

Über die Wirkung des Pepsins resp. Labferments auf konzentrierte Lösungen der Produkte der peptischen Verdauung der Eiweißkörper (Reaktion von A. Danilewski).

Von
D. Lawrow.

(Der Redaktion zugegangen am 15. Januar 1907.)

Die Frage nach der Wirkung des Pepsins resp. Labferments auf konzentrierte Lösungen der peptischen Verdauungsprodukte der Eiweißkörper bietet unzweifelhaft ein besonderes Interesse dar für das Studium der dynamischen Eigenschaften der genannten Fermente.

A. Danilewski hat zuerst gezeigt, daß verschiedene Präparate des Labferments in mehr oder weniger eingedickten Lösungen des Wittepeptons eigentümliche Eiweißniederschläge hervorrufen und zwar durch fermentative Wirkung. Nach der Meinung des genannten Autors beruht die Wirkung des Labferments auf einer Wiederherstellung von Eiweißkörpern aus gewissen Produkten ihrer Verdauung, was sowohl in vitro als auch im Organismus statthaben kann.

Diese A. Danilewskische Reaktion wurde vor allem von W. Okunew an Produkten der peptischen und tryptischen Verdauung des Eieralbumins, Fibrins, Myosins und Caseins der Kuhmilch untersucht.¹⁾ Zu seinen Versuchen verwendete der Autor nicht einzelne Produkte der Verdauung dieses oder jenes Eiweißstoffes, sondern Gemische dieser Produkte. Dem genannten Autor zufolge hat die in Rede stehende Reaktion einen fermentativen Charakter: ihre Produkte sind als Eiweißkörper

¹⁾ W. Okunew. Über die Rolle des Labferments bei den Assimilationsprozessen im Organismus. Inaug.-Diss. 1895. (Aus dem Laboratorium von Prof. A. Danilewski, St. Petersburg.)

besonderer Art anzusehen und zwar sind sie unlöslich in Wasser, sehr schwachen Alkalien und schwachen Säuren. In bedeutenderer Menge (ca. $\frac{1}{3}$) lösen sie sich in heißem 50—60%igen Alkohol; sie präsentieren mehr oder weniger reichliche flockige Niederschläge, die die Reaktionslösung in eine dicke breiartige Masse verwandeln. Der Autor nimmt an, daß die gegebene Reaktion eine Albuminisation sei. Eine ähnliche Albuminisation werde durch das Labferment auch im tierischen Organismus hervorgebracht, was das Verschwinden der Verdauungsprodukte aus dem Verdauungskanale, den Blut- und Lymphwegen bedinge. Nach dem Autor kommt die Albuminisation bei saurer Reaktion, im⁺besonderen auch bei Gegenwart freier Salzsäure, ja sogar bei Gegenwart relativ bedeutender Mengen genannter Säure (z. B. 2%) zustande.

Ferner weist W. Okunew darauf hin, daß im Pankreassaft der Pflanzenfresser und Hunde sich ein Labferment befindet, das «Peptonlösungen» nicht bei saurer, sondern alkalischer Reaktion, z. B. bei Gegenwart 0,5—1% kohlensaures Natron,¹⁾ zur Koagulation bringe.

In der Arbeit «Zur Frage über den Chemismus der peptischen und tryptischen Verdauung der Eiweißkörper»²⁾ habe ich darauf hingewiesen, daß diejenigen Produkte der peptischen und tryptischen Verdauung der Eiweißkörper, welche durch Ammonsulfat nicht gefällt werden, nicht mit Labferment reagieren, und zwar geben sie keine Niederschläge, wie sie W. Okunew beschrieben hat.

W. Sawjalow³⁾ untersuchte die fällende Wirkung des Labferments auf Wittepepton, auf verschiedene Albumosen (Schema Kühnes) des genannten Peptons, auf die Produkte der peptischen Verdauung des Albumins, Myosins, auf Ampho- und Antipepton von Kühne, und zwar in mehr oder weniger

¹⁾ W. Okunew, Wratsch, 1900, S. 682 (russisch).

²⁾ D. Lawrow, Inaug.-Diss. 1897; aus dem Laboratorium von Prof. A. Danilewski, St. Petersburg; s. Diese Zeitschrift, Bd. XXVI, S. 513.

³⁾ W. Sawjalow, Zur Theorie der Eiweißverdauung. Inaug.-Diss., Jurjew, 1899 (russisch); Pflügers Arch., Bd. LXXXV, S. 171, 1901.

konzentrierten Lösungen der genannten Produkte. Einzig und allein das Antipepton von Kühne reagierte nach dem Autor mit Labferment nicht: das Amphopepton reagiert schwach (in den durch das Labferment erhaltenen Niederschlag geht ca. 1% der Substanz über); am stärksten reagiert die Heteroalbumose. Die Reaktion verläuft nach W. Sawjalow am intensivsten bei Gegenwart von ca. 0,55% Salzsäure: ca. 0,9% dieser Säure verhindert die Reaktion. Der Autor bemerkt, daß zum Zustandekommen der Reaktion eine verhältnismäßig bedeutende Konzentration der Lösungen der zu untersuchenden Verdauungsprodukte erforderlich ist, so daß z. B. 8%ige Lösungen schon nicht mehr reagieren. Die Reaktion vollzieht sich auch bei Gegenwart freier Alkalien, z. B. von 0,25% kohlensaurem Natron. Der Autor nennt die Niederschläge, welche sich bei der in Rede stehenden Reaktion bilden, Plasteine; in ihnen sieht er globulinähnliche Eiweißstoffe. Die Plasteine lösen sich nicht in Wasser, wohl aber in schwachen Lösungen der Alkalien und Säuren; bei Gegenwart neutraler Salze lösen sie sich sehr wenig. Die Reaktion selbst sieht der Autor als eine Proteosynthese an. Die Plasteine sind nach Ansicht des Autors in chemischer Beziehung Individuen (keine Gemische), gleich in ihrer elementaren Zusammensetzung und stellen schließlich eine und dieselbe Substanz dar. Die Zusammensetzung der vom Autor untersuchten Plasteine ist folgende:

	Plastein aus Eieralbumin %	Plastein aus Myosin %	Plastein aus Casein %	Plastein aus Wittepepton %
C	55,17	54,89	55,74	53,49
H	7,54	7,13	7,19	7,27
N	14,78	14,67	14,68	15,33
S	1,42	1,17	0,74	1,25
O	20,97	21,14	21,65	22,60
P	—	—	0,16	—

W. Sawjalow¹⁾ nimmt an, daß außer diesen Plasteinen bei der in Rede stehenden Reaktion noch ein «lösliches» Plastein entsteht, das nicht als Niederschlag ausfällt, sondern in Lösung bleibt.

D. Kurajeff²⁾ zeigte zuerst, daß das Papayotin auf 10—20^o/oige Lösungen von Peptonen verschiedener Herkunft koagulierend wirkt und zwar unter Bildung von Niederschlägen, die anscheinend in ihrer Löslichkeit den Plasteinen Sawjalows ähnlich sind. Diese Niederschläge entstehen unter Einwirkung des Papayotins bei amphoterer und alkalischer Reaktion. Lösungen (ca. 11^o/oige) der primären nach E. Pick³⁾ dargestellten Albumosen von amphoterer oder alkalischer Reaktion (durch Natriumcarbonat) geben, mit Papayotin angesetzt, nur einen unbedeutenden flockigen Niederschlag; bei saurer Reaktion hingegen entsteht eine unbedeutende flockige Abscheidung. Im höchsten Grade bemerkenswert ist nach dem Autor die koagulierende Wirkung des Papayotins auf Lösungen von sekundären, nach E. Pick dargestellten Albumosen des Wittepeptons.

Ferner hat der Autor genauer die Niederschläge untersucht, die in den Albumoselösungen durch Papayotin («Koagulosen» des Autors) und Labferment (Plasteine Sawjalows)⁴⁾ erzeugt werden, wobei er darauf hinweist, daß 1. Hetero- und Protoalbumose des Wittepeptons in ca. 10—12,5^o oigen, mit Salzsäure angesäuerten Lösungen gar nicht mit Labferment, wohl aber mit Papayotin reagieren; daß 2. Protocaseose Niederschläge mit Papayotin gibt, nicht jedoch mit Labferment; A'-Deuteroalbumose (nach F. Alexander dargestellt⁵⁾) hingegen sich zur koagulierenden Wirkung dieser Fermente umgekehrt verhält, d. h. sie reagiert nur mit dem Labferment.

Die Zahlen, die die Elementaranalyse der vom Autor untersuchten Niederschläge (aus Caseosen) ergab, sind die folgenden:

¹⁾ W. Sawjalow, Zentralbl. f. Physiologie, Bd. XVI, Nr. 22, 1902.

²⁾ D. Kurajeff, Hofmeisters Beiträge, Bd. I, S. 121—135.

³⁾ E. Pick, Diese Zeitschrift, Bd. XXIV, S. 240.

⁴⁾ D. Kurajeff, Hofmeisters Beiträge, Bd. II, S. 411—424.

⁵⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXV, S. 411, 1898.

	Papayotinniederschläge	Labniederschläge
C =	59,27—60,22	54,33—57,06
H =	7,15— 7,65	6,76— 7,19
N =	12,83—14,23	14,26—14,55
S =	0,88	—
P =	0,14	—

Nach dem Autor ist es bemerkenswert, daß die Quantität der gewonnenen Papayotin- und Labalbumosenniederschläge im Vergleich zur verwendeten Albumosenmenge stets ziemlich gering (2—6%) ausfiel. Die angegebenen Papayotin- und Labniederschläge sind nach dem Autor Albumosen besonderer Art, die vermöge des Labferments resp. Papayotins in einen Koagulationszustand versetzt sind. Gleich Sawjalow¹⁾ nimmt auch der Autor an, daß das Antialbumid und das sogenannte Anti-albumidgerinnsel von Kühne und Chittenden²⁾ große Ähnlichkeit mit den Plasteinen wie auch mit seinen Koagulosen hat. Die Frage, welcher Art die chemische Natur dieses Prozesses sei, und welche physiologische Bedeutung die entstandenen Produkte besaßen, läßt der Autor offen.

Derselbe Autor untersuchte die Plasteine aus krystallisiertem Ovalbumin, das nach der Hopkinsschen Methode gewonnen war.³⁾ Letzteres unterwarf er der Verdauung mit Grübberschem Pepsin und zwar den einen Teil 3 Tage, den anderen 18 Tage lang. Die von der ersten Portion erhaltene Albumosenlösung lieferte mit Labferment das «Plastein A»; die Albumosenlösung von der zweiten Portion ergab mit Lablösung das «Plastein B». Das Analysenresultat der beiden Präparate war folgendes:

	Plastein A.	Plastein B.
C =	58,82	58,92
H =	7,34	7,22
N =	14,44	14,31
S =	1,24	—
Asche =	Spuren	Spuren

¹⁾ l. c.

²⁾ Zeitschrift f. Biologie, Bd. XIX, S. 159, 1883.

³⁾ D. Kurajeff, Hofmeisters Bd. IV, S. 476—485, 1904.

Die Menge und die Zusammensetzung der gewonnenen Plasteine sind nach dem Autor auffallenderweise ganz gleich, ob die Plasteine nach drei- oder nach achtzehntägiger Pepsinverdauung des genannten Eiweißkörpers erhalten sind. Nach Meinung des Autors kann man mit großer Wahrscheinlichkeit annehmen, daß die Lab- und Papayotinniederschläge chemisch einheitliche Körper sind.

A. Nürnberg¹⁾ fand, daß die autolytischen Organextrakte auf Albumosenlösungen und Milch koagulierende Wirkung ausüben.

M. Lawrow und S. Salaskin²⁾ stellten es sich bei ihrer Arbeit zur Hauptaufgabe, nach Möglichkeit den Charakter der angegebenen Reaktion aufzuklären und dann der Lösung der Frage nach der Art des resp. der bei derselben entstehenden Körper näher zu kommen. Zum Ausgangsmaterial für ihre Versuche nahmen die Autoren das Wittepepton als solches und verschiedene Fraktionen dieses Präparates, die nach E. Pick erhalten waren. Zur Reaktion wurden stark eingedickte Lösungen der genannten Produkte verwendet; die Lösungen wurden mit Salzsäure bis zu 0,5% angesäuert und dann entweder mit Revaler Labextrakt oder mit natürlichem Hundemagensaft, der nach J. Pawlows Methode gewonnen war, versetzt.

Auf Grund ihrer Versuche kommen die Autoren unter anderen zu folgenden Schlüssen:

1. Die in konzentrierten Wittepeptonlösungen unter Einwirkung von Magensaft eintretende Bildung von Niederschlägen findet bei allen Arten von Albumosen statt.

2. Es liegen keine Gründe vor, diesen Prozeß als Rückverwandlung oder Regeneration des «Peptons» zu betrachten. Der oder vielleicht auch die hierbei entstehenden Körper behalten in gewisser Hinsicht den Charakter von Albumosen bei.

3. Die erhaltenen Niederschläge bieten einige Unterschiede von Kühnes Antialbumid.

¹⁾ A. Nürnberg, Hofmeisters Beiträge, Bd. IV, S. 543—553.

Aus dem Laboratorium von Prof. Dr. Kurajeff.

²⁾ M. Lawrow und S. Salaskin, Diese Zeitschrift, Bd. XXXVI, S. 277—291, 1902.

4. Es wäre somit richtiger, die von ihnen beschriebenen Niederschläge nicht mit dem präjudizierenden Namen «Plasteine» zu belegen, sondern als Labalbumosen zu bezeichnen.

5. Aller Wahrscheinlichkeit nach sind die Labalbumosen im Gegensatz zu den Pepsinalbumosen das Ergebnis chemischer Synthese, denn zu ihrer Entstehung bedarf es solcher Bedingungen, die denjenigen der Spaltung grade entgegengesetzt sind.

Die Autoren haben die Elementaranalyse der von ihnen dargestellten Labalbumosen nicht gemacht. H. Bayer¹⁾ bestätigt die Beobachtung D. Kurajeffs, daß nach E. Pick aus dem Wittepepton dargestellte, möglichst reine Proto- und Heteroalbumose keine Plasteine mit Lab bilden. Der Autor führte seine Versuche sowohl mit Wittepepton selbst, wie auch mit verschiedenen Fraktionen desselben aus, die vermittelt Alkohol und Aceton erhalten waren. Der Autor faßt das Ergebnis seiner Versuche dahin zusammen, daß die Plasteine mit zunehmender Reinigung rasch die charakteristischen Reaktionen der Eiweißstoffe, einschließlich der Biuret- und Millonschen Reaktion, einbüßen. Man muß auch der Muttersubstanz dieser Plasteine, dem Plasteinogen, die typischen Eiweißreaktionen absprechen. Das Plasteinogen wäre nach dem Autor ein Peptoid von vermutlich sehr einfacher Zusammensetzung. Aus dem Wittepepton erhielt der Autor ein Plastein von folgender Zusammensetzung:

$$C = 38,43\%$$

$$H = 7,01\%$$

$$N = 8,05\%$$

«Die so allgemeine Verbreitung plasteinbildender Fermente in tierischen und pflanzlichen Geweben weist geradezu darauf hin, daß die Zellen über Fermente gebieten, die ihnen zugeschwemmten Bruchstücke des Eiweißmoleküls durch Überführung in unlöslichen Zustand festzuhalten, vielleicht sogar durch einen Kondensationsvorgang den Eiweißkörpern des Protoplasmas bzw. des Blutes anzugliedern vermögen», sagt der Autor am Schlusse seiner Arbeit.

¹⁾ H. Bayer, Hofmeisters Beiträge, Bd. IV, S. 554—562, 1904.

R. Wait¹⁾ untersuchte die Wirkung des Labferments (Präparat von Hansen, Kopenhagen) und des Grüblerschen Pepsins auf Albumine und Globuline des Pferdeblutserums und die Produkte ihrer peptischen Verdauung; ferner auf verschiedene Fraktionen des Wittepeptons, Amphopeptone, Antipeptone und Verdauungsprodukte, die nach Bayer²⁾ erhalten waren. Die Fraktionen des von Heteroalbumose und den durch Ammoniumsulfat nicht fällbaren Produkten befreiten Wittepeptons waren folgende:

- I. Fraktion, Niederschlag, erhalten aus den bis zu ca. 20% eingedickten Lösungen des Wittepeptons durch Versetzen mit Alkohol bis zu 20%.
- II. Fraktion, Niederschlag mit 40% Alkohol.
- III. „ „ „ 60% „ „
- IV. „ „ „ 75% „ „
- V. „ „ „ 75% „ „ + 60% Äther.
- VI. Filtrat von der V. Fraktion.

Der Autor nennt die von ihm untersuchten Niederschläge Koagulosen und kommt auf Grund seiner Versuche zu folgenden Schlüssen:

1. Die erwähnten Globuline verhindern in bedeutendem Maße die koagulierende Wirkung des Labfermentes auf Milch und konzentrierte Lösungen der koagulogenen Substanzen: die Globuline selbst geben mit Labferment keine Niederschläge.

2. Die oben erwähnten Albumine verhindern die koagulierende Wirkung des Labs auf Milch nicht, verhindern jedoch die Wirkung desselben auf die koagulogenen Substanzen. Selbst reagieren sie mit Lab nicht.

3. Calciumchlorid in Mengen bis zu 1,5% beeinflusst die koagulierende Wirkung des Labferments auf koagulogene Substanzen nicht.

4. 11% ige Heteroalbumoselösungen geben bei keiner Reaktion mit Labferment Koagulosen.

5. 19,2% ige Lösungen der Fraktion I geben ebenfalls

¹⁾ R. Wait, Zur Frage über die Wirkung des Labferments auf die Verdauungsprodukte der Eiweißkörper. Inaug.-Diss. Aus dem Laboratorium von Prof. D. Lawrow, Jurjew, 1905.

²⁾ l. c.

bei keiner Reaktion mit Labferment Koagulosen. Die Stoffe dieser Fraktion entsprechen nach dem Verhalten ihrer Niederschläge und anderen Reaktionen einer Protoalbumose.

6. Fraktion II, die keiner Reinigung unterzogen war, reagierte mit Labferment sehr schwach. Die bis zum völligen Verschwinden der Biuretreaktion im Waschwasser ausgewaschene Koagulose gab alle Farbenreaktionen des Eiweißes: sie enthält 15,31% N, 52,23% C und 7,30% H. Es ist sehr wahrscheinlich, daß diese Fraktion, wenn sie gereinigt worden wäre, nicht mit Labferment reagiert hätte.

7. Fraktion III, ungereinigt, reagiert mit Labferment ebenso schwach wie die vorhergehende. Ihre Koagulose gab alle Farbenreaktionen des Eiweißes und enthielt 15,35% N.

8. Fraktion IV reagierte mit Labferment nicht, die Fraktion V hingegen gab 1,6% Koagulose (nach dem N-Gehalt berechnet). Letztere gab alle Farbenreaktionen und enthielt 15,33% N.

9. Die Fraktion VI gab in ihren konzentrierten Lösungen dreimal nach einander mit Labferment behandelt ca. 27% Koagulose (nach dem N-Gehalte berechnet). Nach zweimaliger Reinigung der Fraktion, wobei sie in Wasser gelöst und die wässrige Lösung mit Alkohol (75%) und Äther (60%) gefällt wurde, lieferte sie ca. 31% Koagulose. Die durch Waschen mit Wasser bis zum Verschwinden der Biuretreaktion im Waschwasser gereinigte Koagulose gibt alle Farbenreaktionen des Eiweißes mit Ausnahme der von Molisch und hatte, nach dem Trocknen bei 105—110° C. bis zum konstanten Gewicht, folgende Zusammensetzung:

$$C = 55,70\%$$

$$H = 7,11\%$$

$$N = 14,3\%$$

$$S = 1,3\%$$

10. Die Koagulosen sind je nach der Herkunft verschieden und präsentieren sich als Eiweißkörper besonderer Art, indem sie sich sowohl von den genuinen (nativen) und von den gewonnenen Eiweißkörpern wie auch von den bis jetzt bekannten Verdauungsprodukten der genannten Stoffe unterscheiden. Die Frage nach ihrer chemischen Individualität ist vollkommen un-
aufgeklärt und harret noch der Lösung.

11. Ob die koagulosebildende Wirkung des Labferments einen synthetischen oder analytischen Prozeß darstellt, ist vollkommen unbekannt. Jedenfalls handelt es sich nicht um eine Regeneration von Verdauungsprodukten der Eiweißstoffe zu diesen letzteren.

12. Koagulosen entstehen unter Einfluß des Labferments aus gewissen Produkten der peptischen Verdauung der Eiweißkörper *ceteris paribus* in größter Menge dann, wenn die zu untersuchende Lösung koagulosogener Substanzen eine schwach braune oder schwach braunblaue Färbung mit Kongopapier gibt: freie Salzsäure verhindert mehr weniger die Reaktion, sodaß bei 0,5% freier Salzsäure ein Auftreten der Koagulose fast garnicht mehr beobachtet wird. Bei alkalischer Reaktion entsteht keine Labkoagulose aus den Produkten der peptischen Verdauung der Eiweißkörper.

13. Das Auftreten eines löslichen Plasteins W. Sawjalows hat der Autor niemals beobachtet.

14. Ampho- und Antipeptone geben absolut keine Koagulosen.

15. Hetero- und Protoalbumose des Wittepeptons geben bei ihrer Verdauung mit Pepsin (9tägige Verdauung) koagulosogene Substanzen.

16. Die Bildung von Koagulosen in verdünnten (1—2%igen) Lösungen koagulosogener Substanzen wird in geringen resp. sehr geringen Mengen beobachtet.

17. 95%ige alkoholische Auszüge aus Amphopepton kürzerer oder längerer Verdauung reagieren nicht mit Labferment und geben keine Koagulosen.

18. Koagulosen kommen zustande sowohl mit verschiedenen Präparaten von Pepsin wie auch mit solchen von Labferment.

Wie man aus dem oben Angeführten ersieht, ist die Frage nach der Wirkung des Pepsins resp. Labferments auf konzentrierte Lösungen der Verdauungsprodukte der Eiweißkörper (die A. Danilewskische Reaktion) noch lange nicht genügend aufgeklärt, sogar nicht einmal in den Hauptzügen. Außer Zweifel steht folgendes:

1. Die Produkte der in Rede stehenden Reaktion sind nicht als regenerierte Eiweißkörper von bestimmten Typen anzusehen, sodaß der Vorgang weder als eine Albuminisation noch als eine Globulinisation usw. aufzufassen ist.

2. Die bis jetzt untersuchten Koagulosenplasteine, mit Ausnahme des Plasteins von H. Bayer (l. c.), stehen, nach den verschiedenen, qualitativen Reaktionen zu urteilen, den Eiweißkörpern mehr weniger nahe. Sie unterscheiden sich von den letzteren durch ihre Elementarzusammensetzung und zwar unter anderem dadurch, daß sie im Vergleich zu den Eiweißkörpern mehr Kohlenstoff und weniger Stickstoff haben. Ob sie wirklich Eiweißkörper sind, — diese Frage bedarf noch besonderer Untersuchungen. Ihre chemische Individualität ist noch vollkommen unaufgeklärt.

3. Koagulosenplasteine entstehen unter Bedingungen, die die hydrolytische fermentative Spaltung der Eiweißkörper resp. ihrer Verdauungsprodukte verhindern und zwar insofern, als zu ihrer Bildung eine mehr weniger bedeutende Konzentration der koaguloso- resp. plasteinogenen Substanzen erforderlich ist.

Daß Hetero- und Protoalbumose, Amphopepton und Antipepton von Kühne, wenigstens die oben in den Arbeiten angeführten, nicht zu den koagulosogenen Substanzen zu rechnen sind, ist kaum zweifelhaft.

Der Vorgang bei der Bildung der Koagulosenplasteine ist allem Anscheine nach ebenso verwickelt, wie der Prozeß bei der fermentativen hydrolytischen Spaltung der Eiweißstoffe.

Die unten mitzuteilenden Versuche verfolgen den Zweck, zur Aufklärung einiger Seiten bei der A. Danilewskischen Reaktion beizutragen.

Experimenteller Teil.

Die Wirkung des Grüblerschen Pepsins auf konzentrierte Lösungen der Produkte der peptischen Verdauung des Eieralbumins.

Krystallinisches, nach Hopkins dargestelltes Eieralbumin, koaguliert und ausgewaschen mit heißem Wasser, wurde mit

Grüblerschem Pepsin bei Gegenwart von 0,5 % iger H_2SO_4 und einem Überschuß von Chloroform der Verdauung überlassen. Letztere ging bei 35—40° C. vor sich und dauerte ca. 25 Tage. Die Verdauungslösung wurde dann von Schwefelsäure durch Ätzbaryt befreit, bis zu dünner Sirupkonsistenz eingedampft und vermittelst Alkohol und Äther fraktioniert gefällt. Die Fällung wurde bei 5—10° C. vorgenommen. Mit blauem Lackmuspapier reagierte die Lösung sauer: Kongopapier wurde schwach braun gefärbt.

Es wurden folgende Fraktionen erhalten:

- I. Fraktion, Niederschlag, gewonnen durch Zusatz von Alkohol bis zu 20%. Die Fraktion bestand aus einem unbedeutenden flockigen Niederschlage.
 - II. Fraktion, flockiger Niederschlag von unbedeutender Menge, erhalten mit 40% Alkohol.
 - III. Fraktion, Niederschlag mit 60% Alkohol.
 - IV. 75% „ „
- Die Fraktionen III und IV bildeten sehr klebrige Niederschläge von relativ unbedeutender Menge.
- V. Fraktion, Niederschlag, erhalten durch Versetzen des Filtrates IV mit 60% Äther.
- Diese Fraktion, an Menge die bedeutendste, bestand aus einem sehr zähen, klebrigen Niederschlage.
- VI. Fraktion war das Filtrat der Fraktion V. Hinsichtlich der Menge war diese Fraktion die zweite.

Die Fraktion V wurde fünfmal gereinigt und zwar durch Wiederauflösen in Wasser bis zur dünnen Sirupkonsistenz, nochmalige Fällung mit Alkohol (bis zu 75%) und Äther (bis zu 60%). Die Alkoholätherauszüge dieser Fraktion wurden zur Fraktion VI hinzugefügt. Die erhaltene Mischung wurde von Äther und Alkohol befreit und die wässrige Lösung der Substanzen dieser Fraktion nach Ansäuerung mit 0,5%iger Schwefelsäure durch Phosphorwolframsäure gefällt. Der Phosphorwolframsäureniederschlag wurde abgetrennt, sorgfältig mit Wasser ausgewaschen, das mit Schwefelsäure und Phosphorwolframsäure angesäuert war, und bei Zimmertemperatur mit Ätzbaryt zerlegt. Das Filtrat von dem Phosphorwolframsäureniederschlag wurde mit den Waschfiltraten vereinigt und aus dem Gemische die Schwefel- und Phosphorwolframsäure mit Ätzbaryt entfernt.

Auf diese Weise wurde die Fraktion VI in zwei Unterfraktionen geteilt: Die Unterfraktion M, welche Substanzen der Fraktion in Lösung hielt, die basischen Charakter besaßen resp. durch Phosphorwolframsäure fällbar waren, und die Unterfraktion N, eine Lösung von Substanzen der Fraktion VI, die nicht durch das genannte Reagens gefällt werden.

Es muß hierbei bemerkt werden, daß die Substanzen der Unterfraktion N wohl durch Phosphorwolframsäure fällbar sind; zu ihrer Fällung mit der genannten Säure bei Gegenwart von Mineralsäuren ist jedoch im Vergleich mit den Substanzen der Unterfraktion M eine ganz bedeutend stärkere Konzentration ihrer Lösungen erforderlich. Die Niederschläge, welche durch die Phosphorwolframsäure in den Lösungen der Substanzen der Unterfraktion N hervorgebracht werden, unterscheiden sich scharf im Äußeren von den Phosphorwolframsäureniederschlägen der Substanzen der Unterfraktion M dadurch, daß sie schnell beim Stehen in eine pulverartige, verhältnismäßig sehr wenig voluminöse Form übergehen.

Des weiteren wurde die Unterfraktion M noch in zwei Teile getrennt und zwar durch Ammoniumsulfat bei ca. 100°C .: a) in Albumosesubstanzen der Unterfraktion, die durch das genannte Salz gefällt, und b) Amphopeptonsubstanzen, die durch das genannte Reagens nicht gefällt wurden.

Über die weitere Reinigung der Albumosekörper der Unterfraktion M siehe unten.

Zur Herstellung von Koagulosen benutzte ich Lösungen des Grüblerschen Pepsins, die folgendermaßen bereitet wurden. Eine 5%ige Lösung des genannten Pepsins wurde bis zu 0,2% mit Salzsäure angesäuert und bei $35-40^{\circ}\text{C}$. ca. 5 Tage lang gehalten; darauf wurde die Lösung 7 Tage lang in destilliertem Wasser bei Gegenwart von Chloroform der Dialyse unterzogen. Die dialysierte Lösung wurde bei $35-40^{\circ}\text{C}$. eingengt. Die so erhaltene Pepsinlösung enthielt in je 100 ccm 0,0358 g Stickstoff, wirkte sehr stark verdauend (4 Tropfen der Pepsinlösung + 4 ccm 0,5%iger Salzsäure verdauten nach Mett ca. 5 mm im Verlaufe von ca. 24 Stunden) und koagulierte Kuhmilch sehr schnell und kräftig.

Zu meinen Versuchen benutzte ich nur die Fraktionen V und VI: die Fraktionen I—IV kamen aus folgenden Gründen nicht zur Verwendung: 1. Sie waren nicht rein, da sie Stoffe der höheren Fraktionen enthielten mit Einschluß der Fraktion VI, wie sich das bei ihrer genaueren Untersuchung erwies und zwar bei der Fraktionierung mit Alkoholäther: 2. sie waren in für die Versuche unzureichender Menge vorhanden.

Die Fraktion V reagierte, so lange sie noch nicht der oben beschriebenen fünfmaligen Reinigung unterzogen war, ziemlich stark mit der erwähnten Pepsinlösung unter Bildung von Koagulosen. Nach der Reinigung erwies es sich jedoch, daß sie keine koagulosogenen Substanzen mehr enthielt: denn ihre eingeeengte Lösung (bis auf 2,1856 g Stickstoff in je 100 ccm Lösung) gab mit der genannten Pepsinlösung, die zu 5—15 Tropfen auf je 10 ccm der Fraktionslösung in Anwendung kam, gar keine koaguloseartigen Niederschläge, weder bei amphoterer, noch bei saurer Reaktion (nach Lackmuspapier), noch bei Spuren freier Salzsäure (sehr schwachbraune Färbung des Kongopapiers), noch auch bei größeren Mengen dieser Säure. Eine mit dieser gereinigten Fraktion angestellte Reihe von ähnlichen Versuchen, die sich bis auf ca. 48 Stunden erstreckte, läßt annehmen, daß diese gereinigte Fraktion keine (resp. sehr unbedeutende Mengen) koagulosogenen Substanzen enthielt. Die Stoffe dieser Fraktion haben im allgemeinen Deuteroalbumosecharakter, nach ihren Fällungsreaktionen mit Natriumchlorid, Natriumchlorid + Essigsäure, Kupfersulfat usw. zu urteilen.

Ebenso erwiesen sich die Amphopeptonsubstanzen der Unterfraktion M als nicht koagulosogen. Die Versuche mit diesen Substanzen wurden ebenso ausgeführt wie mit der gereinigten Fraktion V, jedoch mit dem Unterschiede, daß die angegebenen Amphopeptonsubstanzen in konzentrierterer Lösung zur Verwendung kamen, und zwar enthielten je 100 ccm ihrer Lösung 3,792 g Stickstoff.

Vor Anstellung der Proben wurden die Amphopeptonsubstanzen gereinigt, indem ihre Lösung mit Ammoniumsulfat nach W. Kühne behandelt wurde. Hierbei zeigte sich, daß sie in sehr unbedeutenden Mengen Substanzen enthielten, die

durch das genannte Salz zur Ausfällung kamen. Von dem Ammoniumsulfat wurden diese Verdauungsprodukte teils durch Alkohol, teils durch frisch gefälltes Baryumcarbonat befreit.

Als koagulosogene Verdauungsprodukte des in Rede stehenden Albumins erwiesen sich bei den Vorproben Substanzen, die zum Bestande der Unterfraktion N gehörten und die oben genannten Albumosesubstanzen der Fraktion VI: die letzteren reagierten ganz besonders stark auf die koagulosebildende Wirkung der erwähnten Pepsinlösung.

Die Albumosesubstanzen der Fraktion VI.

Eine Lösung dieser Verdauungsprodukte wurde bis zur dünnen Sirupkonsistenz eingeengt (die Lösung reagierte sauer, gab sehr schwachbraune Färbung mit Kongopapier) und bei 8–12° C. mit Alkohol und Äther fraktioniert gefällt. Nach Zusatz von Alkohol bis 85% bildete sich eine geringfügige Trübung, die nach ca. 24 Stunden einen unbedeutenden zähen Niederschlag gab, der entfernt wurde und nicht weiter zur Untersuchung gelangte. Zum Filtrate von dem Niederschlage wurde allmählich Äther bis auf 60% hinzugefügt. Nach ca. 24 Stunden setzte sich ein sehr zäher Niederschlag ab, von dem die Alkoholätherlösung sehr leicht abgegossen werden konnte. Nach Lösung des Niederschlages in Wasser wurde die Lösung A erhalten. Die Alkoholätherlösung ergab nach Verjagung des Äthers und Alkohols die Lösung B.

Lösung A. Die vorläufigen Reinigungsproben dieser Lösung mit Alkohol und Äther zeigten, daß sie als Beimengung Substanzen enthielt, die unlöslich in 85%igem Alkohol, wie auch solche, die in der Alkoholäthermischung löslich waren. In Anbetracht dessen, daß bei einer solchen Reinigung die Hauptfraktion dieser Lösung, nämlich die in 85%igem Alkohol löslichen, in der Alkoholäthermischung jedoch unlöslichen Substanzen in ungenügender Menge erhalten worden wären, wurde die Lösung A als Ganzes zum Versuche benutzt.

Ein Teil der Lösung A wurde zur Elementaranalyse verbraucht, zu welchem Behufe der Trockenrückstand der Lösung zunächst bei 100°, dann bei 105–110° C. bis zum konstanten Gewicht getrocknet wurde. Die Stickstoffbestimmung geschah nach Dumas.

0,3635 g Substanz gaben bei der Verbrennung 46,25 ccm Stickstoff (feucht), bei 18,6° C. und Barometerstand = 747 mm.

Die Bestimmung des Kohlenstoffs und Wasserstoffs geschah, wie bei den anderen unten anzuführenden Analysen, durch Verbrennung der mit Bleichromat gemischten Substanz im Kupferschiffchen im offenen Rohr mit Bleichromat und vorgelegter Kupferspirale: gegen Ende der Verbrennung wurde Sauerstoff (und Luft) hindurchgeblasen.

0,4714 g Substanz gaben 0,2903 g H₂O und 0,7953 g CO₂
 0,295 " " " " 0,183 " " " " 0,5001 " " "

Gefunden:

C = 46,02% und 46,23%

H = 6,89% " 6,94%

N = 14,41%

Zur Gewinnung der Koagulosen wurde die sauer reagierende Lösung A (sie gab mit Kongopapier eine schwachbraune Färbung) bis auf einen Stickstoffgehalt von 4,0988 g in je 100 ccm eingedampft und mit 1 ccm der oben genannten Pepsinlösung vermischt. Bei 38—40° C. hingestellt, begann die Mischung schnell sich zu trüben, sodaß sie nach 30—45 Minuten eine starke Trübung darstellte. Nach ca. 24 Stunden war ein reichlicher feinflockiger Niederschlag ausgefallen. Das Filtrat von diesem Niederschlage trübte sich bei weiterem Stehen im Thermostaten schwach. Die erhaltene Koagulose wurde abfiltriert und mit kaltem destillierten Wasser ausgewaschen. Es erwies sich, daß sie allem Anscheine nach in kaltem destillierten Wasser nicht unlöslich war: Ungeachtet des langen sorgfältigen Auswaschens gaben die Waschfiltrate, natürlich nicht die ersten, immer Spuren von Biuretreaktion.

Die Koagulose wurde vorläufig im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure bei Zimmertemperatur, dann zur Analyse bei 105—110° C. bis zum konstanten Gewicht getrocknet.

Das Filtrat von dem Koaguloseniederschlage wurde mit den Waschfiltraten vereinigt, die Lösung bis zum dünnen Sirup eingedampft, mit 40 Tropfen der angegebenen Pepsinlösung versetzt und im Thermostaten bei 38—40° C. ca. 48 Stunden gehalten. Diese Probe begann später zu reagieren resp. sich zu trüben als die erste und zwar nach 1½ Stunden. Die Ausgiebigkeit des zweiten Koaguloseniederschlages war von mittlerer Stärke. Auf gleiche Weise wurde auch der dritte

Koaguloseniederschlag gewonnen. Der zweite und dritte Niederschlag wurde wie der erste behandelt und mit letzterem vereinigt.

Mit diesen Niederschlägen schied sich ca. 33% Stickstoff der angegebenen Probe der Lösung A aus.

Die so erhaltene Koagulose (Koaguloseniederschläge I + II + III) löste sich sehr leicht in schwachen Lösungen der ätz- und kohlensauren Alkalien und auch in verdünnter Salzsäure (0,25—0,5%); sie gab die Biuretprobe mit rosa resp. rosavioletter Farbe, die Millonsche und Xanthoproteinreaktion. Die Auflösung in 0,25—0,5%iger Salzsäure erfolgte in einigen Minuten vollständig. Die Koagulose enthielt keine Asche und hatte folgende Zusammensetzung:

$$\begin{aligned} \text{C} &= 54,90\% \\ \text{H} &= 7,43\% \\ \text{N} &= 14,54 \text{ und } 14,58\% \end{aligned}$$

0,281 g Substanz gaben bei der Verbrennung 0,5655 g CO₂ und 0,1865 g H₂O.

0,239 g Substanz gaben bei der Verbrennung nach Dumas 30,3 ccm Stickstoff (feucht), bei 14,5° C. und einem Barometerstand = 761,5 mm.

0,1993 g Substanz gaben 25,25 ccm Stickstoff, bei 15,7° C. und B. = 750,0 mm.

Lösung B. Ein Teil der Lösung B, der keiner weiteren Reinigung unterzogen war, wurde zur Elementaranalyse verwendet. Ein anderer Teil jedoch, und zwar der Hauptteil, wurde einer abermaligen Reinigung mit Alkohol und Äther unterworfen, um die Substanzen zu entfernen, die in der oben-erwähnten Alkoholäthermischung unlöslich waren. Zur Gewinnung der Koagulose wurde diese noch einmal gereinigte Hauptportion der Lösung B benutzt.

Zusammensetzung des Trockenrückstandes der Lösung B.

Zur Elementaranalyse wurden die Trockenrückstände sowohl des ungereinigten wie auch gereinigten Teiles der Lösung B zunächst bei 95—100° C., sodann bei 100—105° und schließlich bei 105—110° C. bis zum konstanten Gewicht getrocknet. Hierbei muß bemerkt werden, daß diese Trockenrückstände schon im Verlaufe einiger Tage das konstante Gewicht erreichten.

a) Die Trockensubstanz resp. -substanzen der nicht gereinigten Portion der Lösung B.

0,2678 g gaben 28 ccm Stickstoff bei 13,5° C. und 764 mm.
 0,215 g 0,1472 g H₂O und 0,4416 g CO₂.
 0,2596 g 0,1715 g 0,5339 g

Gefunden:

C = 56,02% und 56,10%
 H = 7,61% 7,39%
 N = 12,4%

b) Die Trockensubstanz resp. -substanzen der gereinigten Portion der Lösung B:

0,2922 g gaben 31,75 ccm Stickstoff bei 21° C. und 767,5 mm.
 0,3052 g 0,2011 g H₂O und 0,6224 g CO₂.

Gefunden:

C = 55,64%
 H = 7,32%
 N = 12,5%

Wie aus diesen Analysenzahlen hervorgeht, hat sich die Elementarzusammensetzung der Trockensubstanz resp. -substanzen der Lösung B nach der erwähnten Reinigung sehr wenig verändert: man kann das wenigstens hinsichtlich des C-, H- und N-Gehaltes annehmen.

Zur Gewinnung der Koagulose resp. Koagulosen wurde der gereinigte Teil der Lösung B, der sauer reagierte mit blauem Lackmuspapier und Kongopapier braun färbte, eingedampft (auf je 100 ccm der eingedickten Lösung kamen 2,002 g Stickstoff) und dreimal nacheinander mit der obengenannten Pepsinlösung aufgestellt, wie das bei Gewinnung der Koagulose der Lösung A beschrieben. Hierbei schied sich mit den Koagulosen ca. 50% Stickstoff aus, der in der genommenen Probe enthalten war. Die drei Koagulosen wurden vereinigt, sorgfältig mit kaltem destillierten Wasser ausgewaschen (die Waschfiltrate von klarem farblosem Aussehen wie Wasser, gaben schwache Spuren von Biuretreaktion selbst nach vielfältigem Auswaschen). Die so erhaltene Koagulose löste sich sehr schwach und langsam in 0,25—5%iger Salzsäure (ein deutlicher Unterschied von der Koagulose resp. Koagulosen, die aus der Lösung A erhalten waren), sehr leicht in verdünnten Lösungen der Ätz- und kohlen-sauren Alkalien: sie gab die Biuretreaktion mit rosa resp. rosa-

violetter Farbe, die Millonsche und Xanthoproteinreaktion; Asche enthielt sie nicht.

Zusammensetzung der Koagulose resp. Koagulosen
der Lösung B.

Zur Analyse wurde die Substanz zunächst im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure bei Zimmertemperatur getrocknet. Zu bemerken ist, daß die in dieser Weise ca. 7 Tage lang getrocknete Substanz durch das Trocknen bei 105–110° C. nur sehr wenig an Gewicht verlor.

0,2055 g	gaben	22,3 ccm	Stickstoff bei	16,2° C. und	762,5 mm
0,2827	"	29,8	"	14,3°	" " 759,5
0,2408	"	0,1682 g	H ₂ O und	0,4985 g	CO ₂ .
0,2418	"	0,1635	"	0,5005	"

Gefunden:

C =	56,47%	und	56,46%
H =	7,82%	"	7,57%
N =	12,71%	"	12,41%

Die Unterfraktion N.

Für die Substanzen dieser Unterfraktion sind vor allem folgende Umstände charakteristisch:

1. Sie werden im allgemeinen schwierig durch Phosphorwolframsäure (in Gegenwart von Mineralsäuren) gefällt;
2. die Phosphorwolframsäureniederschläge dieser Substanzen treten pulverartig, wenig voluminös auf: nach 24- bis 48stündigem Stehen bei Zimmertemperatur ballen sie sich zusammen;
3. die Lösungen dieser Fraktion geben die Biuretreaktion mit rosaroter resp. rosavioletter Farbe;
4. die Lösung dieser Fraktion erwies sich als nicht kristallisierbar.

Wahrscheinlich sind die Substanzen dieser Unterfraktion Körper vom Typus der Monoaminosäuren. Das Auftreten ähnlicher Spaltungsprodukte der Eiweißkörper habe ich schon früher konstatiert.¹⁾ Genauer sind sie von Ed. Swirlowski²⁾ untersucht worden.

¹⁾ D. Lawrow, Zur Kenntnis des Chemismus der peptischen und tryptischen Verdauung der Eiweißkörper. Diese Zeitschrift, Bd. XLIII, S. 447–463.

²⁾ Ed. Swirlowsky, Zur Frage nach der Einwirkung von verdünnter Salzsäure auf die Eiweißstoffe. Diese Zeitschrift, Bd. XLVIII, S. 252–299.

Bei der Untersuchung der Unterfraktion mit der genannten Pepsinlösung zeigte es sich, daß sie stark unter Bildung eines reichlichen Niederschlages von Koagulose resp. Koagulosen reagierte. So begann eine Probe von dünner Sirupkonsistenz nach Zusatz der Pepsinlösung in einer Menge von $\frac{1}{20}$ der Probe bei 38—40° C. schon nach einigen Minuten sich zu trüben und stellte nach 24 Stunden eine dicke gallertartige Masse dar. Die Probe reagierte sauer; Kongopapier wurde braun gefärbt.

Die gallertartige Masse wurde sorgfältig mit dem 10fachen Volumen Wasser vermischt; beim Stehen der Mischung setzte sich ein feiner flockiger Niederschlag ab, der sich leicht abfiltrieren und mit Wasser auswaschen ließ. Der Niederschlag wurde zunächst mit großen Mengen Wasser durch Dekantieren, hernach auf dem Filter bis zum Verschwinden der Biuretreaktion in den Waschfiltraten, die farblos und durchsichtig wie Wasser waren, gereinigt. Der ausgewaschene Niederschlag löste sich schwierig in 0,25—2,5%iger Salzsäure, leicht hingegen in schwachen Lösungen der Ätz- und kohlensauren Alkalien, gab die Biuretreaktion mit rosaroter resp. rosavioletter Farbe. Im Laufe einiger Tage wurde der Niederschlag bis zum konstanten Gewicht, anfänglich im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure, darauf bei 105—110° C. getrocknet.

Die Analysen gaben folgende Resultate:

0,2275 g Substanz gaben 23,5 ccm Stickstoff bei 16,3° C. und 775 mm.
0,2585 „ „ 0,1865 g H₂O und 0,4225 g CO₂

Die Substanz war aschefrei.

Gefunden:

C = 44,58%

H = 8,07%

N = 12,31%

Diese Koagulose war zweifellos ein Gemisch, da ein Teil derselben (ca. $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{3}$) sich verhältnismäßig leicht in kaltem 92—93%igen Alkohol löste, während der andere Teil in solchem Alkohol nur sehr schlecht löslich war.

Diskussion der Resultate.

Bei der mehr weniger lange fortgesetzten Verdauung des Eieralbumins bilden sich eine Reihe von Verdauungsprodukten.

von denen die einen sich als die koagulosogenen charakterisieren (in unserem Falle die Albumosesubstanzen der Unterfraktion M und die Unterfraktion N), während die anderen anscheinend nicht die Fähigkeit besitzen, in mehr weniger konzentrierten Lösungen mit Pepsin koagulöse Niederschläge zu bilden (in unserem Falle die gereinigte Fraktion V, die Amphopeptonsubstanzen der Unterfraktion M).

Koagulosogene Substanzen sind im gegebenen Falle Produkte der peptischen Verdauung von zum mindesten zwei Typen: erstens Verdauungsprodukte mit Albumosencharakter (in unserem Falle Albumosesubstanzen der Unterfraktion M) und zweitens Verdauungsprodukte, die bei mehr weniger tiefergehender Spaltung des Eiweißmoleküls auftreten und wahrscheinlich gewisse Verbindungen — Kombinationen von Monoaminosäuren darstellen (die Substanzen der Unterfraktion N).

Durch die koagulosebildende Wirkung des Grüblerschen Pepsins auf die Produkte der peptischen Verdauung eines gegebenen Eiweißkörpers entstehen eine Reihe von Koagulosen. Bei den obenbeschriebenen Versuchen wurden drei verschiedene Koagulosen gewonnen, und zwar die Koagulosen der Lösung A, der Lösung B und der Unterfraktion N. Sie differieren untereinander vor allem in der Elementarzusammensetzung; ferner unterscheidet sich die Koagulose der Lösung B scharf von derjenigen der Lösung A durch ihre schwache Löslichkeit in verdünnter Salzsäure; endlich unterscheidet sich die Koagulose der Unterfraktion N von den anderen zwei hier untersuchten Koagulosen auch dadurch, daß ihre Muttersubstanz Verdauungsprodukte von ganz anderem Typus sind, als die Verdauungsprodukte, die in den Bestand der Lösungen A und B gehören.

Die Koagulose der Unterfraktion N ist entschieden ein Gemisch (s. oben); die Frage nach der chemischen Einheitlichkeit der zwei anderen oben beschriebenen Koagulosen ist natürlich noch offen.

Es ist bemerkenswert, daß die Koagulose der Lösung B nach ihrer Elementarzusammensetzung (wenigstens hinsichtlich des Kohlenstoff-, Wasserstoff- und Stickstoffgehaltes), der Muttersubstanz resp. -substanzen sehr nahe steht. Dieser Umstand

gibt Grund zur Annahme, daß einige koagulosogene Substanzen wenigstens bei ihrem Übergange in Koagulosen entweder gar keine oder nur eine sehr geringfügige Änderung ihrer Elementarzusammensetzung erleiden.

Die oben beschriebenen Koagulosen unterscheiden sich in ihrer Elementarzusammensetzung mehr oder weniger bedeutend von dem Eiweißkörper, aus welchem ihre Muttersubstanzen erhalten waren, nämlich von dem Eialbumin.

Die koagulosebildende Wirkung des Pepsins auf die Produkte der peptischen Verdauung des Kuhmilchcaseins.

Zweck der unten anzuführenden Versuche war, den Einfluß folgender Bedingungen auf die koagulosebildende Wirkung des Pepsins (von Grüber) klarzustellen: 1. Die Reaktionen der zu untersuchenden Lösung koagulosogener Substanz resp. Substanzen: 2. die Konzentration der zu untersuchenden Lösung.

Zu diesen Versuchen wurden einige Produkte der peptischen Verdauung des Kuhmilchcaseins verwendet. Der genannte Eiweißstoff, nach Hammarsten gewonnen, wurde bei Gegenwart 0,5%iger Schwefelsäure und Chloroform ca. 1½ Monate verdaut, wobei ein verhältnismäßig bedeutender Teil unlöslich blieb. Die von dem unlöslich gebliebenen Reste abfiltrierte Lösung wurde von der Schwefelsäure durch Ätzbaryt befreit, bis zum dünnen Sirup eingedampft und auf einmal bei 8—12° C. mit Alkohol (75%) und Äther (60%) gefällt. Von dem hierbei gebildeten sehr reichlichen Niederschlage wurde nach 24 Stunden die Alkoholätherlösung abgetrennt, — sie bildete die Fraktion, welche der obenbeschriebenen Fraktion VI der Produkte der peptischen Verdauung des Eialbumins entsprach.

Diese Fraktion der Verdauungsprodukte des Caseins wurde von den durch Ammoniumsulfat nicht fällbaren Substanzen wie auch von solchen, die durch Phosphorwolframsäure nicht, resp. schwer gefällt werden, befreit und zu den unten zu beschreibenden Proben benutzt. Letztere wurden unter Benutzung der oben beschriebenen Lösung des Grüber'schen Pepsins ausgeführt.

I.

Hinsichtlich der Frage, welche Reaktion zur Entfaltung der koagulosebildenden Wirkung des Pepsins resp. Labferments die günstigste sei, gehen die Meinungen der Forscher auseinander, wie das aus der oben angeführten Literaturübersicht hervorgeht.

Zur Klärung dieser Frage führte ich einige Versuche aus, wie es R. Wait (l. c.) getan. Hierbei enthielten die Proben Nr. 1 der Versuche eine Lösung der gegebenen koagulogenen Substanzen der ursprünglichen Fraktion, und zwar reagierte die Lösung sauer gegen Lackmus und färbte Kongopapier gar nicht. Zu den Proben Nr. 2—5 wurde die zu untersuchende Lösung zunächst mit Salzsäure bis zu schwach brauner Färbung des Kongopapiers angesäuert: bei solcher Reaktion wurde sie auch zur Probe Nr. 2 genommen; zu den Proben Nr. 3—5 jedoch wurde zu der Lösung nach Berechnung Salzsäure bis auf 0,1%, 0,2% und 0,5% hinzugefügt. Die Proben Nr. 3 färbten Kongopapier mit braunblauer Farbe: die Proben Nr. 4 und 5 mit blauer.

Eine solche Bereitungsmethode der Proben Nr. 3—5 garantiert natürlich nicht genau die Gegenwart der gewünschten Mengen freier Salzsäure, sie gewährt aber jedenfalls die Möglichkeit, unter einander vergleichbare Resultate zu erhalten.

Durch Hinzufügung von kohlensaurem Natron zur gegebenen Fraktionslösung wurden die Proben Nr. 6 erhalten, die schwach amphoter, resp. Nr. 7, die sehr schwach alkalisch reagierten.

Für gewöhnlich wurden die Proben bei 37—40° C. im Verlauf von 24—72 Stunden gehalten. Eine Reihe ähnlicher vergleichender Versuche ergab Resultate, welche die entsprechenden Versuche R. Waits bestätigen.

Beispielsweise führe ich einen solcher Versuche hier an. Der Versuch wurde in graduierten kleinen Zylindern mit Glasstöpfeln ausgeführt. Jede Probe enthielt 10 ccm der zu untersuchenden Lösung von gleicher Konzentration (je 100 ccm der Lösung enthielten 1,577 g Stickstoff), von dieser oder jener Reaktion und 0,5 ccm der oben beschriebenen Pepsinlösung. Die Koagulose schied sich in Form eines flockigen Nieder-

schlages aus, der sich allmählich am Boden der Zylinder absetzte. Die Reaktion in den einzelnen Proben galt für beendet, sobald der Niederschlag der einen oder anderen Probe zuzunehmen aufhörte, wobei die darüber befindliche Lösung vollständig klar wurde.

Im gegebenen Falle dauerte der Versuch ca. 72 Stunden. Die Resultate des Versuches sind folgende.

Die Proben	Resultat der Reaktion.
1	Niederschlag = 2,4 ccm
2	„ = 5,6 „
3	„ = 4,6 „
4) Unverändert
5	
6	Niederschlag = 1,1 ccm.
7	Unverändert.

II.

Wie aus den oben angeführten Literaturangaben hervorgeht, ist die Frage nach dem Einfluß der Konzentration dieser oder jener zu untersuchenden Lösung koagulosogener Substanzen auf die koagulosebildende Wirkung des Pepsins resp. Labferments dahin klargestellt, daß zur kräftigsten Entwicklung der genannten Wirkung des Pepsins resp. Labferments eine mehr weniger hohe Konzentration der genannten Lösungen erforderlich ist.

Die unten mitzuteilenden Versuche stellten sich zum Zwecke, einiges zur Klärung der in Rede stehenden Frage in quantitativer Hinsicht beizutragen.

Zu den Versuchen diente dieselbe Lösung koagulosogener Substanzen des Caseins, die zu den soeben beschriebenen Versuchen zur Anwendung kam: die Lösung wurde mit Salzsäure soweit angesäuert, daß sie ziemlich stark sauer mit Lackmuspapier reagierte und Kongopapier schwach braun färbte.

Zu jeder Probe wurden je 10 ccm der Lösung der koagulosogenen Substanzen verschiedener Konzentration und je 0,5 ccm der oben beschriebenen Pepsinlösung genommen.

Die Proben waren während ca. 96 Stunden bei 38—40° C.

in kleinen, mit Gummistöpseln versehenen Glaszylindern unter Thymolzusatz aufgestellt. Mehrmals täglich wurden die Zylinder sorgfältig umgeschüttelt; beim dritten Versuche wurde das Umschütteln noch viel häufiger vorgenommen, als bei den ersten zwei. Nach Beendigung der Reaktion (vollständiges Absetzen der Niederschläge) wurden durch Filtration die Niederschläge abgetrennt und mit kaltem destillierten Wasser, bis zum Verschwinden der Biuretreaktion in den Waschfiltraten, ausgewaschen. In den vereinigten Filtraten jeder Probe (= «Filtrat der Probe» der Tabellen) wurde der Stickstoffgehalt bestimmt und eine Korrektur hinsichtlich des Pepsinstickstoffs angebracht. Es beziehen sich daher die in den Tabellen angeführten Stickstoffzahlen nur auf den Stickstoff der koagulogenen Substanzen.

Tabelle I.

Nummer der Proben	Stickstoffgehalt der Probe g	Stickstoffgehalt des Filtrates der Probe g	Quantität des mit der Koagulose aus- geschiedenen Stickstoffs %
1	0,0376	0,0372	1,1
2	0,0751	0,0708	5,7
3	0,1502	0,1259	16,2
4	0,2253	0,1668	25,9
5	0,3004	0,2072	31,0

Tabelle II.

Nummer der Proben	Stickstoffgehalt der Probe g	Stickstoffgehalt des Filtrates der Probe g	Quantität des mit der Koagulose aus- geschiedenen Stickstoffs %
1	0,0376	0,03684	2,01
2	0,0751	0,0715	4,8
3	0,1502	0,1256	16,4
4	0,2253	0,1778	21,1
5	0,3004	0,2247	25,2

Tabelle III.

Nummer der Proben	Stickstoffgehalt der Probe g	Stickstoffgehalt des Filtrates der Probe g	Quantität des mit der Koagulose aus- geschiedenen Stickstoffs %
1	0.0364	0.0355	2.4
2	0.0729	0.0685	6.0
3	0.1457	0.1153	20.8
4	0.2186	0.1535	29.8
5	0.2914	0.1935	33.6

Anmerkung 1. Der Trockenrückstand der Lösung der gegebenen koagulosogenen Substanzen enthält 13.28% Stickstoff.

0.2981 g Substanz ergab bei der Verbrennung nach Dumas 34.1 ccm Stickstoff bei 16,6° C. und 759,2 mm.

Die Proben Nr. 3 der Versuche enthielten somit ca. 11% Trockenrückstand, die Proben Nr. 5 ca. 22% usw.

Anmerkung 2. Parallel zu den Proben der drei Versuche wurden Kontrollproben mit abgetöteter Pepsinlösung aufgestellt. Zu diesem Behufe wurde die bekannte Pepsinlösung vorher bei 85—95° C. ca. 1½ Stunden lang erhitzt, wobei sie sich äußerlich gar nicht veränderte. Mit dieser inaktiv gewordenen Pepsinlösung gaben die oben angeführten Proben Nr. 1—5 in ca. 96 Stunden nicht den geringsten Niederschlag.

Aus den soeben angeführten Versuchen kann man folgendes schließen:

1. Die koagulosebildende Wirkung des Pepsins resp. Labferments äußert sich vollkommen deutlich sogar in 3%igen Lösungen der koagulosogenen Substanzen.

2. Auf das Entstehen von Koagulosen unter der Einwirkung des Pepsins resp. Labferments übt *ceteris paribus* auch die Konzentration der zu dem Versuche verwendeten Lösung einen ziemlich bedeutenden Einfluß — wenigstens in gewissen Grenzen — aus. Dieser Einfluß ist ein verstärkender und prävaliert allem Anscheine nach vor dem Einfluß der in den Versuch eingeführten Menge koagulosogener Substanzen.

Tatsächlich gab z. B. der dritte Versuch in dieser Hinsicht folgende Resultate:

Nummer der Proben	Stickstoffgehalt der Probe	Quantität des mit der Koagulose ausgeschiedenen Stickstoffs
1	A g	0,00088 g = a g
2	2 A	0,0044 „ = 5 a
3	4 A	0,0305 „ = 34,7 a
4	6 A	0,0651 „ = 74 a
5	8 A	0,0979 „ = 111 a

Wie aus der Tabelle ersichtlich, übersteigt das Verhältnis (in bezug auf den Stickstoff) der in den Proben Nr. 2- 5 entstandenen Koagulosenmengen einerseits, zu der in der Probe Nr. 1 entstandenen Koagulosenmenge andererseits, um ein Bedeutendes nicht nur das einfache Verhältnis der Mengen der koagulosogenen Substanzen in den entsprechenden Proben, sondern auch das quadratische Verhältnis dieser Mengen.

Die Koagulosen der Proben aus den soeben angeführten Versuchen hatten folgende Eigenschaften:

1. Sie sind fast vollkommen unlöslich in destilliertem Wasser und Kochsalzlösungen, sowohl bei gewöhnlicher Temperatur wie auch beim Erwärmen oder Kochen.

2. Sie sind ziemlich wenig löslich in 0,25—5%iger Salz- resp. Schwefelsäure, sehr leicht dagegen sogar in schwachen Lösungen der ätz- und Kohlensäuren Alkalien.

3. Ihre Lösungen geben die Biuretreaktion mit rosaroter resp. rotvioletter Farbe.

4. Sie geben die Millonsche, Xanthoprotein-, Molischsche und Liebermannsche Reaktion. Zu einem Teile (ca. $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{3}$) sind sie mehr weniger leicht in kaltem 92—93%igen Alkohol löslich, zum anderen (größten) Teile in solchem kaltem Alkohol schwer löslich; mit letzterem jedoch auf 75—80° C. erwärmt, lösen sie sich ziemlich schnell bis auf einen auch in heißem Alkohol von derselben Stärke schwer löslichen Rest.

Die Zusammensetzung des Trockenrückstandes der gegebenen Fraktion der koagulosogenen Substanzen des Caseins ist folgende:

$$C = 57,56\%$$

$$H = 7,18\%$$

$$N = 12,89\%$$

0,3345 g Substanz bis zum konstanten Gewicht bei 105—110° C. getrocknet, gaben bei der Verbrennung mit Bleichromat mit vorgelegter reduzierter Kupferspirale (zu Ende der Verbrennung wurde ein Sauerstoff- und Luftstrom durchgelassen) 0,2145 g H₂O und 0,7058 g CO₂.

Bei der Einwirkung der obengenannten Pepsinlösung auf die gegebene Fraktion erhält man allem Anscheine nach mehrere Koagulosen, wie folgende vorläufige Proben zeigen.

Eine Lösung dieser koagulosogenen Verdauungsprodukte, die in je 100 ccm 1,562 g Stickstoff enthielt und Congopapier schwach braun färbte, wurde mit der obengenannten Pepsinlösung (auf 100 ccm Lösung wurde 1 ccm Pepsinlösung genommen) vermischt und ca. 24 Stunden bei 38—40° C. gehalten, wobei allmählich in relativ mäßiger Menge ein ziemlich kompakter, zum Teil sich zusammenballender, flockiger Niederschlag entstand — Niederschlag A. Der Niederschlag wurde abgetrennt und das erhaltene Filtrat noch ca. 24 Stunden bei genannter Temperatur gehalten, wobei in relativ mäßiger Menge ein flockiger Niederschlag ausschied — Niederschlag B, der abgetrennt wurde. Die erhaltenen Koagulosen wurden mit kaltem, destilliertem Wasser ausgewaschen bis zum fast völligen Schwinden der Biuretreaktion in den Waschfiltraten. (Die Reaktion wurde in minimaler, kaum erkennbarer Stärke nur in Schichten von 10—15 cm Dicke erhalten), dann anfänglich im Vakuumexsikator über Schwefelsäure bei Zimmertemperatur und hernach zur Analyse bei 105—110° C. getrocknet. Das Trocknen bis zum konstanten Gewicht wird in einigen Tagen erreicht. Die Zusammensetzung des Niederschlages A ist die folgende:

$$C = 45,76\%$$

$$H = 7,54\%$$

$$N = 11,11\%$$

0,3201 g Substanz gaben beim Verbrennen nach Dumas 31,2 ccm Stickstoff bei 16,5° C. und 749,5 mm.

0,293 g Substanz gaben 0,1975 g H₂O und 0,4915 g CO₂.

Der Niederschlag B, mit Wasser ausgewaschen und getrocknet wie Niederschlag A, enthielt 12,34% Stickstoff.

0,3451 g Substanz gaben 36,25 ccm Stickstoff bei 15,3° C. und 763,5 mm.

Beim äußeren Ansehen unterschied er sich, wie oben schon angegeben, vom Niederschlage A hauptsächlich dadurch, daß er vollständig flockig war, sich also nicht zusammenballte. Beim Extrahieren dieses feuchten, mit Wasser sorgfältig ausgewaschenen Niederschlages mit 92 $\frac{1}{2}$ %igem kalten Alkohol im Verlaufe einiger Stunden wurde ein alkoholischer Auszug gewonnen, dessen Trockenrückstand 10,61% Stickstoff enthielt.

0,329 g Substanz (bei 105—110° C. getrocknet) gaben 30,5 ccm Stickstoff bei 17,1° C. und 747,2 mm.

Folgende eigentümliche Äußerungsform der koagulosogenen Einwirkung der genannten Pepsinlösung auf die gegebene Fraktion der koagulosogenen Verdauungsprodukte des Caseins verdient hier angeführt zu werden. In Lösungen, die konzentrierter waren, als die oben erwähnten, und freie Salzsäure bis zu 0,1% enthielten, bildete sich unter dem Einflusse des Pepsins im Verlaufe von 48—72 Stunden, bei 38—40° C., langsam nur eine Opalescenz mittleren Grades. Die Lösungen wurden immer weniger beweglich, um schließlich, unter Beibehaltung der Opalescenz, nach 4—5 Tagen die Konsistenz und das Aussehen einer starr gewordenen konzentrierten Gelatine-lösung anzunehmen (Kontrollproben mit abgetöteter Pepsinlösung blieben vollkommen unverändert). Solche Proben (ich habe mehrere solcher Proben angestellt), die keinen sichtbaren Niederschlag enthielten, gaben mit dem 5—10fachen Volumen destillierten Wassers vermischt mehr oder weniger reichliche flockige Niederschläge mit den Eigenschaften der Koagulosen.

Hier möchte ich darauf hinweisen, daß koagulosogene Substanzen auch durch die Einwirkung von Säuren und Alkalien auf Eiweißstoffe gebildet werden.

Zum Zwecke vorläufiger Klarstellung der Frage nach einer solchen Entstehung der genannten Substanzen wurden von mir Versuche angestellt, die darin bestanden, daß einmal auskrystallisiertes, durch Hitze koaguliertes Pferdehämoglobin mit 0,5% Salzsäure bei 38—40° C. im Verlaufe von 60 Tagen in Gegenwart von Chloroform behandelt wurde und ein Ver-

such, in dem Kuhcasein mit einer heißen gesättigten Lösung Ätzbaryt bei 85—90° C. aufgestellt wurde, was folgendermaßen geschah. Das Casein wurde mit der angegebenen gesättigten Barytlösung bei gegebener Temperatur in einem Glaskolben, der mit einer langen Kapillarröhre versehen war, ca. 24 Stunden gehalten, worauf vom ungelöst gebliebenen Caseinrückstande die Lösung der erhaltenen Produkte abgetrennt, der Rückstand jedoch in gleicher Weise weiterbehandelt wurde.

Sowohl aus den Lösungen der Produkte der erwähnten Behandlung des Hämoglobins, wie aus den vereinigten Lösungen der Produkte des behandelten Caseins wurden in bekannter Weise Alkoholätherauszüge erhalten. Diese der Reinigung nicht unterzogenen Auszüge enthielten in relativ geringer Menge koagulosogene Substanzen. Die aus ihnen gewonnenen Koagulosen verhielten sich im allgemeinen, ihren Eigenschaften zufolge, wie die oben beschriebenen: die Koagulosen des Caseins lösten sich wenig in 0,25—2,5%iger Salz- resp. Schwefelsäure, während die Koagulosen des Hämoglobins zum Teil ziemlich leicht in diesen Säuren bei gegebener Konzentration löslich waren.

Schluß.

Auf Grund der oben angeführten Versuchsergebnisse, wie auch der Versuchsergebnisse der oben zitierten Autoren, kann man folgende Schlüsse ziehen:

1. Bei der peptischen Verdauung der Eiweißkörper, wie auch bei ihrer Zerlegung durch Mineralsäuren oder Alkalien, entstehen koagulosogene Substanzen, die die Fähigkeit haben, bei der Behandlung ihrer Lösungen mit Pepsin resp. Labferment eigenartige Niederschläge, Koagulosen, zu bilden.

2. Die koagulosogene Funktion ist augenscheinlich nur gewissen Verdauungs- resp. Spaltungsprodukten der Eiweißkörper eigen. In dieser Hinsicht kann man zum mindesten zwei Haupttypen unterscheiden und zwar koagulosogene Substanzen vom Typus der Albumosen resp. den bekannten Albumosen ähnlicher Produkte und koagulosogene Substanzen vom Typus der Monoaminosäuren (in unserem Falle die Substanzen der Unterfraktion N).

3. Die koagulosebildende Fähigkeit des Pepsins resp. Labferments wird auch bei relativ niedrigen Konzentrationen der Lösungen koagulosogener Substanzen beobachtet. Bei mehr weniger hohen Konzentrationen wird die Fähigkeit bedeutend gesteigert, wenigstens innerhalb gewisser Grenzen.

4. Die koagulosebildende Fähigkeit des Pepsins resp. Labferments entwickelt sich am besten dann, wenn die zum Versuche benutzte Lösung koagulosogener Substanzen schwach sauer mit Congopapier reagiert (schwach braune Färbung). Schon ein relativ geringer Überschuß freier Mineralsäure verhindert resp. hebt die in Rede stehende Wirksamkeit dieser Fermente auf. Bei alkalischer Reaktion der Lösungen koagulosogener Produkte der peptischen Verdauung der Eiweißkörper wird eine Bildung von Koagulosen unter dem Einflusse des Pepsins resp. Labferments nicht beobachtet.

5. Bei der koagulosebildenden Tätigkeit der genannten Fermente entsteht eine Reihe von Koagulosen, deren chemische Individualität noch vollkommen unaufgeklärt ist.

6. Einige koagulosogene Substanzen wenigstens werden bei ihrem Übergange in Koagulosen wenig resp. gar nicht in ihrer Elementarzusammensetzung alteriert.

7. Der Elementarzusammensetzung nach unterscheiden sich die bisher bekannten Koagulosen in ziemlich charakteristischer Weise von bekannten genuinen Eiweißstoffen. In dieser Hinsicht ist für sie vor allem charakteristisch der im Vergleich zu den Eiweißstoffen verminderte Gehalt an Stickstoff.

8. Ihren qualitativen Reaktionen nach haben einige bis jetzt bekannte Koagulosen Ähnlichkeit mit den Stoffen vom Eiweißtypus. Ob sie aber wirklich Eiweißsubstanzen sind, ist nicht ausgemacht.

9. Zur Reinigung dieser oder jener Fraktion der Eiweißverdauungsprodukte von koagulosogenen Substanzen ist eine wiederholte Behandlung der gegebenen Fraktion mit einem zur Extraktion der koagulosogenen Substanzen geeigneten Lösungsmittel erforderlich.

10. Bei einer drei- bis viermaligen Behandlung konzentrierter Lösungen koagulosogener Substanzen mit Pepsin resp.

Labferment entstehen Koagulosen in relativ bedeutenden Mengen (in unseren Fällen bis zu 50%).

11. Koagulosogene Substanzen werden bei mehr weniger lange andauernder peptischer Verdauung der Eiweißstoffe in relativ geringen Mengen erhalten.

12. Die koagulosebildende Wirkung des Pepsins resp. Labferments, die A. Danilewskische Reaktion, ist allem Anschein nach eine, im Verhältnis zur verdauenden Wirkung dieses Ferments resp. dieser Fermente umgekehrte Reaktion: sie entwickelt sich am besten unter anderem bei hohen Konzentrationen der reagierenden Lösungen — unter Bedingungen, die die hydrolytische Spaltung der Eiweißkörper resp. ihrer Verdauungsprodukte verhindern.