

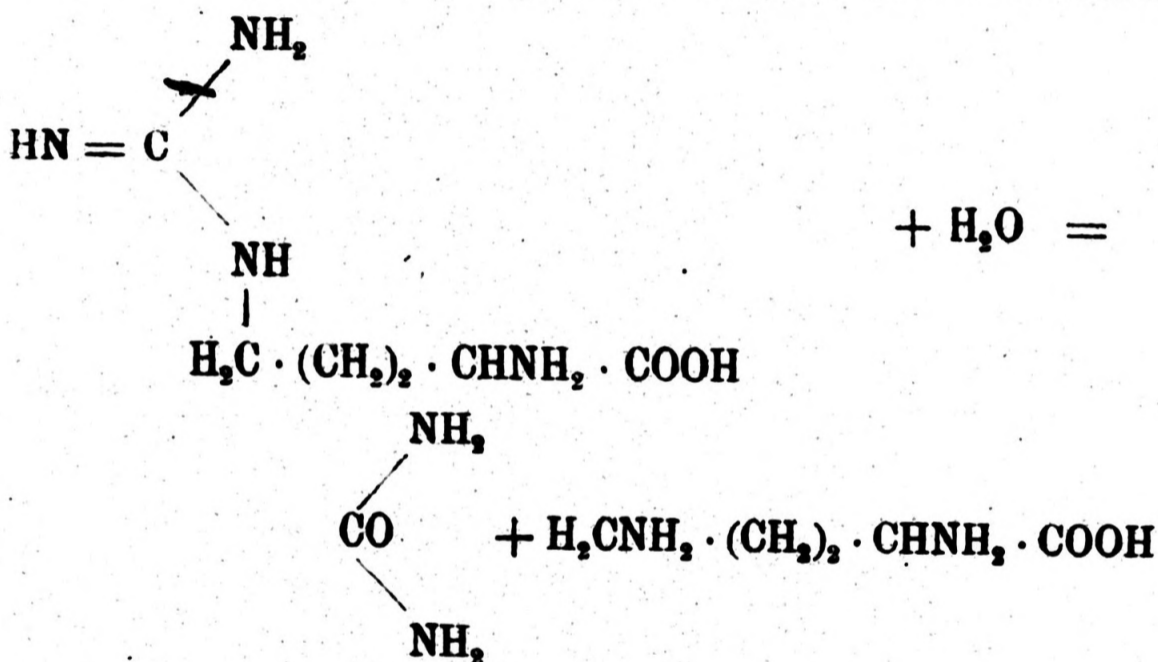
Über den Reaktionsverlauf bei Arginasewirkung.

Von

R. Eberhard Gross.

(Aus dem Institut für Eiweißforschung [Stiftung Behringer] der Universität Heidelberg.)
(Der Redaktion zugegangen am 21. Dezember 1920.)

Die von Kossel und Dakin¹⁾ entdeckte Spaltung des Arginins durch Arginase in Ornithin und Harnstoff



ist nach obenstehender Formel eine bimolekulare Reaktion. Wenn man aber mit Lösungen arbeitet, bei denen das Wasser in sehr großem Überschuss vorhanden ist, kann bei Hydrolysen bekanntlich die geringe Menge des chemisch verbrauchten Wassers gegenüber der großen Quantität des Lösungsmittels vernachlässigt werden. So ist anzunehmen, daß die Spaltung des Arginins durch die Arginase sich wie eine monomolekulare Reaktion verhält, und daß die für Reaktionen erster Ordnung aufgestellten Gleichungen der Reaktionsgeschwindigkeit auf sie anwendbar sind. Es müßte somit für die Arginasewirkung die Differentialformel gelten:

$$\frac{dx}{dt} = k(a - x),$$

¹⁾ Kossel und Dakin, Diese Zeitschr. Bd. 41, S. 321 (1904).

in der dx die in der unendlich kleinen Zeit dt umgesetzte Stoffmenge und a die ursprünglich vorhandene Menge der Substanz bedeutet. Durch Integration geht diese Gleichung in die der experimentellen Prüfung zugängliche Form

$$\frac{1}{t} \log \text{nat} \frac{a}{a-x} = \text{konst}$$

über.

Bei den folgenden Versuchen war die Aufgabe, die Anwendbarkeit dieser Formel auf die Arginasewirkung zu untersuchen.

Zur Beobachtung der allmählichen Spaltung des Arginins durch die Arginase diente die Formoltitration nach Sørensen¹⁾. Ich folgte dabei der von Jessen-Hansen in Abderhaldens Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden gegebenen Vorschrift. Von den 4 im Argininmolekül enthaltenen N-Atomen wird durch die Formoltitration nur das eine in der α -Aminogruppe enthaltene N-Atom angezeigt, was 25% des Gesamtstickstoffs nach Kjeldahl entspricht. Wird ein Molekül Arginin völlig in Ornithin und Harnstoff zerlegt, so reagieren nun von den 4 vorhandenen N-Atomen die beiden in der α - und δ -Aminogruppe des Ornithins, während der gebildete Harnstoff wie vorher die Guanidingruppe des Arginins keinen Stickstoff anzeigt. Man findet jetzt 50% des Gesamtstickstoffs bei der Formoltitration wieder. Bei völligem Abbau des Arginins steigt also der bei der Formoltitration gefundene Wert von 25 auf 50, bzw. von 1 auf 2. Für dazwischen liegende Werte läßt sich durch eine kleine Rechnung der prozentuale Abbau ohne weiteres feststellen. Bei Versuchen von Edlbacher²⁾, in denen dieser das Vorkommen oder Fehlen der Arginase in den verschiedenen Tierorganen nachwies und den Einfluß von fördernden und hemmenden Momenten bei deren Wirkung studierte, hatte sich die Formoltitration gut bewährt, und es lag auf der Hand, diese Methode auch bei den vorliegenden Beobachtungen der kinetischen Verhältnisse der Arginasewirkung anzuwenden. Bei stets gleichmäßiger Handhabung und genügender Übung in ihrer

¹⁾ Sørensen, Biochem. Zeitschr. Bd. 7, S. 43 (1907).

²⁾ Edlbacher, Diese Zeitschr. Bd. 95, S. 81 (1915) und Bd. 100, S. 111 (1917).

Anwendung kann man trotz ihrer nur beschränkten Genauigkeit Werte erwarten, die ein gutes Bild über die zeitlichen Verhältnisse der studierten Reaktion ergeben.

Es wurde mit einer Barytlösung titriert, von der 1 ccm 2,62 mg N entsprach.

Auch die Bestimmung des Aminostickstoffs nach D. van Slyke¹⁾ wurde versucht. Diese Methode, besonders in ihrem modernen Mikroverfahren, hätte den großen Vorteil geboten, daß mit wesentlich kleineren Mengen des kostbaren Arginins hätte gearbeitet werden können. Auch bei dieser Methode wird nur die α -Aminogruppe des Arginins angezeigt. Von den nach der Spaltung entstehenden Reaktionsprodukten gibt aber auch der Harnstoff nach der üblichen Schüttlungszeit von 20 Minuten geringe Mengen N an. Die gefundenen Werte waren entsprechend regelmäßig zu hoch. Nach Angaben von van Slyke soll der Harnstoff erst nach 2stündigem Schütteln mit salpetriger Säure seinen gesamten N anzeigen, also konstante Werte geben. Ein derartig langes Schütteln war bei Reihenversuchen, wie sie die Aufgabe erforderte, nicht möglich.

Das zu den Versuchen dienende d-Arginin stellte ich aus Arachin, dem Globulin von *Arachis hypogaea*, das nach Analysen von Johns und Breese Jones²⁾ 13,5 % Arginin enthält und sich nach den von mir gemachten Erfahrungen sehr gut als Ausgangsmaterial für die Arginingewinnung³⁾ eignet, nach dem bekannten Silber-Barytverfahren von Kossel und Kutscher⁴⁾ als Carbonat dar und verwandte es als Chlorid. Seine Reinheit prüfte ich durch Vergleich des nach Kjeldahl bestimmten Gesamtstickstoffs mit dem Formolstickstoff einer gleichgroßen Menge, die sich bei reinem Arginin wie 100 : 25 verhalten müssen. Auch die quantitative Bestimmung des Aminostick-

¹⁾ D. D. van Slyke, Journ. of Biol. Chem. Bd. 23, S. 407 (1915).

²⁾ C. O. Johns und D. Breese Jones. Journ. of Biol. Chem. Bd. 36, S. 491 (1918).

³⁾ Das Rohmaterial zur Gewinnung des Arachins verdanken wir dem lebenswürdigen Entgegenkommen der Bremen-Besigheimer Ölfabriken A.G. in Bremen, die uns Ölpreßkuchen der Erdnuß in dankenswerter Weise überließen.

⁴⁾ Kossel und Kutscher, Diese Zeitschr Bd. 31, S. 165 (1900/01).

stoffs nach van Slyke wurde hier zum Vergleich herangezogen.

Kjeldahl	5 ccm Argininchloridlösung	38,22 mg N = 100 %
Formoltitration	5 ccm "	9,17 mg N = 24 %
van Slyke	5 ccm ,	9,85 mg N = 25,8 %

Die kleine Abweichung bei der Formoltitration nach unten, und bei der Methode von van Slyke nach oben, liegen innerhalb der den beiden Methoden anhaftenden Fehlergrenzen. Nehmen wir aus beiden Zahlen das Mittel, so erhalten wir einen Wert, der uns die Sicherheit gibt, daß wir es mit reinem Arginin zu tun haben.

Die Arginase wurde aus 250 g ganz frischer Kalbsleber gewonnen, die durch die Hackmaschine getrieben und mit Kieselgur vermengt in der Buchnerschen Presse bei 300 Atmosphären Druck ausgepreßt wurden. Der Preßsaft wurde dann unter ständigem Rühren in die fünffache Menge Aceton in feinem Strahl eingegossen. Der gebildete Niederschlag blieb einige Stunden stehen, wurde dann auf der Nutsche abgesaugt, mit Aceton, Alkohol und Äther nachgewaschen und im Exsikkator getrocknet. Das getrocknete Präparat wurde fein zerrieben und jeweils eine Arginaselösung so hergestellt, daß auf 100 Teile Wasser 1 Teil Arginasepulver kam. Die Fermentlösung wurde immer am Abend vor einem Versuch angesetzt, über Nacht mit einigen Tropfen Toluol auf Eis gehalten und, da sich nicht alles Arginasepulver löst, kurz vor dem Versuch filtriert. Wo andere Mengenverhältnisse oder eine andere Darstellungsweise des Fermentes gewählt wurden, ist dies bei den betreffenden Versuchen erwähnt.

Ich wählte für die Versuche eine fast neutrale Reaktion, um der dem Säugerblut eigenen Wasserstoffionenkonzentration, für die von Hasselbalch und Lundsgaard¹⁾ ein Durchschnittswert von $[H^+]_{38,5^{\circ}} = 0,49 \cdot 10^{-7}$ angegeben wird, möglichst nahe zu kommen. Arginin sowie Arginaselösung wurden zu diesem Zweck vor ihrer Vermengung mit Benützung von Azolithminpapier gegen eine Sörensensche Phosphatmischung von gleichen molekularen Teilen prim. und sek. Phosphates

¹⁾ Hasselbalch u. Lundsgaard, Bioch. Zeitschr. Bd. 38, S. 77 (1912).

($[H^+]_{37.0} = 10^{-6.62}$) genau eingestellt. Die Temperatur war bei allen Versuchen durch einen Wasserthermostaten auf $37,2^\circ$ festgehalten und schwankte während der Dauer der einzelnen Versuche in keinem Falle um mehr als $\frac{2}{10}^\circ$. Um der gewählten Temperatur gleich vom ersten Momente des Versuches ab sicher zu sein, wurden die Lösungen vor ihrer Mischung entsprechend erwärmt.

Versuch 1.

Je 5 ccm Argininlösung, denen bei der Formoltitration 3,6 ccm Barytlauge entsprechen, + 5 ccm 1%ige Arginase-lösung werden unter Zugabe von 10 Tropfen Toluol in kleinen Erlenmeyerkölbchen bei $37,2^\circ$ gehalten¹⁾. Nach den jeweils angegebenen Zeiten kurzes Aufkochen und nach Abkühlung Formoltitration. Als Kontrolle bei der Titration dienen Kölbchen mit je 5 ccm Wasser und 5 ccm Fermentlösung, die ebenso wie die Proben behandelt werden. Aus der Menge der verbrauchten Barytlauge ist in jedem Falle nach der Gleichung $k = \frac{1}{t} \log \text{nat} \frac{a}{a-x}$ der Wert für k berechnet worden, wobei der Anfangswert $a = 100$ gesetzt wurde, so daß x die Argininzerersetzung in Prozent bedeutet.

Nr.	Zeit in Std.	Gebrauchte ccm Baryt- lösung	Arginin- zerersetzung in % = x	k	Anmerkungen
1	0	3,6	0	—	Fermentzusatz erst nach Zugabe von Formol, so daß Ferment unwirksam bleibt.
2					
3	$\frac{1}{4}$	3,8	5,6	0,239	—
4	$\frac{3}{4}$	4,1	13,8	0,198	—
5	$1\frac{1}{2}$	4,25	18,0	0,132	—
6	3	4,7	30,4	0,127	—
7	6	5,25	45,6	0,101	—
8	9	5,5	52,8	0,083	—
9	24	6,2	72,0	0,053	—
	24 + 2	6,3	75,0	—	Nach 24 Std. erneut Zu- satz von 5 ccm Ferment. Nach 2 Std. titriert.

¹⁾ In diesem und allen anderen Versuchen wurden die Kölbchen zug korkt.

Man ersieht aus Versuch 1, daß man für k keine Konstante erhält, sondern daß die erhaltenen Werte mit zunehmender Zeit dauernd fallen. Die Argininzerersetzung geht unter den gewählten Bedingungen in 24 Stunden nur bis 72%. Die an Stelle von k gefundene Veränderliche sinkt in diesem Zersetzungsreich unter $\frac{1}{4}$ ihres ersten Wertes. Weitere Zugabe von 5 ccm Ferment nach 24 Stunden steigert den ferneren Abbau in 2 Stunden nur auf 75%. Setzt man die nach 24 Stunden noch vorhandene Argininmenge (100%—72%) = 100, und berechnet, wieviel Prozent davon durch die 5 ccm neuen Fermentes in 2 Stunden abgebaut wurden, so ergibt sich ein Abbau von 10,5%, während zu Beginn des Versuches in $1\frac{1}{2}$ Stunden 18% des vorhandenen Arginins abgebaut wurden.

Versuch 2.

Zu Versuch 2 diente eine 2%ige Fermentlösung und eine Argininlösung, von der 5 ccm 4,3 ccm der Barytlösung entsprachen. Temp. 37.2. Die übrigen Bedingungen waren dieselben wie in Versuch 1.

Nr.	Zeit in Std.	Gebrauchte ccm Barytlösung	Argininzerersetzung in % = x	k	Anmerkungen
1	0	4,3	0	—	—
2	$\frac{1}{4}$	4,6	6,96	0,289	—
3	$\frac{1}{2}$	4,8	11,6	0,246	—
4	1	5,2	20,8	0,234	—
5	2	5,8	34,8	0,214	—
6	4	6,45	50,0	0,176	—
7	8	7,1	65,2	0,132	—
8	24	7,55	75,6	0,059	—
9	24 + $1\frac{1}{2}$	7,65	78,0	—	Nach 24 Std. Zugabe von 5 ccm neuen Fermentes. Titration nach $1\frac{1}{2}$ Std.
10	24 + $5\frac{1}{2}$	7,9	83,6	—	Wie bei 9. Titration nach $5\frac{1}{2}$ Std.

Auch hier erhalten wir keine Konstante, sondern beobachten ein dauerndes Fallen für k , das nach 24 Stunden ca. $\frac{1}{6}$

des ersten Wertes erreicht. Der Abbau ist nach 24 Stunden auch hier unvollkommen und nur bis zu 75,6% vorgeschritten. Neuer Zusatz von Ferment ergibt nach 1½ Stunden einen weiteren Abbau auf 78%, nach 5½ Stunden auf 83,6%. Setzen wir wieder wie bei Versuch 1 die nach 24 Stunden noch unversehrte Argininmenge (100%—75,6%) = 100, so erhalten wir Werte von 9,8% Abbau innerhalb 1½ Stunden, und von 32,8% innerhalb 5½ Stunden. Beide Werte bleiben hinter den entsprechenden zu Anfang des Versuches weit zurück.

Versuch 3.

Um festzustellen, ob das Ferment vielleicht schon allein durch 24stündiges Erwärmen auf die Temperatur von 37° in seiner Wirksamkeit beeinträchtigt wird, wurden in Versuch 3 5 ccm Argininlösung mit 5 ccm 1%iger ArginaseLösung, die aber vorher 24 Stunden auf 37° erwärmt worden waren, zusammengegeben und nach 1 Stunde titriert.

Nr.	Zeit in Std.	Gebrauchte ccm Baryt- lösung	Arginin- zersetzung in % = x
1	0	4,3	0
2	1	5,2	20,8

Da es sich um die gleiche Arginin- und Fermentlösung wie in Versuch 2 handelt, so können die beiden nach 1 Stunde gefundenen Werte hier und dort ohne weiteres miteinander verglichen werden. Ihre Gleichheit beweist, daß ein 24stündiges Erwärmen auf 37° die Wirksamkeit des Fermentes in keiner Weise beeinträchtigt.

In den bisherigen Versuchen war die Wasserstoffionen-konzentration des Reaktionsgemisches nicht durch Beifügung eines Puffers festgehalten, jedoch waren, wie schon eingangs erwähnt, Arginin- wie ArginaseLösung vor Beginn der Versuche gegen ein Sörensensches Phosphatgemisch 1:1 unter Anwendung von Azolithminpapier genau eingestellt worden. Vor Ausführung der Titration wurde die Reaktion jedesmal

geprüft, und innerhalb der Versuchsdauer von 24 Stunden eine merkliche Änderung der Reaktion nicht beobachtet. Um aber jeden Irrtum nach dieser Richtung auszuschließen, ist in dem folgenden Versuch 4 die Wasserstoffionenkonzentration durch Zugabe eines Sörensenschen Phosphatgemisches 1 : 1 fixiert. Da die Anwesenheit von Phosphaten die Formoltitration unmöglich macht, so muß die Phosphorsäure in jedem Falle vor der Titration quantitativ entfernt werden. Ich bin auch hier den Vorschriften von Jessen-Hansen in Abderhaldens Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden gefolgt.

Versuch 4.

Je 5 ccm Argininlösung, denen 4,3 ccm unserer Barytlauge entsprechen, werden mit 10 ccm eines $\frac{1}{15}$ mol. Phosphatgemisches 1 : 1 und 5 ccm einer 1%igen Fermentlösung versetzt. Die Kontrollen enthalten 5 ccm Wasser, 10 ccm Phosphatmischung und 5 ccm Ferment. Temp. 37,2.

Nr.	Zeit in Std.	Gebrauchte ccm Baryt- lösung	Arginin- zersetzung in % = x	k	Anmerkungen
1	0	4,3	0	—	—
2	2	5,7	32,4	0,196	—
3	4	6,0	39,2	0,124	—
4	8	6,75	56,8	0,105	—
5	24	7,25	68,4	0,046	—
6	24 + 2	7,4	72,0	—	Nach 24 Std. Zugabe von 5 ccm neuen Fermentes. Titration nach 2 Std.
7	24 + 4	7,75	80,0	—	Wie 6. Titration n. 4 Std.
8	24 + 6	7,9	84,0	—	Wie 6. Titration n. 6 Std.
9	24 + 8	7,9	84,0	—	Wie 6. Titration n. 8 Std.

Der Versuch 4 ergibt ein ganz ähnliches Resultat wie die vorhergehenden Versuche ohne Pufferbeigabe: keine Konstante, sondern fallende Werte für k und einen Abbau des Arginins innerhalb 24 Stunden nur bis zu 68,4%. Eine neue Zugabe von Ferment nach 24 Stunden steigert den Abbau in

6 Stunden auf 84%. Über diesen Wert hinaus geht die Reaktion nicht.

Versuch 5 sollte darüber Aufschluß geben, ob der Abbau des Arginins bei längerer Dauer der Fermenteinwirkung nicht doch noch höhere Werte erreicht. Um gleichzeitig sicher zu gehen, daß der bisher beobachtete mangelhafte Argininabbau nicht etwa durch eine Eigentümlichkeit des angewandten Arginasepräparates bedingt sei, wurde diesmal eine Froschleberbreisuspension verwendet, die folgendermaßen hergestellt war: 3,4 g ganz frische Froschleber wurden mit Quarzsand verrieben, in 30 ccm destilliertem Wasser aufgeschwemmt und nach den früher für die Fermentlösung gestellten Regeln neutralisiert. Von dieser Suspension kamen je 5 ccm zur Verwendung.

Versuch 5.

5 ccm Argininlösung, die 4,3 ccm Barytlauge entsprechen, + 5 ccm Froschlebersuspension + 10 Tropfen Toluol, je in kleinen Erlenmeyern bei 37,2°.

a)	Probe:	Kontrolle:
	5 ccm Argininlösung	5 ccm Wasser
	5 ccm Suspension	5 ccm Suspension
	<hr/>	<hr/>
	nach 40 Stunden titriert	
	8,6 ccm Barytlauge	0,7 ccm Barytlauge
	0,7 ccm "	
	<hr/>	
Diff.	7,9 ccm Barytlauge	
b)	Probe:	Kontrolle:
	5 ccm Argininlösung	5 ccm Wasser
	5 ccm Suspension	5 ccm Suspension
	<hr/>	<hr/>
	nach 6 Tagen titriert	
	8,6 ccm Barytlauge	0,7 ccm Barytlauge
	0,7 ccm "	
	<hr/>	
Diff.	7,9 ccm Barytlauge.	

Der gleichbleibende Wert von 7,9 ccm Barytlauge entspricht einem Argininabbau von 84%. Der mangelhafte Abbau ist also unabhängig von Art und Darstellungsweise des Fermentes.

Das Resultat der bisher geschilderten Versuche — Sinken

der für k berechneten Werte im Laufe der Reaktion, unvollständiger Abbau des Arginins auch bei längerer Einwirkung des Fermentes, verlangsamter und ebenfalls unvollkommener Fortgang der Reaktion bei Zugabe von frischem Ferment — läßt die Möglichkeit einer Fermenthemmung durch die Endprodukte Harnstoff und Ornithin zu. Die folgenden Versuche erörtern diese Möglichkeit.

Das zu den weiteren Versuchen benötigte *d*-Ornithin wurde aus *d*-Arginin, das dieselbe Herkunft wie das bisher verwendete hatte, durch 24stündige fermentative Spaltung mittels Kalbslebersuspension bei 37° gewonnen. Die Darstellung des Ornithins aus dem Reaktionsgemisch geschah durch Ausfällung mittels Phosphorwolframsäure und weitere Isolierung nach dem Vorgang von Herzog¹⁾ mit dem Kossel-Kutscherschen Silberbarytverfahren. Das Präparat wurde dann weiter als Pikrat gereinigt, nach Wiederholung des Silberbarytverfahrens als Carbonat gewonnen und, wie ursprünglich das Arginin, nach Neutralisation als Chlorhydrat angewandt.

1. Versuche, bei denen zu der Argininlösung vor der Zugabe des Fermentes Harnstoff zugesetzt wurde.

In Versuch 6 ist die Harnstoffzugabe so bemessen, daß von vornherein so viel Harnstoff zugegen ist, als bei vollkommenem Abbau des Arginins entstehen würde. In Versuch 7 sind nur $\frac{2}{3}$ der entsprechenden Menge zugesetzt. In Versuch 6 entsprechen 5 ccm Argininlösung 4,3 ccm Barytlösung, in Versuch 7 5 ccm der Argininlösung 4,8 ccm der Barytlösung. 1% Fermentlösung, je 10 Tropfen Toluol, Temperatur $37,2^{\circ}$.

Versuch 6.

a) Mit Harnstoffzugabe.

Probe:	Kontrolle:
5 ccm Argininlösung	5 ccm Wasser
5 ccm 1% ige Harnstofflösung	5 ccm Harnstofflösung
<u>5 ccm Fermentlösung</u>	<u>5 ccm Fermentlösung</u>

¹⁾ Herzog, Diese Zeitschr. Bd. 35, S. 525 (1901/02).

nach 24 Stunden titriert

Probe:

7,4 ccm Barytlösung

0,35 ccm

Kontrolle:

0,35 ccm Barytlösung

Diff. 7,05 ccm Barytlösung = 64% Abbau.

b) Ohne Harnstoffzugabe.

Probe:

5 ccm Argininlösung

5 ccm Wasser

5 ccm Fermentlösung

Kontrolle:

5 ccm Wasser

5 ccm Wasser

5 ccm Fermentlösung

nach 24 Stunden titriert

7,6 ccm Barytlösung

0,4 ccm

0,4 ccm Barytlösung

Diff. 7,2 ccm Barytlösung = 67,2% Abbau.

Versuch 7.

a) Mit Harnstoffzugabe.

Probe:

5 ccm Argininlösung

5 ccm Wasser

5 ccm 0,8%ige Harnstofflösung

5 ccm Fermentlösung

Kontrolle:

5 ccm Wasser

5 ccm Wasser

5 ccm 0,8%ige Harnstoff-
lösung

5 ccm Fermentlösung

nach 24 Stunden titriert

8,95 ccm Barytlösung

0,5 ccm

0,5 ccm Barytlösung

Diff. 8,45 ccm Barytlösung = 76% Abbau.

b) Ohne Harnstoffzugabe.

Probe:

5 ccm Argininlösung

10 ccm Wasser

5 ccm Fermentlösung

Kontrolle:

5 ccm Wasser

10 ccm Wasser

5 ccm Fermentlösung

nach 24 Stunden titriert

9,0 ccm Barytlösung

0,5 ccm

0,5 ccm Barytlösung

Diff. 8,5 ccm Barytlösung = 77,2% Abbau.

2. Versuche, bei denen zu der Argininlösung vor der Zugabe des Fermentes Ornithin zugesetzt wurde.

In Versuch 8 sind $\frac{2}{3}$ der Ornithinmenge zugesetzt, die bei völligem Abbau aus der angewandten Argininmenge entstehen würden, in Versuch 9 doppelt soviel als in Versuch 8. In beiden Versuchen entsprechen 5 ccm der angewandten Ornithinmenge 6,4 ccm der Barytlösung, 5 ccm der Argininlösung 4,8 ccm der Barytlösung. 1% Fermentlösung, je 10 Tropfen Toluol, Temperatur 37,2°.

Versuch 8.

a) Mit Ornithinzugabe.

Probe:	Kontrolle
5 ccm Argininlösung	5 ccm Wasser
5 ccm Ornithinlösung	5 ccm Ornithinlösung
5 ccm Wasser	5 ccm Wasser
<u>5 ccm Fermentlösung</u>	<u>5 ccm Fermentlösung</u>
nach 24 Stunden titriert	
14,35 ccm Barytlösung	6,7 ccm Barytlösung
<u>6,7 ccm</u> „	
Diff. 7,65 ccm Barytlösung = 59,2% Abbau.	

b) Ohne Ornithinzugabe.

Probe:	Kontrolle:
5 ccm Argininlösung	5 ccm Wasser
10 ccm Wasser	10 ccm Wasser
<u>5 ccm Fermentlösung</u>	<u>5 ccm Fermentlösung</u>
nach 24 Stunden titriert	
9,0 ccm Barytlösung	0,5 ccm Barytlösung
<u>0,5 ccm</u> „	
Diff. 8,5 ccm Barytlösung = 77,2% Abbau.	

Versuch 9.

a) Mit Ornithinzugabe.

Probe:	Kontrolle:
5 ccm Argininlösung	5 ccm Wasser
10 ccm Ornithinlösung	10 ccm Ornithinlösung
<u>5 ccm Fermentlösung</u>	<u>5 ccm Fermentlösung</u>

nach 24 Stunden titriert

Probe:

19,8 ccm Barytlösung

12,8 ccm

Diff. $7,0$ ccm Barytlösung = $45,6\%$ Abbau.

Kontrolle:

12,8 ccm Barytlösung

b) Ohne Ornithinzugabe.

Probe:

5 ccm Argininlösung

10 ccm Wasser

5 ccm Fermentlösung

nach 24 Stunden titriert

9,0 ccm Barytlösung

0,5 ccm

Diff. $8,5$ ccm Barytlösung = $77,2\%$ Abbau.

Kontrolle:

5 ccm Wasser

10 ccm Wasser

5 ccm Fermentlösung

0,5 ccm Barytlösung

In den beiden Versuchen ergibt sich eine starke Beeinträchtigung des Abbaus durch das zugesetzte Ornithin, die in Versuch 9 entsprechend der größeren Ornithinmenge noch wesentlich stärker hervortritt als in Versuch 8. Gegen diese starke Verminderung des Abbaus durch Ornithinzusatz kommt die minimale Beeinträchtigung von 1 bzw. 3% durch Harnstoffzusatz in Versuch 6 und 7 nicht in Betracht.

3. Versuche, bei denen zu der Argininlösung vor der Zugabe des Fermentes Harnstoff und Ornithin zugesetzt wurden.

In Versuch 10 wurden nur $13,4\%$ der Ornithinmenge, die bei völligem Abbau entstehen würde, dagegen die gesamte entsprechende Harnstoffmenge zugesetzt, in Versuch 11 je $\frac{2}{3}$ der möglichen Harnstoff- und Ornithinmenge. In Versuch 10 entsprechen 5 ccm Arginin 4,3 ccm der Barytlösung, 5 ccm Ornithin 1,15 ccm der Barytlösung, in Versuch 11 5 ccm Arginin 4,8 ccm der Barytlösung, 5 ccm Ornithin 6,4 ccm Barytlösung. 1% Fermentlösung, je 10 Tropfen Toluol, Temperatur $37,2^\circ$.

Versuch 10.

a) Mit Harnstoff- und Ornithinzugabe.

Probe:

5 ccm Argininlösung
 5 ccm Ornithinlösung
 5 ccm 1%ige Harnstofflösung
 5 ccm Fermentlösung

nach 24 Stunden titriert

8,2 ccm Barytlösung
 1,4 ccm "

Diff. 6,8 ccm Barytlösung = 58% Abbau.

Kontrolle:

5 ccm Wasser
 5 ccm Ornithinlösung
 5 ccm 1%ige Harnstofflösung
 5 ccm Fermentlösung

1,4 ccm Barytlösung

b) Ohne Harnstoff- und Ornithinzugabe.

Probe:

5 ccm Argininlösung
 5 ccm Fermentlösung

nach 24 Stunden titriert

7,6 ccm Barytlösung
 0,3 ccm "

Diff. 7,3 ccm Barytlösung = 69,6% Abbau.

Kontrolle:

5 ccm Wasser
 5 ccm Fermentlösung

0,3 ccm Barytlösung

Versuch 11.

a) Mit Harnstoff- und Ornithinzugabe.

Probe:

5 ccm Argininlösung
 5 ccm Ornithinlösung
 5 ccm 0,8%ige Harnstofflösung
 5 ccm Fermentlösung

nach 24 Stunden titriert

13,9 ccm Barytlösung
 6,5 ccm "

Diff. 7,4 ccm Barytlösung = 54% Abbau.

Kontrolle:

5 ccm Wasser
 5 ccm Ornithinlösung
 5 ccm 0,8%ige Harnstofflösg.
 5 ccm Fermentlösung

6,5 ccm Barytlösung

b) Ohne Harnstoff- und Ornithinzugabe.

Probe:

5 ccm Argininlösung
 10 ccm Wasser
 5 ccm Fermentlösung

Kontrolle:

5 ccm Wasser
 10 ccm Wasser
 5 ccm Fermentlösung

nach 24 Stunden titriert

Probe:
9,0 ccm Barytlösung
0,5 ccm

Kontrolle:
0,5 ccm Barytlösung

Diff. 8,5 ccm Barytlösung = 77,2% Abbau.

Versuch 8 (Ornithinzusatz allein) und Versuch 11 (Ornithin- und Harnstoffzusatz) lassen sich ohne weiteres miteinander vergleichen, da bei ihnen gleich viel Ornithin angewandt wurde und die Fermentlösung sowie die Argininlösung die gleichen waren. Es tritt dabei eine noch etwas deutlichere Hemmung der Arginasewirkung durch Ornithin + Harnstoff als durch Ornithin allein in die Erscheinung.

Zusammenfassung.

In vorstehenden Versuchen hat sich gezeigt, daß man bei Anwendung der für monomolekulare Reaktionen gültigen Formel $k = \frac{1}{t} \log \text{nat} \frac{a}{a-x}$ auf die Argininspaltung durch Arginase keine Konstante erhält, sondern an ihrer Stelle Werte, die mit der Dauer der Reaktion abnehmen. Diese Verhältnisse gelten bei der in den Versuchen gewählten $[H^+]_{37^\circ} = 10^{-6,92}$. Ich zweifle nicht an der Möglichkeit, daß sich bei der Wahl anderer Wasserstoffionenkonzentrationen und Temperaturen andere Verhältnisse ergeben, wollte mich aber auf die Anwendung einer Wasserstoffionenkonzentration, die der des Säugerblutes recht nahe liegt, beschränken.

In den Versuchen hat sich weiter ergeben, daß die fermentative Zerlegung des Arginins nicht zu Ende gelangt, sondern daß die Reaktion bei rund 70–85% Abbau stehen bleibt. Auch nach Zusatz von frischem Ferment geht die Reaktion nur in beschränktem Maße weiter und kommt bald zum Stillstand. Auch Edlbacher spricht in seiner eingangs zitierten Arbeit an einer Stelle, wo er Arginasewirkung beobachtet, nur von einem „fast“ vollkommenen Abbau. Und in den von ihm aufgeführten Tabellen findet sich in keinem Fall ein Abbau, der 100% erreichen würde. Seine Versuche sprechen also im gleichen Sinne.

Bei der Untersuchung, wie weit die bei der Reaktion gebildeten Endprodukte Harnstoff und Ornithin an der Beeinträchtigung der Reaktion schuld sind, fand sich, daß der Zusatz von Harnstoff allein die Reaktion nicht nennenswert beeinflußt, während ein Zusatz von Ornithin allein eine starke Herabsetzung des Abbaus verursacht. Diese Beeinträchtigung tritt noch etwas deutlicher hervor, wenn man beide Endprodukte zusammen einwirken läßt. Die Tatsache, daß von den beiden Reaktionsprodukten im wesentlichen nur das eine (Ornithin) hemmend wirkt, spricht meines Erachtens dafür, daß wir es bei dem Stillstand der Reaktion nicht mit der Erreichung eines echten chemischen Gleichgewichtes zu tun haben, sondern mit einem Endzustand (Tammann¹), bei dem vor Erreichung eines chemischen Gleichgewichtes das Ferment unwirksam wird.

* * *

Diese Arbeit habe ich auf Veranlassung von Herrn Prof. A. Kossel ausgeführt, und es ist mir eine angenehme Pflicht, ihm für die vielen Anregungen und Unterstützungen während der Arbeit an dieser Stelle meinen wärmsten Dank auszusprechen.

¹) G. Tammann, Diese Zeitschrift Bd. 16, S. 271 (1891).