

Über die Filtration von Lab und Pepsin.

Von

Casimir Funk und Albert Niemann.

(Aus dem chem. Laboratorium der Universitätskinderklinik, Berlin.)
(Der Redaktion zugegangen am 9. August 1910.)

Von Maurice Holderer ist unlängst eine Methode zur Filtration von Fermentlösungen publiziert worden, mit deren Hilfe es gelang, die Filtrierbarkeit der Invertase von *Aspergillus niger*,¹⁾ sowie der Amylase, Dextrinase und Peroxydase des Malzes,²⁾ der Katalase, des Pepsins und Emulsins³⁾ in verschiedenen Ionenkonzentrationen nachzuweisen. Insbesondere gelang es, was für die von uns gewählte Fragestellung wesentlich ist, G. Bertrand und M. Holderer, die Cellase mit Hilfe dieser Methode vom Emulsin zu trennen und als besonderes Ferment zu charakterisieren.⁴⁾

Wir wollen hier die Methode an einem für unsere Zwecke besonders geeigneten Beispiel, am Pepsin, kurz beschreiben. Eine Lösung von käuflichem Pepsin, die gegen Methylorange neutral war, wurde durch eine Chamberlandtonkerze filtriert; das Filtrat erwies sich als fast vollständig inaktiv; wurde dagegen die Pepsinlösung vor der Filtration mit 2‰ Salzsäure oder mit 1‰ Ammonsulfat versetzt, so blieb das Filtrat aktiv. Dasselbe gilt auch für eine Lösung, die durch Alkalizusatz gegen Phenolphthalein neutralisiert wurde, nur war in diesem Falle die Fermentwirkung durch das Alkali beträchtlich abgeschwächt.

Wir waren nun der Meinung, daß es nicht uninteressant sein würde, mit Hilfe dieser Methode, die die Individualität der Cellase zu erweisen vermochte, zu prüfen, ob die Lab- und Pepsinwirkung käuflicher Präparate oder auch von Magensäften, nach der Filtration in verschiedenen Medien einander vollständig parallel bleiben oder etwa irgend welche Unterschiede aufweisen würden.

¹⁾ C. r. de l'Acad. d. Sc., Bd. CXLIX, S. 1153 (1909).

²⁾ C. r. de l'Acad. d. Sc., Bd. CL, S. 285 (1910).

³⁾ C. r. de l'Acad. d. Sc., Bd. CL, S. 790 (1910).

⁴⁾ C. r. de l'Acad. d. Sc., Bd. CXLIX, S. 1385 (1909); ebenda, Bd. CL, S. 230 (1910).

Wir wollen hier der Kürze halber nicht auf die umfangreiche Literatur über die Frage der Identität von Pepsin und Lab eingehen und verweisen in dieser Beziehung auf das Buch von Oppenheimer «Fermente» III. Auflage, 1909, sowie auf das Kapitel über Michgerinnung von Schloßmann und Engel im Handbuch der Biochemie von Oppenheimer, Bd. III, 1. Hälfte. Wir möchten nur kurz auf die Methoden eingehen, die zur Trennung der beiden Fermentwirkungen angewandt worden sind: Erwärmen mit darauf folgendem Neutralisieren,¹⁾ Erwärmen auf 38°,²⁾ Versuch der Trennung durch Alkaliwirkung,³⁾ mittels Dialyse durch menschliches Amnion,⁴⁾ durch die Wirkung von Antitrypsin oder von Serum auf Pepsinlösungen bei verschiedenen Temperaturen.⁵⁾

Wir glauben unsere Versuche den früheren anreihen zu dürfen und wollen als deren Resultat schon hier betonen, daß in allen Versuchen die Abschwächung der einen Fermentwirkung nach der Filtration auch die der anderen zur Folge hatte. Allerdings war bei allen von uns untersuchten Präparaten die Lab- und Pepsinwirkung ungleich stark; vielleicht dürfte diese Verschiedenheit auf einer scheinbaren Anreicherung eines Fermentes durch Anwesenheit von Paralysatoren beruhen.

Außer der Filtrierbarkeit von Lab- und Pepsinlösungen bei neutraler, saurer und alkalischer Reaktion haben wir auch ihre Filtrierbarkeit nach Zusatz von neutralen, sauren und alkalischen Salzen untersucht und auch hier eine vollständige Parallelität der beiden Wirkungen gefunden. Im Gegensatz zu früheren Ergebnissen⁶⁾ konnten wir eine stärkere Hemmung der Pepsin- und Labwirkung durch Neutralsalze (Kochsalz, Ammonsulfat) nicht feststellen, dagegen fanden wir eine solche durch saures citronensaures Natrium. Hervorheben möchten wir noch, daß wir durch Zusatz von Aminosäuren (Glykokoll,

¹⁾ Schmidt-Nielsen, zit. n. Oppenheimer, Fermente, Spez. Teil, S. 291.

²⁾ Sawitsch, Diese Zeitschrift, Bd. LV, S. 84 (1908).

³⁾ Tichomirow, Diese Zeitschrift, Bd. LV, S. 107 (1908).

⁴⁾ Jacoby, Biochem. Zeitschrift, Bd. I, S. 53 (1906).

⁵⁾ Briot, C. r. de la Soc. de Biologie, Bd. LXIV, S. 369 (1908).

⁶⁾ Dastre, C. r. de la Soc. de Biol., S. 778 (1894).

d-Alanin) die Labwirkung zu schädigen vermochten, worin vielleicht eine gewisse Analogie mit der Hemmung der peptolytischen Fermente durch Aminosäuren zu erblicken ist.¹⁾

Bei einigen Versuchen haben wir außerdem in der Fermentstammlösung und in den Filtraten den Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt; dabei fanden wir, daß das Filtrat, ob es nun wirksam oder unwirksam war, fast immer den gleichen Stickstoffgehalt zeigte wie die Stammlösung, daß also die Wirksamkeit des Fermentes gleich Null sein kann, obwohl der Stickstoff quantitativ übergegangen ist. Besonders konnte das in den Fällen gezeigt werden, wo sich das Ferment vollständig gelöst hatte; in anderen Fällen zeigte die Fermentlösung eine Trübung infolge Suspension kleinster, ungelöst gebliebener Partikelchen; diese vor Beginn des eigentlichen Filtrationsversuches durch eine besondere Filtration zu entfernen, haben wir unterlassen, um nicht etwa schon hierdurch das Ferment zu schädigen; sie wurden dann bei der Filtration durch die Chamberlandkerze natürlich zurückgehalten, was einen geringeren Stickstoffgehalt des Filtrates zur Folge haben mußte.

Auf eine Erklärung unserer bezüglich der Stickstoffverteilung gewonnenen Resultate möchten wir vorderhand verzichten; jedenfalls ist es sehr bemerkenswert, daß, obwohl der gesamte Stickstoff im Filtrat vorhanden ist, dieses dennoch unwirksam sein kann. Wenn man dies letztere dadurch erklären will, daß das Ferment durch die Tonkerze zurückgehalten wird, so könnte nach dem Verhalten des Stickstoffs diese Hypothese nur dann zutreffen, wenn man annimmt, daß das Ferment stickstofffrei ist. Andernfalls müßte die Schlußfolgerung gezogen werden, daß das Ferment zwar vollständig in das Filtrat übergeht, aber durch die Filtration geschädigt wird.

Wir haben unsere Versuche zunächst an Magensäften vom Hund (Fistelsaft, den wir der Güte des Herrn Prof. Bickel verdanken), von Säuglingen und von Erwachsenen ausgeführt, ferner an Labpräparaten von Grübler und Witte-Rostock und an Pepsin von Grübler. Anhangsweise haben wir auch die Filtration von Trypsin-Grübler ausgeführt. Was die Me-

¹⁾ Abderhalden u. Gigon, Diese Zeitschrift, Bd. LIII, S. 251 (1907).

thodik anbelangt, so hielten wir uns an die oben beschriebene von Holderer. Wir lösten von den zu untersuchenden Präparaten 4—5 g im Liter, bestimmten die Reaktion gegen Methylorange und Phenolphthalein und in einigen Fällen den Stickstoffgehalt. Mit den Magensäften, die wir zum Teil verdünnten, wurde entsprechend verfahren.

Wir teilten dann die Lösung in vier gleiche Teile und bestimmten in dem ersten Teil die Labwirkung nach der Methode von Fuld,¹⁾ das Pepsin nach Fuld und Levison²⁾ bzw. das Trypsin nach Fuld. Statt des von diesem verwandten Milchpulvers, das wir nicht erhalten konnten, haben wir eine konstant zusammengesetzte rohe Magermilch genommen, wie sie die Kinderklinik der Charité von der Nieder-Ludwigsdorfer Molkerei bezieht. Die Verdünnungen der Fermentlösung wurden in den Verhältnissen: $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$ usw. ausgeführt. Fast durchweg wurden 0,5 ccm Fermentlösung zu 4,5 ccm Milch bzw. 2 ccm Edestinlösung zugesetzt. Jeder einzelne Versuch wurde ohne Unterbrechung durchgeführt und an demselben Tage, an dem er begonnen hatte, beendet.

Die käuflichen Fermentpräparate erwiesen sich sämtlich als neutral gegen Methylorange. Dem einen Teil der Fermentlösung wurde nun $\frac{1}{20}$ Volumen n_{10} -Salzsäure zugesetzt: ein größerer Salzsäurezusatz wurde vermieden, um das Flüssigkeitsvolumen nicht unnötig zu vergrößern; dann wurde filtriert. — als Filtrierkerze wurde Chamberland-F genommen. Die Kerzen und alle Glassachen waren sterilisiert — das Filtrat mit $\frac{1}{20}$ Volumen n_{10} -Natronlauge auf die ursprüngliche neutrale Reaktion gebracht und mit Milch und Edestinlösung angesetzt.

Ein anderer Teil der Lösung wurde mit einem Neutralsalze (NaCl , NH_4SO_4) versetzt und filtriert und der letzte Teil endlich mit n_{10} -NaOH gegen Phenolphthalein neutral gemacht und nach der Filtration auf die ursprüngliche Reaktion gebracht. Die Volumenänderung war in allen Fällen so gering, daß sie für das Resultat nicht in Betracht kam.

¹⁾ Fuld, Biochem. Zeitschrift. Bd. IV, S. 54 (1907); Blum und Fuld, Ebenda. Bd. IV, S. 62 (1907).

²⁾ Fuld und Levison, Biochem. Zeitschr., Bd. VI. S. 473 (1907).

Tabelle I. Filtration von Magensäften.

	I. Magensaft vom Hund (Fistelsaft)		II. Magensaft vom erwachsenen Menschen		III. Magensaft vom Säugling	
	Fermentwirkung Verdünnungen: $\frac{1}{8}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$ usw. Je 1 ccm zu 4.5 ccm Milch und 2 ccm Edestin	N in g	Fermentwirkung Verdünnungen usw. wie bei I.	N in g	Fermentwirkung Verdünnungen usw. wie bei I.	N in g
Unfiltriert	+++	0,037	+++	0,282	+++	0,019
Filtriert bei der ursprüngl. saur. Reaktion	+	0,037	+++	0,262	+++	0,019
Filtriert nach Neutralisation gegen Methyl- orange	---	0,034	---	---	---	0,017
Filtriert bei derselben Reaktion mit 1% (NH ₄)SO ₄	---	---	---	---	---	---
Filtriert nach Neutralisation gegen Phenol- phthalein	---	0,0360	---	0,268	---	---

Aus diesen 3 Versuchen ist zu ersehen, daß, obwohl die unfiltrierten Magensäfte Pepsin- und Labwirkung besaßen und im Filtrat fast der gesamte Stickstoff vorhanden war, die Filtrate dennoch unwirksam waren. Die Filtration ging sehr langsam vor sich und die Kerzen zeigten sich nach derselben mit einer schleimigen Substanz überzogen.

Tabelle II. Filtration bei verschiedener Reaktion.

	IV.		V.		VI.	
	Lab	N in g	Lab	N in g	Lab	N in g
Unfiltriert	Pepsin Lab	—	Lab Grübler (1:300000) 4 g im Liter gelöst. Lösung nicht völlig klar, neutral gegen Methyl- orange. 10 ccm der Lösung brauchten zur Neutralisation gegen Phenolphthalein 0,15 ccm n_{10} -NaOH	—	Pepsin Grübler 5 g im Liter gelöst. Lösung nicht völlig klar, neutral gegen Methyl- orange. 10 ccm der Lösung brauchten zur Neutralisation gegen Phenolphthalein 0,8 ccm n_{10} -NaOH	—
Filtriert bei der ursprüngl. Reaktion	Pepsin Lab	—	Fermentwirkung Verdünnungen $\frac{1}{10}, \frac{1}{100}, \frac{1}{1000}$ usw. Je 0,5 ccm zu 4,5 ccm Milch und 2 ccm Edestin	—	Fermentwirkung Verdünnungen $\frac{1}{2}, \frac{1}{4}, \frac{1}{8}$ usw. Je 0,5 ccm zu 4,5 ccm Milch und 2 ccm Edestin	—
Filtriert bei derselben Reaktion mit 1% (NH ₄)SO ₄	Pepsin Lab	—	—	—	—	—
Filtriert nach Zusatz von $\frac{1}{10}$ Vol. n_{10} -HCl	Pepsin Lab	—	—	—	—	—
Filtriert nach Neutralisation gegen Phenol- phthalein	Pepsin Lab	—	—	—	—	—
		++		++	++	0,714
		++		++	++	0,658
		—		—	—	—
		—		—	—	0,630
		++		++	++	0,630

Tabelle III.

Wirkung von neutralen, sauren und alkalischen Salzen auf die Filtration von Lab und Pepsin.

		VII.		VIII.	
		Pepsin Grübler		Lab Witte	
		4 g im Liter gelöst. Lösung nicht ganz klar. Die Salze wurden in der Weise zugesetzt, daß eine $\frac{2}{10}$ -Normallösung entstand		Lösungsverhältnis und Zusatz der Salze wie bei VII.	
		Fermentwirkung	N	Fermentwirkung	N
		Verdünnungen $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$ usw. 0,5 ccm zu 4,5 ccm Milch und 2 ccm Edestin.	in g	Verdünnungen usw. wie bei VII.	in g
Unfiltriert	Pepsin	+	0,504	+	0,378
	Lab	+	—	+	—
Filtriert mit Chlornatrium	Pepsin	+	0,504	+	0,294
	Lab	+	—	+	—
Filtriert mit saurem citronensaurem Natrium	Pepsin	+	0,490	+	0,322
	Lab	+	—	+	—
Filtriert mit Natriumacetat	Pepsin	+	0,504	+	0,322
	Lab	+	—	+	—

Hier zeigte sich eine starke Hemmung von seiten des citronensauren Natriums durch Kalkfällung, sodaß nur Röhren III koagulierte, in dem die Verdünnung offenbar schon so groß war, daß die obengenannte schädigende Wirkung nicht mehr eintreten konnte.

Tabelle IV.

Kontrollversuche zur Prüfung des Einflusses des Ammonsulfatzusatzes mit und ohne Filtration auf die Wirksamkeit des Fermentes.

		IX.	X.	XI.
		Lab Grübler 4 g im Liter gelöst	Pepsin Grübler 4 g im Liter gelöst	Pepsin Grübler 5 g im Liter gelöst
		Fermentwirkung	Fermentwirkung	Fermentwirkung
Unfiltriert	Pepsin	+ - - - - -	+ + + + - -	+ - - - - -
	Lab	+ + + + + +	+ + + + + +	+ + + + - -
Unfiltriert mit 1% (NH ₄) ₂ SO ₄	Pepsin	+ - - - - -	+ + + + - -	+ - - - - -
	Lab	+ + + + + +	+ + + + + +	+ + + + - -
Filtriert mit 1% (NH ₄) ₂ SO ₄	Pepsin	- - - - - -	- - - - - -	- - - - - -
	Lab	- - - - - -	- - - - - -	- - - - - -

Tabelle V.

Kontrollversuche zwecks Prüfung, wie die Änderung der Reaktion und der Zusatz von NaCl sowie der von Aminosäuren (Glykokoll und Alanin) an sich, ohne Filtration, die Fermentwirkung beeinflussen.

	XII.	XIII.
	Pepsin Grübler 5 g im Liter gelöst	Labpulver Witte 2 g im Liter gelöst
	Pepsinwirkung Verdünnungen usw. wie bei X.	Labwirkung Verdünnungen usw. wie bei X.
Ursprüngl. Lösung	+++++ - - - -	+++++ + + + + -
Nach Zusatz von NaCl (2/10-normal)	+++++ - - - -	+++++ + + + + -
Nach Zusatz von 1/20 Vol. n/10-HCl.		
Nach 1/2 Stunde mit 1/20 Vol. n/10-NaOH neutralisiert	+++++ - - - -	+++++ + + + + -
Nach Neutralisation gegen Phenolphthalein (50 ccm erfordernten 4,5 ccm n/10-NaOH)	- - - - -	- - - - -
Nach Zusatz von 1/10 Mol. Glykokoll		+++++ + - - -
Nach Zusatz von 1/10 Mol. d-Alanin		+++++ + + + - -

Tabelle VI. Filtration von Trypsin.

	XIV.								N in g
	Trypsin Grübler. 4 g im Liter gelöst. Neutral gegen Methylorange. 10 ccm brauchten zur Neutralisation gegen Phenolphthalein 0,3 ccm n/10-NaOH								
	Trypsinwirkung: Verdünnungen 1/2, 1/4, 1/8 usw. Je 1 ccm zu 2 ccm Caseinlösung zugesetzt								
Unfiltriert	+	+	+	+	-	-	-	-	0,812
Filtriert bei der ursprüngl. Reaktion	-	-	-	-	-	-	-	-	0,812
Filtriert ebenso mit 1% NaCl	+	-	-	-	-	-	-	-	0,812
Filtriert mit 1/20-Vol. n/10-HCl	+	+	-	-	-	-	-	-	0,800
Filtriert nach Neutralisation gegen Phenolphthalein	+	-	-	-	-	-	-	-	0,812

Zusammenfassung.

Überblickt man die Reihe unserer Versuche, so fällt fast überall ohne weiteres ein vollkommener Parallelismus der beiden Fermentwirkungen auf. Dagegen sind zwei Unterschiede bemerkenswert:

1. daß bei der Filtration von Lab in gegen Phenolphthalein neutraler Lösung das Ferment im Gegensatz zum Pepsin nicht geschädigt wird,

2. daß das Pepsin mit 1% Ammonsulfat filtriert, Lab dagegen nicht.

Unsere Kontrollversuche zeigen nun aber, daß dieser Gegensatz nur ein scheinbarer ist. Zufällig war das Pepsinpräparat stärker sauer wie das Labpräparat, erforderte also zur Neutralisation gegen Phenolphthalein mehr Alkalizusatz. Wenn wir dem Labpräparat ebensoviel Alkali zusetzten, wie beim Pepsin nötig war, so zeigte sich auch die Labwirkung total geschädigt. (S. Tab. V Kontrollversuch XII und XIII.)

Was den zweiten Gegensatz anbetrifft, so zeigen die Kontrollversuche Tabelle IV, daß die Filtrierbarkeit nach Zusatz von Ammonsulfat von der in der Lösung enthaltenen Fermentmenge abhängig ist.

Eine Lösung von 4 g Pepsin-Grübler im Liter zeigte sich nach der Filtration mit 1% Ammonsulfat unwirksam (Versuch VIII), während eine Lösung von 5 g im Liter noch wirksam war (Versuch IX). Da wir nun im Versuch nur 4 g, im Versuch dagegen 5 g im Liter gelöst hatten, so ist auch der hier zutage getretene Gegensatz als ein nur scheinbarer erwiesen.

Wir können also unsere Resultate dahin zusammenfassen, daß bei Anwendung der Holdererschen Filtrationsmethode zur Trennung der Fermente diese letztere bei Lab- und Pepsinpräparaten nicht gelungen ist, daß sich vielmehr eine vollständige Parallelität der beiden Fermentwirkungen herausgestellt hat.
