

Beitrag zur Technik des Nachweises intracellulärer Fermente.

Von

Emil Abderhalden und Hans Pringsheim.

(Aus dem physiologischen Institute der tierärztlichen Hochschule und dem chemischen Institute der Universität zu Berlin.)

(Der Redaktion zugegangen am 15. Februar 1910.)

Für den Nachweis intracellulärer Fermente besitzen wir zurzeit im wesentlichen nur zwei Methoden, einmal die Verfolgung des Abbaus bestimmter Verbindungen durch autolytische Prozesse und zweitens die Darstellung von Preßsäften aus Geweben. Die erstere Methode hat manche Nachteile. Sie ist im allgemeinen vor allem nicht zu quantitativen Versuchen geeignet, weil bei der Autolyse ein ausgedehnter Abbau der verschiedenartigsten Substanzen stattfindet und die mannigfachsten Prozesse nebeneinander herlaufen. Eine bedeutend elegantere und übersichtlichere Methodik ergibt die Verwendung von nach der Methode von E. Buchner dargestellten Preßsäften. Die meist wenig gefärbten, klaren Lösungen gestatten auch eine Verfolgung ihrer Einwirkung auf optisch-aktive, resp. racemische Verbindungen. Im Laufe einer großen Reihe von Untersuchungen hat sich nun herausgestellt, daß die in üblicher Weise durch Verreiben von Geweben mit Quarzsand, Vermengen mit Kieselgur und Auspressen unter einem, bis zu 300 Atmosphären gehenden Druck, hergestellten Preßsäfte in vielen Fällen keine Einwirkung auf bestimmte Verbindungen ergeben, trotzdem unzweifelhaft die gesuchten Fermente in den untersuchten Geweben vorhanden waren. So beobachteten wir wiederholt,

daß Preßsäfte von Pilzen Polypeptide nicht spalteten, während bei der Verwendung des Mycels eine Spaltung nachweisbar war. Sehr instruktiv lassen sich diese Befunde durch Verwendung von Seidenpepton gestalten. In Fällen, in denen der dargestellte Preßsaft weder Polypeptide noch Pepton spaltete, erwies sich die ausgepreßte Kieselgurmasse als fermenthaltig. Wurde der nach dem Auspressen verbleibende Rückstand mit einer 10—20%igen Seidenpeptonlösung durchgeknetet und dann das Gemisch bei 37° aufbewahrt, dann beobachtete man schon innerhalb 24 Stunden das Auftreten zahlreicher feiner Knötchen. Es sind dies Drusen von Tyrosinkristallen. Diese Beobachtung, die mit den von Pringsheim und Zemplén¹⁾ bei Versuchen über Polysaccharide spaltende Fermente gemachten Befunden übereinstimmt, zeigt, daß es ganz unmöglich ist, Preßsäfte von Geweben als Kriterium für die An- resp. Abwesenheit von Fermenten speziell der Gruppe der proteolytischen zu verwenden. Nur der positive Befund läßt Schlüsse zu. Negative Resultate schließen die Möglichkeit ein, daß die Fermente nicht in den Preßsaft übergegangen sind. Man wird in Zukunft bei derartigen Untersuchungen neben dem Preßsaft stets auch den Preßrückstand — Kieselgur + zerriebenes Gewebe — untersuchen müssen, um vor Täuschungen bewahrt zu bleiben. Ganz analoge Beobachtungen, wie mit Pilzpreßsäften, haben wir auch bei Verwendung von tierischen Organen gemacht. Wiederholt beobachteten wir, daß die einzelnen Fraktionen der gewonnenen Preßsäfte — 1. bis 50 Atmosphären, 2. 50—150 Atmosphären, 3. 150—300 Atmosphären — Polypeptide nicht spalteten. Wurde der Preßrückstand nochmals mit physiologischer Kochsalzlösung gut vermischt und das Auspressen wiederholt, so war der Preßsaft wiederum völlig inaktiv. Der Preßrückstand dagegen gab, mit Seidenpeptonlösung durchtränkt, Abscheidung von Tyrosin.

Wir haben die eben erwähnten Beobachtungen bei der Fortführung unserer Untersuchungen über das Vorkommen von

¹⁾ Hans Pringsheim und Géza Zemplén. Studien über die Polysaccharide spaltenden Enzyme in Pilzpreßsäften. Diese Zeitschrift, Bd. LXII, S. 367, 1909.

peptolytischen Fermenten gemacht, welche Polypeptide spalten,¹⁾ an deren Aufbau optisch-aktive Aminosäuren enthalten sind, die bis jetzt nicht in der Natur aufgefunden worden sind. Die Preßsäfte der angewandten 14 Pilze zeigten zum großen Teil keine Einwirkung auf Glycyl-l-tyrosin und auf dl-Leucyl-glycin. Positive Resultate gaben nur die Preßsäfte von *Aspergillus Wentii*, *Fusarium vasinfectum* und *Sclerotinia sclerotiorum*.

Aspergillus Wentii.

Nährlösung: Rohrzucker, 0,1% Pepton + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Wachstum: 3. Juli bis 20. Juli 1909.

1 cm Preßsaft,

1 „ Wasser,

5 „ dl-Leucyl-glycinlösung ($\frac{1}{1000}$ -Mol.).

9⁰⁰ + 0,53⁰ 21. VII. 09.

10⁰⁰ + 0,49⁰

1⁰⁰ + 0,42⁰

3⁰⁰ + 0,39⁰

6⁰⁰ + 0,30⁰

9⁰⁰ + 0,27⁰

Fusarium vasinfectum.

Nährlösung: Rohrzucker, Pepton.

Wachstum: 3. Juli bis 3. August 1909.

1 cm Preßsaft,

1 „ Wasser,

5 „ dl-Leucyl-glycinlösung ($\frac{1}{1000}$ -Mol.).

10⁰⁰ + 0,25⁰ 29. VII. 09.

11⁰⁰ + 0,22⁰

12⁰⁰ + 0,20⁰

1⁰⁰ + 0,20⁰

3⁰⁰ + 0,20⁰

4⁰⁰ + 0,20⁰

5⁰⁰ + 0,20⁰

10⁰⁰ + 0,16⁰ 30. VII. 09.

12⁰⁰ + 0,16⁰

3⁰⁰ + 0,14⁰

5⁰⁰ + 0,14⁰

9⁰⁰ + 0,10⁰ 31. VII. 09.

¹⁾ Emil Abderhalden und Hans Pringsheim, Studien über die Spezifität der peptolytischen Fermente bei verschiedenen Pilzen. Diese Zeitschrift, Bd. LIX, S. 249, 1909.

Sclerotinia sclerotiorum.

Nährlösung: Rohrzucker, Pepton, schwefelsaures Ammoniak.

Wachstum: 10. Juli bis 4. August 1909.

	1 ccm Preßsaft,			
	1 » Wasser,			
	5 » dl-Leucyl-glycinlösung (1/1000-Mol.).			
9 ³⁰	+ 0,25°	5. VIII. 09.	11 ⁴⁵	+ 0,25° 5. VIII. 09.
11 ⁰⁰	— 0,10°		12 ⁰⁰	+ 0,09°
11 ³⁰	— 0,25°		12 ³⁰	+ 0,06°
12 ⁰⁰	— 0,45°		1 ⁰⁰	— 0,08°
12 ³⁰	— 0,65°		3 ⁰⁰	— 0,55°
1 ⁰⁰	— 0,70°		5 ⁰⁰	— 0,72°
3 ⁰⁰	— 0,90°		5 ⁴⁵	— 0,78°
4 ⁵⁰	— 0,91°		6 ³⁰	— 0,82°
5 ⁴⁵	— 0,90°		8 ¹⁰	— 0,95° 6. VIII. 09.
6 ³⁰	— 0,88°			
8 ⁰⁰	— 0,92°	6. VIII. 09.		

Sclerotinia sclerotiorum.

Nährlösung: Rohrzucker, Pepton, schwefelsaures Ammoniak.

Wachstum: 10. Juli bis 4. August 1909.

	1 ccm Preßsaft,	
	1 » Wasser,	
	5 » Seidenpeptonlösung. 5° ₁₀ ig.	
10 ⁰⁰	— 1,00°	5. VIII. 09.
11 ⁰⁰	— 0,87°	
1 ⁰⁰	— 0,90°	
3 ⁰⁰	— 0,87°	
5 ⁰⁰	— 0,60°	schwer ablesbar.
6 ³⁰	— 0,56°	
8 ³⁰	— 0,60°	6. VIII. 09.

Wir haben an Stelle der Polypeptide auch Seidenpepton gewählt und hier meist Spaltung erhalten. Nur in fünf Fällen blieb die Spaltung ganz aus. Durch Züchtung auf Witte-Pepton konnte bei zwei Pilzen — *Penicillium glaucum*, *Mucor javanicus* — Abbau von Seidenpepton nachgewiesen werden. In mehreren Fällen spaltete das Mycel des Pilzes auch dann, wenn mit dem Preßsaft ein Abbau von Seidenpepton nicht nachweisbar war.

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die Einwirkung verschiedener Pilze auf Seidenpepton. + bedeutet, daß das Seidenpepton gespalten wurde.

Art des Pilzes	Nährlösung ¹⁾	Wachstum	Spaltung
1. <i>Aspergillus Wentii</i> . . .	Rohrzucker (NH ₄) ₂ SO ₄	28. Juli bis 24. Okt. 09 28. » » 10. Nov. 09	+ +
2. <i>Monilia sitophila</i> . . .	desgl.	16. » » 24. Okt. 09	+ +
3. <i>Mucor javanicus</i> . . .	»	10. März bis 24. Okt. 09	—
4. » » . . .	Pepton	8.—13. Jan. 10	+ 14. Jan. (mikroskopisch von Bakterien)
5. » » . . .	Pflaumendekokt	9. Dez. bis 5. Jan. 10	— 8. Jan.
6. <i>Aspergillus niger</i> . . .	Rohrzucker (NH ₄) ₂ SO ₄	9.—11. Nov. 09	+ 12. Nov.
7. » <i>orycae</i> . . .	desgl.	9.—11. » 09	+ 12.
8. <i>Penicillium dubium</i> . . .	»	9.—17. » 09	+ 19.
9. » <i>glaucum</i> . . .	»	9.—29. » 09	— 8. Dez.
10. » » . . .	Pflaumendekokt	9.—17. Dez. 09	— 20. »
11. » » . . .	Pepton	13. Dez. bis 4. Jan. 10	+ 5. Jan.
12. » (glaucum?) ähnliche Form . . .	Rohrzucker (NH ₄) ₂ SO ₄	—	spaltet stark
13. <i>Trichothecium roseum</i> . .	Rohrzucker, Pepton, (NH ₄) ₂ SO ₄ Pepton	24. Nov. bis 5. Jan. 10 —	— 8. Jan. —
14. <i>Mucor rhizopodiformis</i> . .	Glukose, Glutaminsäure	16.—22. Juli 09	—
15. <i>Merulius lacrimans</i> . . .	Papier, (NH ₄) ₂ SO ₄	8. Juli bis 11. Nov. 09	—
16. <i>Comphora</i>	» »	16. » » 22. » 09	—
17. <i>Mucor corymbifer</i> . . .	Rohrzucker (NH ₄) ₂ SO ₄	23. Nov. bis 2. Dez. 09	— 8. Dez.
18. <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .	Rohrzucker, Pepton (NH ₄) ₂ SO ₄	11.—25. Nov. 09	+ 27. Nov.
19. » » . . .	desgl.	16. Nov. bis 1. Dez. 09	Preßsaft —
20. » <i>trifoliorum</i> . . .	»	15. » » 14. » 09	» Rückstand —
21. <i>Penicillium purpurogenum</i>	Glukose, Glutaminsäure	15. Nov. bis 3. Dez. 09	+ 6. Dez.
22. » » . . .	Rohrzucker (NH ₄) ₂ SO ₄	11.—22. Nov. 09	+ +
23. » » . . .	Glukose, Glutaminsäure	6. Dez. bis 4. Jan. 10	Mycel + 5. Jan. Preßsaft — 8. Jan. schwach 10. Jan. Rückstand + 7. Jan.
24. <i>Hyphomyces rosellus</i> . .	Rohrzucker (NH ₄) ₂ SO ₄	21. Juli bis 24. Okt. 09	+ +
25. » » . . .	Rohrzucker, Pepton (NH ₄) ₂ SO ₄	15.—22. Nov.	Mycel — Preßsaft —
26. <i>Fusarium vasinfectum</i> . .	desgl.	15. Nov. bis 8. Dez. 09	Mycel + 10. Dez. Rückstand + 10. Dez. Preßsaft + 11. Dez.
27. » » . . .	traubensaures Ammon	16. » » 9. » 09	+ 10. Dez.

¹⁾ Zuerst steht die Kohlenstoff-, dann folgt die Stickstoffquelle. Als Salze wurden KH₂PO₄, MgSO₄, NaCl und Spuren von FeSO₄ gegeben.