

Über die Einwirkung von proteolytischen Fermenten auf Protamine.

Von

Dr. M. Takemura aus Tokyo.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Heidelberg.)

(Der Redaktion zugegangen am 2. Oktober 1909.)

Seitdem durch die Arbeiten von A. Kossel die Grundzüge des chemischen Baus der Protamine bekannt geworden sind, hat auch die Frage nach dem Verhalten dieser Körper zu den proteolytischen Fermenten ein erneutes Interesse gewonnen. Manche Protamine enthalten bekanntlich nur 5—6 Eiweißbausteine, sie bieten also einfachere und günstigere Bedingungen für das Studium der Angriffsweise proteolytischer Fermente als die komplizierteren Proteinstoffe, die man bisher gewöhnlich benutzt hat.

Von den Dipeptiden und Polypeptiden, deren Verwendbarkeit für die Untersuchung der Fermentwirkungen von E. Fischer und Bergell,¹⁾ E. Fischer und E. Abderhalden,²⁾ E. Abderhalden und seinen Mitarbeitern³⁾ dargetan ist, unterscheiden sie sich u. a. dadurch, daß sie dem Ferment solche Atomgruppierungen als Angriffspunkte darbieten, wie sie in den bisher benutzten synthetischen Amidosäureverbindungen nicht enthalten sind. Sie geben die Möglichkeit, das Verhalten der Arginidverkettung zu den proteolytischen Fermenten zu untersuchen.

¹⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXVI, S. 2592 (1903).

²⁾ Ebenda, Bd. XXXVII, S. 3103 (1904).

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLVI, S. 52 u. viele folgende Abhandlungen.

Ich habe daher auf den Vorschlag und unter Leitung des Herrn Professor A. Kossel einige vorläufige Versuche in dieser Richtung unternommen.

Die früheren Arbeiten von A. Kossel und A. Mathews hatten ergeben, daß das Salmin von Pepsinsalzsäure nicht angegriffen wird, während das Trypsin bei den Protaminen, speziell beim Sturin schnell eine Zerlegung herbeiführt, die ähnlich verläuft wie bei den komplizierteren Proteinstoffen. «Nach diesen Ergebnissen» — so äußerten sich die beiden Autoren im Jahre 1898¹⁾ — «erscheint die Wirkung des Trypsins auf die Protamine als ein Analogon der Wirkung diastatischer Fermente. Ebenso wie die letzteren die Polysaccharide in Hexosen und zum Teil auch in Hexobiosen zerlegen, erfolgt unter der Wirkung des Trypsins eine Aufspaltung der einfachsten Eiweißstoffe, indem Hexone gebildet werden. Bei den komplizierteren Eiweißsubstanzen — den Eiweißkörpern im gewöhnlichen Sinne des Worts — ist die Wirkung die gleiche, doch werden hier zugleich mit der Sprengung des Protamin-kerns noch Leucin, Tyrosin, Asparaginsäure und andere Atomgruppen frei».

Untersuchungsmethode.

Nach dem Vorgange von Hirschler, welcher zuerst die Phosphorwolframsäurefällung in der später so viel benutzten Kombination mit der Kjeldahlschen Methode anwandte, um die Einwirkung von Pepsin und Trypsin quantitativ zu untersuchen,²⁾ ist diese Säure häufig zur Prüfung des Verlaufs der Proteolyse angewandt worden. Für den vorliegenden Zweck war sie jedoch nicht geeignet, da die aus Protamin entstehenden Spaltungsprodukte zum größten Teil Basen sind, welche durch dies Reagens ebenso wie ihre Muttersubstanz niedergeschlagen werden. Ich verwandte daher die von S. G. Hedin³⁾ ausgearbeitete Fällungsmethode mit Gerbsäure, welche wohl

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXV, S. 194 (1898).

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XI, S. 25 (1886).

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXII, S. 341; Bd. LII, S. 412.

das Protamin, aber unter den von mir angewandten Versuchsbedingungen nicht das Arginin niederschlägt. Die Einwirkung des Fermentes gibt sich also dadurch zu erkennen, daß die Menge der durch Gerbsäure nicht fällbaren Proteinderivate zunimmt. Leider ist aber auch diese Methode, die beim Casein ausgezeichnete Resultate ergeben hat, für das Clupein nicht einwandfrei. Denn eine gewisse Menge des Clupeins scheint der Gerbsäurefällung zu entgehen. Auch sind die Bedingungen, welche die Fällbarkeit der Protamine durch Gerbsäure beeinflussen, noch nicht hinreichend bekannt. Immerhin ist es möglich, das Fortschreiten der Hydrolyse zu verfolgen, indem man die Zahlen der durch Gerbsäure nicht fällbaren Substanz, welche sich zu verschiedenen Zeiten nach Beginn der Fermentwirkung ergeben, untereinander vergleicht.

Die Versuche wurden im allgemeinen in der Weise angestellt, daß eine bestimmte Menge der Enzymlösung mit einer genau gemessenen Menge einer Clupeinlösung, deren Stickstoffgehalt bekannt war, unter Zusatz von Chloroform und Toluol vermischt wurde. Längere oder kürzere Zeit nach der Mischung wurde in dem Gemisch der Stickstoff der durch Gerbsäure nicht fällbaren Substanz bestimmt, indem die Enzym-Clupeinmischung¹⁾ mit dem gleichen Volumen der Gerbsäuremischung versetzt und filtriert wurde. Eine abgemessene Menge des Filtrats diente zur Kjeldahl-Bestimmung. Diese Bestimmung wurde in gewissen Zeiträumen nach dem Verweilen im Brutofen wiederholt. Die Resultate sind in Stab c) der folgenden Tabellen angegeben. Außerdem wurde durch besondere Versuche festgestellt, wieviel von dem Stickstoff der Fermentlösung der durch Gerbsäure nicht fällbaren Substanz angehört und wie sich diese Zahl bei der Digestion im Brutofen unter gleichen Bedingungen wie im Hauptversuch ändert — Stab b) der Tabelle. Durch Subtraktion dieser Zahl von der in Stab c) enthaltenen ergibt sich die Änderung in der Zusammensetzung der Clupeinlösung — Stab d) und e) der Tabelle. Die Zahlen in den Stäben b), c), d), e) geben die Anzahl Kubikzentimeter

¹⁾ 70 g Gerbsäure, 100 g Kochsalz, 50 ccm Eisessig im Liter (Hedin).

n_{10} -Säure an, welche bei den Kjeldahl-Bestimmungen verbraucht wurden, die Zahlen des Stabes f) geben den Stickstoff der durch Gerbsäure nicht fällbaren Spaltungsprodukte des Clupeins in Prozenten des Gesamtstickstoffs des dem Versuch unterworfenen Clupeins.

Versuche mit pepsinhaltigen Flüssigkeiten.

Zu den Versuchen diente 1. ein salzsaures Extrakt der gereinigten Schweinemagenschleimhaut, 2. Magen fistelsaft des Hundes und 3. ein käufliches Pepsinpräparat, welche in der ersten Versuchsreihe bei Gegenwart von Salzsäure auf Clupein einwirkten.

Ich gebe zunächst die bei Einwirkung des Schleimhaut-extraktes gewonnenen Zahlen.

Versuch 1.

Einwirkung eines salzsauren Extraktes der gereinigten Schleimhaut des Schweinemagens auf Clupeinchlorhydrat.

Die Stickstoffmenge in 2,5 ccm der Clupeinlösung entspricht 6,08 ccm n_{10} -Säure (Kjeldahl-Bestimmung). 1 Vol. der Pepsinlösung mit 2 Vol. Clupeinlösung gemischt.

a) Versuchst- tage	Durch Gerbsäure nicht fällbarer Stickstoff in Kubik- zentimetern n_{10} -Säure				
	b) in 1,67 ccm Pepsin- lösung	c) in 5 ccm der Pepsin- Clupein- mischung	d) in 3,33 ccm der Clupein- lösung	e) in 2,5 ccm der Clupein- lösung	f) in Pro- zenten des Clupein- stickstoffs
1	1,25	3,08	1,83	1,38	23,0
2	1,43	3,18	1,75	1,31	21,6
3	1,50	3,18	1,68	1,27	21,0
5	1,48	3,33	1,85	1,39	23,0

In diesem Versuch ist eine Zunahme des durch Gerbsäure nicht fällbaren Stickstoffs unter der Einwirkung des

Pepsins nicht bemerkbar, obgleich das enzymhaltige Extrakt eine starke fibrinlösende Wirkung besaß.

Das gleiche Resultat ergab sich bei der Untersuchung des Fistelsaftes, der ebenfalls kräftig fibrinlösend wirkte.

Versuch 2.

Einwirkung eines Fistelmagensaftes vom Hunde auf Clupeinacetat.

Die Stickstoffmenge in 2,5 ccm der Clupeinacetatlösung entspricht 5,81 ccm n_{10} -Säure (Kjeldahl-Bestimmung). Magensaft und Clupeinlösung zu gleichen Teilen vermischt.

a) Versuchst- tage	Durch Gerbsäure nicht fällbarer Stickstoff in Kubik- zentimetern n_{10} -Säure			
	b) in 2,5 ccm Fistelsaft	c) in 5 ccm Mischung	e) in 2,5 ccm Clupein- lösung	f) in Prozenten des Clupeinstickstoffs
1	0,75	2,08	1,33	22,9
2	0,90	2,48	1,58	27,2
3	1,08	2,50	1,42	24,4
5	1,10	2,63	1,53	26,7

Die Zunahme der nicht fällbaren Stoffe ist in diesem Versuch sehr gering und wenn überhaupt eine Zersetzung stattgefunden hat, kann diese nur eine minimale gewesen sein.

Diese Resultate stimmen also mit den früheren Ergebnissen von A. Kossel und A. Mathews überein, ebenso befinden sie sich im Einklang mit Versuchen, welche Herr Dr. Makita im hiesigen Institut angestellt hat. Um so auffälliger war der Ausfall des Versuches mit käuflichem Pepsin.

Versuch 3.

Einwirkung käuflichen Pepsins auf Clupeinchlorhydrat bei Gegenwart von Salzsäure.

Die Stickstoffmenge in 2,5 ccm der Clupeinchloridlösung entspricht 5,05 ccm n_{10} -Säure (Kjeldahl-Bestimmung). Pepsinlösung und Clupeinlösung zu gleichen Teilen vermischt.

a) Versuchst- tage	Durch Gerbsäure nicht fällbarer Stickstoff in Kubik- zentimetern n_{10} -Säure			
	b) in 2,5 ccm Pepsinlösung	c) in 5 ccm Mischung	e) in 2,5 ccm Clupein- lösung	f) in Prozenten des Clupeinstickstoffs
1	0,30	1,68	1,38	27,3
2	0,34	1,95	1,61	31,9
3	0,36	2,08	1,72	34,1
4	0,34	2,30	1,96	38,0

Hier ist offenbar eine Zunahme des nicht fällbaren Stickstoffs vorhanden. Dieses unsern ersten Beobachtungen widersprechende Ergebnis erinnert an frühere Versuche von Malfatti,¹⁾ nach welchen einzelne Pepsinpräparate die Tryptophanbildung aus Eiweiß hervorrufen, andere nicht. Sehr nahelegend ist die Vermutung, daß in Pepsinlösungen gelegentlich neben dem Pepsin ein zweites Ferment vorhanden ist, dessen Wirkung eine tiefgreifende ist. Ich erinnere auch an die Befunde von Abderhalden und Rona,²⁾ nach deren Versuchen gewisse käufliche Pepsinpräparate nach kurzer Zeit Tryptophan und Amidosäuren aus Casein in Freiheit setzen, während dies bei reinem Hundemagensaft nicht der Fall ist. Seit den Untersuchungen von Hahn und Geret³⁾ sowie von S. G. Hedin⁴⁾ und seinen Schülern kennen wir eine Gruppe derartiger Enzyme, deren Wirkungsoptimum — im Gegensatz zum Trypsin — in saurer Lösung liegt. Als Prototyp derselben kann die Lieno- β -Protease gelten, welche nach J. B. Leathes⁵⁾ die Eiweißstoffe ebenso tiefgreifend spaltet, wie das Trypsin. Nun haben diese Enzyme gegenüber dem Pepsin die Eigentümlichkeit, daß ihre Wirkung bei Gegenwart von organischen Säuren ebenso kräftig ist wie bei Gegenwart der äquivalenten

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXI, S. 43 (1900).

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLVII, S. 360 (1906).

³⁾ Zeitschrift f. Biologie, Bd. XL, S. 117 (1900).

⁴⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXII, S. 341 (1901), und S. 530 (1901).

⁵⁾ Journal of physiology, Bd. XXVIII, S. 360 (1902).

Menge Salzsäure. Es schien mir daher interessant, die Wirkung dieser Fermentlösungen auf Clupein bei Gegenwart von Essigsäure festzustellen. Hierbei zeigten sich nun aber Ergebnisse, welche ich vorläufig nicht alle zu erklären vermag. Das käufliche Pepsin, welches bei Gegenwart von Salzsäure eine Hydrolyse hervorrief, wirkte bei Gegenwart der äquivalenten Menge Essigsäure nicht oder nur in geringem Grade (Versuche 3 und 4). Das Extrakt der Magenschleimhaut war weder in salzsaurer noch in essigsaurer Lösung erheblich wirksam (Versuche 1 und 5). Der Fistelmagensaft des Hundes hingegen, der in salzsaurer Lösung nur eine sehr geringe Zersetzung des Clupeins herbeigeführt hatte (Versuch 2), wirkte in essigsaurer Lösung recht kräftig (Versuch 6).

Versuch 4.

Einwirkung käuflichen Pepsins auf Clupeinacetat bei Gegenwart von Essigsäure.

Die Stickstoffmenge in 2,5 ccm der Clupeinacetatlösung entspricht 5,80 ccm n_{10} -Säure (Kjeldahl-Bestimmung). Pepsinlösung und Clupeinlösung zu gleichen Teilen vermischt.

a) Versuchst- tage	Durch Gerbsäure nicht fällbarer Stickstoff in Kubik- zentimetern n_{10} -Säure			
	b) in 2,5 ccm Pepsinlösung	c) in 5 ccm Mischung	e) in 2,5 ccm Clupein- lösung	f) in Prozenten des Clupeinstickstoffs
1	0,30	1,50	1,20	20,7
2	0,34	1,50	1,16	20,0
3	0,36	1,70	1,34	23,1
4	0,34	1,78	1,44	24,8

Versuch 5.

Das Extrakt der Schweinemagenschleimhaut wurde zuerst neutralisiert, dann Essigsäure zugefügt, bis ihr Gehalt in der Flüssigkeit 0,25% entsprach.

Die Stickstoffmenge in 2,5 ccm Clupeinchloridlösung ent-

spricht 6,08 ccm n_{10} -Säure (Kjeldahl-Bestimmung). 1 Vol. des Schweinemagensaftes mit 2 Vol. Clupeinlösung gemischt.

a) Versuchst- tage	Durch Gerbsäure nicht fällbarer Stickstoff in Kubik- zentimetern n_{10} -Säure				
	b) in 1,67 ccm Magen- saft	c) in 5 ccm der Magensaft- Clupein- mischung	d) in 3,33 ccm der Clupein- lösung	e) in 2,5 ccm der Clupein- lösung	f) in Pro- zenten des Clupein- stickstoffs
1	1,25	2,63	1,38	1,05	17,3
2	1,43	3,00	1,57	1,19	19,6
3	1,50	3,05	1,55	1,17	19,2
5	1,48	3,28	1,80	1,36	22,4

Versuch 6.

Einwirkung des Magenfistelsaftes vom Hund auf Clupeinacetat
in essigsäurem Medium.

Die Stickstoffmenge in 2,5 ccm der Clupeinacetatlösung ent-
spricht 6,05 ccm n_{10} -Säure (Kjeldahl-Bestimmung). Magen-
fistelsaft und Clupeinlösung zu gleichen Teilen vermischt.

a) Versuchst- tage	Durch Gerbsäure nicht fällbarer Stickstoff in Kubik- zentimetern n_{10} -Säure			
	b) in 2,5 ccm Magen- fistelsaft	c) in 5 ccm Mischung	e) in 2,5 ccm Clupein- lösung	f) in Prozenten des Clupeinstickstoffs
1	0,68	1,53	0,85	14,1
2	0,68	3,05	2,37	39,2
3	0,75	3,58	2,83	46,8
5	0,70	3,95	3,25	53,7

Es ergibt sich also aus diesen Versuchen, daß die Pepsin-
salzsäure in den meisten Fällen keine Zersetzung des Protamins
herbeigeführt hatte, daß jedoch bei zwei Versuchen (Vers. 3
und 6) eine Umwandlung des Protamins zu beobachten war.

Trypsin.

Dieser Versuch wurde ausgeführt, um festzustellen, in welcher Weise sich die von A. Kossel und A. Mathews bereits früher beobachtete Zerlegung der Protamine durch Trypsin bei dem Gerbsäureverfahren zu erkennen gibt. Aus der folgenden Tabelle ist zu ersehen, daß das von mir benutzte Verfahren in diesem Falle eine fast völlige Zersetzung anzeigt.

Versuch 7.

Einwirkung kühflichen Trypsins auf Clupeinacetat in 0,25%iger Na₂CO₃-Lösung.

Die Stickstoffmenge in 2,5 ccm der Clupeinacetatlösung entspricht 5,82 ccm ⁿ/₁₀-Säure (Kjeldahl-Bestimmung). Trypsinlösung und Clupeinlösung zu gleichen Teilen vermischt.

a) Versuchst- age	Durch Gerbsäure nicht fällbarer Stickstoff in Kubik- zentimetern ⁿ / ₁₀ -Säure			
	b) in 2,5 ccm Trypsin- lösung	c) in 5 ccm Mischung	e) in 2,5 ccm Clupein- lösung	f) in Prozenten des Clupeinstickstoffs
1	0,7	2,03	1,33	22,9
2	0,7	6,13	5,43	93,3
3	0,7	6,13	5,43	93,3
6	0,7	6,08	5,38	92,4

Lieno-β-protease (Hedin).

Die Wirkung dieses Ferments auf Protamin ist bisher noch nicht untersucht worden. Zur Darstellung der Lieno-β-Protease aus der Milz vom Rind benutzte ich das von Hedin angegebene Verfahren. Die Versuche in salzsaurer und essigsaurer Lösung führten zu folgenden Resultaten:

Versuch 8.

Einwirkung der Lieno-β-protease auf Clupeinacetat in essigsauerm Medium (0,2%).

Die Stickstoffmenge in 2,5 ccm der Clupeinacetatlösung entspricht 5,82 ccm ⁿ/₁₀-Säure (Kjeldahl-Bestimmung). Lieno-β-proteaselösung und Clupeinlösung zu gleichen Teilen vermischt.

a) Versuchst- tage	Durch Gerbsäure nicht fällbarer Stickstoff in Kubik- zentimetern n_{10} -Säure			
	b) in 2,5 ccm Lieno- β -pro- teaselösung	c) in 5 ccm Mischung	c) in 2,5 ccm Clupein- lösung	f) in Prozenten des Clupeinstickstoffs
1	0,58	1,38	0,80	13,8
2	2,38	3,70	1,32	22,8
3	2,45	4,28	1,83	31,4
6	2,60	4,80	2,20	38,0

Versuch 9.

Einwirkung der Lieno- β -protease auf Clupeinchlorid im salzsauren Medium (0,1%).

Die Stickstoffmenge in 2,5 ccm Clupeinchloridlösung entspricht 5,05 ccm n_{10} -Säure (Kjeldahl-Bestimmung). Lieno- β -proteaselösung und Clupeinlösung zu gleichen Teilen vermischt.

a) Versuchst- tage	Durch Gerbsäure nicht fällbarer Stickstoff in Kubik- zentimetern n_{10} -Säure			
	b) in 2,5 ccm Lieno- β -pro- teaselösung	c) in 5 ccm Mischung	c) in 2,5 ccm Clupein- lösung	f) in Prozenten des Clupeinstickstoffs
1	0,35	1,05	0,70	13,9
2	0,43	1,09	0,66	13,1
3	0,43	1,13	0,70	13,9
5	0,45	1,35	0,90	17,8

Bei Gegenwart von Essigsäure hatte eine kräftige Zersetzung des Clupeins stattgefunden, in dem Salzsäureversuch war das Resultat ein undeutliches und zweifelhaftes.

Hefepreßsaft.

Auch über die Wirkung des in der Hefe vorhandenen proteolytischen Enzyms auf Protamine lagen bisher keine Beobachtungen vor. Ich benutzte zur Gewinnung des Preßsaftes Getreidepreßhefe und ließ den Saft bei Gegenwart von Citronensäure, Phosphorsäure und Salzsäure auf Clupein einwirken.

Versuch 10.

Einwirkung des Hefepreßsaftes auf Clupeinacetat in citronensaurem Medium (0,2%).

Der Hefepreßsaft hatte vor dem Versuch 24 Stunden lang im Brutofen gestanden.

Die Stickstoffmenge in 2,5 ccm der Clupeinacetatlösung entspricht 6,03 ccm n_{10} -Säure (Kjeldahl-Bestimmung).

a) Versuchst- tage	Durch Gerbsäure nicht fällbarer Stickstoff in Kubik- zentimetern n_{10} -Säure				
	b) in 1,67 ccm Preßsaft	c) in 5 ccm Mischung	d) in 3,33 ccm der Clupein- lösung	e) in 2,5 ccm der Clupein- lösung	f) in Pro- zenten des Clupein- stickstoffs
1	6,08	6,65	0,57	0,43	7,1
2	6,68	7,40	0,72	0,54	9,0
3	6,63	7,80	1,27	0,95	15,8
5	6,55	8,75	2,20	1,65	27,4

Versuch 11.

Einwirkung des Hefepreßsaftes auf Clupeinacetat in phosphorsaurem Medium (0,2%).

Der Preßsaft hatte vorher 24 Stunden lang im Brutofen gestanden.

Die Stickstoffmenge in 2,5 ccm der Clupeinacetalösung entspricht 6,05 ccm n_{10} -Säure (Kjeldahl-Bestimmung).

a) Versuchst- tage	Durch Gerbsäure nicht fällbarer Stickstoff in Kubik- zentimetern n_{10} -Säure				
	b) in 1,67 ccm Preßsaft	c) in 5 ccm Mischung	d) in 3,33 ccm Clupein- lösung	e) in 2,5 ccm Clupein- lösung	f) in Pro- zenten des Clupein- stickstoffs
1	5,05	5,23	0,18	0,14	2,2
2	5,30	6,25	0,95	0,75	12,4
3	5,35	7,08	1,73	1,27	21,0
5	5,30	7,48	2,18	1,64	27,1

Versuch 12.

Einwirkung des Hefepreßsaftes auf Clupeinacetat in salzsaurem Medium (0,15%).

Der Preßsaft hatte 24 Stunden lang im Brutofen gestanden.

Die Stickstoffmenge in 2,5 ccm der Clupeinacetatlösung entspricht 5,90 ccm $n/10$ -Säure (Kjeldahl-Bestimmung).

a) Versuchst- age	Durch Gerbsäure nicht fällbarer Stickstoff in Kubik- zentimetern $n/10$ -Säure				
	b) in 1,67 ccm Preßsaft	c) in 5 ccm Mischung	d) in 3,33 ccm Clupein- lösung	e) in 2,5 ccm Clupein- lösung	f) in Pro- zenten des Clupein- stickstoffs
1	5,50	5,48	0	0	—
2	5,58	6,45	0,87	0,65	11,0
3	5,50	6,48	0,98	0,74	12,5
5	5,50	7,10	1,60	1,20	20,3

Es ergab sich in allen drei Fällen eine Wirkung, die jedoch bei Gegenwart von Salzsäure geringer, bei Gegenwart von Citronensäure und Phosphorsäure deutlicher ausgeprägt war.

Es ist aber nicht angängig, aus diesen Versuchen allgemeinere Schlüsse bezüglich der Wirkungsweise dieser Säuren abzuleiten. Dazu ist die Zusammensetzung der betreffenden Flüssigkeiten (Preßsäfte, Organextrakte) zu wenig bekannt und offenbar wird die Wirkungsweise der verschiedenen Säuren erst durch Feststellung der Ionenkonzentration aufzuklären sein.

Während mit den Hefepreßsäften eine unzweifelhafte Vermehrung der durch Gerbsäure nicht fällbaren Stoffe nachgewiesen wurde, gelangte ich bei Anwendung eines Extrakts von «Zymin» nicht zu einem positiven Ergebnis. Bei diesen Versuchen war die Vermehrung der durch Hedins Reagens nicht fällbaren stickstoffhaltigen Bestandteile so gering, daß sie in das Bereich der Versuchsfehler fiel, und zwar zeigte sich dies sowohl bei der Wirkung auf Clupein wie auf Sturin.

Papayotin.

Endlich fand ich ein ziemlich kräftiges Enzym in dem käuflichen Papayotin, welches, wie die folgenden Tabellen zeigen, sowohl in essigsaurer, wie in neutraler Lösung schnell eine partielle Zerlegung des Clupeins herbeiführt.

Versuch 13.

Einwirkung von Papayotin auf Clupeinacetat in essigsauerm Medium (0,2%).

Die Stickstoffmenge in 2,5 ccm der Clupeinacetatlösung entspricht 6,05 ccm n_{10} -Säure (Kjeldahlbestimmung).

Papayotinlösung und Clupeinlösung in gleichen Teilen vermischt.

a) Versuchst- tage	Durch Gerbsäure nicht fällbarer Stickstoff in Kubik- zentimetern n_{10} -Säure			
	b) in 2,5 ccm Papayotin- lösung	c) in 5 ccm Mischung	e) in 2,5 ccm Clupein- lösung	f) in Prozenten des Clupeinstickstoffs
1	4,43	5,68	1,25	20,7
2	4,73	7,50	2,77	45,8
3	4,83	7,78	2,95	48,8
5	5,05	7,75	2,70	44,6

Versuch 14.

Einwirkung von Papayotin auf Clupeinacetat in neutralem Medium.

Die Stickstoffmenge in 2,5 ccm der Clupeinacetatlösung entspricht 6,03 ccm n_{10} -Säure (Kjeldahlbestimmung).

Papayotinlösung und Clupeinlösung zu gleichen Teilen vermischt.

a) Versuchst- tage	Durch Gerbsäure nicht fällbarer Stickstoff in Kubik- zentimetern $\frac{n}{10}$ -Säure			
	b) in 2,5 ccm Papayotin- lösung	c) in 5 ccm Mischung	e) in 2,5 ccm Clupein- lösung	f) in Prozenten des Clupeinstickstoffs
1	3,90	4,18	0,28	4,6
2	4,20	6,48	2,28	37,8
3	4,13	6,73	2,60	43,1
5	4,25	6,75	2,50	41,3

Die obigen Untersuchungen lassen eine Tatsache sehr deutlich hervortreten: nämlich die Existenz einer Reihe von Enzymen (« β -Proteasen»), die in schwachsaurer Lösung eine partielle Zerlegung der Protamine, wie der komplizierteren Proteinstoffe) bewirken. Zu diesen gehören die «Lieno- β -Protease» (Hedins), die «Endotryptase» (Hahn und Geret), sowie das Papayotin. Die Wirkung des Pepsins, die sich in einzelnen Fällen und nur in geringerem Maße zu erkennen gab, ist wahrscheinlich auf beigemischte β -Proteasen zurückzuführen.