 5 Alb.	+ 50 Cas. + 3 NaOH 0.1 n
2.	15 > + 5 > erh.	+ 50 Cas. + 3 NaOH 0.1 n
	Mit Alb. von A.	Mit Alb. von B.
Nr. 1.	8,4 ; Hemmung 2,25	11,9 ; keine Hemmung
> 2.	11,25	11,8.

Sehr verdünntes Schweinetrypsin mit Alb. vom Pferd in der Verdünnung 1 Alb.: 10 H<sub>2</sub>O:

1.	10 Tryps. + 10 Alb.	+ 25 Cas.
2.	10 > + 10 > erh.	+ 25 >
	2 Tage bei 37°; 20 Gerbsäure; 50 Filtrat.	
	Mit Alb. von A.	Mit Alb. von B.
Nr. 1.	4,2; Hemmung 14,5	21,6 ; keine Hemmung
> 2.	18,7	21,65.

Obwohl das aus dem nicht auf 56° erhitzten Serum erhaltene Globulin die primäre Protease enthält und demnach selbst auf Casein einwirkt, hemmt es entschieden die Einwirkung von Trypsin auf Casein, während dies nicht für das nach Erhitzen des Serums auf 56° hergestellte Globulin konstatiert werden konnte. Die Hemmungswirkung des Globulins A ist doch entschieden geringer als die mit Alb. von A erhaltene. Das Trypsin war das im vorigen Versuche angewandte Schweinetrypsin in der gleichen Verdünnung. Das Globulin war nicht verdünnt.

1.	10 Tryps. + 5 Glob.	+ 25 Cas.
2.	5 > erh.	
	2 Tage bei 37°; 20 Gerbsäure: 40 Filtrat.	
	Mit Glob. A	Mit Glob. B.
Nr. 1.	8,2; Hemmung 8,9	11,2; keine Hemmung
> 2.	17,1	11,0.

Aus Rindsserum wurden wie oben aus Pferdeserum Globulin und Albuminfraktionen hergestellt einerseits mit nicht erhitztem Serum, andererseits mit Serum, das 30 Minuten auf 56—57° erhitzt worden war. Die beiden Globulinfraktionen wurden nach der Dialyse auf dasselbe Volumen aufgefüllt und ebenso die Albuminfraktionen.

Zunächst wurde mit beiden Globulinfractionen und Harnerepsin geprüft, ob dieselben primäre Proteasen enthielten. Die Mengen waren in einem Versuche:

1.	20 Glob.	+ 20 H. E.	+ 50 Cas.	+ 3 NaOH 0,1 n
2.	20 »	+ 20 H. E. erh.	+ 50 »	+ 3 NaOH 0,1 n
3.	20 »	erh. + 20 H. E.	+ 50 »	+ 3 NaOH 0,1 n
4.	(20 »	+ 20 H. E.) »	+ 50 »	+ 3 NaOH 0,1 n

4 Tage bei 37°; 40 Gerbsäure; 75 Filtrat.

	Mit Glob. A	Mit Glob. B
Nr. 1.	8,5; red. Wert 6,6	2,15; red. Wert 0,35
» 2.	4,6; » » 2,7	1,75; » » 0,0
» 3.	2,7; » » 0,8	2,60; » » 0,8
» 4.	1,9.	1,8.

In dem auf 56—57° erhitzten Serum war also keine primäre Protease vorhanden. Das Glob. A enthielt wie gewöhnlich primäre Protease, wie aus dem Versuche zu ersehen ist.

Darauf wurden die Globulinfractionen auf Erepsin geprüft. Die Mengen waren:

1.	25 Glob.	+ 50 Pept.	+ 2 NaOH 0,1 n
2.	25 »	erh. + 50 »	+ 2 NaOH 0,1 n

7 Tagen bei 37°; 40 Gerbsäure; 80 Filtrat.

	Mit Glob. A.	Mit Glob. B.
Nr. 1.	34,85; red. Wert 18,55	19,9; red. Wert 2,8
» 2.	16,3	17,1.

Die Einwirkung auf Pepton war also im Glob. A ziemlich stark, in Glob. B aber bedeutend schwächer, obwohl deutlich ausgesprochen. Während also die primäre Protease der Globulinfraction beim Erhitzen des Serums auf 56—57° während 30 Minuten völlig vernichtet wird, wurde das Erepsin nur stark geschwächt.

Die Wirkung des Serumalbumins auf Pepton wurde auch geprüft und zwar in beiden Fällen mit folgenden Volumina:

1.	25 Alb.	+ 50 Pept.	+ 2 NaOH 0,1 n
2.	25 »	erh. + 50 »	+ 2 NaOH 0,1 n

5 Tage bei 37°; 40 Gerbsäure; 75 Filtrat.

	Mit Alb. von A	Mit Alb. von B.
Nr. 1.	14,6; red. Wert 3,0	15,25; red. Wert 3,45
» 2.	11,6	11,8.

In diesem Falle war also die Erepsinwirkung in dem Alb. auch in dem auf 56—57° erhitzten Serum erhalten.

Die Hemmungswirkung wird im Rindsserum beim Erhitzen auf  $56^{\circ}$  nicht vernichtet, sondern nur etwas geschwächt, was sich vor allem bei der Hemmung der Trypsinwirkung sichtbar macht. Beim Versuche hierüber war das Trypsin dasselbe wie das in den Versuchen S. 26 angewandte; das Alb. war mit 10 Vol. Wasser verdünnt:

	1. 10 Tryps. + 10 Alb.	+ 25 Cas.
	2. 10 > + 10 > erh.	+ 25 >
	2 Tage bei $37^{\circ}$ ; 20 Gerbsäure; 40 Filtrat.	
	Mit Alb. von A.	Mit Alb. von B.
Nr. 1.	2,4; Hemmung 14,3	5,05; Hemmung 11,0
> 2.	16,7	16,05.

Die Hemmung war folglich in beiden Fällen sehr deutlich, obwohl etwas stärker mit Alb. vom nicht erhitzten Serum.

Aus einem anderen Rindsserum wurden wie vorher die Fraktionen A und B aus nicht erhitztem und auf  $56-57^{\circ}$  erhitztem Serum bereitet. Dann wurden die Globulinfraktionen wie oben mit Harnenzym zusammen auf primäre Protease geprüft. Die Mengen waren:

	10 Glob. + 20 H. E. + 25 Cas. + 2 NaOH 0,1 n	
	4 Tage bei $37^{\circ}$ ; 20 Gerbsäure; 45 Filtrat.	
	Mit Glob. A.	Mit Glob. B.
Nr. 1.	6,6; red. Wert 4,9	2,25; red. Wert 0,4
> 2.	3,2; > > 1,5	1,8 ; > > 0
> 3.	2,2; > > 0,5	2,3 ; > > 0,45
> 4.	1,7	1,85.

In Glob. A war also primäre Protease vorhanden, aber nicht in B, was mit den oben erhaltenen Ergebnissen vollkommen übereinstimmt.

Mit noch einem anderen Rindsserum wurden dieselben Eiweißfraktionen hergestellt, nur wurden die Globulinfraktionen im ganzen 6 mal mit  $\text{Am}_2\text{SO}_4$  gefällt, während vorher nur 4 mal gefällt wurde. Die Prüfung der Globulinfraktionen auf primäre Protease geschah diesmal ohne Zuhilfenahme von Harnenzym folgendermaßen:

	1. 10 Glob.	+ 25 Cas.	+ 2 NaOH 0,1 n
	2. 10 >	erh. + 25 >	+ 2 NaOH 0,1 n
	4 Tage bei $37^{\circ}$ ; 20 Gerbsäure; 30 Filtrat.		

	Mit Glob. A.	Mit Glob. B
Nr. 1.	1,35; red. Wert 0,85	0,5; red. Wert 0
» 2.	0,5	0,5.

Eine gewisse Wirkung wurde also mit Glob. A erhalten, mit Glob. B aber keine.

Die Albuminfraktionen wurden wie vorher mit Pepton untersucht:

- |    |           |            |                |
|----|-----------|------------|----------------|
| 1. | 25 Alb.   | + 50 Pept. | + 2 NaOH 0,1 n |
| 2. | 25 » erh. | + 50 »     | + 2 NaOH 0,1 n |
- 4 Tage bei 37°; 30 Gerbsäure; 90 Filtrat.

	Mit Alb. A.	Mit Alb. B.
Nr. 1.	18,85; red. Wert 4,1	16,9; red. Wert 1,8
» 2.	14,75	15,1.

Die Erepsinwirkung war also im Alb. B nicht ausgelöscht, sondern nur geschwächt.

Es ergibt sich also, daß beim Erhitzen von Pferde- oder Rindsserum auf 56° während 30 Minuten die primäre Protease völlig vernichtet wird, während die sekundäre nur stark geschädigt wird. Die hemmenden Substanzen waren im Versuche mit Pferdeserum auch völlig zerlegt, während dieselben im Rinderserum nur geschwächt waren.

#### 8. Behandlung des Serums bzw. des Albumins mit Chloroform, Äther, Toluol.

Viele Forscher haben beobachtet, daß die Hemmung, welche Serum auf die Trypsinwirkung ausübt, durch Behandlung des Serums mit Äther, Chloroform oder Benzol mehr oder weniger vollständig verschwindet.<sup>1)</sup> Außerdem hatten bereits vorher Delezenne und Pozerski<sup>2)</sup> gefunden, daß Serum beim Aufbewahren mit Chloroform das Vermögen erwarb, auf Eiweiß spaltend einzuwirken. Bald darauf, da ich gefunden hatte, daß das proteolytische Enzym des Serumglobulins durch

<sup>1)</sup> Schwartz, Wien. klin. Wochenschr., Bd. 22, S. 1151 (1909); Cobliner, Biochem. Zeitschr., Bd. 25, S. 494 (1910); Rosenthal, Folia serolog., Bd. 6, S. 285 (1911); Meyer, ebenda, Bd. 7, S. 472 (1911); Kirchheim, Arch. f. exp. Path. u. Pharm., Bd. 73, S. 374 (1913); Sugimoto, ebenda, Bd. 74, S. 14 (1913); Jobling u. Petersen, Journ. of exp. Med., Bd. 19, S. 459 (1914).

<sup>2)</sup> Compt. rend. d. l. Soc. biol., Bd. 55, S. 327 (1903).

das Serumalbumin in seiner Wirkung gehemmt wird, habe ich auf die Möglichkeit hingewiesen, daß die hemmende Substanz bei der Einwirkung von Chloroform auf das Serum geschädigt und außer Wirkung gesetzt wird.<sup>1)</sup> Über die erwähnten Verhältnisse habe ich nun einige Versuche angestellt:

Zunächst wurde Rindsserum mit 2 Volumen Chloroform 3 Stunden im Schüttelapparat behandelt. Da nach dem Schütteln die Flüssigkeiten sich nur schlecht voneinander scheiden, wurde zentrifugiert und die Serumschicht mehrmals filtriert. Dann wurden folgende Proben bereitet:

1. 15 Ser. nicht beh. mit Chloroform + 25 Cas.
  2. 15 > beh. mit Chloroform + 25 >
  3. 15 > erh. + 25 >
- 4 Tage bei 37°; 20 Gerbsäure + 20 H<sub>2</sub>O; 30 Filtrat.
- |        |                           |
|--------|---------------------------|
| Nr. 1. | 1,7; red. Wert 0,6        |
| > 2.   | 3,1; > > 2,0; Zunahme 1,4 |
| > 3.   | 1,1.                      |

Durch die Behandlung mit Chloroform war folglich das Vermögen des Serums, auf Casein einzuwirken, um einen Betrag gestiegen, der  $2,0 - 0,6 = 1,4$  ccm Säure entsprach.

Ein anderes Rindsserum ergab folgende Ziffern:

- |        |                           |
|--------|---------------------------|
| Nr. 1. | 1,6; red. Wert 0,4        |
| > 2.   | 2,0; > > 0,8; Zunahme 0,4 |
| > 3.   | 1,2.                      |

Bei der Einwirkung auf Pepton ergab das erste der behandelten Rindssera:

1. 10 Ser. nicht beh. mit Chloroform + 25 Pept.
  2. 10 > beh. mit Chloroform + 25 >
  3. 10 > erh. + 25 >
- 4 Tage bei 37°; 20 Gerbsäure + 20 H<sub>2</sub>O; 35 Filtrat.
- |        |                              |
|--------|------------------------------|
| Nr. 1. | 7,85; red. Wert 3,25         |
| > 2.   | 8,75; > > 4,15; Zunahme 0,9. |
| > 3.   | 4,6.                         |

Auch hier finden wir also eine Zunahme der Einwirkung nach der Chloroformbehandlung; berechnet als Bruchteil der Gesamtwirkung erreicht aber diese Zunahme nicht denselben Wert wie bei Einwirkung auf Casein.

<sup>1)</sup> Journ. of Physiol., Bd. 30, S. 195 (1903).

Pferdeserum ergab nach 3stündigem Schütteln einerseits mit 2 Volumen Chloroform, anderseits mit 2 Volumen Äther folgendes:

1.	15 Ser.	nicht beh.	mit Extraktionsmittel	+ 25 Cas.
2.	15	>	beh. mit Chloroform	+ 25 >
3.	15	>	> Äther	+ 25 >
4.	15	>	erh.	+ 25 >
4 Tage bei 37°; 25 Gerbsäure + 20 H <sub>2</sub> O; 40 Filtrat.				
Nr. 1.	2,25;	red. Wert	0,15	
> 2.	2,55;	>	> 0,45;	Zunahme 0,3
> 3.	2,3;	>	> 0,2;	> 0,05.
> 4.	2,1.			

In den eben angeführten Versuchen, wo das Serum mit Chloroform oder Äther behandelt wurde, konnte also eine geringe Zunahme der proteolytischen Wirkung beobachtet werden, nach der Behandlung mit Chloroform aber mindestens beim Pferdeserum übersteigt diese Zunahme kaum den Versuchsfehler. Wie oben angedeutet wurde, liegt diese Zunahme wahrscheinlich daran, daß die hemmende Substanz in irgend welcher Weise außer Wirkung gesetzt wird. Daß dem so ist, geht aus folgenden Versuchen deutlicher hervor, wo das Serumalbumin, das nach dem oben Gesagten die Hauptmasse der hemmenden Substanzen enthält, mit verschiedenen Flüssigkeiten behandelt wurde.

25 ccm Alb. vom Rind wurde mit 2 Volumen der unten angegebenen Flüssigkeiten 2 Stunden geschüttelt. Danach wurden die Flüssigkeiten eventuell durch Zentrifugieren von der Albuminlösung geschieden und die Einwirkung des nicht behandelten Albumins sowie die des mit verschiedenen Mitteln behandelten auf Trypsin untersucht. Das Trypsin war das vorher angewandte Schweinetrypsin, in der gleichen Weise wie vorher verdünnt. Die Albuminlösungen wurden vor der Bereitung der Verdauungsproben alle mit 5 Volumen Wasser verdünnt.

1.	10 Tryps.	+ 5 Alb.	nicht beh.	+ 25 Cas.
2.	10	>	beh. mit Toluol	+ 25 >
3.	10	>	> Äther	+ 25 >
4.	10	>	> Chloroform	+ 25 >
5.	10	>	erh.	+ 25 >

2 Tage bei 37°; 20 Gerbsäure; 35 Filtrat.

Nr. 1.	2,0; Hemmung	13,7
› 2.	2,3; ›	13,4
› 3.	9,5; ›	6,2
› 4.	13,0; ›	2,7
› 5.	15,7.	

Wie ersichtlich fiel die Hemmung nach der Behandlung mit Chloroform sehr gering aus im Vergleich mit der vom nicht behandelten Albumin erzeugten. Weniger wurde die Hemmung durch die Ätherbehandlung vermindert und nach Toluolbehandlung war die Hemmung praktisch unbeeinflusst.

In einer entsprechenden Versuchsreihe wurde der Einfluß derselben Albuminlösungen auf die Hemmung des Globulinenzym geprüft. Das Enzym rührte vom Pferd her. Das Albumin wurde diesmal unverdünnt angewandt.

1.	10 Glob. + 5 Alb. nicht beh.	+ 25 Cas.	+ 2 NaOH 0,1 n
2.	10 › + 5 › beh. mit Toluol	+ 25 ›	+ 2 NaOH 0,1 n
3.	10 › + 5 › › › Äther	+ 25 ›	+ 2 NaOH 0,1 n
4.	10 › + 5 › › › Chloroform	+ 25 ›	+ 2 NaOH 0,1 n
5.	10 › + 5 erh.	+ 25 ›	+ 2 NaOH 0,1 n

4 Tage bei 37°; 25 Gerbsäure; 35 Filtrat.

Nr. 1.	6,8 ; Hemmung	3,1
› 2.	6,85; ›	3,05
› 3.	7,3 ; ›	2,6
› 4.	10,7 ; Zunahme	0,8
› 5.	9,9.	

Hier finden wir also nach Chloroformbehandlung sogar eine geringe Zunahme der Enzymwirkung. Dies liegt offenbar daran, daß die hemmende Wirkung des Albumins aufgehoben war, wodurch die begünstigende Wirkung des in der Albuminfraktion vorhandenen Erepsins hervortreten konnte. Nach der Ätherbehandlung war die Hemmung entschieden, aber nicht sehr stark vermindert, während die Toluolbehandlung ohne Einfluß war. Diese letztere Beobachtung verdient besonders hervorgehoben zu werden, da daraus erhellt, daß der Gebrauch von Toluol als Antisepticum sowohl beim Aufbewahren der verschiedenen von mir gebrauchten Flüssigkeiten wie bei den eigentlichen Verdauungsversuchen die Wirkung der Hemmungskörper nicht beeinflußt haben kann.

Der Einfluß der Ätherbehandlung auf die hemmenden Substanzen war in den obigen zwei Versuchen zwar deutlich, aber doch gering. In einem anderen Versuche habe ich deshalb versucht durch kontinuierliche Extraktion in einer dem Soxhletschen Apparate ähnlichen Einrichtung während 12 Stunden bessere Resultate zu erzielen. Die Agentien waren die gleichen wie im vorigen Versuche:

1. 10 Glob. + 10 Alb. nicht extrahiert + 25 Cas. + 2 NaOH 0,1 n
2. 10 > + 10 > extr. mit Äther + 25 > + 2 NaOH 0,1 n
3. 10 > + 10 > erh. + 25 > + 2 NaOH 0,1 n

4 Tage bei 37°; 25 Gerbsäure; 40 Filtrat.

Nr. 1.	8,1 ;	Hemmung	3,6
> 2.	8,45;	>	3,25
> 3.	11,7.		

Die Hemmung wurde also bei dieser Behandlung nicht stärker beeinflußt als beim Schütteln mit Äther, und überhaupt scheint es unmöglich zu sein, durch Behandlung des Albumins mit Äther eine vollkommene Beseitigung der Hemmung zu bewirken.

Dies gelingt aber, wie wir für das Globulinenzym bereits gesehen haben, bei der Chloroformbehandlung, obwohl diese nicht immer so weit getrieben wird, daß das chloroformbehandelte Albumin die Enzymwirkung verstärkt. Im folgenden Versuche war die Hemmung nur eben aufgehoben. Das Globulin rührte vom Pferd her und das Albumin vom Rind. Dasselbe wurde 3 Stunden mit 2 Volumen Chloroform geschüttelt:

1. 15 Glob. + 10 Alb. nicht beh. + 25 Cas. + 2 NaOH 0,1 n
2. 15 > + 10 > beh. mit Chlorof. + 25 > + 2 NaOH 0,1 n
3. 15 > + 10 > erh. + 25 > + 2 NaOH 0,1 n

4 Tage bei 37°; 30 Gerbsäure; 45 Filtrat.

Nr. 1.	9,5 ;	Hemmung	3,4
> 2.	12,95;		
> 3.	12,9.		

Folgender Versuch zeigt, daß die Hemmung, welche das Rindsalbumin auf Trypsin bewirkt, nach 3 stündigem Schütteln mit Chloroform vollkommen beseitigt werden kann, mindestens wenn das Trypsin auf Casein einwirkt; bei der Einwirkung

auf Pepton war ein Teil der Hemmung noch vorhanden. Das Trypsin war das bei den vorigen Trypsinversuchen gebrauchte.

- |    |           |          |                   |           |          |       |
|----|-----------|----------|-------------------|-----------|----------|-------|
| 1. | 10 Tryps. | + 5 Alb. | nicht beh.        | + 25 Cas. | + 1 NaOH | 0,1 n |
| 2. | 10        | + 5      | beh. mit Chlorof. | + 25      | + 1 NaOH | 0,1 n |
| 3. | 10        | + 5      | erh.              | + 25      | + 1 NaOH | 0,1 n |

3 Tage bei 37°; 20 Gerbsäure; 45 Filtrat.

- |        |        |         |      |
|--------|--------|---------|------|
| Nr. 1. | 1,8 ;  | Hemmung | 17,8 |
| > 2.   | 19,55; | >       | 0,05 |
| > 3.   | 19,6.  |         |      |

- |    |           |          |                   |            |
|----|-----------|----------|-------------------|------------|
| 1. | 10 Tryps. | + 5 Alb. | nicht beh.        | + 50 Pept. |
| 2. | 10        | + 5      | beh. mit Chlorof. | + 50       |
| 3. | 10        | + 5      | erh.              | + 50       |
| 4. | (10       | + 5      | )                 | + 50       |

4 Tage bei 37°; 30 Gerbsäure; 65 Filtrat.

- |        |                 |               |      |
|--------|-----------------|---------------|------|
| Nr. 1. | 21,3; red. Wert | 10,5; Hemmung | 18,3 |
| > 2.   | 35,7; >         | > 24,9; >     | 3,9  |
| > 3.   | 39,6; >         | > 28,8        |      |
| > 4.   | 10,8.           |               |      |

Die Hemmung der Pepton digestion läßt sich also schwieriger beseitigen als die der Caseindigestion.

Unter den geprüften organischen Flüssigkeiten ist folglich Chloroform diejenige, welche bei der Einwirkung auf Albumin dessen Vermögen von Hemmung am kräftigsten herunterbringt. Deshalb habe ich mit Chloroform geprüft, ob möglicherweise an das Enzym gebundener Hemmungskörper geschwächt werden kann, was sich offenbar in der Weise kund geben würde, daß eine verhältnismäßig unwirksame Mischung von Enzym und Hemmungskörper bei der Behandlung mit Chloroform an Enzymwirkung zunehmen würde. Zum folgenden Versuch, welcher die angedeutete Frage berührt, wurde dasselbe Trypsin wie vorher angewandt. Albumin vom Rind kam in der Verdünnung 1 Alb. : 5 H<sub>2</sub>O zur Verwendung. Ein Teil von dem Albumin wurde keiner weiteren Vorbehandlung unterworfen. Ein anderer Teil wurde mit 2 Volumen Chloroform 8 Stunden bei 37° unter Umschütteln gehalten. Wieder ein anderer Teil wurde zur Bereitung einer Mischung von 50 ccm Trypsinlösung und 25 ccm Alb. verwendet. Diese Mischung wurde zunächst 2 Stunden bei 37° gehalten, damit die Einwirkung des Albumins auf das Trypsin stattfinden

konnte. Darauf wurde ein Teil dieser Mischung in der gleichen Weise mit Chloroform behandelt wie das Albumin. Schließlich wurden folgende Verdauungsflüssigkeiten bereitet.

- |    |           |          |                         |           |   |
|----|-----------|----------|-------------------------|-----------|---|
| 1. | 10 Tryps. | + 5 Alb. | nicht beh. mit Chlorof. | + 25 Cas. |   |
| 2. | 10        | > + 5    | > erh. auf 100°         | + 25      | > |
| 3. | 10        | > + 5    | > beh. mit Chlorof.     | + 25      | > |
| 4. | 15        | Mischung | nicht beh. mit Chlorof. | + 25      | > |
| 5. | 15        | >        | beh. mit Chlorof.       | + 25      | > |

2 Tage bei 37°; 20 Gerbsäure; 35 Filtrat.

Nr. 1.	1,6
> 2.	14,2
> 3.	14,2
> 4.	1,6
> 5.	1,5.

Es ist folglich zu ersehen, daß die hemmende Substanz ohne die Gegenwart von Trypsin vollkommen entkräftet wurde (Nr. 2, 3), aber nicht durch Chloroform beeinflusst wurde für den Fall, daß dessen Einwirkung auf Trypsin bereits stattgefunden hatte (Nr. 1, 4, 5). Dasselbe habe ich auch mit Globulinenzym vom Pferd und Albumin vom Rind nachweisen können:

100 ccm Glob. + 50 ccm Alb. wurde 1 Stunde bei 37° gehalten und filtriert. Ein Teil davon wurde mit 2 Volumen Chloroform 3 Stunden geschüttelt.

- |    |    |          |                           |           |                  |
|----|----|----------|---------------------------|-----------|------------------|
| 1. | 15 | Mischung | nicht beh. mit Chloroform | + 25 Cas. | + 1 NaOH 0,1 n   |
| 2. | 15 | >        | > > > > > erh.            | + 25      | > + 1 NaOH 0,1 n |
| 3. | 15 | >        | beh. mit Chlorof.         | + 25      | > + 1 NaOH 0,1 n |
| 4. | 15 | >        | > > > > > erh.            | + 25      | > + 1 NaOH 0,1 n |

4 Tage bei 37°; 25 Gerbsäure; 35 Filtrat.

Nr. 1.	4,15; red. Wert 2,15
> 2.	2
> 3.	4,1 ; > > 2,15
> 4.	1,95.

Die Enzymwirkung war also dieselbe, unabhängig davon, ob die Mischung von Glob. und Alb. mit Chloroform behandelt war oder nicht.

Der Rückstand, welcher nach der Verdunstung des bei der Behandlung des Albumins angewandten Äthers zurückbleibt, ist sehr gering. Wird dasselbe mit etwas Wasser und

einem Tropfen 0,1 n-NaOH angerührt, bildet sich eine Emulsion, aber trotz eifriger Bemühungen ist es mir nicht gelungen, mit Hilfe dieser Emulsion irgendwelche Hemmung der Trypsinwirkung zu erzielen, und überhaupt geben meine Extraktionsversuche keinen Aufschluß über die Natur der hemmenden Substanz.

In diesem Zusammenhang mag daran erinnert werden, daß nach meinen früheren Versuchen über diejenige Substanz in dem Serumalbumin, welche die Trypsinwirkung hemmt, diese Substanz ihr hemmendes Vermögen beim Behandeln mit schwacher Säure (0,2% Essigsäure bei 37°) verliert, daß aber dieses nicht eintritt, für den Fall, daß ein Gemenge von Trypsin und Albumin der Säurewirkung unterworfen wird und die hemmende Substanz also bei der Säurebehandlung bereits mit dem Trypsin verbunden ist.<sup>1)</sup> Ein solches Gemenge nimmt also weder bei der Behandlung mit Chloroform noch mit Säure an Trypsinwirkung zu. Anders verhält sich, wie ich auch gefunden habe, diejenige Substanz im Serum, welche das Kalbslab in seiner Wirkung hemmt. Diese Substanz verliert auch beim Behandeln mit Säure ihr Hemmungsvermögen, aber dies geschieht sowohl wenn die Substanz in freier Form zugegen ist, wie auch wenn dieselbe mit dem Lab bereits verbunden ist, und eine Lablösung, welche hemmende Substanz enthält, nimmt folglich bei vorsichtigem Behandeln mit Säure an labungs-erregendem Vermögen zu.<sup>2)</sup>

### 9. Zusammenfassung.

Die hauptsächlichsten Ergebnisse dieser Arbeit können kurz folgendermaßen angegeben werden:

1. Mit der Gerbsäuremethode geprüft, zeigt das Serum entweder keine oder eine sehr schwache Einwirkung auf Casein, aber eine unzweifelhafte Aufspaltung von Pepton.

2. Wenn das Serum mit  $\text{Am}_2\text{SO}_4$  fraktioniert wird, enthält die bei etwa  $\frac{1}{3}$  Sättigung ausfallende Globulinfraction

<sup>1)</sup> Biochem. Journ., Bd. 1, S. 474 (1906).

<sup>2)</sup> Diese Zeitschr., Bd. 60, S. 85 (1909).

primäre und sekundäre Protease, d. h. sie wirkt auf Casein und auf Pepton spaltend ein. Erstere Wirkungsfähigkeit kann nicht nachgewiesen werden nach dem Erhitzen des Serums auf  $56^{\circ}$  während 30 Minuten, wohl aber die letztere, obwohl stark geschwächt. Die zwischen  $\frac{1}{2}$  und voller Sättigung ausfallende Albuminfraktion enthält praktisch nur sekundäre Protease, d. h. sie wirkt wohl auf Pepton, aber nicht nennenswert auf Casein ein. Außerdem enthält die Albuminfraktion Substanzen, welche sowohl die Wirkung des Pankreastrypsins wie die der primären Protease der Globulinfraktion hemmen.

3. Die Wirkung dieser hemmenden Substanzen wird beim Behandeln des Albumins mit Chloroform oder Äther aufgehoben bzw. geschwächt. Wenn aber die hemmenden Substanzen auf die Enzyme bereits eingewirkt haben, ist eine nachfolgende Behandlung mit Chloroform wirkungslos.

---