Über die Amidasewirkung.

I. Mitteilung. Beiträge zur Kenntnis der Leberasparaginase.

Von

Daiji Hiwatasi

(樋渡大次)

*(Aus dem Medizinisch-chemischen Institut der Medizinischen
Fakultät der Kaiserlichen Tohoku-Universität,
Sendai. Direktor: Prof. Dr. S. Utzino.)*

Nach der Feststellung von Lang (1904) über die Desamidierung, dass eine Ammoniakabspaltung sich aus Asparagin durch verschiedene Organe des Rindes, wie Leber, Niere, Nebenniere, Milz, Hoden, Pankreas, Darmschleimhaut, Lymphdrüse und Muskel mit der grössten Leichtigkeit vollzieht, haben O. v. Fürth und Friedmann (1910) ferner die Verbreitung asparagindesamidierendes Fermentes in Schweins- wie Pferdorganen bestätigt, indem sie sich Leber, Milz, Niere, Lunge und Muskel von Schweinen und Pferden und ferner Herzmuskel, Darmschleimhaut und Hirn des Pferdes als Material bedienten. Darunter war die Ammoniakbildung durch Darmschleimhaut auffallend intensiver als die durch ein anderes Organ bewirkte und beträgt eine grössere Menge Ammoniak als die des Amidstickstoffs im Asparaginmolekül. Es wurde daher auch auf eine partielle Abspaltung des Aminosäurestickstoffs hingewiesen.

Nach den Ergebnissen von Clementi (1922) betreffs der Verbreitung des asparaginspaltenden Fermentes in Tier-, Vogel- und Fischarten schien die Leber der Omnivoren und der Hervivoren als ein einziges Hauptorgan vom Träger dieses Fermentes aufzutreten. Nur bei Meerschweinchen fiel die Asparagindesamidierung sonst durch Niere, Darm und Blutserum positiv aus, wie diejenige durch Niere und Darm des Pferdes und auch durch Hühnerniere. Bei diesen Versuchen hat Clementi eine Formoltitration der gebildeten Asparaginsäure ausgeführt. Nach der Angabe von Clementi (1922) war die Asparagindesamidase sehr empfindlich gegenüber Säure und sie wurde durch Alkohol nur bei schwach alkalischer Reaktion ziemlich in guter Aus-

beute gefällt, durch Aceton aber nur in schlechter Ausbeute.

Die Inaktivierung der Leberasparaginase bei Trocknung nach der Aceton-Äther-Methode wurde auch von Mizuhara (1929) beobachtet und die optimale Reaktion der Lebermazeration mit Glycerin liegt bei pH 7,7. Nach seiner Angabe ist die Leberasparaginase des Kaninchens und des Huhns stärker als die des Schweins, Rindes und Hundes. In Leber, Niere oder Darm bzw. Darmscheidhaut des Menschenfötus und des Neugeborenen hat Abe (1930) die Asparaginasewirkung festgestellt, aber fast keine Glycindesaminase. Nach Clementi und Prampolini (1929) war die günstigste Reaktion der Asparaginase im Hühnerleberextrakt aber bei pH 7,2–7,6 mit flachem Abfall nach der alkalischen und steilem Abfall nach der sauren Seite hin.

In den erfolgreichen Untersuchungen über Leberasparaginase des Kalbs und des Kaninchens hat Suzuki (1936) darüber berichtet, dass die Optimalreaktion der Leberasparaginase bei pH 8,1 liegt, die sich im mit Kaolin behandelten Presssaft der Kalbsleber und auch im Rohrzuckerextrakt der Kaninchenleber befindet, indem die optimale Zone der Asparaginase im dialysierten Autolysat der Kalbsleber mit 1 %iger Sodalösung sich von 7,5 bis 9,0 erstreckte und ihr Mittelpunkt pH 8,2 zeigte.

Um ein Weiteres zur Kenntnis der Gewebesdesamidierung einerseits beizutragen und einen Einblick in die pathologische Biochemie der Gewebe andererseits zu gewähren, hat Verf. die systematische Untersuchung der Amidasewirkung unter Leitung von Prof. S. Utzino in Angriff genommen und als erstes hier die Leberasparaginase des Kaninchens und des Schweins in Bezug auf ihre Aktivität unter verschiedenen Bedingungen studiert, da die Literatur öfters ihre Unbeständigkeit wie Empfindlichkeit lehrt.

Als Enzym bedient man sich der kollierten Gewebemazeration, die mit Gewebebrei und Glycerin-Wasser unter Zermahlen bereitet wurde. Die Versuche hat man sofort oder am folgenden Tag nach der Enzymbereitung angestellt, nachdem die Gewebemazeration unter Toluol im Eisschrank aufbewahrt wurde. Die Hauptversuche mit Enzym-Substrat und Kontrollversuche mit Enzym allein wurden unter Toluol bei 37° C digeriert. Die Menge des gebildeten Ammoniaks ermittelt man nach Folin mittels 0,02 n-H₂SO₄. Die Kontrollwerte wurden von denjenigen des Hauptversuchs abgezogen und die korrigierten Werte des Säureverbrauchs zur Neutralisation des Ammoniaks in Tabelle angegeben.

Unter den hier versuchten Lebermazerationen der verschiedenen

Tierarten liegt die optimale Reaktion der Asparaginase im allgemeinen auf schwach alkalischer Seite, und zwar im Optimalbereich von pH 7,5–8,5 für Kaninchen-, Schweins-, Rinder- und Walleber mit dem flachen Abfall nach alkalischer Seite von pH 9,0 und mit der starken Inaktivierung schon bei pH 6,0, aber mit einer Ausnahme von Hühnerlebermazeration, die in Übereinstimmung mit der Angabe von Clementi und Prampolini (1929) einen Optimalbereich von pH 7,0–7,5 mit deutlicher Aktivität bei pH 6,0 zeigte (Tabelle I).

Seitdem Hino in seinen enzymologischen Untersuchungen mit frischen Gewebeschnitten im naturtreuen Sinne einen guten Erfolg erzielt hat (noch nicht veröffentlicht), wurden hier auch vergleichende Versuche mit frischen Gewebeschnitten und Gewebemazeration angestellt, die mit gleichen Stückchen Leberschnitten und Glycerin-Wasser in der angegebenen Weise wie in der Tabelle I bereitet wurde. Da die Resultate der Ammoniakbildung durch frische Leberschnitte wie auch durch Lebermazeration ganz gleich ausfiel, möchte man wohl unter Enzymwirkung der Gewebemazeration im gleichen Sinne diejenige der frischen Gewebeschnitte verstehen und man kann sich vielleicht sehr wahrscheinlich vorstellen, dass diese Gewebemazeration insofern eine wirksame Enzymwirkung zeigen kann, als in frischen Gewebeschnitten mindere äussere Eingriffe erlaubt sind und mehr naturgemässe Vorgänge erwartet werden (Tabelle II).

In Hinsicht der Asparaginase-Verbreitung kam die Leber als Hauptorgan in Betracht, wie schon Clementi angab, da die anderen Gewebe nur eine minimale Ammoniakbildung zeigten (Tabelle III). Hier sei aber besonders angeführt, dass im Kaninchenhirn und in der Walnere eine ziemlich starke Ammonbildung bestätigt wurde. Was die Hirnasparaginase betrifft, möchte Verf. zu späterer Gelegenheit darauf zurückkommen. Hier sei nur auf die ziemlich starke Walleberasparaginase (pH 7,5–8,0) hingewiesen.

Was die Haltbarkeit der Asparaginase anbelangt, blieb die Aktivität der Kaninchenlebermazeration mit Glycerin-Wasser (koliert) bei der Aufbewahrung im Eisschrank bis auf 5 Tage fast unverändert erhalten, dann trat Inaktivierung ein, besonders stark nach einer Woche; bei der Schweinsleber schien die Beeinträchtigung noch etwas schneller einzutreten, und zwar schon deutlich 3 Tage nach der Bereitung und noch stärker nach einer Woche (Tabelle IV).

Nach Erhitzen bei 55° C (30 Min. lang) blieb die Asparaginaseaktivität der Kaninchenleber noch ziemlich gut erhalten, während sie erst nach Erwärmen bei 60° C (30 Min.) deutlich inaktiviert wurde und

schon nach kurzem Erhitzen bei 70° C (5 Min.) fast ganz verloren ging. Die Schweineleber-Asparaginase, deren eigene Aktivität sich etwas schwächer als diejenige der Kaninchenleber erwies, schien noch leichter beeinträchtigt zu werden (Tabelle V).

Wie schon von Clementi (1922) angedeutet, ist die Asparaginase gegen Säurewirkung, unabhängig von der Säurenatur, sehr empfindlich und die Aktivität ging nach Behandeln bei pH 4,0 (30 Min.) verloren, während bei alkalischer Reaktion die Aktivität ziemlich gut erhalten blieb, indem auch die Reaktion von pH 6,0 keinen so schädigenden Einfluss ausübte (Tabelle VI).

Wie früher in Hinsicht auf die Resistenzfrage der Asparaginase einmal von Clementi (1922) auf die Empfindlichkeit derselben gegenüber Aceton und ein andermal von Suzuki (1936) auf die abgeschwächte Aktivität des Acetonpulvers der Kalbsleber hingewiesen wurde, zeigte die Leberasparaginase des Kaninchens, die sich als die stärkste unter den versuchten Tierarten erwies, eine deutliche Inaktivierung, falls der Leberbrei mit Aceton und Äther getrocknet wurde, während diejenige des Schweins jedoch, deren eigene Aktivität deutlich schwächer als die des Kaninchens war, bei der Acetontrocknung ziemlich gut erhalten blieb, und zwar fiel die Ammoniakbildung durch Acetonpulver noch positiv aus, das nach 12stündiger Aufbewahrung in Aceton getrocknet wurde (Tabelle VII).

Dies Ergebnis lehrt, dass die Schweinsleberasparaginase trotz ihrer schwächeren eigenen Aktivität als die der Kaninchenleber noch gut nach der Aceton-Äther-Methode getrocknet werden konnte. Hier sei noch erwähnt, dass aus dem sodaalkalisierten Leberbrei (pH 8,0) des Schweins etwas besseres Acetonpulver hergestellt wurde, als es ohne Alkalisierung getrocknet wurde (Tabelle VII).

Unter den Oxydations- wie Reduktionsmitteln blieb Wasserstoffsättigung oder H_2O_2 -Zusatz in einer kleineren Menge fast ohne Einfluss auf die Leberasparaginase, während Schwefelwasserstoff hemmend auf die Ammoniakbildung wirkte, die jedoch durch Verjagen des Schwefelwasserstoffs durch Lufteinleiten wiederhergestellt werden konnte. In einer verhältnismässig grösseren Konzentration gegenüber Enzymmenge ruft auch Cysteinzusatz eine Hemmung auf die Asparaginase-Wirkung hervor, da eine herabgesetzte Ammoniakbildung nur dann bei 10fach verdünnter Enzymlösung deutlich zur Beobachtung kam (Tabelle VIII).

Zuletzt sei hier die Beeinflussung der anorganischen Salze auf Leberasparaginase des Kaninchens und des Schweins angeführt (Ta-

belle IX u. X). Unter den versuchten anorganischen Salzen übten Mangansulfat, Kobaltsulfat, Bleiacetat und Erdalkalisalze keinen Einfluss auf die Leberasparaginase aus. In einer Konzentration von 0,01 Mol wirkte Magnesiumsalz aber auf Kaninchen- wie Schweinsleberasparaginase und Kobaltsulfat wie Bleiacetat nur auf Schweinsasparaginase hemmend. Die Asparaginase wurde durch Cadmiumsulfat, Silbernitrat und Sublimat schon in einer sehr schwachen Konzentration von 0,0002 Mol fast gänzlich zerstört; das Kalomel wirkte aber etwas schwächer, indem Schweinsleber im allgemeinen etwas resistenter zu sein schien. Gegenüber Zinksalz wie Kupfersalz ist sie auch sehr empfindlich, während Nickel- und Eisensalz wie Halogenessigsäure nur in einer höheren Konzentration von 0,01–0,002 Mol schädigend wirkten. Bezüglich der Halogenessigsäure kommt hier auch die Säureinaktivierung in Betracht.

Zusammenfassung.

1) In der vorliegenden Arbeit wurde die Asparaginaseaktivität der Gewebemazeration unter verschiedenen Bedingungen untersucht und das Studium ihrer Resistenzfrage kam in der Hauptsache in Betracht. Da die Lebermazeration des Kaninchens und Schweins fast die gleiche Aktivität mit den frischen geflorenen Leberschnittchen erwies, hat man die Versuche hauptsächlich mit der Gewebemazeration ausgeführt; die Lebermazeration des Kaninchens kann man wohl 5 Tage lang fast ohne Veränderung der Aktivität unter Toluol im Eisschrank aufbewahren, während die des Schweins etwas schneller inaktiviert zu werden scheint.

2) Die Optimalreaktion der Lebermazeration liegt im allgemeinen bei schwach alkalischer Reaktion, also bei pH 7,5 für Kaninchen und Schwein, bei pH 7,5–8,0 für Seiwal, bei pH 8,0–8,5 für Rind und Hund, aber ausnahmsweise bei pH 7,0 für Huhn. Unter den untersuchten Organen scheint die Leber als einziges Hauptorgan des Asparaginaseträgers in Betracht zu kommen und die anderen Organe wie Milz, Pankreas und Muskel zeigen eine sehr schwache Asparaginaseaktivität. Hier sei jedoch auf die starke Hirnasparaginase hingewiesen.

3) Gegen Hitzewirkung bis auf bei 55° C erwies sich die Leberasparaginase des Kaninchens noch widerstandsfähig zu sein, indem sie schon durch Hitze bei 60° (30 Min.) deutlich inaktiviert und bei 70° C (5 Min.) fast gänzlich vernichtet wird. Hier sei besonders hervorgehoben, dass die Leberasparaginase durch Aufbewahren bei pH 4,0 mittels Salzsäure, Milchsäure oder Halogenessigsäure inaktiviert wur-

de, während sie gegen Alkaliwirkung bei pH 9,0 widerstehen konnte.

4) Die Acetonbehandlung ruft auch die Inaktivierung der Leberasparaginase hervor. Schwefelwasserstoff wirkte hemmend auf die Asparaginaseaktivität, die jedoch durch Verjagen des Schwefelwasserstoffs durch Lufteinleiten wiederhergestellt werden konnte. Durch Cysteinzusatz scheint die Aktivität gehemmt zu werden, falls die Enzymmenge verhältnismässig kleiner ist. Eine kleine Menge H_2O_2 oder H_2 bleibt fast ohne Einfluss.

5) Unter den untersuchten anorganischen Salzen üben Cadmiumsulfat, Silbernitrat und Sublimat wie Kalomel eine sehr stark schädigende Wirkung in sehr schwacher Konzentration von 0,0002 Mol auf die Leberasparaginase des Kaninchens wie des Schweins aus. Durch Zink- und Kupfersalz wird sie auch deutlich beeinträchtigt, während Mangan-, Kobalt- und Calciumsalz bis auf in einer 0,01 Mol-Konzentration fast ohne Einfluss auf die Kaninchenasparaginase bleibt, wie Mangan-, Calcium- und Bariumsalz auf die Schweinsasparaginase.

Dem Unterrichtsministerium sei an dieser Stelle gedankt für die Gewährung einer Unterstützung zur Anregung wissenschaftlicher Forschung.

Prof. Dr. S. Utzino.

Literatur

- Abe, M. (1930): Kinki Fujinka Gakkai Zasshi, **13**, 617, 626 u. 634.
Clementi, A. (1922): Arch. intern. de Physiol., **19**, 369.
Clementi, A. u. Prampolini, P. (1929): Arch. di Sci. biol., **13**, 443.
v. Fürth, O. u. Friedmann, M. (1910): Biochem. Zeits., **26**, 435.
Lang, S. (1904): Beitr. zur physiol. Chem. u. Path., **5**, 321.
Mizuhara, Sh. (1929): Kinki Fujinka Gakkai Zasshi, **12**, 18 u. 30 (Japanisch 1076).
Suzuki, Y. (1936): Journ. Biochem., **23**, 57.

Versuchsteil.

Tabelle I.

Optimal-pH der Leberasparaginase der verschiedenen Tiere.

Enzymlösung: Der Leberbrei wurde mit der 7 Volummenge Glycerin-Wasser (1:1) gut zerrieben, durch Gaze koliert und sofort oder am folgenden Tag verwendet, nachdem die Mazeration unter Toluol im Eisschrank aufbewahrt wurde.

Versuchsansatz: 2 ccm 0,1 Mol-Asparaginlösung + 2 ccm Enzymlösung + 10 ccm Phosphatpufferlösung von verschiedenen pH-Werten + Toluol; digeriert bei 37° C 10 Std., aber 24 Std. für den Versuch mit Wal-Leber.

Zur Kontrolle wurde Lebermazeration mit Phosphatpuffer ohne Asparagin unter den gleichen Bedingungen digeriert. Das abgespaltene Ammoniak im Digestat wurde in 0,02 n-H₂SO₄ nach Folin abdestilliert und die Ammoniakmenge in ccm 0,02 n-H₂SO₄, die zur Neutralisation gebraucht wurde, angegeben. Der Säureverbrauch im Kontrollversuch, der ungefähr 0,3 ccm 0,02 n-H₂SO₄ betrug, wurde von denjenigen des Hauptversuchs abgezogen und diese korrigierten Werte der Säure-Verbrauchs in Tabelle angegeben.

Säureverbrauch (ccm 0,02 n-H₂SO₄)

pH	Kaninchen	Schwein	Hund	Huhn	Rind	Wal ^{*)}
10,0	0,20	—	—	—	—	—
9,0	3,50	1,90	2,15	4,65	1,50	0,95
8,5	4,30	2,20	2,40	5,95	1,70	3,30
8,0	4,45	2,25	2,55	6,45	1,70	3,60
7,5	4,80	2,40	2,30	7,20	1,55	3,50
7,0	3,90	1,75	2,05	7,40	1,25	1,90
6,0	0,45	0,60	0,60	5,15	0,35	—

* Hier wurde 1 ccm 0,1 Mol-Asparaginlösung gebraucht.

Tabelle II.

Asparaginasewirkung der Leberschnittchen.

Hier wurde die Asparaginase-Aktivität der Leberschnittchen mit derjenigen der Lebermazeration verglichen.

Enzym: Die frische gefrorene Kaninchenleber von 2 ccm Quadrat wurde in Schnittchen von 150 μ Dicke (ein Stückchen von 2 ccm Länge und 2 ccm Breite) nach der Gefriermethode abgeschnitten und je 2-3 Schnittchen der Kaninchen- oder Schweinsleber respektive als solche in Suspension bei Versuchen gebraucht. Zum Vergleichszweck hat man eine Glycerin-Wasser-Mazeration mit diesen Leberschnittchen bereitet und eine gewisse Menge Mazeration geprüft, die 2-3 Schnittchen entspricht.

Versuchsansatz: 1 ccm 0,1 Mol-Asparaginlösung + Leberschnittchen oder Lebermazeration + 10 ccm Phosphatpufferlösung von pH 7,5 + Toluol; digeriert bei 37° C 24 Std. lang. Kontrolle mit Enzym-Puffer ohne Substrat. Ammoniakbestimmung im Digestat nach Folin. Diese Kontrollwerte sind von denjenigen des Hauptversuchs abgezogen und die korrigierten Werte des Säureverbrauchs in Tabellen angegeben.

Säureverbrauch (ccm 0,02 n-H₂SO₄)

Tierarten	Kaninchenleber		Schweinsleber	
Enzym	2 Schnittchen	Mazeration	3 Schnittchen	Mazeration
ccm 0,02 n-H ₂ SO ₄	4,25 (85 %)	4,35 (87 %)	2,90 (58 %)	2,70 (54 %)

Tabelle III.

Asparaginase-Wirkung der Organe der verschiedenen Tiere.

Enzymlösung: Zur Bereitung der Organmazeration wurden 7 Volum-Teile Glycerin-Wasser (1:1) für 1 Teil Kaninchenmilz, -pankreas oder Leber des allen geprüften Materials und 3 Volum-Teile Glycerin-Wasser für 1 Teil anderer Organe gebraucht.

Versuchsansatz: 1 ccm 0,1 Mol-Asparaginlösung + 2 ccm Enzymlösung + 10 ccm Phosphatpufferlösung von pH 7,5 + Toluol; digeriert bei 37° C 24 Std. lang. Ammoniakbestimmung im Digestat nach Folin. Die korrigierten Werte des Säure-Verbrauchs im Hauptversuche in Tabelle angegeben.

Säureverbrauch (ccm 0,02 n-H₂SO₄)

Organ Tier u. Fisch	Leber	Niere	Gehirn	Muskel	Milz	Pankreas
Kaninchen	4,60	0,75	1,40	0,25	0,25	0,15
Schwein	4,10	—	0,85	—	0,45	0,30
Huhn	4,65	—	—	—	—	—
Hund	3,75	—	—	—	—	—
Rind	2,85	—	0,85	—	—	—
Taube	2,35	—	—	0,55	—	—
Wal (Seiwal)	3,50	2,50	—	—	—	—
Aal	2,40	—	—	—	—	—

Tabelle IV.

Einfluss der Aufbewahrung im Eisschrank auf Leberasparaginase des Kaninchens und des Schweins.

Enzymlösung: 1 Teil Leberbrei wurde mit 7 Volum-Teilen Glycerin-Wasser gut zerrieben, durch Gaze koliert und unter Toluol im Eisschrank verschiedene Tage lang aufbewahrt und dann auf die Asparaginaseaktivität hin geprüft.

Versuchsansatz: 1 ccm 0,1 Mol-Asparaginlösung + 2 ccm Enzymlösung + 10 ccm Phosphatpufferlösung von pH 7,5 + Toluol; digeriert bei 37° C 24 Std. lang. Jede Kontrolle mit Enzym-Puffer ohne Asparagin. Ammoniak-Bestimmung im ganzen Digestat. Die korrigierten Werte des Säureverbrauchs in Tabelle angegeben.

Säureverbrauch (ccm 0,02 n-H₂SO₄)

Kaninchen- leber	Aufbewahrungs-Tage	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	0,02 n-H ₂ SO ₄ ccm	4,50	4,55	4,50	4,50	4,55	4,15	3,90	3,70	3,20	2,35	1,55	1,20
	Spaltung %	90	91	90	90	91	83	78	74	64	47	31	24
Schweins- leber	0,02 n-H ₂ SO ₄ ccm	3,30	3,30	3,40	3,05	2,70	2,50	2,15	1,95	1,35	1,10	0,90	0,60
	Spaltung %	66	66	68	61	54	50	43	39	27	22	18	12

Tabelle V.

*Hitzeinaktivierung der Leberasparaginase des
Kaninchens und des Schweins.*

Enzymlösung: 1 Teil Leberbrei plus 7 Volum-Teile Glycerin-Wasser (1:1); erhitzt im Wasserbade von 50°–70° C während 5, 10, 15 u. 30 Min.

Versuchsansatz: 1 ccm 0,1 Mol-Asparaginlösung + 2 ccm erhitzter Enzymlösung + 10 ccm Phosphatpufferlösung von pH 7,5; Digestion bei 37° C während 24 Stunden. Kontrolle wie in Tabelle I. Ammoniakbestimmung. Die Werte in Tabelle korrigiert.

Säureverbrauch (ccm 0,02 n-H₂SO₄)

Zeit (Min.) Bade- temperatur C			5 Min.	10 Min.	15 Min.	30 Min.
Kaninchen	nicht erhitzt	4,55	—	—	—	—
	50°	—	4,55	4,55	4,55	4,55
	55°	—	4,50	4,45	4,40	4,30
	60°	—	4,50	4,45	4,20	2,80
	70°	—	0,10	0	0	0
Schwein	nicht erhitzt	3,65	—	—	—	—
	55°	—	3,55	3,35	3,15	2,35
	60°	—	3,45	1,95	0,85	0,75
	70°	—	0,50	0,30	0,20	0,15

Tabelle VI.

Säureinaktivierung der Leberasparaginase des Kaninchens.

Versuchsansatz: 1 ccm 0,1 Mol-Asparaginlösung + je 2 ccm Enzymlösung (Lebermazeration wie in der anderen Tabelle), die bei pH 4,0 mit verschiedenen Säuren eingestellt und 30 Min. lang bei Raumtemperatur aufbewahrt wurde + 10 ccm Phosphatpufferlösung von pH 7,5; digeriert bei 37° C 24 Std. lang.

Für Einstellung bei pH 7,5 wurde Natriumkarbonatlösung gebraucht.

Kontrollte mit Enzym-Puffer ohne Asparagin. Diese Werte abgezogen. Die Zahlen in Tabelle korrigiert.

Säureverbrauch (ccm 0,02 n-H₂SO₄)

Kontrolle	HCl			Milchsäure	CH ₂ Cl-COOH	CH ₃ J-COOH	Na ₂ CO ₃		
	pH 2	pH 4	pH 6	pH 4	pH 4	pH 4	pH 7,5	pH 9,0	pH 10,0
4,60	0	0	4,45	0	0	0	4,60	4,30	4,10

Tabelle VII.

Asparaginaseaktivität der getrockneten Leberpulver des Kaninchens und des Schweins.

(A) Lebermazeration: Ebenso wie in Tabelle I.

(B) Leber-Trockenpulver: Leberbrei wurde möglichst schnell dreimal mit der 5fachen Volummenge Aceton und dann zweimal mit Äther behandelt, getrocknet und je 0,1 g Pulver, das der Lebermenge in 2 ccm Mazeration entspricht, als Enzym im Versuche gebraucht.

(C) Für Versuch I-C wurde Leberbrei nach 4stündiger und für Versuch II-C¹⁾ und II-C²⁾ nach 6-12stündiger Aufbewahrung in Aceton bei Zimmertemperatur respektive in der angegebenen Weise getrocknet, und je 0,1 g Pulver kam zur Verwendung.

(D) Enzym D bedeutet den Rückstand der unter 40° C abgedampften Acetonlösung, die in B für Gewebetrocknung gebraucht wurde. Als Enzym benutzte man 0,2 ccm dieser Lösung, die 2 ccm Lebermazeration oder 0,1 g Pulver entspricht.

(E) Leber-Trockenpulver: Ebenso wie bei (B) wurde der Leberbrei getrocknet, nachdem der Brei mit Sodalösung bei pH 8,0 eingestellt wurde.

Versuchsansatz: 1 ccm 0,1 Mol-Asparaginlösung + 0,1 g Enzympulver (oder 2 ccm Enzymmazeration A oder 0,2 ccm Enzymlösung) + 10 ccm Phosphatpufferlösung von pH 7,5; digeriert bei pH 7,5 37° C 24 Std. lang. Kontrolle wie in angegebenen Tabellen. Abzug der Leerwerte für Enzym. Die Werte in Tabelle korrigiert.

Säureverbrauch (ccm 0,02 n-H₂SO₄)

Enzym	I Kaninchen	II Schwein			
A	4,60	2,80	2,80	3,25	3,05
B	0,50	1,05	1,05	0,75	—
C	0,10	0,85 ¹⁾	0,85 ²⁾	—	—
D	—	—	—	0	—
E	—	—	—	—	1,35
B+D	—	—	—	0,75	—

Tabelle VIII.

Einfluss von H₂O₂, H₂, H₂S und Cystein auf die Leberasparaginase des Kaninchens.

Enzymlösung; 2 ccm Lebermazeration, aus 1 Teil Brei und 7 Vol.-Teilen Glycerin-Wasser (1:1), wurden mit 3 Tropfen 3 %iger Wasserstoffsuperoxyd-lösung 30 Minuten lang in Raumtemperatur oder mit Cysteinchlorhydrat (mit NaOH neutralisiert) in bestimmter Mol-Konzentration 30 Min. lang bei 37° C aufbewahrt. Wasserstoff und Schwefelwasserstoff hat man in 2 ccm Lebermazeration während 30 Minuten durchgeleitet und im Versuch angewendet. Im Versuch b wurde Schwefelwasserstoff durch Luftdurchleiten abgejagt. Beim Cystein-Versuch wurden 2 ccm verdünnter Enzymlösung verwendet, indem man die Lebermazeration mit Wasser aufs zehnfache in b) oder aufs fünffache in c) verdünnt hat.

Versuchsansatz: 1 ccm 0,1 Mol-Asparagininlösung + 2 ccm Enzymlösung + 10 ccm Phosphatpufferlösung (pH 7,5); digeriert bei 37° C 24 Std.

Kontrolle mit Enzym-Puffer ohne Asparagin. Ammoniakbestimmung nach Folin. Abzug des Leerwertes für Kontrolle. Die korrigierten Werte in Tabelle angegeben.

Säureverbrauch (ccm 0,02 n-H₂SO₄)

Zusatzstoffe	a		b		c
ohne H ₂ O ₂	4,60	4,65	—		—
mit H ₂ O ₂	4,60	4,70	—		—
ohne H ₂	4,65	—	—		—
mit H ₂	4,65	—	—		—
ohne H ₂ S	4,65	4,20	4,00	4,75	—
mit H ₂ S	1,65	0,65	3,20	4,50	—
ohne Cystein	4,50	1,00		2,95	
mit Cystein (in Mol)	4,30 (1/10 Mol)	0,45 (1/10 Mol)		2,50 (1/20 Mol)	

Tabelle IX.

Einfluss der anorganischen Salze auf Leberasparaginase des Kaninchens.

Enzymlösung: Ebenso wie in anderen Versuchen.

Versuchsansatz: 1 ccm 0,1 Mol-Asparagininlösung + 2 ccm Enzymlösung + 2 ccm Wasser + 2 ccm Salzlösung von verschiedener Konzentration (3/2000, 3/800, 3/400, 3/200 oder 3/40 Mol) + 8 ccm Phosphatpufferlösung (pH 7,5); digeriert bei 37° C 24 Std.. Zur Kontrolle wurden 2 ccm Wasser anstatt der Salzlösung gebraucht. Man hat die Versuche mit HgCl₂ in noch verdünnter Konzentration angestellt und folgenden Säuregebrauch beobachtet: 0,40 ccm bei 1/50 000, 0 bei 1/20 000 und 0 bei 1/10 000 Mol HgCl₂. Kontrolle mit Enzym-Puffer ohne Asparagin. Die korrigierten Werte in Tabelle.

Säureverbrauch (ccm 0,02 n-H₂SO₄)

Mol in Digestat Salze	0	1/5 000	1/2 000	1/1 000	1/500	1/100
MnSO ₄	4,70	4,70	4,70	4,55	4,50	4,50
CoSO ₄	4,70	4,70	4,70	4,80	4,65	4,55
Pb(CH ₃ COO) ₂	4,40	4,45	4,40	4,45	4,40	—
NiSO ₄	4,55	4,55	4,40	4,30	2,70	0,30
FeCl ₃	4,50	4,50	4,50	2,70	0,55	0,20
ZnSO ₄	4,60	1,55	0,80	0,75	0,75	—
CuSO ₄	4,60	3,85	1,95	0,45	0	0
CuCl ₂	4,60	3,90	1,90	0,30	0	0
CdSO ₄	4,55	0	0	0	0	0
HgCl ₂	4,45	0	0	0	0	—
Hg ₂ Cl ₂	4,30	0,95	0,70	0,50	—	—
AgNO ₃	4,55	0,15	0	0	0	0
CaCl ₂	4,70	4,70	4,75	4,70	4,70	4,70
MgSO ₄	4,60	4,60	4,70	4,65	4,35	2,20
CH ₂ Cl COOH	4,50	4,50	4,50	4,35	4,30	0,10
CH ₂ J COOH	4,50	4,50	4,50	4,45	3,30	0

Tabelle X.

Einfluss der anorganischen Salze auf Leberasparaginase des Schweins.

Die Versuchsanordnung: Ebenso wie in der vorigen Tabelle IX.

Säureverbrauch (ccm 0,02 n- H_2SO_4)

Mol in Digestat Salze	0	1/5 000	1/2 000	1/1 000	1/500	1/100
MnSO ₄	2,40	2,40	2,40	2,30	2,40	2,40
CoSO ₄	2,40	2,30	2,00	1,90	1,80	1,60
Pb(CH ₃ COO) ₂	3,30	3,30	3,30	3,30	2,90	—
NiSO ₄	2,40	2,30	2,15	2,10	1,55	0,35
FeSO ₄	2,45	2,40	2,45	2,45	2,45	1,65
FeCl ₃	2,45	2,40	2,10	0,70	0,25	0,05
ZnSO ₄	3,30	0,80	0,75	0,75	0,75	—
CuSO ₄	2,40	0,75	0,55	0,45	0,30	0
CuCl ₂	2,45	0,35	0,30	0,20	0	0
CdSO ₄	3,15	0,10	0	0	0	0
HgCl ₂	3,30	0,65	0,50	0,20	0	—
Hg ₂ Cl ₂	3,30	0,75	0,50	0,40	—	—
AgNO ₃	2,45	0,40	0	0	0	0
CaCl ₂	3,35	3,35	3,45	3,50	3,55	3,35
MgCl ₂	3,35	3,35	3,25	3,35	3,35	2,30
BaCl ₂	3,35	3,35	3,35	3,30	3,35	3,35
CH ₃ Cl COOH	3,35	3,35	3,25	3,10	1,45	0,15
CH ₃ I COOH	3,35	3,35	3,15	2,10	0,60	0,50