

Ueber eine neue Bereitungsweise des Pepsins.

Von

C. A. Pekelharing in Utrecht.

(Der Redaction zugegangen am 3. Juni 1896.)

Wird ein kräftig wirkender künstlicher Magensaft gegen Wasser dialysirt, so bildet sich in der Flüssigkeit bald, bei gut unterhaltener Strömung des Aussenwassers in 24 Stunden, ein Niederschlag, welcher bei fortgesetzter Dialyse sich, wenigstens zum grössten Theil, wieder löst. Die Trübung kann dann wieder hervorgerufen werden durch Zusatz von Salzsäure zu der durch die Dialyse nahezu neutral gewordenen Flüssigkeit, und zwar am besten so, dass der Gehalt an HCl auf 0,02% gebracht wird.

Aus künstlichem Magensaft lässt sich also eine Substanz ausscheiden, welche in Salzsäure von 0,1% und höherer Concentration löslich ist, ebenso in durch Dialyse möglichst salz- und säurearm gemachtem künstlichem Magensaft, schwer löslich aber in 0,02 procentiger Salzsäure — eine Substanz, welche sich als ein sehr kräftig wirkendes Pepsin herausstellte. Ich fand diese Substanz im künstlichen Magensaft aus der Magenschleimhaut des Schweines, des Hundes und des Kalbes, und ebenso in Lösungen von Handelspepsinen, wenn wenigstens diese Lösungen concentrirt genug waren.

Die mittelst Dialyse in künstlichem Magensaft hervorgerufene Trübung ist indessen immer nur geringfügig, so dass es nicht leicht ist, die sich ausscheidende Substanz in für eine genauere Untersuchung ausreichender Menge zu bereiten.

Nach Vorversuchen in verschiedener Richtung verfuhr ich dazu schliesslich in folgender Weise:

Die Schleimhäute von 10 Schweinemagen (nur der Fundustheil wurde verwendet) wurden zerhackt und mit 6 Liter 0,5 proc. Salzsäure 5 Tage lang bei 37° C. digerirt.

Die Flüssigkeit ist dann gewöhnlich schlecht zu filtriren. Anfangs ist das Filtrat trübe, und wenn es endlich klar zu werden beginnt, sind die Poren des Filters bald verstopft und hört die Filtration auf. Ich habe darum das Filter folgenderweise eingerichtet. In einen, auf eine mit der Luftpumpe verbundene Flasche gestellten Trichter wurde eine etwa centimeterdicke, konisch abgeschliffene, von zahlreichen Oeffnungen perforirte Ebonitplatte gelegt. Dieselbe wurde mit feuchtem Filtrirpapier bedeckt, und dann wurde, während die Luft aus der Flasche herausgesogen wurde, ein dünner Brei von in Wasser fein zerriebenem Filtrirpapier darauf gegossen. Durch die so erhaltene, 2 bis 3 cm. dicke, feste Schicht wurde dann die zu filtrirende Flüssigkeit hindurchgesogen. Die in dieser Weise völlig geklärte Verdauungsflüssigkeit wurde dann, in Pergamentpapierschläuchen, in ein grosses Reservoir mit strömendem Leitungswasser gestellt und etwa 24 Stunden dialysirt. Dann war der Dialysatorinhalt trübe geworden. Bisweilen wurde jetzt die Flüssigkeit wieder in der soeben beschriebenen Weise durch zusammengepresstes Filtrirpapier hindurchgesogen, wobei dann die nach der Filtration mit 0,2 proc. Salzsäure zu extrahirenden Papierpropfen so klein wie möglich genommen wurden. Gewöhnlich aber wurde der Niederschlag mittelst der Centrifuge aus der dialysirten Flüssigkeit abgeschieden. Dieser Niederschlag löst sich in 0,2 proc. Salzsäure zum grössten Theil. Erhitzen auf Körpertemperatur steigert die Löslichkeit noch beträchtlich. Desshalb wurde der Niederschlag etwa eine Stunde mit 30 bis 40 cbcm. 0,2 proc. Salzsäure auf 37° C. digerirt. Bei derselben Temperatur wurde die Lösung filtrirt. So wurde ein vollkommen klares, gelblich gefärbtes Filtrat erhalten, welches sich beim Abkühlen trübte und, gegen destillirtes Wasser dialysirt, bald einen feinkörnigen Niederschlag absetzte, der sich, wie der in der ursprünglichen Verdauungsflüssigkeit durch Dialyse hervorgerufene Niederschlag, bei lange anhaltender Dialyse zum grössten Theil wieder löste, dann aber, durch Salzsäurezusatz, bis zu einem Gehalt von 0,02% nochmals hervorgerufen werden konnte. Am vortheilhaftesten fand ich es 15 bis 20 Stunden lang zu dia-

lysiren und dann den Dialysatorinhalt zu filtriren. Der Niederschlag wurde wieder in 0,2 proc. HCl gelöst und die filtrirte, klare Lösung wurde wieder 15 bis 20 Stunden gegen destillirtem Wasser dialysirt. Dann wurde der Niederschlag abfiltrirt, mit wenig destillirtem Wasser gewaschen, zwischen Filtrirpapier ausgepresst, vom Filter genommen und über Schwefelsäure getrocknet.

In der ursprünglichen, dialysirten Verdauungsflüssigkeit ist aber ein grosser Theil des sogleich näher zu beschreibenden Bestandtheils gelöst geblieben. Zur wenigstens theilweisen Ausscheidung muss die Lösung concentrirt werden. Das gelang mir am besten durch Behandlung der Flüssigkeit, nach dem Centrifugiren, mit basischem Bleiacetat und Ammoniak. Es bildet sich dann ein voluminöser Niederschlag, welcher leicht zu filtriren ist. Der Niederschlag wurde vom Filter genommen und mit einer gesättigten Oxalsäurelösung versetzt. Der dicke Brei liefert dann bald eine gelbbraune Flüssigkeit, welche durch Filtriren leicht vom Bleioxalat zu befreien ist. So war die Lösung in kurzer Frist von 6 bis 7 Liter auf ein Volum von 300 bis 400 cbcm. reducirt. Diese stark saure, völlig klare Flüssigkeit wurde 24 bis 36 Stunden gegen strömendes Leitungswasser dialysirt. In dem Dialysator hatte sich dann wieder ein Niederschlag gebildet, welcher, mittelst der Centrifuge von der Flüssigkeit getrennt, bei 37° C. in 0,2 proc. Salzsäure gelöst, durch Dialyse gegen destillirtes Wasser wieder gefällt, aufs Neue in Salzsäure gelöst, kurz, ganz in der oben beschriebenen Weise behandelt und schliesslich über Schwefelsäure getrocknet wurde.

Zwischen dieser Substanz und der mittelst Dialyse aus der ursprünglichen Verdauungsflüssigkeit erhaltenen habe ich in keiner Hinsicht irgend einen Unterschied finden können. Anfangs war die aus der durch Zersetzung des Bleiniederschlages erhaltenen Flüssigkeit gefällte Substanz braun gefärbt; wiederholtes, wenn nöthig dreimaliges, Lösen in Salzsäure und Fällen mittelst Dialyse lieferte aber schliesslich ein nur wenig gefärbtes Präparat. Vollkommen weiss war es niemals, ebensowenig wie der aus der ursprünglichen Verdauungsflüssigkeit

beim Dialysiren gefällte Stoff, welcher von Anfang an nur wenig gefärbt war. Beim Trocknen im Exsiccator wurde die Farbe immer dunkler. Die getrocknete Substanz lässt sich leicht fein zerreiben und bildet dann ein leichtgelbes, kaum hygroskopisches Pulver.

Dieser Stoff, welcher sich als ein ausserordentlich kräftiges Pepsin herausstellte, ist, frisch gefällt mittelst Dialyse, in nicht unbeträchtlicher Menge löslich in reinem Wasser, viel leichter aber in schwacher Kochsalzlösung. Getrocknet löst derselbe sich nicht merkbar in Wasser, wohl aber in verdünnter Kochsalzlösung. In verschiedenen verdünnten Säuren löst sich die Substanz, am besten bei Körpertemperatur, zu einer wasserklaren Flüssigkeit. Aus dieser Lösung wird sie wieder, wenn wenigstens die Flüssigkeit salzarm ist, theilweise gefällt, sobald der Säuregrad bis zu einem gewissen Gehalt erniedrigt wird. Wie oben mitgetheilt, ist der Gehalt, wobei die Löslichkeit am Geringsten ist, für Salzsäure 0,02 %.

Die Substanz gibt die Eiweissreactionen und enthält Phosphor und zwar ungefähr 1 %. Die Phosphorbestimmungen lieferten aber untereinander nicht so gute Uebereinstimmung, dass die Substanz als ganz rein betrachtet werden dürfte. Anfangs wusch ich den im Dialysator gebildeten Niederschlag, vor dem Trocknen, mit Alkohol und Aether aus. Dann wurde der P-Gehalt niedriger gefunden, in einem Fall sogar nur 0,6 %. Man würde geneigt sein, daraus zu folgern, dass die Substanz von P-haltigen Stoffen verunreinigt war, welche beim Auswaschen mit Aether entfernt wurden. So einfach liegt aber die Sache nicht. Das Auswaschen mit Alkohol zerstört die Substanz: sie verliert dabei ihre Löslichkeit in HCl und auch das Vermögen, Eiweiss zu verdauen. Es wäre auch schwer anzunehmen, dass in der beschriebenen Weise bereitete Pepsin sei in irgend erheblichem Maass mit Lecithin, Protagon oder derartigen Stoffen verunreinigt, nachdem dasselbe aus einer völlig klaren Lösung in Wasser mit ein wenig Salzsäure erhalten war, und ohne jede Opalescenz wieder in verdünnter Salzsäure gelöst werden konnte. Ich glaube einigen Grund für die Annahme zu haben, dass das Pepsin bald mehr, bald

weniger mit einer wasserlöslichen P-haltigen Substanz verunreinigt sei. Ist das thatsächlich der Fall, so wird diese Verunreinigung durch nochmalige Wiederholung des Lösens in Salzsäure und Fällens mittelst Dialyse zu beseitigen sein. Diese Operation geht aber mit grossem Verlust an Material einher, da die Fällung mittelst Dialyse immer unvollständig ist. Ich habe deshalb die Bereitung grösserer Pepsinmengen in Aussicht genommen und werde dann versuchen, mittelst wiederholter Reinigung Pepsin mit constantem P-Gehalt zu gewinnen. Das wird aber einige Zeit in Anspruch nehmen. Bei der oben beschriebenen Bereitungsweise, wo das Pepsin zwei oder höchstens drei Mal mittelst Dialyse gegen destillirtes Wasser gefällt wurde, ist die Ausbeute schon nicht gross: etwa 0,5 gr. aus 10 Schweinsmagenschleimhäuten. Ausserdem ist die warme Jahreszeit nicht sehr günstig für diese Bereitung, erstens mit Rücksicht auf die Gefahr der Verunreinigung der sehr schwach sauren Flüssigkeit mit Mikroorganismen, und zweitens weil das Pepsin sich bei der Dialyse bei höherer Temperatur viel schwieriger ausscheidet als bei kaltem Wetter.

Dieser phosphorhaltige Eiweissstoff ist nicht nur eine sehr labile, sondern auch eine sehr complicirte Verbindung. Wird die saure, klare Lösung über der Flamme erhitzt, so findet eine Spaltung statt, in ein bei saurerer Reaction unlösliches Nucleoproteid, eine in warmem Alkohl leicht, in kaltem schwer lösliche P-haltige Substanz, und eine Albumose.

Zur Bereitung des in Säure unlöslichen Spaltungsproductes, des Nucleoproteids, habe ich nicht nur das mittelst Dialyse gewonnene Pepsin gebraucht, sondern auch die immer noch sehr kräftig eiweissverdauenden Lösungen, aus welchen sich im Dialysator Pepsin ausgeschieden hatte. Beim Kochen der klaren Flüssigkeit über der Flamme bildete sich ein reichlicher, sich gut absetzender Niederschlag. Oefters war die obenstehende Flüssigkeit ein wenig opalescirend. Der Niederschlag wurde erst durch Decantiren, dann auf dem Filter mit Wasser gewaschen, bis das ablaufende Wasser die Biuretreaction nicht mehr gab, dann wurde derselbe vom Filter genommen, mit 85 proc. Alkohol bei 45° C. digerirt, bei dieser

Temperatur filtrirt, wiederholt mit warmem Alkohol, dann mit kaltem absolutem Alkohol und schliesslich mit Aether gewaschen und dann über Schwefelsäure oder Chlorcalcium getrocknet. So wurde ein rein weisses Pulver erhalten, das sich in Wasser bei neutraler oder saurerer Reaction nicht, leicht aber bei alkalischer Reaction löste. Mit Natronlauge und Bleiacetat gekocht, liefert es Schwefelblei, es zeigt die Millon'sche und die Xanthoproteinreaction, die Biuretreaction, kurz, das unlösliche, aus der Pepsinlösung erhaltene Spaltungsproduct ist ein Eiweissstoff. Ausserdem enthält es Phosphor. In drei Präparaten, von verschiedenen Bereitungen herstammend, fand ich, nachdem die bei 110° C. getrocknete Substanz mit der etwa 30fachen Menge Soda-Salpeter verbrannt war:

I.	Von 0,308 gr. Substanz	0,0035 gr. $Mg_2 P_2 O_7$,	also 0,31 % P.
II.	» 0,1738 »	» 0,0019 »	» 0,3 » »
III.	» 0,3035 »	» 0,0036 »	» 0,33 » »

Der Aschegehalt der Substanz ist bei diesen Bestimmungen nicht in Rechnung gebracht. Der hierdurch verursachte Fehler kommt aber nicht in Betracht. Die für Bestimmung III gebrauchte Substanz enthielt nur 0,46 % Asche. Auch in anderen Fällen fand ich den Aschegehalt sehr gering. Nicht jedesmal aber wurde eine genügende Substanzmenge erhalten, um ausser der P-Bestimmung auch noch eine Aschebestimmung machen zu können.

Dass diese phosphorhaltige Eiweisssubstanz thatsächlich als ein Nucleoproteid betrachtet werden darf, geht daraus hervor, dass sie beim Kochen mit verdünnter Schwefelsäure Alloxurbasen liefert. Ich kann in Bezug hierauf jetzt nur mittheilen, dass die Silberverbindungen dieser Basen, in heisser Salpetersäure gelöst, sich beim Abkühlen grösstentheils wieder ausscheiden. Die bis jetzt erhaltenen Mengen reichten zur genaueren Characterisirung nicht aus.

Eine reducirende Substanz wurde beim Kochen mit 3proc. Schwefelsäure aus diesem Nucleoproteid nicht erhalten.

Der Phosphorgehalt des Nucleoproteids ist geringer als der der Muttersubstanz, des Pepsins. Man darf also erwarten, dass unter den beim Kochen frei werdenden Spaltungspro-

ducten eine andere phosphorreiche Substanz zu finden sein wird. Thatsächlich scheidet sich aus dem Alkohol, mit welchem das Nucleoproteid digerirt ist, beim Erkalten eine Substanz aus, welche, mit Soda-Salpeter verbrannt, eine phosphorreiche Asche liefert. Die Natur dieser Substanz ist indessen noch nicht näher festgestellt.

Drittens enthält die gekochte Pepsinlösung Albumose als Spaltungsproduct. Das nach der Ausscheidung des Nucleoproteids klare Filtrat wird durch Zusatz von Essigsäure mit Kochsalz opalescirend, welche Opalescenz beim Kochen verschwindet und beim Abkühlen zurückkehrt. Sättigung der Lösung mit Ammonsulfat ruft einen Niederschlag hervor, welcher auch nach dem Kochen leicht löslich in Wasser ist und starke Biuretreaction gibt. Wenn die Lösung nacheinander bei saurer und alkalischer Reaction siedend mit Ammonsulfat gesättigt und nach dem Abkühlen filtrirt wird, gibt das Filtrat noch immer, wenngleich in geringem Maasse, die Biuretreaction.

Dass diese Albumose schon von vornherein als Verunreinigung in dem Pepsin vorhanden sein sollte, ist nicht anzunehmen. Das zwei- oder dreimal in Salzsäure gelöste und durch Dialyse gefällte und dann noch mit ein wenig Wasser gewaschene Pepsin kann die so leichtlösliche Albumose, welche ja von Essigsäure und Kochsalz in der Kälte kaum gefällt wird, nicht in einigermaassen erheblicher Menge mitgerissen haben. Und die Menge der Albumose, welche nach dem Kochen und Filtriren der Pepsinlösung von Ammoniumsulfat gefällt wird, ist gar nicht unerheblich.

Merkwürdigerweise findet die beschriebene Spaltung, wobei ein Nucleoproteid ausfällt, nur statt bei schneller Erhitzung. Wird die Pepsinlösung langsam im Wasserbad erwärmt, so ist die Ausscheidung des Nucleoproteids unvollständig oder gar nicht zu beobachten. Eine Pepsinlösung kann, wenn sie nur nicht viel freie Säure enthält, im Wasserbad langsam auf 65° bis 70° C. erhitzt werden, ohne dass die Flüssigkeit sich auch nur im Geringsten trübt. Dennoch ist sie dann alterirt: sie hat das Vermögen, Eiweiss zu verdauen, verloren und trübt sich jetzt auch nicht mehr beim Erhitzen über der Flamme.

Die Temperatur, bei welcher sich die Lösung bei schneller Erhitzung — durch Eintauchen des Probirrohrs in heisses Wasser — trübt, ist vom Säuregehalt abhängig. Eine Lösung, welche bei der Dialyse einen Theil ihres Pepsins verloren hat, gibt beim Kochen über der Flamme eine reichliche Fällung; sie röthet Lakmuspapier, bläut aber Congopapier nicht; sie trübt sich erst beim Eintauchen in Wasser von 85° C. Sobald aber diese Lösung mit Salzsäure in Ueberschuss versetzt ist, trübt sie sich schon bei 60° C. Nichtsdestoweniger verliert sie, ohne Säurezusatz eine Viertelstunde auf 60° C. erwärmt, wiewohl sie jetzt klar bleibt, das Vermögen, Eiweiss zu verdauen und beim Kochen über der Flamme einen Niederschlag zu liefern.

Dieser höchst complicirte Eiweissstoff, welcher im künstlichen Magensaft nachgewiesen werden kann, ist offenbar auch im natürlichen Magensaft vorhanden. Im reinen Magensaft des Hundes, welcher weder Speichel noch Nahrungsreste enthielt, fand Mad. Schoumow-Simanowsky¹⁾ eine Eiweisssubstanz, welche sich ausschied beim Abkühlen und, wenn durch Alkalizusatz der Säuregehalt verringert wurde, sich aber wieder löste, sobald die Reaction der Flüssigkeit neutral gemacht wurde, und welche auch nach dem Trocknen leichtlöslich war in verdünnter Salzsäure, Eiweiss verdaute und in saurer Lösung bei 60° C. gerann. Nur wurde diese Substanz nicht immer phosphorhaltig gefunden, wenigstens nicht nach dem Auswaschen mit Alkohol. Nachdem ich aber fand, dass die aus dem künstlichen Magensaft erhaltene Substanz durch Behandlung mit Alkohol angegriffen wird und dabei Phosphor verliert, spricht, wie ich glaube, das von Mad. Schoumow-Simanowsky bei der Analyse der nicht mit Alkohol ausgewaschenen Substanz erhaltene positive Resultat mehr zu Gunsten der Identität der aus natürlichem und aus künstlichem Magensaft bereiteten Stoffen als das Nichtauffinden des P nach der Alkoholbehandlung dagegen spricht.

Die von mir gebrauchte Bereitungsweise hat, meiner Ansicht nach, einen grossen Vortheil insofern, als sie die Ge-

¹⁾ Arch. d. Sciences biol. St. Petersb., T. II, S. 463.

fahr der Verunreinigung, namentlich mit anderen Eiweissstoffen, soviel wie möglich verringert. Eine klare, durch 5 tägige Digestion der Magenschleimhaut mit 0,5 proc. HCl erhaltene Lösung enthält wohl keine Verdauungsproducte von Eiweiss, welche mittelst Dialyse bis der Säuregehalt auf 0,02% HCl gesunken ist gefällt werden, dann wieder in 0,2 proc. HCl löslich sind, sich wieder ausscheiden, sobald der Säuregehalt verringert wird, und sich aufs Neue lösen, wenn die Säureentziehung noch weiter geht.

Dieser Vortheil wiegt wohl den Nachtheil auf, dass bei der Bereitung viel Material verloren wird, so dass die Bereitung von Präparaten, welche sowohl in Bezug auf die Menge als auf die Reinheit den strengen Forderungen, welche bei der Elementaranalyse gestellt werden sollen, genügen, viel Zeit und Arbeit in Anspruch nehmen wird.

Der Stoff ist aber, auch wenn die elementare Zusammensetzung noch nicht bekannt ist, genügend characterisirt, um denselben von anderen bis jetzt bekannten Stoffen unterscheiden zu können.

Es drängt sich jetzt die Frage auf, ob dieser Stoff die Wirkung des Pepsins nur deshalb zeigt, weil derselbe das Enzym mechanisch mitgerissen hat oder ob dieser sehr complizirte phosphorhaltige Eiweissstoff vielleicht selbst als das Enzym, als das wahre Pepsin betrachtet werden dürfte.

Wie es mir scheint, kann man einigen Grund finden zur Beantwortung dieser Frage im letztgenannten Sinn.

Präparate verschiedener Herkunft, aus der Magenschleimhaut des Kalbes und des Hundes sowohl als aus der des Schweines, zeigten eine ausserordentlich grosse verdauende Wirkung. Abgewogene Mengen der über Schwefelsäure getrockneten Substanz wurden in 0,2 proc. HCl gelöst. Von einer solchen Lösung wurde je 1 ccm. vermischt mit je 5 ccm. HCl 0,2%, wozu eine Fibrinflocke oder ein kleiner Cylinder aus geronnenem Hühnereiweiss hinzugesetzt war. Jedesmal stellte es sich nun heraus, dass einzelne Hundertel eines Milligramms des Pepsins genügten, in diesen 6 ccm. Flüssigkeit bei Körpertemperatur eine Fibrinflocke innerhalb

einer Stunde, ein 2 mm. dickes und 1 cm. langes Eiweisscylinderchen in Verlauf von einigen Stunden zu lösen. Ja $\frac{1}{1000}$ mgr. löst noch in einigen Stunden eine Fibrinflocke. Es braucht kaum gesagt zu werden, dass jedesmal durch Controlversuche unter übrigens genau denselben Verhältnissen, aber ohne Pepsin, nachgewiesen wurde, dass in der Zeit, in welcher das Fibrin oder das Hühnereiweiss von dem Pepsin gelöst war, die Digestion mit Salzsäure allein keine nachweisbare Lösung verursachte.

Es hält wohl schwer sich vorzustellen, dass eine in so geringer Menge sich noch wirksam zeigende Substanz diese Wirksamkeit nur einer Verunreinigung verdanken sollte.

Weiter ist es der Beachtung werth, dass der Stoff, in Lösung erhitzt, das Vermögen, Eiweiss zu verdauen, eben bei derjenigen Temperatur, bei welcher Zersetzung eintritt, einbüsst, auch wenn bei langsamer Erhitzung und Abwesenheit freier Säure das Nucleoproteid nicht gefällt wird. Durch Erhitzen auf 60° C. wird eine nicht zu wenig freie Säure enthaltende Lösung getrübt; eine dialysirte Lösung bleibt bei dieser Temperatur völlig klar, verliert aber, wenn wenigstens die Erhitzung lange genug, etwa eine Viertelstunde, gedauert hat, das Vermögen, beim Kochen Nucleoproteid auszuschcheiden. Der Stoff ist also, ob die Lösung sich getrübt hat oder nicht, durch das Erhitzen auf 60° C. zersetzt. Und eben bei dieser Temperatur ist das Enzym zerstört.

Ich fand sogar, dass bei kurz dauernder Erhitzung einer freie Säure enthaltenden Lösung der Grad der Zersetzung, kenntlich an der Intensität der Trübung, gleichen Schritt hält mit dem Sinken der Verdauungskraft. Je 1 cbcm. einer wenig freie Säure enthaltenden, bei 60° C. noch klar bleibenden Lösung wurde 2 Minuten lang im Wasserbad erhitzt, dann sogleich mit je 5 cbcm. eine Fibrinflocke enthaltender 0,2 proc. Salzsäure vermischt und auf 37° C. gebracht. Das Resultat war folgendes:

- | | | | |
|----|------------------------------|--------------------|-------------------------------|
| a) | Erhitzt auf 75° C., | ist trübe, | digerirt nicht. |
| b) | » | » 70° » » | opalescirend, » sehr schwach. |
| c) | » | » 65° » » | kaum opalescirend, » gut. |
| d) | » | » 60° » » | klar, » sehr gut. |

In diesem Fall hatte die Erhitzung auf 60° C. nicht lange genug gedauert, das Enzym zu zerstören — der complicirte Eiweissstoff war aber auch nicht zersetzt: die Lösung war nicht nur klar geblieben, sondern hatte auch die Fähigkeit, bei schnellem Erhitzen Nucleoproteid auszuschleiden, behalten.

Es wäre ein sehr merkwürdiges Zusammentreffen, wenn der Eiweissstoff und das Enzym zufälligerweise zusammen gemischt, eine so völlige Uebereinstimmung in Bezug auf die Widerstandsfähigkeit gegen Erhitzung zeigen würden.

Oefters ist aber darauf aufmerksam gemacht, dass eine nach der Brücke'schen Methode hergestellte Pepsinlösung die Eiweissreactionen nicht gibt und das Pepsin daher nicht als ein Eiweisskörper betrachtet werden darf. In Bezug darauf muss ich aber bemerken, dass das von mir bereitete Pepsin schon in sehr verdünnter Lösung eine sehr kräftige Wirkung zeigt. Wird von der im Exsiccator getrockneten Substanz 0.010 gr. in 100 ccm. 0,2 proc. Salzsäure gelöst, so erhält man einen sehr kräftig wirkenden Magensaft, welcher aber weder mit Tannin, noch mit Salpetersäure die geringste Spur einer Opalescenz gibt, beim Kochen mit Salpetersäure farblos bleibt und dann nach Zusatz von Ammoniak kaum merklich gelb gefärbt wird. Und doch ist die in der Salzsäure gelöste Substanz ganz sicher eine Eiweissverbindung.

Auch umgekehrt konnte ich nachweisen, dass in kräftig wirksamem Magensaft, welcher die Eiweissreactionen nicht gab, ein Eiweissstoff vorhanden war. Sehr gut wirkendes Handelspepsin (ein amerikanisches Fabrikat von Armour in Chicago) wurde in 2 proc. Phosphorsäure gelöst. Das klare Filtrat wurde mit Kalkwasser alkalisch gemacht und filtrirt. Dann wurde der Niederschlag mittelst Salzsäure gelöst und die filtrirte Lösung dialysirt. Die Flüssigkeit, deren Volum beim Dialysiren stark gewachsen war, war klar geblieben, gab von Eiweissreactionen keine Spur, löste aber mit Hilfe von Salzsäure Fibrin schnell auf. Zum Einengen wurde die Lösung mit basischem Bleiacetat und Ammoniak behandelt und der Niederschlag mit Oxalsäure zersetzt. Auf diese Weise wurde das Volum von circa 200 ccm. auf 10 ccm. reducirt.

Diese Lösung wurde beim Dialysiren trübe. Die durch Erwärmen auf 37° C. wieder nahezu geklärte Flüssigkeit digerirte sehr kräftig (2 Tropfen lösten in einer Viertelstunde eine grosse Fibrinflocke in 6 ccm. 0,2 proc. Salzsäure), lieferte beim Kochen über der Flamme einen, sich nicht in Salzsäure, leicht aber in Natronlauge lösenden Niederschlag, trübte sich beim Zusatz von Tannin und von Salpetersäure, färbte sich beim Kochen mit Salpetersäure gelb und gab die Millon'sche Reaction.

Das Ausbleiben der Eiweissreactionen in gut wirkenden Pepsinlösungen beweist also nicht, dass Pepsin nicht ein Eiweissstoff ist.

Schliesslich will ich noch eine Beobachtung mittheilen, welche mich sehr überrascht hat. Nicht nur das von mir bereitete, sondern auch verschiedene Handelspepsine, von Langebek, von Witte, von Armoux, sind im Stande, Milch bei neutraler Reaction gerinnen zu machen. Werden einige Körnchen des Pepsins mit einem Tropfen Wasser, oder besser noch mit einem Tropfen 0,7 proc. NaCl angefeuchtet und dann mit etwa 5 ccm. Milch vermischt, so gerinnt die Milch bei Körpertemperatur innerhalb einiger Minuten vollständig. Wird das Pepsin mit mehr Wasser oder Kochsalzlösung verdünnt, dann ruft es in der Milch keine sichtbare Veränderung hervor. Diese Beobachtung überraschte mich umsomehr, als ich mich früher schon von der Richtigkeit der Mittheilung Hammarsten's überzeugt hatte, dass eine Chymosinlösung durch Digestion mit Pepsin bei einem Gehalt an HCl von 0,3% ganz unwirksam gemacht wird. Ich erinnere daran, dass das von mir bereitete Pepsin mittelst Digestion der Magenschleimhaut in 0,5 proc. Salzsäure während 5 Tagen erhalten wurde. Anfangs glaubte ich, dass in dieser Weise die Annahme gesichert wurde, dass in der Flüssigkeit, aus welcher ich das Pepsin herzustellen wünschte, kein anderes Enzym vorhanden sei.