

# Über die Darstellung von pepsinarmen oder pepsinfreien Chymosinlösungen.

Von  
Olof Hammarsten.

(Der Redaktion zugegangen am 22. Juli 1911.)

Während des Fortganges meiner Untersuchungen über Pepsin- und Chymosinwirkung fand ich es notwendig, wenn möglich eine Trennung der beiden Enzyme zu bewirken, und aus mehreren Gründen versuchte ich dabei in erster Linie pepsinfreie Chymosinlösungen darzustellen.

Schon vor längerer Zeit hatte ich<sup>1)</sup> zu dem Zwecke eine Methode ausgearbeitet, deren erste Phase in einer fraktionierten Fällung mit Magnesiumcarbonat bestand. Hierbei wurde die Hauptmenge des Pepsins entfernt, während die Lösung noch reichliche Mengen Chymosin enthielt. Gegen diese Methode, welche ausschließlich für die Verarbeitung von Kalbsmageninfusionen ausgearbeitet war, hat man<sup>2)</sup> indessen auf Grund von Versuchen mit Hundemagensaft, in welchem kein typisches Chymosin vorkommt, angewendet, daß das vom Magnesiumniederschlag getrennte Filtrat nicht pepsinfrei ist, sondern ein infolge der Wirkung des Alkalis (des Magnesiumcarbonates) modifiziertes, inaktives Pepsin enthält.

Für die Frage von der Identität der zwei Enzymwirkungen ist es nun allerdings ziemlich gleichgültig, ob man eine wirklich pepsinfreie Chymosinlösung oder eine solche, in welcher neben dem Chymosin ein unwirksames Pepsin vorkommt, erhält: auf der anderen Seite muß man aber dahin streben, eine solche Methode auszuarbeiten, welche sowohl die schädigende Wirkung

<sup>1)</sup> Upsala Läkareförenings Förhandlingar, Bd. 8.

<sup>2)</sup> Pawlow und Parastschuk, Diese Zeitschrift, Bd. 42.

des Alkalis wie jede andere schädliche Einwirkung auf die Enzyme ausschließt. Um dieses Ziel zu erreichen, habe ich die Ausfällung mit Eiweiß unter geeigneten Verhältnissen versucht.

Nach einigen vorbereitenden, nicht gut gelungenen Versuchen mit anderen Eiweißstoffen ging ich zu dem Casein über, welches zu diesem Zwecke als sehr geeignet sich erwies. Eine Methode, die zur sicheren Darstellung von pepsinfreien Chymosinlösungen führt, habe ich allerdings noch nicht ausarbeiten können, und überhaupt habe ich bisher nur einmal eine Chymosinlösung erhalten, in welcher ich kein Pepsin nachweisen konnte. Dagegen gelingt es leicht, pepsinarme Chymosinlösungen darzustellen; und da dies für die Frage von der Identität des Pepsins und Chymosins von Interesse ist, will ich die schon jetzt erhaltenen Resultate hier mitteilen.

Die Methode besteht in ihren Hauptzügen darin, daß man eine saure Kalbsmageninfusion mit einer neutralen Alkalicaseinatlösung in solchen Verhältnissen mischt, daß das zuerst ausfallende Casein von der Säure wieder gerade aufgelöst wird. Diese saure Caseinlösung wird nun mit nur so viel  $n/10$ -Natronlauge versetzt, daß eine reichliche Caseinausfällung bei noch stark saurer Reaktion stattfindet und die Filtration leicht vonstatten geht. Von dem ausfallenden Casein werden hierbei beide Enzyme niedergerissen, das Pepsin aber in viel reichlicherer Menge als das Chymosin. Man erhält also ein wasserklares, sauer reagierendes Filtrat, welches eine ganz andere Relation zwischen Pepsin- und Chymosinwirkung als die ursprüngliche Infusion zeigt.

Der Grund, warum man die sauer reagierende, caseinhaltige Infusion nicht neutralisieren, sondern nur mit so viel Lauge versetzen soll, daß eine reichliche Caseinfällung bei saurer Reaktion stattfindet, ist natürlich der, daß das Casein bei Zusatz von Alkali bis zu neutraler Reaktion sich wieder zu Caseinalkali löst. Die passende Menge  $n/10$ -Lauge muß deshalb auch in jedem Versuche besonders ermittelt werden.

Das Filtrat von der Caseinfällung ist bei richtiger Arbeit wasserhell und es reagiert ziemlich stark sauer. Dieses Filtrat kann nun direkt sowohl zu der Chymosin- wie der Pepsin-

probe benutzt werden. Da aber eine Chymosinwirkung nur in dem Falle sicher bewiesen ist, wenn man bei neutraler Reaktion arbeitet, habe ich das Filtrat genau neutralisiert (mit blauem, rotem und violetter Lackmuspapier von Kahlbaum als Indikator) und mit der ebenfalls genau neutralisierten, gleich stark mit Wasser verdünnten Infusion verglichen.

Mit Rücksicht auf diese Neutralisation will ich besonders hervorheben, daß sie bei sorgfältiger Arbeit keine merkbare schädliche Einwirkung auf die Enzyme ausübt. Man hat bekanntlich gefunden, daß z. B. der Hundemagensaft nicht ohne Schädigung der Enzyme mit  $n/10$ -Lauge neutralisiert werden kann, und man hat dann ohne weiteres angenommen, daß auch andere Magensäfte oder Infusionen in derselben Weise sich verhalten. Diese Annahme ist wenigstens bezüglich der Kalbsmageninfusionen eine ganz irrige, was wohl jedem Forscher, der viel mit solchen Infusionen gearbeitet hat, wohlbekannt ist. Als Beispiele von der nicht schädlichen Wirkung der Neutralisation der Kalbsmageninfusionen will ich deshalb nur folgendes anführen. Verdünnte Infusionen, die ich mit  $n/10$ -Lauge genau neutralisiert hatte, und welche unmittelbar nach der Neutralisation Milch in dem Verhältnisse 1:10 in 1—2 Minuten koagulierten, habe ich, nachdem sie mit Toluol versetzt worden waren, 1 Monat in einem kalten Zimmer und dann 2 oder 3 Monate bei 17—19° C. aufbewahrt, ohne eine sichere Abnahme ihrer Wirksamkeit konstatieren zu können.

Auf die Chymosinwirkung übt also die Neutralisation keine sichtbare schädigende Wirkung aus. Daß es in derselben Weise mit der Pepsinwirkung sich verhält, kann man in der Weise zeigen, daß man die neutralisierte Infusion wieder auf den ursprünglichen Säuregrad bringt und mit einer anderen Portion derselben nicht neutralisierten Infusion vergleicht, nachdem man die letztere mit Salzsäure von derselben Stärke entsprechend verdünnt und mit der entsprechenden Menge Kochsalz (während der Neutralisation der Infusion gebildet) versetzt hat. Ein Unterschied in der Verdauungsfähigkeit der beiden Proben ist nicht zu beobachten.

Um die Stärke der Enzymwirkungen in dem Caseinfiltrate

und der ursprünglichen Infusion vergleichen zu können, ist es also gestattet (und für die Prüfung der Chymosinwirkung notwendig), beide genau zu neutralisieren und dann die Infusion durch Wasserzusatz auf den Verdünnungsgrad des Caseinfiltrates zu bringen. Für die Bestimmung der Chymosinwirkung werden diese zwei Flüssigkeiten nun direkt mit Milch geprüft. Für die Pepsinprobe müssen beide selbstverständlich wieder angesäuert und genau auf denselben Säuregrad (HCl) gebracht werden.

Bei Ausführung der Pepsinprobe mit diesen zwei Lösungen findet man nun, wie oben gesagt, daß die Pepsinwirkung unverhältnismäßig viel stärker als die Chymosinwirkung herabgesetzt ist. Daß diese Herabsetzung der Pepsinwirkung nicht von der vorangegangenen Neutralisation der Caseinfiltrate herühren kann, geht aus dem oben Gesagten hervor, denn die Pepsinwirkung in der Kontrollinfusion würde wohl auch in diesem Falle durch die Neutralisation herabgesetzt werden. Der entscheidende Beweis, daß die vorangegangene Neutralisation der Caseinfiltrate für die schwache Pepsinwirkung nicht verantwortlich ist, läßt sich jedoch leicht führen. Die Neutralisation ist nämlich allerdings absolut notwendig für den ganz sicheren Nachweis einer Chymosinwirkung; die Pepsinprobe kann aber mit dem nie neutralisierten, passend mit HCl angesäuerten Caseinfiltrate direkt angestellt werden. Die in dieser Weise von mir ausgeführten Kontrollversuche haben nichts an den Hauptresultaten geändert; die Pepsinarmut der Caseinfiltrate war unter diesen Verhältnissen ebenso leicht zu konstatieren.

Da man den Wert der Methode und die Beweiskraft der Resultate erst nach einer genaueren Kenntnis der Versuchsanordnung beurteilen kann, führe ich hier einen Versuch an, welcher als Typus der übrigen gelten kann.

Die Kalbsmageninfusion enthielt 0,245% HCl und 0,818% feste Stoffe. Die Caseinlösung reagierte neutral und enthielt 4% Casein als Natriumcaseinat. Zu 135 ccm dieser sauren Infusion wurden 200 ccm der Caseinlösung allmählich und unter Umrühren zugesetzt. Das Casein löste sich beinahe vollständig zu einer stark opalisierenden Flüssigkeit auf. Ohne die ganz vollständige Auflösung des Caseins abzuwarten, wurde das

Gemenge nach etwa 5 Minuten mit  $n/10$ -Natronlauge versetzt. Nach Zusatz von 16 ccm Lauge, unter stetigem Umrühren, aber ohne Umschütteln, entstand eine reichliche grobflockige Caseinfällung, die leicht abzufiltrieren war. Das wasserhelle Filtrat reagierte sauer.

Von diesem, sauer reagierenden Filtrate wurden 300 ccm abgemessen, entsprechend 115 ccm der ursprünglichen, sauren Kalbsmageninfusion. Diese 300 ccm erforderten zur genauen Neutralisation 27 ccm  $n/10$ -Lauge, und es entsprachen also 327 ccm des neutralisierten Filtrates 115 ccm der ursprünglichen sauren Infusion. Das so erhaltene neutralisierte Caseinfiltrat wird hier, wie in allen anderen Versuchen in diesem Aufsatze, mit **F** (= Filtrat) bezeichnet.

Auf der anderen Seite wurden von der ursprünglichen, sauren Kalbsmageninfusion 30 ccm abgemessen und mit  $n/10$ -Natronlauge neutralisiert. Es waren hierzu 20,1 ccm erforderlich. Diese 50,1 ccm wurden mit Wasser zu 85,3 ccm verdünnt und die so erhaltene Kontrollelösung, hier wie überall mit **K** (= Kontrollelösung) bezeichnet, hatte also denselben Verdünnungsgrad wie **F** ( $30 : 85,3 = 115 : 327$ ).

Zu der Milchgerinnungsprobe wurde hier, wie in allen anderen Versuchen, 1 ccm der zu prüfenden Lösung zu 10 ccm Milch gesetzt. Die Probe, an zwei verschiedenen Tagen ausgeführt (bei  $37-38^{\circ}$  C.), ergab:

für **K** Gerinnung in 45—60"

» **F** » » 150"

Die Gerinnungszeiten für **K** und **F** verhielten sich also rund wie 1 : 3 und durch die Ausfällung mit Casein war also der Chymosingehalt auf  $1/3$  herabgesetzt worden.

Zur Vergleichung des Pepsingehaltes nach Mett wurden kleinere Mengen beider Flüssigkeiten auf den Säuregrad 0,3% HCl gebracht. Die Temperatur schwankte während des Versuches zwischen  $36$  und  $37^{\circ}$  C. Das Versuchsergebnis war folgendes:

	nach 24 St.	48 St.	72 St.
<b>K</b>	4,5 mm	8,5 mm	13 mm
<b>F</b>	0,0 »	0,0 »	0,0 »

Kleine, freie Eiweißzylinder (Inhalt der Mettschen Röhren) waren in **K** nach einigen Stunden verdaut; in **F** waren sie nach 72 Stunden nicht merkbar angegriffen.

Ein Rest des nicht neutralisierten Filtrates (**F**), mit Salzsäure bis zu 0,3 versetzt, war ebenso unwirksam bei der Mettschen Probe wie das vorher neutralisierte und dann wieder angesäuerte Filtrat (**F**).

Das Ergebnis der Untersuchung beider Lösungen mit der Pepsin-Fibrinprobe werde ich unten in einem anderen Zusammenhange mitteilen.

Der Versuch hatte also das auffallende Resultat gegeben, daß die Fällung mit Casein den Chymosingehalt nur auf  $\frac{1}{3}$  herabgesetzt hatte, während die Pepsinwirkung so stark vermindert war, daß die Mettsche Probe negativ ausfiel. Eine ähnliche Herabsetzung der Pepsinwirkung habe ich übrigens in sämtlichen von mir ausgeführten 12 Versuchen beobachtet. Die Mettsche Probe gab immer im Laufe von 72—96 Stunden ein negatives Resultat, und nur in 2 Versuchen wurden freie Eiweißzylinder (Inhalt der Mettschen Röhren) nach 30—48 Stunden merkbar angegriffen und dann langsam verdaut.

Daß durch Auflösung des Caseins in einer sauren Infusion und Wiederausfällung desselben durch teilweise Neutralisation der Säure eine Vernichtung oder Inaktivierung des Pepsins nicht bewirkt werden kann, liegt auf der Hand. Der Beweis, daß die Pepsinarmut von einer Ausfällung des Pepsins zusammen mit dem Casein herrührt, liegt auch in dem Verhalten der Caseinfällung. Nach Auflösung derselben in Verdauungssalzsäure wird nämlich das Casein unter Abspaltung von Pseudonuclein rasch verdaut. Setzt man die Verdauung einige Tage fort, um eine reichliche Peptonbildung zu erzielen, und läßt dann diese Lösung gegen eine Salzsäure derselben Konzentration (zur Entfernung der Verdauungsprodukte) dialysieren, so erhält man auch eine kräftig wirkende Pepsinlösung.

Daß die Kalbsinfusion weder von Anfang an noch nach der Neutralisation Stoffe enthält, welche die Mettsche Probe verhindern, lehrt der Kontrollversuch mit der Lösung **K**. Das von mir zu den Versuchen angewandte Casein hatte ich teils

selbst bereitet, teils hatte ich es von Kahlbaum (sein reines Casein nach Hammarsten) bezogen. Das letztere erwies sich als ebenso brauchbar wie jenes. Daß die aus diesem Materiale bereiteten Lösungen keine die Pepsinverdauung hemmende Stoffe enthielten, ging aus ihrer außerordentlich leichten und raschen Verdauung hervor. Es blieb also nur die Einwendung übrig, daß die chemischen Vorgänge bei der Auflösung oder Ausfällung des Caseins vielleicht Veranlassung zur Bildung von hemmenden Stoffen geben könnte. Daß dies in der Tat der Fall ist, geht aus dem folgenden hervor.

#### **Die Entstehung von hemmenden Stoffen in dem Gemenge von saurer Infusion und Caseinlösung.**

Schon bei der ersten Untersuchung eines Filtrates (**F**) von dem Caseinniederschlage fand ich, daß es, wenn auch nur in schwachem Grade, den bitteren Geschmack einer Lösung von peptisch verdaulichem Casein hatte; und ebenso hatte das auf dem Filtrum gesammelte Casein einen bitteren Geschmack. Dies führte zu der Vermutung, daß während der Arbeit eine teilweise Verdauung des Caseins stattgefunden hatte, und diese Vermutung wurde durch die weitere Untersuchung bestätigt.

In fast allen meinen Versuchen habe ich den Gehalt der beiden Lösungen **F** und **K** an festen Stoffen bestimmt und dabei immer eine bedeutend größere Menge von festen Stoffen in dem Filtrate (**F**) als in der gleich stark verdünnten Kontrolllösung (**K**) gefunden. So enthielt in dem oben als Beispiel angeführten Versuche das Filtrat **F** 1,39% feste Stoffe, von denen 0,175% aus löslichen Salzen und 1,215% aus organischer Substanz bestanden. In der Kontrolllösung (**K**) fand ich nur 0,420% feste Stoffe, darunter 0,165% lösliche Salze und 0,255% organische Substanz. Das Filtrat **F** von der Caseinfällung enthielt also zwischen 5- und 6mal soviel organische Stoffe wie die Kontrolllösung **K**.

Diese organische Substanz ist kein Rest von nicht gefälltem Casein, und das Filtrat enthält höchstens Spuren von mit Säure fällbarer Proteinsubstanz. Hiermit stimmt auch die Beobachtung, daß, wenn man Casein statt in einer sauren In-

fusion in einer Salzsäure von derselben Konzentration löst und dann durch Alkalizusatz wieder ausfällt, das Filtrat höchstens Spuren von Casein enthält. Die Menge des ausgefällten Caseins ist auch in diesem Falle viel bedeutender als bei Fällung desselben aus einer sauren Infusion. Alles dies spricht dafür, daß in der sauren Infusion eine teilweise Verdauung des Caseins stattgefunden hat. Daß dem so ist, ergab auch die weitere Untersuchung. Diese lehrte nämlich, daß die organische Substanz des Caseinfiltrates **F** jedenfalls zum allergrößten Teile aus Albumosen, sowohl primären wie sekundären, besteht.

Unter den von mir gewählten Versuchsbedingungen findet also unzweifelhaft eine Hydrolyse des Caseins statt, und zwar in bedeutendem Umfange. In dem als Beispiel gewählten Versuche enthielt die Mischung von 200 ccm Caseinlösung und 135 ccm saurer Infusion im ganzen 8 g Casein, also einen Gehalt von rund 2,4% Casein. Das Filtrat **F** enthielt nach Abzug der aus der Infusion stammenden organischen Substanz gegen 1% an von dem Casein herrührenden Stoffen, und da dieses Filtrat durch die Neutralisation stärker verdünnt als das ursprüngliche Caseininfusionsgemenge geworden war, kann man also sagen, daß gegen die Hälfte des Caseins in lösliche Verdauungsprodukte umgewandelt war. Dies ist umsomehr bemerkenswert, als ich ähnliche Verhältnisse auch in solchen Versuchen beobachtet habe, wo nur 2—3 Minuten zwischen dem Zusammenmischen der beiden Lösungen und der Ausfällung des Caseins verflossen. Hierzu kommt aber noch, daß ich die meisten Versuche im Winter ausgeführt habe; wo die Temperatur der Infusionen und der Caseinlösungen nur 2—3° C. betrug. Auf die Frage, ob es hier um eine Chymosinwirkung bei saurer Reaktion oder eine Pepsinwirkung sich handelt, kann ich diesmal nicht eingehen. Hier mag es genügend sein, hervorzuheben, daß das Casein in der sauren Infusion sogar bei sehr niedriger Temperatur sehr rasch gespaltet wird, und daß dementsprechend der bei partieller Neutralisation entstehende Niederschlag nicht aus unverändertem Casein besteht.

Zwischen dem Caseinfiltrate **F** und der Kontrolllösung **K** besteht also der Unterschied, daß das erstere Verdauungs-

produkte enthält. Da nun bekanntlich die Verdauungsprodukte eine hemmende Wirkung auf die Pepsinverdauung ausüben, während sie vielleicht ohne Wirkung auf die Milchgerinnung bei neutraler Reaktion sind, war es notwendig zu prüfen, inwieweit der negative Ausfall der Mettschen Verdauungsprobe durch die Anwesenheit von hemmenden Verdauungsprodukten bedingt sein könnte. Da es aus unten anzuführenden Gründen auch notwendig war, die Prüfung auf die Anwesenheit von Pepsin in anderer Weise auszuführen, und da ich hierzu der Karminfibrinprobe mich bediente, scheint es mir angemessen zu sein, die Wirkung der hemmenden Stoffe auf sowohl die Mettsche Probe wie die Fibrinpepsinprobe in einem Zusammenhange zu besprechen.

#### Wirkung der hemmenden Stoffe auf die Mettsche Probe und die Fibrinpepsinprobe.

Zur Prüfung der hemmenden Wirkung der Verdauungsprodukte wurde in dem obigen, als Beispiel gewählten Versuche, wie in den anderen, ein Teil des neutralisierten Filtrats (**F**) in einem geschlossenen Gefäße (um die Verdunstung von Wasser zu verhindern) erhitzt, um vorhandene Enzyme zu zerstören. Hierbei trübte sich das Filtrat in allen Versuchen, setzte aber nur in einigen einen spärlichen, feinen Bodensatz ab, welcher wieder gleichmäßig in der Flüssigkeit verteilt wurde. Um die Möglichkeit zu prüfen, ob infolge des Erhitzens die hemmende Wirkung verändert worden war, wurde auch ein Teil des nicht erhitzten Filtrates geprüft. Sämtliche Lösungen wurden auf denselben Säuregrad, 0,2—0,3% HCl, gebracht. Die Verdünnung geschah mit einer Salzsäure von derselben Stärke, in diesem Versuche 0,3% HCl. Es wurden die Versuchslösungen nach folgender Versuchsanordnung geprüft.

**A** 5 ccm von der Kontrolllösung (**K**) + 5 ccm HCl 0,3 %.

**B** 5 ccm von der Kontrolllösung (**K**) + 5 ccm von dem erhitzten Filtrate (**F**).

**C** 5 ccm von der Kontrolllösung (**K**) + 5 ccm von dem nicht erhitzten Filtrate (**F**).

**D** 5 ccm HCl 0,3% + 5 ccm von dem nicht erhitzten Filtrate (**F**).

Das Versuchsergebnis war folgendes:

	nach 24 St.	48 St.	72 St.	96 St.	120 St.
<b>A</b>	3—4 mm	6,5 mm	9 mm	11,5 mm	13,5 mm
<b>B</b>	2,5—3 »	5,5 »	8,5 »	10,5 »	12,5 »
<b>C</b>	3 »	5,5 »	8,5 »	11 »	13 »
<b>D</b>	0,0 »	0,0 »	0,0 »	0,0 »	0,0 »

Man ersieht sogleich, daß eine hemmende Wirkung der Verdauungsprodukte nicht die Ursache des negativen Ausfalles der Mettschen Probe sein kann. Die mit erhitztem oder nicht erhitztem saurem Filtrat (**F**) gemischte Kontrolllösung in **B** und **C** verdaute allerdings ein wenig, aber nicht wesentlich schwächer als dieselbe, nur mit Salzsäure verdünnte Kontrolllösung in **A**. Das mit Salzsäure verdünnte, nicht erhitzte Caseinfiltrat **F** war dagegen ebenso unwirksam wie das nicht verdünnte.

Zu ähnlichen Resultaten bin ich auch in den übrigen Versuchen gekommen, wobei ich jedoch die Beobachtung meistens nicht länger als 72 Stunden fortgesetzt habe. Der negative Ausfall der Mettschen Probe kann also nicht durch die Anwesenheit von hemmenden Stoffen in den Caseinfiltraten bedingt sein, sondern sie muß unzweifelhaft von Mangel an Pepsin herrühren.

Nach der Caseinfällungsmethode kann man also, selbst bei Verminderung des Chymosingehaltes um nur  $\frac{1}{2}$  (vgl. die Übersichtstabelle unten S. 165), das Pepsin so reichlich ausfällen, daß die Mettsche Probe negativ ausfällt.

Dies bedeutet nun allerdings nicht, daß die Filtrate von den Caseinfällungen pepsinfrei sind, denn die Mettsche Probe hat keine besonders große Empfindlichkeit, und wenn man eine saure Pepsinlösung oder einen Magensaft hinreichend mit Verdauungssalzsäure verdünnt, gibt sie diese Probe nicht mehr. Dies gilt besonders für die Kalbsmageninfusionen, welche bei sehr starker Chymosinwirkung keine besonders starke Pepsinwirkung zeigen. So habe ich<sup>1)</sup> z. B. in einem früheren Auf-

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift. Bd. 56.

sätze gezeigt, daß schon die Verdünnung einer solchen Infusion auf  $\frac{1}{64}$  genügend sein kann, um bei Ausführung der Mettschen Probe während 72 Stunden ein negatives Resultat zu geben.

Es war also gewiß nicht ausgeschlossen, daß die Caseinfiltrate, trotz des negativen Ausfalles der Mettschen Probe, pepsinhaltig seien. Dies war im Gegenteil höchst wahrscheinlich, und in ein paar Versuchen, in welchen freie Eiweißzylinder langsam gelöst wurden, war es unzweifelhaft. Es war also notwendig, eine andere, mehr empfindliche Pepsinprobe zu versuchen, und zwar umsomehr, als für den Fall, daß die Caseinfiltrate als pepsinhaltig sich erwiesen, ein Vergleich zwischen ihrem Pepsingehalt und demjenigen der Kontrolllösungen sehr erwünscht war. Als eine solche Pepsinprobe habe ich diejenige mit karmingefärbtem Fibrin, welches ich in hauptsächlichlicher Übereinstimmung mit dem Verfahren von Grützner und Korn<sup>1)</sup> bereitete, gewählt.

Die Pepsinprobe mit Karminfibrin hat gegenüber der Mettschen Probe den Vorteil, daß sie viel rascher verläuft und bei Zimmertemperatur ausgeführt werden kann. Infolge ihrer sehr großen Empfindlichkeit muß man jedoch immer eine Kontrolleprobe mit Säure von derselben Stärke allein und demselben Fibrin anordnen, wenn man mit kleinen Pepsinmengen arbeitet, die erst nach mehreren Stunden eine beginnende Verdauung zeigen. Das Fibrin muß ferner gleichmäßig fein zerrieben sein, und die verschiedenen Proben müssen, so weit möglich, dieselbe Fibrinmenge enthalten, was bei sehr genauem Arbeiten eine Abwägung desselben für jede Probe nötig macht. Das Karminfibrin wurde in Glycerin aufbewahrt und vor jedem Versuche sorgfältig ausgewaschen und ausgepreßt.

Da man kein reines Pepsin darstellen kann, ist es natürlich nicht möglich, die Empfindlichkeit der Karminfibrinprobe in Zahlen anzugeben. Um eine ungefähre Vorstellung von ihrer Empfindlichkeit, besonders im Vergleiche mit der Mettschen Probe, zu gewinnen, habe ich indessen einige Versuche mit

<sup>1)</sup> P. Grützner, Pflügers Arch. 8 u. 106. — A. Korn, Über Methoden, Pepsin quantitativ zu bestimmen. Inaug.-Dissert., Tübingen 1902.

einem alten, mehrere Jahre aufbewahrten käuflichen Pepsin (von Langebeck in Kopenhagen) angestellt. Bei einem Säuregrade von 0,1% HCl konnte ich mit der Karminfibrinprobe das Pepsin in einer Verdünnung von 1 : 1 000 000 leicht und sicher (im Laufe von 7—8 Stunden) und in der Verdünnung 1 : 10 000 000 nur schwer, aber doch deutlich nachweisen. In dem letzteren Falle waren hierzu jedoch mehr als 24 Stunden erforderlich, und die Farbe der Lösung lieferte hier keine Anhaltspunkte für die Beurteilung der Probe. Sie war nämlich nur schwach rötlichgelb, wie in der Kontrollprobe mit Säure allein, und nur an der Verminderung der Fibrinmenge in der Pepsinlösung konnte die Verdauung erkannt werden. Die Empfindlichkeitsgrenze für die Mettsche Probe bei Anwendung desselben Pepsins lag zwischen 1 : 100 000 und 1 : 200 000 bei einer Beobachtungszeit von 72 Stunden. Nach dieser Zeit war nämlich bei der erstgenannten Konzentration gegen 1 mm und bei der zweiten Konzentration keine sichtbare Menge der Eiweißsäule verdaut worden. Die Karminfibrinprobe hat also eine bedeutend größere Empfindlichkeit als die Mettsche Probe.

Die Karminfibrinprobe habe ich nun in allen, in der Übersichtstabelle (S. 165) zusammengestellten 12 Versuchen benutzt, und während die Mettsche Probe in allen negativ ausfiel, war das Ergebnis mit der Karminfibrinprobe in 11 Fällen ein positives. Nur in einem Versuche (Nr. 7 der Tabelle) habe ich selbst mit dieser empfindlichen Probe kein Pepsin nachweisen können.

Infolge der Empfindlichkeit dieser Probe war es auch möglich, mit Hilfe derselben einen Vergleich zwischen dem Pepsingehalte der Caseinfiltrate (**F**) und der Kontrollösungen (**K**) anzustellen. Ich werde zu diesem Vergleiche bald zurückkommen.

Die hemmende Wirkung der Verdauungsprodukte in den Caseinfiltraten kommt in den Mettschen Versuchen bei den in ihnen vorkommenden hohen Säuregraden, 0,2—0,3% HCl, und bei dem noch ziemlich hohen Pepsingehalte der Kontrollösungen (**K**) nur wenig zur Geltung. Nun war es aber sehr wahrscheinlich, daß diese Produkte eine um so größere hemmende Wirkung ausüben würden, je geringer der Pepsingehalt

war, und daß diese hemmende Wirkung besser in den Fibrinversuchen (mit 0,1% HCl) als in den Mettschen Proben zum Vorschein kommen würde. Um den Wert der Karminfibrinprobe beurteilen zu können, war es also nötig, erst einige Versuche in dieser Richtung auszuführen.

Zu diesen Versuchen habe ich das obige käufliche Pepsinum Langebeck benutzt, und die Versuchsanordnung war folgende: Es wurde zu drei Proben von je 9 ccm Salzsäure (0,1% HCl) je 1 ccm Pepsinlösung von resp.  $\frac{1}{100}$ ,  $\frac{1}{1000}$  und  $\frac{1}{10000}$  Pepsin in Salzsäure von 0,1% HCl gesetzt. Der Pepsingehalt war also in **A**  $\frac{1}{1000}$ , in **B**  $\frac{1}{10000}$  und in **C**  $\frac{1}{100000}$ . Auf der anderen Seite wurde ein Teil des erhitzten Caseinfiltrates auf den Säuregrad 0,1% HCl gebracht und von ihm 3 Proben von je 9 ccm mit je 1 ccm derselben Pepsinlösungen versetzt. Der Pepsingehalt war also hier ebenfalls **A**, =  $\frac{1}{1000}$ , **B**, =  $\frac{1}{10000}$  und **C**, =  $\frac{1}{100000}$ ; und der einzige Unterschied war der, daß diese zweite Versuchsreihe die hemmend wirkenden Verdauungsprodukte enthielt. Als Vergleichsmaß der Verdauungsfähigkeit wurde der ganz sicher zu erkennende Anfang der Verdauung gewählt. Die Verdauung begann nach folgenden Zeiten:

in <b>A</b> nach etwa 7 Minuten	in <b>A</b> , nach 30—35 Minuten
» <b>B</b> » » 30 »	» <b>B</b> , » gegen 5 Stunden
» <b>C</b> » gegen 2 $\frac{1}{2}$ Stunden	» <b>C</b> , » 10 Stunden keine sichere Verdauung. Nach 20 Stunden (während der Nacht) ganz sichere, ziemlich starke Verdauung.

In diesem Versuche war der Gehalt des Caseinfiltrates an organischer Substanz gegen 1,2%; in einem anderen, in welchem er nur 0,7% betrug, kam die hemmende Wirkung weniger stark zum Vorschein. Dieser Versuch, ganz wie der vorige angeordnet, mit den Pepsinmengen  $\frac{1}{1000}$ ,  $\frac{1}{10000}$ ,  $\frac{1}{100000}$ , gab folgende Resultate. Die Verdauung begann:

in <b>A</b> nach etwa 6 Minuten	in <b>A</b> , nach 10 Minuten
» <b>B</b> » » 30 »	» <b>B</b> , » etwa 1 $\frac{1}{2}$ Stunden
» <b>C</b> » 2 $\frac{1}{4}$ —2 $\frac{1}{2}$ Stunden	» <b>C</b> , » 10—11 »

Die hemmende Wirkung der Verdauungsprodukte kann also bei Anwendung der Pepsinfibrinprobe stark zur Geltung kommen, und sie nimmt, wie voraussichtlich war, mit der

Menge dieser Produkte zu. Bei Gegenwart von ziemlich großen Fermentmengen ist dieser Einfluß nicht wesentlich störend; bei Anwesenheit von nur sehr kleinen Fermentmengen kann aber die Verdauung so stark verlangsamt werden, daß genaue Beobachtungen über den Anfang und den Verlauf der Verdauung kaum möglich sind. Sobald die Verdauung erst nach gegen 24 Stunden oder später anfängt, ist es nicht (wenigstens nicht mir) möglich, den Zeitpunkt der beginnenden Verdauung genau anzugeben, und während mehrerer Stunden ist man unsicher, ob die Verdauung begonnen hat oder nicht. Diese Schwierigkeit wird wesentlich dadurch bedingt, daß die Farbe der Probe hier eine andere als bei rascher Verdauung ist. Im letzteren Falle ist sie mehr oder weniger karminrot oder rotviolett; bei sehr langsamer Verdauung ist sie dagegen mehr rötlichgelb, wie nach langdauernder Einwirkung der Säure allein.

Nach den in dem vorigen mitgeteilten Untersuchungen ist es also offenbar, daß die schwache peptische Wirkung der Caseinfiltrate von zwei zusammenwirkenden Momenten bedingt sein kann. Das eine ist die Pepsinarmut und das andere die Gegenwart von hemmend wirkenden Stoffen. Das letztere ist bei Ausführung der Mettschen Probe von geringem Belang; bei Anwendung der Karminfibrinprobe kann es aber von großer Bedeutung werden. Bei einer vergleichenden Prüfung des Pepsin gehaltes in den Caseinfiltraten (**F**) und den Kontrollelösungen (**K**) ist es also unbedingt notwendig, die hemmend wirkenden Verdauungsprodukte genau zu berücksichtigen, bzw. ihre Wirkung zu eliminieren. Wie ich hierbei verfahren habe, werde ich in dem nun folgenden Abschnitte zeigen.

#### Vergleichende Bestimmung des Pepsingehaltes der Caseinfiltrate und der Kontrollelösungen.

Bei einer vergleichenden Bestimmung des Pepsingehaltes in zwei Flüssigkeiten mittels der Karminfibrinprobe kann man, wenigstens bei den hier in Rede stehenden kleinen Pepsinmengen, keine genaue Gesetzmäßigkeit zwischen Pepsinmenge und Verdauungsgeschwindigkeit konstatieren. Ein genauer Vergleich läßt sich also nicht ausführen; es ist nur eine grobe

Schätzung möglich, die allerdings bei den hier in Frage kommenden großen Unterschieden völlig hinreichend ist. Wenn ich zum Beispiel eine Kontrolllösung auf die Verdünnungsgrade  $\frac{1}{50}$ ,  $\frac{1}{100}$ ,  $\frac{1}{200}$ ,  $\frac{1}{400}$  gebracht hatte, war es leicht zu sehen, ob die Verdauung in dem Caseinfiltrate einem Verdünnungsgrade, der zwischen  $\frac{1}{50}$  und  $\frac{1}{100}$  oder zwischen  $\frac{1}{100}$  und  $\frac{1}{200}$  usw. lag, entsprach. Wenn das Caseinfiltrat stärker als die Kontrolllösung  $\frac{1}{200}$ , aber schwächer als die von  $\frac{1}{100}$  verdaute, wurde eine neue Reihe mit den Verdünnungen  $\frac{1}{100}$ ,  $\frac{1}{150}$  und  $\frac{1}{200}$  angeordnet, um den Vergleich etwas genauer durchzuführen. Wenn nun das Caseinfiltrat kräftiger als  $\frac{1}{150}$ , aber schwächer als  $\frac{1}{100}$  Kontrolllösung verdaute, wurde sein Gehalt an Pepsin zu  $\frac{1}{100}$  von dem der Kontrolllösung berechnet, um nicht zugunsten der letzteren zu rechnen. Bei Verdünnungen zwischen  $\frac{1}{25}$  und  $\frac{1}{50}$  oder  $\frac{1}{50}$  und  $\frac{1}{100}$  wurde durch Anordnung von mehreren Zwischenstufen eine etwas genauere Bestimmung nach demselben Prinzipie versucht.

Die Methode gestattet also nur eine annähernde und ziemlich grobe Schätzung des Pepsingehaltes; bei den hier in Frage kommenden, sehr großen Unterschieden ist sie aber gut brauchbar.

Bei einem Vergleiche der Caseinfiltrate mit einer Lösung von Pepsin in Salzsäure von demselben Säuregrade findet man, daß die Aufquellung des Fibrins in den Filtraten mehr oder weniger gehemmt oder gestört ist. Diese störende Wirkung kann man durch Verdünnung der Filtrate mit Salzsäure von 0,1% aufheben, und aus dem Grunde habe ich, so oft dies tunlich war, nicht die unverdünnten, sauren, sondern die mit bekannten Säuremengen verdünnten Caseinfiltrate geprüft. Ich sage «so oft dies tunlich war», denn in einigen Versuchen war der Pepsingehalt dieser Filtrate so klein, daß nach Verdünnung mit Säure keine sichere Verdauung zu beobachten war. Zuletzt will ich nur noch beiläufig bemerken, daß die unverdünnten Caseinfiltrate bei der Verdauung eine viel schönere, mehr violette Farbe als sowohl die verdünnten Filtrate wie eine Pepsinlösung desselben Säuregrades zeigten.

Um einen Vergleich des Pepsingehaltes in den Casein-

filtraten und den Kontrolllösungen unter Berücksichtigung der hemmenden Wirkung der Verdauungsprodukte auszuführen, standen mir zwei Wege offen. Ich konnte einerseits die Kontrolllösungen auf denselben Gehalt von Verdauungsprodukten wie die Caseinfiltrate bringen, und ich konnte zweitens diese Produkte durch anhaltende Dialyse entfernen. Ich habe nach diesen beiden Hauptmethoden gearbeitet.

Die Versuche mit Zusatz von hemmenden Verdauungsprodukten wurden teils mit den erhitzten und teils mit den nicht erhitzten Caseinfiltraten ausgeführt. Die Erhitzung hatte zum Zweck, die Enzymreste in den Filtraten zu vernichten. Die Anwendung von nicht erhitztem Filtrat geschah, um den Einwand, daß das Erhitzen die Hemmungswirkung vielleicht herabgesetzt hatte, zu prüfen.

Die nähere Anordnung dürfte am besten aus einem Beispiel hervorgehen, und als solches nehme ich denselben Versuch, welcher schon in dem vorigen besprochen worden ist.

Von dem neutralisierten Caseinfiltrate (**F**) wurde, wie schon oben gesagt, ein Teil erhitzt und dann erkalten gelassen. Sowohl dieser Teil wie der nicht erhitzte wurde auf den Säuregrad 0,1% HCl gebracht. Dasselbe geschah auch mit der neutralisierten Kontrolllösung (**K**), und alle 3 hatten also den Säuregrad 0,1% HCl. Die saure Kontrolllösung wurde dann mit Salzsäure von 0,1% d<sub>er</sub>art verdünnt, daß der Pepsin-gehalt dieser Lösungen  $\frac{1}{5}$ ,  $\frac{1}{10}$ ,  $\frac{1}{15}$ ,  $\frac{1}{20}$  und  $\frac{1}{30}$  von dem ursprünglichen betrug.

Von dem nicht erhitzten Caseinfiltrate wurden folgende 2 Proben angeordnet:

**F** ( $\frac{1}{2}$ ) aus 5 ccm Filtrat (**F**) und 5 ccm HCl 0,1%

**F** ( $\frac{1}{4}$ ) » 2,5 » » **F** » 7,5 » HCl 0,1%.

Von dem erhitzten Caseinfiltrate und den obengenannten verdünnten Kontrolllösungen ( $\frac{1}{5}$ ,  $\frac{1}{10}$ ,  $\frac{1}{15}$  usw.) wurden folgende Mischungen gemacht:

**K** ( $\frac{1}{50}$ ) aus 5 ccm erhitztem **F**, 4 ccm HCl 0,1% und 1 ccm **K**  $\frac{1}{5}$ .

**K** ( $\frac{1}{100}$ ) aus 2,5 ccm erhitztem **F**, 6,5 ccm HCl 0,1% und 1 ccm **K**  $\frac{1}{10}$ .

**K** ( $1/150$ ) aus 2,5 ccm erhitztem **F**, 6,5 ccm HCl 0,1% und 1 ccm **K**  $1/15$ .

**K** ( $1/200$ ) aus 2,5 ccm erhitztem **F**, 6,5 ccm HCl 0,1% und 1 ccm **K**  $1/20$ .

**K** ( $1/300$ ) aus 2,5 ccm erhitztem **F**, 6,5 ccm HCl 0,1% und 1 ccm **K**  $1/30$ .

Bezüglich des Gehaltes an hemmenden Stoffen waren also:

**F** ( $1/2$ ) = **K** ( $1/50$ )

**F** ( $1/4$ ) = **K** ( $1/100$ ), **K** ( $1/150$ ), **K** ( $1/200$ ), **K** ( $1/300$ ).

Wie in allen anderen Versuchen wurde auch in diesem eine Kontrolleprobe mit Säure (0,1% HCl) allein und Karminfibrin angeordnet. Zimmertemperatur 17—18° C.

Das Versuchsergebnis war folgendes:

Probe **F** ( $1/2$ ). Die Verdauung begann oder war jedenfalls an der geänderten Farbe sehr deutlich sichtbar nach 2 Stunden 30—40 Minuten.

Probe **K** ( $1/50$ ). Die Verdauung begann nach 30 bis 40 Minuten und ging dann viel rascher als in irgend einer anderen Probe vonstatten.

Probe **F** ( $1/4$ ). Die Verdauung begann nach 3—3 $\frac{1}{2}$  Stunden.

Probe **K** ( $1/100$ ). Die Verdauung begann nach 50 Minuten bis 1 Stunde.

Probe **K** ( $1/150$ ). Die Verdauung begann nach 1 St. 20 Min. bis 1 St. 30 Min.

Probe **K** ( $1/200$ ). Die Verdauung begann nach etwa 2 Stunden. Verdaute in der Fortsetzung rascher als sowohl **F** ( $1/4$ ) wie **F** ( $1/2$ ).

Probe **K** ( $1/300$ ). Die Verdauung begann nach 2 St. 30—45 Min. Verdaute dann langsamer als **F** ( $1/2$ ), aber rascher als **F** ( $1/4$ ).

Ein neuer Versuch mit **F** ( $1/4$ ), **K** ( $1/200$ ) und **K** ( $1/300$ ) ergab dasselbe Resultat, insofern als auch hier nicht nur **K** ( $1/200$ ), sondern auch **K** ( $1/300$ ) rascher als **F** ( $1/4$ ) verdauten. Bei demselben Gehalte an hemmenden Stoffen und Säure war also die Verdauungskraft des Caseinfiltrates weniger als  $1/75$  von dem der Kontrolleprobe.

Der Versuch mit Zusatz von nicht erhitztem Caseinfiltrat

zu den Kontrolllösungen wurde nach ganz demselben Prinzip ausgeführt, nur mit dem Unterschiede, daß ich auf Grund früherer Erfahrungen hier mit noch größeren Verdünnungen von **K** arbeitete. Es wurde hier **F** ( $1/4$ ) mit **K** ( $1/200$ ), **K** ( $1/300$ ), **K** ( $1/400$ ) und **K** ( $1/600$ ) verglichen. Das Ergebnis war, daß **F** ( $1/4$ ) langsamer als **K** ( $1/400$ ), aber rascher als **K** ( $1/600$ ) verdaute. Der Pepsingehalt in **F** lag also bei dieser Versuchsanordnung zwischen  $1/100$  und  $1/150$  von demjenigen in **K**.

Das Versuchsergebnis war also bei Zusatz von nicht erhitztem Filtrat ein anderes als bei Zusatz von erhitztem, und dies rührt daher, daß in jenem Falle die Verdauung in den Kontrolllösungen rascher als im letzteren verläuft. Nach Zusatz von erhitztem Filtrat fing also die Verdauung in **K** ( $1/200$ ) nach etwa 2 Stunden und in **K** ( $1/300$ ) nach 2 Stunden 30 bis 45 Minuten an, während die entsprechenden Zeiten nach Zusatz von nicht erhitztem Caseinfiltrat 1 Stunde, resp. 1 Stunde 30 Minuten waren.

Dieser Unterschied rührt wohl kaum daher, daß die nicht erhitzten Verdauungsprodukte weniger stark hemmend als die erhitzten wirken, sondern eher daher, daß das in den nicht erhitzten Caseinfiltraten zurückgebliebene Pepsin seine Wirkung zu der Pepsinwirkung der verdünnten Kontrolllösungen hinzuaddiert. Wenn dem aber so ist, müssen hierdurch bedeutende Fehler bei Versuchen mit verdünnten Kontrolllösungen und nicht erhitztem Caseinfiltrat entstehen können. So würde z. B. eine auf  $1/1000$  verdünnte Kontrolllösung, welche allein vielleicht keine Verdauung im Laufe von 24 Stunden bewirkte, mit einer bestimmten Menge eines nicht erhitzten Caseinfiltrates gemischt, infolge des Pepsingehaltes des letzteren ungefähr ebenso rasch verdauen (z. B. nach 5—6 Stunden), wie dieselbe Menge Caseinfiltrat mit der entsprechenden Menge Säure verdünnt. Aus den Versuchen mit nicht erhitztem Caseinfiltrat lassen sich also keine Schlüsse bezüglich des relativen Pepsingehaltes ziehen, und deshalb habe ich auch die nach diesem Verfahren erhaltenen Zahlen nicht in die Übersichtstabelle aufgenommen. Dagegen zeigen diese Versuche, daß jedenfalls keine Aufhebung oder Abschwächung der hemmenden Wirkung der Verdauungs-

produkte infolge des Erhitzens stattfindet. Die Möglichkeit, daß umgekehrt diese hemmende Wirkung durch das Erhitzen gesteigert wird, läßt sich natürlich nicht ausschließen. Wenn aber eine solche Zunahme der Hemmungswirkung durch das Erhitzen stattfindet, würde hierdurch die Beweiskraft der mit erhitztem Filtrat ausgeführten Versuche nur erhöht werden.

Sämtliche, mit Zusatz von hemmenden Verdauungsprodukten ausgeführten Versuche mit Karminfibrin haben zu einem, mit dem oben mitgeteilten in der Hauptsache übereinstimmenden Resultate geführt. Sie haben nämlich alle gezeigt, daß die schwache Pepsinwirkung in den Caseinfiltraten nicht durch die hemmende Wirkung der Verdauungsprodukte allein, sondern vor allem durch die Armut der ersteren an Pepsin bedingt ist. Es war wichtig, dieses Ergebnis auch in anderer Weise zu kontrollieren, und zu dem Zwecke habe ich die Dialyse verwendet.

Die Dialyseversuche fanden in offenen Dialysatoren, die mit großen Uhrgläsern bedeckt waren, statt. Die zu dialysierende Flüssigkeit hatte immer den Säuregrad 0,1% HCl und sie wurde gegen Wasser von demselben Säuregrade, unter mehrmaligem täglichem Wechsel der Außenflüssigkeit, dialysiert. Die Dialyse wurde in den verschiedenen Versuchen 4—7 Tage fortgesetzt. Während der Dialyse fand infolge Wasserverdunstung immer eine geringe Konzentration der Innenflüssigkeit statt; durch Nachspülen des Dialysators mit etwas Salzsäure von 0,1% wurde aber das ursprüngliche Volumen wieder ziemlich genau hergestellt. Die Temperatur war während der Dialyse 2—3° C.

Untersucht man die genügend lange dialysierten Caseinfiltrate, so findet man sogleich, daß sie etwas anders als die ursprünglichen Filtrate sich verhalten. Das Aufquellen des Fibrins wird nämlich nunmehr nicht gestört, und die Fibrinflocken quellen in den dialysierten Filtraten ganz so wie in einer Salzsäure entsprechender Konzentration oder in den Kontrollelösungen auf. Dies spricht dafür, daß die Verdauungsprodukte durch die Dialyse hinreichend entfernt werden.

Um die Wirkung der Dialyse durch ein Beispiel zu zeigen, wähle ich wiederum denselben Versuch (Nr. 9 der Tabelle), den ich wiederholt in dem vorigen als Beispiel angeführt habe.

Von dem erst neutralisierten und dann auf den Säuregrad 0,1% HCl gebrachten Caseinfiltrate wurden 40 ccm während 6 Tage gegen Salzsäure von 0,1% dialysiert. Die Menge des dialysierten Filtrates betrug, nach dem Ausspülen des Dialysators mit einigen Kubikzentimetern Salzsäure von 0,1% HCl, 41 ccm.

Einige Kubikzentimeter dieses sauren dialysierten Filtrates wurden mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt und dann mit Milch geprüft. Die Gerinnungszeit war bis 2 Min. 35 bis 45 Sek. Das nicht dialysierte, saure Filtrat, ebenfalls mit seinem gleichen Volumen Wasser verdünnt, koagulierte die Milch in 2 Min. 40—45 Sek., und die Chymosinwirkung des Filtrates war also infolge der Dialyse nicht herabgesetzt worden. Um dies noch weiter zu kontrollieren, wurde ein Teil von sowohl dem dialysierten wie von dem nicht dialysierten Caseinfiltrate genau mit  $n/10$ -Lauge neutralisiert und mit Milch geprüft. Die Gerinnungszeit war in beiden etwa 3 Min. 15 Sek. und auch diese Versuchsanordnung zeigte also keine Abschwächung der Chymosinwirkung infolge der Dialyse. Die Gerinnungszeit war allerdings etwas größer als in dem ursprünglichen, neutralen Filtrate (= 2 Min. 30 Sek.); dies rührt aber daher, daß die zwei obengenannten Proben durch das Wiederansäuern und darauffolgende Zurückneutralisieren stärker verdünnt waren.

Durch diese Milchversuche war es also erwiesen, daß das Chymosin durch die anhaltende Dialyse weder abgeschwächt noch zum Teil verloren gegangen war. Wenn, wie einige annehmen, Pepsin und Chymosin nur dasselbe Enzym sind, kann also selbstverständlich auch das Pepsin keine Abschwächung durch die Dialyse erfahren haben.

Bei der Pepsinprobe mit Karminfibrin zeigte es sich nun, daß die dialysierte Probe viel rascher als die nicht dialysierte verdaute. In der dialysierten begann die Verdauung nach etwa 1 Stunde, in der nicht dialysierten nach etwa 2 Stunden. In der ersteren quoll das Fibrin wie in einer Säure von 0,1% HCl auf; in der letzteren war die Aufquellung viel geringer und die Farbe schöner violett.

Bei der vergleichenden Pepsinbestimmung in dem dialysierten Caseinfiltrate (F) und in der Kontrollelösung wurde in

folgender Weise verfahren. Von dem dialysierten, sauren Caseinfiltrate kamen zur Prüfung das Filtrat direkt (= **F**) und die durch Verdünnung mit HCl 0,1% erhaltenen Konzentrationen **F** ( $1/2$ ) und **F** ( $1/4$ ). Von der Kontrolllösung wurde, ebenfalls durch Verdünnung mit Salzsäure von 0,1%, die Konzentrationen **K** ( $1/50$ ), **K** ( $1/100$ ), **K** ( $1/150$ ), **K** ( $1/200$ ), **K** ( $1/300$ ) und **K** ( $1/400$ ) hergestellt. Das Versuchsergebnis war, daß **F** am besten **K** ( $1/100$ ) entsprach. **F** ( $1/2$ ) verdaute ein wenig langsamer und schwächer als **K** ( $1/200$ ) und **F** ( $1/4$ ) verdaute fast genau so stark wie **K** ( $1/400$ ). Die relativen Pepsinmengen verhielten sich also ungefähr wie 1 :  $1/100$ .

Man kann nun hier einwenden, daß die vollständige Entfernung der hemmenden Stoffe durch die Dialyse nicht sicher bewiesen ist, und daß eine Hemmungswirkung also nicht ganz ausgeschlossen war. Um eine solche Möglichkeit zu prüfen, wurde ein Teil der dialysierten Lösung mit käuflichem Pepsin in dem Verhältnisse 1 : 100000 versetzt und dann mit einer Pepsinlösung, 1 : 100000 Salzsäure von 0,1%, verglichen. Die Verdauung ging hier etwas rascher in dem dialysierten Filtrate als in der Kontrollepepsinlösung vonstatten, was wohl daher rührte, daß die Wirkung der kleinen Pepsinmengen in jenem zu der Wirkung des zugesetzten Pepsins sich hinzuaddierte. Aus diesem Grunde kann der Versuch nicht entscheidend werden: jedenfalls spricht er aber nicht zugunsten der Annahme von hemmenden Stoffen in dem dialysierten Caseinfiltrate.

Die Effektivität der Dialyse bezüglich der Entfernung der hemmenden Stoffe kann nur bei Abwesenheit von Pepsin in den Filtraten kontrolliert werden. Nun habe ich nur 1 mal (in dem Versuche 7 der Tabelle) ein Caseinfiltrat erhalten, in welchem ich kein Pepsin nachweisen konnte, und in diesem Falle habe ich auch die Dialyse versucht. Dieses Filtrat zeigte vor der Dialyse nach Zusatz von ein wenig Pepsin eine ziemlich stark hemmende Wirkung; nach der Dialyse während 4 Tagen zeigte es keine solche Wirkung mehr. Dies geht aus dem Folgenden hervor. Von dem dialysierten Filtrate wurden 9 ccm mit 1 ccm einer sauren Pepsinlösung (von 0,1% HCl und  $1/100000$  Pepsin) gemischt, sodaß der Gehalt an Pepsin in dem

Gemenge  $\frac{1}{1000000}$  betrug. Hiermit wurde nun eine Verdauungssalzsäure (0,1% HCl) mit derselben Pepsinmenge  $\frac{1}{1000000}$  verglichen. Das Pepsin war in beiden das obengenannte käufliche Pepsinum Langebeck. Erst nach 8 Stunden ungefähr war in beiden eine ganz unzweifelhafte Verdauung zu sehen, und nach 10 Stunden war die Menge des Fibrins in beiden wesentlich vermindert. Ein bestimmter Unterschied in dem Aussehen beider Proben war indessen weder zu dieser Zeit noch später zu beobachten. In diesem Versuche waren also die hemmenden Stoffe nach 4tägiger Dialyse vollständig entfernt worden; und die Annahme, daß die geringe Verdauungskraft der übrigen, meistens 6—7 Tage lang dialysierten Caseinfiltrate durch die Anwesenheit eines Restes von hemmenden Stoffen bedingt sein würde, entbehrt also jeder Begründung. Auch bei dieser Versuchsanordnung (Dialyse) kommt man also zu dem Schlusse, daß der große Unterschied in der Verdauungsfähigkeit der Caseinfiltrate und der Kontrolllösungen von einem wesentlich verschiedenen Pepsingehalt herrührt.

Vergleicht man die nach dem ersten Verfahren (Zusatz von enzymfreien hemmenden Stoffen) und nach dem zweiten (Entfernen der hemmenden Stoffe durch Dialyse) erhaltenen Resultate, so erhält man für die Pepsinmengen in **K** und **F** folgende Relationen.

Nach dem ersten Verfahren **K** : **F** = 1 :  $\frac{1}{75}$

» » zweiten » **K** : **F** = 1 :  $\frac{1}{100}$ .

Die Relation ist etwas ungünstiger nach dem zweiten Verfahren und dasselbe habe ich auch in anderen Versuchen gesehen. Um den Mangel an Parallelität zwischen Pepsin- und Chymosinwirkung nicht zu groß erscheinen zu lassen, habe ich in diesem Versuche, wie in den anderen, die günstigere Relation als die richtigste gewählt. In diesem Versuche habe ich also die Relation zwischen den Pepsinmengen in Kontrolllösung und Caseinfiltrat gleich 1 :  $\frac{1}{75}$  berechnet.

Als Endergebnis dieses als Beispiel angeführten Versuches erhielt ich also folgende Relationen:

$$\begin{array}{cc} \text{Chymosin} & \text{Pepsin} \\ \mathbf{K} : \mathbf{F} = 1 : \frac{1}{3} & = 1 : \frac{1}{75}. \end{array}$$

Die Parallelität zwischen Chymosin- und Pepsinwirkung ist also, wie man ersieht, durch die Ausfällung mit Casein vollständig aufgehoben worden.

Nach der detaillierten Beschreibung dieses Versuches und der gewählten Versuchsanordnung kann ich zu einer Übersicht sämtlicher Versuche übergehen.

#### Übersicht der Versuchsergebnisse.

Nach den, in dem oben als Beispiel beschriebenen Versuche (Nr. 9 der Tabelle) mitgeteilten Anordnungen habe ich noch 11 andere Versuche ausgeführt. Wie schon oben gesagt, habe ich in keinem von ihnen ein positives Resultat mit der Mettschen Probe erhalten, während in allen eine mehr oder weniger starke Chymosinwirkung zum Vorschein kam. Da die vergleichende Pepsinbestimmung nur durch Versuche mit Fibrin möglich war, beziehen sich alle in der tabellarischen Zusammenstellung vorkommenden Pepsinwerte auf Versuche mit Karminfibrin. In den 5 ersten Versuchen wurde die Dialyse nicht versucht, und erst mit dem 6. Versuche kam diese Versuchsanordnung zur Anwendung. Die Versuche mit erhitzten, also enzymfreien Caseinfiltraten als hemmenden Lösungen gaben immer die für die unitarische Ansicht am wenigsten ungünstigen Pepsinrelationen, und aus dem Grunde sind nur diese Zahlen in die Tabelle aufgenommen. Wie schon oben bemerkt, bedeuten **F** die Filtrate von der Caseinfällung und **K** die entsprechend verdünnten Kontrolleproben von den nicht mit Casein gefällten Infusionen. **K** dient als Einheit = 1.

Es würde zu einer gar zu großen Weitläufigkeit führen, wenn ich die detaillierten Resultate aller 12 Versuche anführen wollte, und da sie sämtlich nach dem Muster des oben ausführlich beschriebenen Versuches ausgeführt wurden (nur mit der Ausnahme, daß in den 5 ersten Versuchen das Dialyseverfahren nicht zur Anwendung kam), dürfte dies wohl überflüssig sein. Die absoluten Zahlen für die Geschwindigkeit der Pepsinverdauung lassen sich übrigens nicht in eine tabellarische Übersicht einführen, und aus dem Grunde ist nur die Relation der Pepsinwirkung in die Übersichtstabelle aufgenommen worden.

Nur für die Versuche 4 und 7, in welchen die Pepsinarmut am deutlichsten hervortritt, dürften etwas mehr detaillierte Angaben notwendig sein.

Nr. des Versuches	Chymosin K : F	Pepsin K : F
1	1 : $\frac{1}{2}$	1 : $\frac{1}{40}$
2	1 : $\frac{1}{2}$	1 : $\frac{1}{30}$
3	1 : $\frac{1}{2}$	1 : $\frac{1}{60}$
4	1 : $\frac{1}{20}$	1 : $< \frac{1}{400}$
5	1 : $\frac{1}{3}$	1 : $\frac{1}{150}$
6	1 : $\frac{1}{3}$	1 : $\frac{1}{100}$
7	1 : $\frac{1}{2.5}$	1 : 0
8	1 : $\frac{1}{3}$	1 : $\frac{1}{100}$
9	1 : $\frac{1}{3}$	1 : $\frac{1}{75}$
10	1 : $\frac{1}{5}$	1 : $\frac{1}{70}$
11	1 : $\frac{1}{2}$	1 : $\frac{1}{40}$
12	1 : $\frac{1}{4}$	1 : $\frac{1}{60}$

Auch die detaillierte Wiedergabe der Zahlen für die Geschwindigkeit der Chymosinwirkung habe ich als überflüssig erachtet, und man dürfte genügende Anhaltspunkte für ihre Beurteilung erhalten, wenn ich erwähne, daß die Gerinnungszeit in den Kontrollösungen (K) in 7 Versuchen (Nr. 1, 2, 4, 7, 9, 11 und 12) zwischen 45 und 90 Sek., in 4 (Nr. 3, 5, 6 und 8) zwischen 2 Min. und 2 Min. 35 Sek. schwankte und in einem (Nr. 10) 3 Minuten betrug. Die Relationszahlen für die Milchgerinnung sind übrigens abgerundete Zahlen. Wenn also z. B. die Gerinnungszeiten mit der Kontrollösung und dem Caseinfiltrate in einem Versuche (Nr. 10) 3 resp. 16 Minuten war, ist die Relation gleich 1 :  $\frac{1}{5}$  statt 1 :  $\frac{1}{5.3}$  gesetzt worden; wenn sie in einem anderen (Nr. 3) resp. 2 Min. und 3 Min. 10 Sek. waren, ist die Relation zu 1 :  $\frac{1}{2}$  statt 1 :  $\frac{1}{1.6}$  berechnet usw. Da es ganz gleichgültig ist, ob man mit der genauen oder mit der abgerundeten Zahl rechnet, habe ich in die Tabelle nur die abgerundeten Zahlen eingeführt.

Für den Versuch 4 habe ich den Pepsingehalt des Caseinfiltrates zu weniger als  $\frac{1}{400}$  von dem Pepsingehalte der Kon-

trollösung angegeben. Die Relation kann ich nicht näher angeben, und zwar aus zwei Gründen. Der eine ist der, daß ich eine so schwache Wirkung nicht erwartet hatte und aus dem Grunde schon so große Mengen der Versuchsflüssigkeiten verbraucht hatte, daß eine genauere Verfolgung dieser Frage nicht länger möglich war. Der andere ist der, daß bei Gegenwart von so kleinen Pepsinmengen es mir nicht möglich ist, den Zeitpunkt, wo die Verdauung anfängt, genau festzustellen. Das mit Salzsäure von 0,1% HCl angesäuerte Caseinfiltrat zeigte nämlich im Vergleich zu der Kontrolleprobe mit Säure allein keine sichere Verdauung im Laufe von 24 Stunden. Nach 34 Stunden war es noch nicht möglich, einen ganz sicheren Unterschied zwischen den zwei Proben zu sehen, aber nach 44 Stunden war die Caseinfiltratprobe unzweifelhaft mehr verändert als die Säure-Kontrolleprobe, und es waren wohl also unzweifelhaft Spuren von Pepsin in jener vorhanden. Die Kontrolllösung K, in dem Verhältnisse 1:400 mit dem Caseinfiltrate gemischt, verdaute allerdings nicht merkbar in den ersten 8 Stunden; während der folgenden 12 Stunden (in der Nacht) hatte aber eine recht starke Verdauung stattgefunden. Ich kann also jedenfalls sicher sagen, daß der Pepsingehalt des Caseinfiltrates wesentlich weniger als  $\frac{1}{400}$  von dem der Kontrolllösung betrug. Zu einem Reste des Caseinfiltrates wurde käufliches Pepsin in dem Verhältnisse 1:1000000 gesetzt und mit einer Kontrollsäureprobe mit Fibrin verglichen. Nach 24 Stunden war in jener Probe eine ganz unzweifelhafte Verdauung zu konstatieren, während das Fibrin der Kontrolleprobe nicht angegriffen war. Die hemmenden Stoffe waren also nicht genügend, um die Wirkung einer so kleinen Pepsinmenge wie 1:1000000 zu verhindern, und das Caseinfiltrat konnte also nur Spuren von Pepsin enthalten. In diesem Falle war aber infolge der Fällung mit Casein auch die Chymosinwirkung stark herabgesetzt. Die Kontrolllösung koagulierte die Milch in  $1\frac{1}{2}$  Minuten, das Caseinfiltrat dagegen erst nach 33 Minuten. Die Relation der Chymosinwirkung war also 1: $\frac{1}{22}$ . Von welcher großer Bedeutung die Reaktion für die Chymosinwirkung ist, geht daraus hervor, daß das mit 0,1% HCl angesäuerte Casein-

filtrat die Milch, in dem Verhältnisse 1 : 10, in 3 Minuten koagulierte.

In dem Versuche 7 koagulierte die neutralisierte Kontrolleprobe die Milch in 1 Min. 30 Sek. und das neutralisierte Caseinfiltrat in 37 Minuten. Die Relation war also rund 1 :  $\frac{1}{25}$ . Bei Gegenwart von  $\text{CaCl}_2$  wirkte indessen das Caseinfiltrat anscheinend ziemlich kräftig, indem die Milchgerinnung bei Gegenwart von 0,4%  $\text{CaCl}_2$  in 3 Minuten verlief.

Die Pepsinprobe gab in diesem Versuche ein ganz negatives Resultat. Nach 48 Stunden war keine Verdauung sichtbar, und selbst nach 72 Stunden war es nicht möglich, einen bestimmten Unterschied von der Kontrolleprobe mit Säure allein zu beobachten. Daß dieser negative Ausfall nicht durch die Anwesenheit von hemmenden Stoffen bedingt war, geht aus dem schon oben mitgetheilten Resultate des Dialyseversuches hervor. Auch dieses dialysierte Filtrat, welches auf Milch mit derselben Stärke wie vor der Dialyse wirkte, gab nämlich bei der Pepsinprobe ein völlig negatives Resultat, während nach Zusatz von Pepsin (1 : 1 000 000) dieses Filtrat ebensogut wie eine Kontrollensäureprobe mit derselben Pepsinmenge verdaute.

Mit Ausnahme von diesem Versuche habe ich nie ein pepsinfreies Caseinfiltrat erhalten. Betrachtet man die obige tabellarische Zusammenstellung, so findet man übrigens eine sehr schwankende Relation der Pepsinmengen. Es war auch kaum anderes zu erwarten, da die Infusionen von vornherein Verschiedenheiten zeigen, und da die Fällung mit Casein in den verschiedenen Fällen bei etwas verschiedenen Säuregraden und mit verschiedenen Caseinmengen stattfand. Irgendwelche Regelmäßigkeit habe ich jedoch hierbei nicht finden können, und die Vermutung, daß man bei Anwendung von mehr konzentrierten Caseinlösungen eine reichlichere Pepsinausfällung als bei Anwendung von verdünnteren erhalten würde, fand sich nicht bestätigt. So wurde z. B. in dem Versuche 7, wo ich das Filtrat pepsinfrei fand, 1 Vol. einer Infusion von 0,3%  $\text{HCl}$  und 0,443% festen Stoffen mit 2 Vol. einer Caseinlösung von 3% gefällt. In dem Versuche 9 dagegen, in welchem der Pepsingehalt nur auf  $\frac{1}{75}$  von demjenigen der Kontrollelösung

herabging, wurden 135 ccm einer Infusion von 0,245 % HCl und 0,818 % festen Stoffen mit 200 ccm einer Caseinlösung von 4 % gemischt. Das zur Erhaltung eines möglichst pepsinarmen Filtrates geeignetste Verfahren habe ich also noch nicht ermitteln können. Übrigens muß ich hervorheben, daß mein Verfahren nur auf Kalbsmageninfusionen, welche anderen Infusionen oder Magensäften gegenüber relativ sehr reich an Chymosin sind, sich bezieht.

Das Hauptresultat der vorliegenden Untersuchungen ist also, daß man durch Fällung einer sauren Infusion mit Caseinlösung die Relation der zwei Enzymwirkungen vollständig verändern kann, und zwar so, daß die Pepsinwirkung viel stärker als die Chymosinwirkung abgeschwächt wird. Von einer schädigenden Einwirkung der Reagenzien auf die Enzyme kann hier keine Rede sein. Durch die Entstehung von hemmenden Substanzen kann die Abschwächung der Pepsinwirkung ebenfalls nicht bedingt sein, und man kann sie nur durch die Armut der Caseinfiltrate an Pepsin erklären. Vorläufig kann diese Armut an Pepsin nicht in anderer Weise erklärt werden als durch die Annahme, daß hier zwei verschiedene Enzyme vorliegen, von denen das eine, das Pepsin, reichlicher als das andere, das Chymosin, von dem Casein niedergezogen wird. Diese vollständige Aufhebung der Parallelität der zwei Enzymwirkungen kann ich jedenfalls nicht mit der Annahme, daß beide Wirkungen von demselben Enzyme herrühren, in Einklang bringen.