

# Weitere Studien am Pikelharingschen Pepsin.

Von

W. E. Ringer.

Mit zwei Abbildungen im Text.

(Aus dem physiologischen Laboratorium der Universität Utrecht.)

(Der Redaktion zugegangen am 22. September 1915.)

## Erste Abteilung.

### 1. Einleitung.

Vor einiger Zeit haben Pikelharing und ich die elektrische Überführung des Pikelharingschen Pepsins studiert.<sup>1)</sup> Wir haben damals schon gefunden, daß das nach Pikelharing aus Schweinemagenschleimhaut dargestellte Enzym, wenn die Darstellung unter günstigen Umständen ausgeführt wird, keinen iso-elektrischen Punkt besitzt. Dieser Befund war mit den Resultaten der Untersuchungen von Leonor Michaelis und Davidsohn<sup>2)</sup> nicht in Übereinstimmung; diese Forscher hatten für Pepsin einen iso-elektrischen Punkt bei  $C_H = 5,5 \times 10^{-5}$  oder  $p_H = 4,26$  gefunden.<sup>3)</sup> Pikelharing und ich fanden aber, daß das nach den Angaben von Pikelharing dargestellte Pepsin nach Zugabe von kleinen Mengen Eiweiß oder Albumosen einen iso-elektrischen Punkt zu zeigen anfängt und weiter daß, wenn die Darstellung des Pepsins unter weniger günstigen Umständen stattfindet (z. B. bei zu hoher

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 75, S. 282 (1911).

<sup>2)</sup> Biochemische Zeitschrift, Bd. 28, S. 1 (1910).

<sup>3)</sup>  $p_H$  ist bekanntlich nach Sørensen der negative Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration.  $\text{Log}_{10} 5,5 \times 10^{-5} = -4,26$ , also  $p_H = 4,26$ .

Temperatur) dasselbe sich zeigt; weil nun L. Michaelis und Davidsohn mit dem Grüblerschen Pepsin, das sicher nicht rein ist, gearbeitet haben, so haben wir diesen Widerspruch in den Resultaten von Michaelis und Davidsohn einerseits und von uns andererseits durch die Verunreinigungen des Grüblerschen Pepsins erklären zu können gemeint.

Für das Studium der Bedingungen der Pepsinwirkung ist die Existenz oder Nichtexistenz eines iso-elektrischen Punktes gar nicht ohne Interesse. Bekanntlich wird von Michaelis und seinen Mitarbeitern angenommen, daß die Ladung eines Enzyms mit seiner Wirkung in engem Zusammenhang steht. Das wird von den genannten Forschern aus ihren interessanten Untersuchungen an verschiedenen Enzymen, Invertin, Trypsin usw., aber auch an Pepsin geschlossen. Was dieses letztere Enzym anbetrifft, sagen L. Michaelis und Mendelssohn, daß «das Pepsin ein Ferment ist, das den Dissoziationsgesetzen folgt und dessen freie Kationen der proteolytisch wirksame Bestandteil sind». <sup>1)</sup> Das Auftreten eines Optimums der H-Ionenkonzentration für die Pepsinwirkung erklärt sich nach Michaelis auffolgende Weise. Bei sehr schwach saurer Reaktion wird erstens Pepsin allmählich zerstört, und zweitens haben sich da noch sehr wenig Pepsinkationen gebildet. Bei Zunahme des Säuregehalts nehmen letztere an Zahl zu und wird die Enzymzerstörung weniger intensiv. Bei noch weiterer Zunahme des Säuregehalts bilden sich aber immer mehr zweiwertige Pepsinkationen, die wieder unwirksam sind; dazu wird das Enzym vielleicht durch den zu hohen Säuregehalt auch wieder geschädigt. Deshalb sinkt die Pepsinwirkung, sobald  $p_H$  kleiner als etwa 1,5 wird, wieder ab. Bei sehr geringem Säuregrade steigt die Labwirkung; es könnte nach Michaelis sein, daß das Pepsin jenseits des iso-elektrischen Punktes, also wenn es negativ geladen ist, diese eigentümliche Wirkung entfaltet; daß also die Labwirkung von Pepsinanionen abhängig sein würde. Damit wäre

<sup>1)</sup> Biochemische Zeitschrift, Bd. 65, S. 1 (1914). Über die Betrachtungen von Michaelis und seinen Mitarbeitern, siehe auch z. B. die Übersicht in «die Wasserstoffionenkonzentration» von Leonor Michaelis, 1914.



dann die alte Streitfrage nach der Identität oder Nichtidentität von Pepsin und Labenzym auch gelöst.

Diese interessanten Betrachtungen von L. Michaelis und seinen Mitarbeitern über die Bedingungen der Pepsinwirkung bestehen nur zu Recht, wenn die elektrischen Verhältnisse dieses Enzyms so sind, als diese Forscher zu zeigen gemeint haben. Sie fallen aber größtenteils, wenn die Nichtexistenz des iso-elektrischen Punktes gezeigt werden kann.

Es war deshalb ohne Zweifel wichtig, den Widerspruch zwischen den Resultaten der genannten Forscher und denen von uns noch einmal genau zu studieren. Deshalb habe ich die Untersuchung wieder aufgenommen. Die Frage war also: besteht die Meinung von Pikelharing und mir, daß Pepsin keinen iso-elektrischen Punkt hat und daß, wenn es einen solchen Punkt vortäuscht, es verunreinigt ist, zu Recht? Und weiter, wenn diese Frage bejahend beantwortet werden muß, kann man dann noch auf andere Weise die eigentümlichen Wirkungsbedingungen dieses Enzyms näher beleuchten?

In erster Linie war es nötig, über eine genügende Menge reinen Pepsins verfügen zu können. Früher hatten wir es aus Schweinemagenschleimhaut dargestellt, aber die Darstellung gelingt nicht immer. Man ist von verschiedenen Umständen dabei zu sehr abhängig. Außerdem ist das so dargestellte Enzym zwar sehr stark aktiv, aber nicht ganz rein. Nach Pikelharing kann man eigentlich nur aus Magensaft eines nach Pawlow operierten Hundes das Pepsin ganz rein bekommen. Ich habe denn auch einen solchen Hund gebraucht.

## 2. Die Darstellung der gebrauchten Pepsinpräparate.

Ein großer und starker Hund, etwa 26 kg schwer, wurde in der hiesigen chirurgischen Klinik von Prof. Lameris nach Pawlow operiert. Die beiden Operationen, Anlegen der Magen-fistel und der Oesophagusfistel, wurden einige Wochen nacheinander ausgeführt und gelangen vorzüglich. Das Tier hat dann, während etwa anderthalb Jahr wöchentlich zweimal 3—500 ccm Magensaft geliefert. Das Tier, daß unter anderem auch von L. J. Geselschap<sup>1)</sup> für seine wichtigen Unter-

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 94, S. 205, 1915.

suchungen über Pepsinbestimmung gebraucht wurde, lieferte in den letzten Monaten einen Saft, der in zunehmendem Maße mit bräunlichem Schleim verunreinigt war. Es zeigte sich nachher, daß infolge von Bindegewebswucherung eine Schleimhautfalte neben der Kanüle in die Richtung der Öffnung gedrungen und erodiert war und bei der geringsten Berührung blutete. In der Zeit aber, während deren der Saft von mir gebraucht wurde, war er gänzlich ungefärbt und nach Filtration wasserklar. Nur bei niedrigerer Temperatur trat eine leichte Opalescenz hervor. Zumal in den späteren Monaten passierte es von Zeit zu Zeit einmal, daß ein wenig Galle mit dem Magensaft ausgeschieden wurde. Es braucht kaum gesagt zu werden, daß in solchen Fällen der Versuch sofort unterbrochen und nicht eher als am nächsten Tage wieder fortgesetzt wurde. Selbstverständlich auch wurde die Galle enthaltende Portion, auch wenn die Menge der Galle sehr wenig war, nicht zur Pepsindarstellung verwendet. Die Darstellung des Pepsins aus dem Magensaft geschah im übrigen genau nach den Angaben Pekelharings.

Also der Saft <sup>1)</sup> wurde gegen destilliertes Wasser dialysiert, und zwar wurde so viel Wasser gebraucht, daß die Abscheidung des Pepsins am vollständigsten war. Nach dem Zentrifugieren bekommt man dann eine völlig wasserklare Flüssigkeit und einen Niederschlag, welcher mit ein wenig des Zentrifugats abfiltriert und mit etwas destilliertem Wasser ausgewaschen wurde. Nach energischem Auspressen zwischen Fließpapier ließ er sich leicht vom Filter abnehmen, er wurde dann in Vacuo über Schwefelsäure getrocknet und zuletzt im Achatmörser sehr fein zerrieben. Dieses Präparat (A) war weiß mit einem Stich ins Graue. Um es weiter zu reinigen, kann man es in wenig Salzsäure von etwa 0,05 n bei 37° lösen und noch einmal mittels Dialyse fällen; das dann erhaltene Präparat (B) war rein weiß. Das Präparat B wurde von mir nur ausnahmsweise gebraucht, ich verwendete in den nach-

<sup>1)</sup> Der Salzsäuregehalt des Magensaftes war auffallend konstant, er schwankte nur wenig um 0,15 normal. Die  $C_H$  war um 0,1 und  $p_H$  also = 1.

folgenden Versuchen meistens die reineren Präparate C oder D. Der dialysierte Magensaft enthält immer noch merkliche Mengen Pepsin. Er wurde mit dem gleichen Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung vermischt, wobei ein Niederschlag entsteht, der sich in 24 Stunden abgesetzt hat. Er wurde von der größten Menge der Flüssigkeit durch Dekantation getrennt; die Niederschläge von verschiedenen Versuchstagen wurden gesammelt und von Zeit zu Zeit weiter verarbeitet. Dazu wurde der Gesamtniederschlag durch ein gehärtetes Filter filtriert, gegen Salzsäure von 0,05 n dialysiert, dann in so wenig Säure von dieser Stärke wie möglich bei 37° gelöst und wieder durch geeignete Dialyse gefällt. Auf diese Weise bekommt man ein sehr reines Präparat (C), welches schneeweiß war. Diese über Schwefelsäure getrockneten Pepsinpräparate haben immerhin noch einen Wassergehalt von etwa 10%. Wenigstens der Gewichtsverlust bei 115° beträgt so viel und dieser Verlust wird wohl hauptsächlich noch anhaftendem oder gebundenem Wasser zu verdanken sein. Präparat A gab 0,4% Asche. Ein Präparat aus Schweinemagenschleimhaut dargestellt enthielt 11,5% «Wasser» und gab 1,29% Asche. Auch schon hieraus sieht man ohne weiteres, daß dieses Pepsin viel weniger rein ist. Alle diese Pepsinpräparate enthalten Chlor, wie a priori zu erwarten ist, weil sie während der Verarbeitung immer mit Salzsäure in Berührung sind und die Auswaschung keine vollständige sein kann, schon deswegen, weil Pepsin in Wasser nicht unbeträchtlich löslich ist. Zwar wurden die Präparate nach einmaligem Auswaschen sorgfältig zwischen Fließpapier ausgepreßt, aber selbstverständlich kann die Entfernung der anhaftenden Flüssigkeit nur eine verhältnismäßig sehr unvollkommene sein. Pikelharing hat die Frage aufgeworfen, ob Pepsin an sich Phosphor und auch Chlor enthält. Was den Phosphor anbetrifft, konnte er zeigen, daß dieser nur von Beimischungen (Nucleoproteiden) herrührt und daß das reinste Enzym phosphorfrei ist. Aber auch für das Chlor hatte er es wenigstens wahrscheinlich gemacht, daß es von gebundener Salzsäure herrührt. Um das Chlor so viel wie möglich zu entfernen, schlug er den einzig möglichen Weg ein und suchte es durch Dialyse zu entfernen.



Dazu wurde das Pepsin statt in Salzsäure in Oxalsäure gelöst. Er hatte aber die Reinigung nicht so weit fortgesetzt, daß er ein chlorfreies Präparat bekommen hätte. Die Frage nach dem Chlorgehalt stand also noch etwas unsicher. Weil es in einigen meiner Versuche darauf ankam, ein möglichst chlorfreies Pepsin zu haben, so habe ich diese Frage wieder aufgenommen und dabei wesentlich nach dem Verfahren Pekelharings die Reinigung fortgesetzt. Im Magensaft und während der Abscheidung, wobei das Pepsin mit Salzsäure in Berührung ist, bindet es unzweifelhaft je nach Umständen mehr oder weniger von dieser Säure. Auswaschen mit Wasser, um das anhaftende und das gebundene Chlor zu entfernen, kann nicht zum Ziele führen, weil zum Schluß auch das Pepsin dabei in Lösung geht. Wie gesagt, ist hier nur die Dialyse zu verwenden. Ich ging vom Ammoniumsulfatniederschlag aus, dieser wurde dialysiert, aber jetzt nicht gegen Salzsäurelösung, sondern gegen reine Oxalsäurelösung (etwa 1%). Die Außenflüssigkeit wurde so lange erneuert, bis kein  $\text{SO}_3$  und Cl mehr nachgewiesen werden konnte. Dann wurde das Pepsin, so weit es noch ungelöst war, bei  $37^\circ$  in Oxalsäure gelöst und wieder dialysiert, und zwar gebrauchte ich als Außenflüssigkeit nicht Wasser, sondern eine schwache Oxalsäurelösung, welche gegen Ende der Dialyse eine solche Konzentration haben mußte, wie es für eine möglichst vollständige Präzipitation des Pepsins erwünscht war. Diese Dialyse wurde im ganzen 5 Tage fortgesetzt, wobei die Außenflüssigkeit zweimal pro Tag erneuert wurde. Zum Schluß wurde das Pepsin in der gewöhnlichen Weise abzentrifugiert, ausgewaschen, ausgepreßt und getrocknet (Präparat D). Man sieht leicht ein, daß bei diesem Verfahren nicht nur die anhaftende Salzsäure, sondern auch die gebundene praktisch völlig entfernt werden muß.<sup>1)</sup> Denn letztere wird, wenn der Salzsäuregehalt der Umgebung immer geringer wird, immer mehr durch Hydrolyse vom Pepsin losgerissen und dialy-

<sup>1)</sup> Die ganze auf einmal verarbeitete Pepsinmenge betrug bei diesem Verfahren von 0,5 bis höchstens etwa 1 g. Das Volumen der Flüssigkeit, gegen welche dialysiert wurde, war etwa 2,5 Liter. Also in den 5 Tagen wurden gegen etwa 25 Liter dialysiert.

siert in die Außenflüssigkeit. Die Oxalsäure tritt dabei an die Stelle der Salzsäure. Von den verschiedenen Pepsinpräparaten bestimmte ich dann den Chlorgehalt und zwar in folgender Weise. Etwa 0,5 g Pepsin wurde sorgfältig mit 10 g einer Mischung aus 3 Teilen  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  und 1 Teil  $\text{KNO}_3$  gemischt, und zwar wurde zuerst die ganze Menge gelöst, das Wasser zuerst auf dem Wasserbade, dann im Trockenschrank bei allmählich steigender Temperatur ausgetrieben und zuletzt über einer ganz kleinen Flamme erhitzt. Die erhaltene weiße Asche wurde mit Wasser und tropfenweise Salpetersäure gelöst, wobei die große Platinschale sorgfältig mit einem Uhrglas bedeckt war. Nachdem durch Erhitzen die Kohlensäure ausgetrieben und neutralisiert worden war, wurde der Chlorgehalt mittels Titration (Mohr) bestimmt. Durch einen Blindversuch lernte man den Chlorgehalt der gebrauchten (selbstverständlich so viel wie möglich chlorfreien) Reagenzien kennen. Auf diese Weise fand ich für die verschiedenen Präparate folgende Chlorgehalte:

Schweinemagenschleimhautpepsin-		
präparat . . . . .	0,085%	Chlor
Präparat A . . . . .	0,15	%
"  C . . . . .	0,092	%
"  D . . . . .	Kein Chlor konnte aufgefunden werden.	
"  D . . . . .	«Wasser-Gehalt 8,23%; Asche 0,27%» <sup>1)</sup>	

Ich glaube also, mit Sicherheit schließen zu müssen, daß Pepsin nicht nur phosphor-, sondern auch chlorfrei ist. Der Chlorgehalt der gewöhnlichen Präparate rührt nur von anhaftender, oder besser von gebundener Salzsäure her. Mit diesen Pepsinpräparaten habe ich dann unsere früheren Untersuchungen wieder aufgenommen. Hier sollen zuerst die Überführungsversuche beschrieben werden.

<sup>1)</sup> Es sei hier noch bemerkt, daß die Präparate alle ziemlich gleich aktiv waren und auch das Schweinepepsin an Aktivität nicht übertrafen; zwar sind die Methoden zur Aktivitätsbestimmung nicht besonders genau, aber es scheint, daß die Verunreinigungen des Schweinepepsins und auch von Präparat A die Aktivität nicht merklich beeinflussen. Jedenfalls möchte ich ausdrücklich bemerken, daß das chlorfreie Präparat D sicherlich in Aktivität den andern Präparaten nicht hintansteht. Alle Präparate lassen sich im Exsikkator und im Dunkeln jahrelang ohne merklichen Verlust an Aktivität aufbewahren.

### 3. Versuche zur Bestimmung der elektrischen Überführung des reinen Pepsins bei verschiedenen Aciditäten.

Diese Versuche wurden, um Strömungen durch Temperaturänderungen auszuschließen, alle bei 25° im Thermostaten ausgeführt. Ich gebrauchte Apparate nach Michaelis, die aber ein wenig abgeändert waren. Zuerst waren statt der Kautschukstöpsel Glasschliffe angebracht. Dann habe ich die Röhren mit den unpolarisierbaren Elektroden länger, tiefer und weiter machen lassen; dadurch konnte ich die Elektroden, ohne Störungen befürchten zu müssen, längere Zeit dem Strom aussetzen. Besonders der Silberelektrode habe ich eine größere Kapazität gegeben, sie bestand aus einem dicken Silberdraht, der unten abgeplattet war, der ausgewalzte Teil hatte eine Oberfläche von etwa 4 qcm. Dieser Teil stand je nach Bedarf in mit Salzsäure angesäuerter starker NaCl-Lösung oder auch in reiner Salzsäurelösung von z. B. 10%. Die Elektrodenflüssigkeit wurde, nachdem der Apparat gefüllt war, mit einer sehr feinen Pipette auf den Boden des Röhrens vorsichtig abgelassen. Der nicht abgeplattete Teil der Silberelektrode war mit Kautschuk überzogen. Die Kupferelektrode war ein dicker Kupferdraht, zum größten Teil mit Gummi überzogen, nur der untere Teil, etwa 1 cm lang, der in Kupferchlorid, bisweilen auch in gesättigte Kupfersulfatlösung tauchte, war frei. Die Pepsinlösung wurde auf 37° erhitzt, dann sofort bei stark erniedrigtem Drucke einige Augenblicke gekocht. Die Temperatur des sich rasch abkühlenden Pepsins mag dabei 25 bis 20° gewesen sein. Die Seitenflüssigkeiten, die also die Seitenröhren des Apparates und die größten Teile der Elektrodenröhren anfüllten, wurden auch unmittelbar vor dem Versuch ausgekocht. Der Apparat wurde dann in den Thermostaten gestellt, zuerst die Pepsinlösung eingefüllt, und nachdem diese die Temperatur (25°) angenommen hatte, wurden die Hähne geschlossen, die Seitengefäße sorgfältig gereinigt und getrocknet und dann der Apparat weiter gefüllt, wobei dafür Sorge getragen wurde, daß nirgendwo Gasblasen hinterblieben. Selbst-



verständlich wurden die großen Hähne nicht eher geöffnet, als nachdem durch geeignetes Öffnen der kleinen Hähne alle Niveauunterschiede sich völlig ausgeglichen hatten. Erschütterungen während der Versuche waren ausgeschlossen. Bei dieser Anordnung wurden niemals auch nur die geringsten Gasblasen am Ende des Versuches im Apparat beobachtet, wodurch Flüssigkeitsverschiebungen hervorgerufen werden könnten. Sowohl beim Füllen des Apparates als besonders beim Abbrechen des Versuches wurde dafür Sorge getragen, daß keine Spur der Elektrodenflüssigkeiten in die Seitenröhren kommen konnte. Die Bestimmung des Enzymgehaltes geschah nach Mett. Die Seitenflüssigkeiten hatten immer denselben Säuregehalt wie die Pepsinlösung. In dieser letzteren war sicher ein Teil der Säure vom Pepsin gebunden, aber weil die Menge des Pepsins sehr gering war, konnte der  $p_H$  in der Pepsinlösung und in den Seitenflüssigkeiten nicht sehr verschieden sein. Die Spannung war wechselnd je nach dem Widerstand; bei größeren Säuregehalten durfte die Spannung nicht zu hoch sein, weil sonst Gasblasen entwickelt wurden; sie wechselte zwischen 110 und 20 Volt. Die Versuchsdauer war meistens 5 Stunden. Bei unseren früheren Versuchen, wobei in die Seitengefäße nur Wasser gebracht wurde, war das spezifische Gewicht der Pepsinlösung immer merklich größer als das des angrenzenden Wassers. Dadurch wurde Strömungen, die doch nie, auch bei konstanter Temperatur gänzlich zu vermeiden sind, entgegengewirkt. Jetzt, wo ich den Seitenflüssigkeiten denselben Säuregehalt wie der Pepsinlösung gab, war der einzige Grund für eine Differenz im spezifischen Gewicht im winzigen Pepsin-gehalt gelegen. Deshalb kann man a priori erwarten, daß, besonders wenn durch den Strom eine sei es auch noch so geringe Änderung der Konzentrationen hervorgerufen wird, leicht Störungen auftreten müssen. Die Erfahrung bestätigte diese Erwartung insoweit, als von Zeit zu Zeit (immerhin sehr geringe) Störungen auftraten;<sup>1)</sup> ich habe denn auch in der

<sup>1)</sup> Daß dies leicht geschehen kann, wird einem besonders deutlich, wenn man bedenkt, wie leicht während des Stromdurchganges sich das spezifische Gewicht von einer (oder beiden) der Seitenflüssigkeiten etwas

letzten Versuchsreihe das spezifische Gewicht der Pepsinlösung vergrößert und zwar durch einen möglichst indifferenten Stoff, der mit Pepsin keine Bindung eingehen, keine Säure binden und auch die Reaktion der Lösung weder sofort noch allmählich beeinflussen dürfte. Zu diesem Zweck habe ich Rohrzucker gewählt, der diesen Bedingungen genügend entspricht, ich habe also in den späteren Versuchen zu der Pepsinlösung etwa ein Prozent Rohrzucker gegeben. Ich bemerke aber ausdrücklich, daß die Versuche ohne Zucker dieselben Resultate gegeben haben, nur daß von Zeit zu Zeit eine kleine Störung sich bemerkbar machte und daß in den Versuchen mit Zucker auch nicht einmal mehr eine Abweichung vom gewöhnlichen Verhalten beobachtet wurde. Ich habe, zur weiteren Sicherheit, einige Versuche angestellt, wobei der Apparat wie immer aufgestellt wurde, die unpolarisierbaren Elektroden aber verwechselt wurden, also in das Röhrchen, in das sonst die Silberelektrode tauchte, wurde jetzt die Kupferelektrode gebracht und umgekehrt. Der Strom ging dann also in umgekehrter Richtung als gewöhnlich durch den Apparat. Wenn die beobachtete Bewegung des Pepsins nicht vom elektrischen Felde, sondern von Eigentümlichkeiten des Apparats beherrscht würde, indem z. B. der eine große Hahn ein wenig höher angebracht wäre als der andere, müßte das jetzt an den Tag treten. Das Resultat war aber immer dasselbe. Die nächste Tabelle I gibt eine Übersicht der ungestörten Versuche ohne Zuckerzusatz. Zur Bestimmung der digerierenden Wirkung der Seitenflüssigkeiten wurde zu den schwach sauren Lösungen Salzsäure zugesetzt, bis der Gehalt etwa 0,05 normal war, die stärker sauren Lösungen wurden ohne weiteres untersucht. Zu jeder Flüssigkeit wurden zwei Mettsche Röhrchen gegeben. In den Tabellen sind die Mittelwerte, berechnet auf ein Röhrchen, gegeben.

---

vergrößern kann, wodurch dann Flüssigkeitsströmungen nicht ausbleiben können und der wahre Effekt der richtenden Kraft des elektrischen Feldes ganz oder zum Teil verdeckt wird. Wie zu erwarten, zeigten sich diese Störungen besonders in den höher konzentrierten Lösungen, wo also der Strom meistens etwas stärker ist, und Änderungen des spezifischen Gewichts am meisten zu befürchten sind.

Tabelle I.

Überführungsversuche mit Pepsin A.

Versuchs-Nr.	Pepsinmenge auf 50 ccm mg	Normalität Pepsinlösung	Normalität Seitenlösung	Spannung und Zeitdauer		Digerierende Wirkung in 48 Stunden		Bemerkungen
				Volt	std.	Kathode mm	Anode mm	
1	20	0,0093	0,0095	220	5	0	7,5	
2	20	0,0186	0,0151	200	5	0	4,8	
3	10	0,0272	0,0270	100	5	0,2	2,0	
4	30	0,0237	0,0241	100	5	0,1	2,4	$\left\{ \begin{array}{l} p_H \text{ Pepsinlög. } 1,80, C_H = 0,016 \\ p_H \text{ Seitenlög. } 1,77, C_H = 0,017 \end{array} \right.$
5	20	0,0291	0,0301	100	5	0,4	4,8	
6	30	0,0417	0,0417	100	5	0,25	4,8	
7	40	0,0582	0,0601	80	5	0,4	7,0	
8	30	0,0576	0,0576	80	5	0,1	4,0	
9	20	0,0598	0,0592	80	5 1/2	0,42	7,2	
10	20	0,1215	0,1180	50	5	0,9	8,4	$\left\{ \begin{array}{l} p_H \text{ Pepsinlög. } 1,10, C_H = 0,0797 \\ p_H \text{ Seitenlög. } 1,08, C_H = 0,0838 \end{array} \right.$

Aus der Tabelle geht hervor, daß das Pepsin sich in allen Versuchen nach der Anode bewegt hat, die Enzymmenge an der Kathodenseite ist überall sehr gering. Weiter sehen wir, daß die Säurebindung von der kleinen Menge Pepsin  $p_H$  nur sehr wenig verschiebt.

Indessen, wie gesagt, in einigen Versuchen traten Störungen auf; jedoch auch hierbei blieb die Enzymmenge an der Anodenseite die größte. Diese Versuche ergaben:

- I. 0,027 n-HCl Anode 5,1 mm Kathode 3,5 mm.
- II. 0,219 n-HCl „ 4,2 „ „ 3,1 „
- III. 0,219 n-HCl „ 5,9 „ „ 3,5 „

Folgende Tabelle II gibt die Resultate der Versuche mit Pepsinlösungen, zu welchen 1 % Rohrucker zugegeben war. Die Enzymmenge war in allen Versuchen 20 mg Pepsin C auf 50 ccm. Man sieht aus der Tabelle, daß das Pepsin sich in allen Versuchen rein anodisch bewegt hat, also negativ geladen war. Denn nur in den Versuchen 7 und 9 zeigt sich eine einigermaßen merkliche Verdauung an der Kathodenseite, aber diese ist doch immerhin nur ein kleiner



Teil derjenigen an der Anodenseite. Wir können also jetzt mit Sicherheit sagen, daß das Pikelharingsche reine Pepsin keinen iso-elektrischen Punkt besitzt, es ist unter allen Umständen negativ geladen.

Tabelle II.

Überführungsversuche mit Lösungen von Pepsin C, zu welchen Rohrzucker gegeben war.

Versuchs-Nr.	Normalität Pepsinlösung	Normalität Seitenlösung	Spannung und Zeitdauer		Elektroden wie gewöhnlich oder umgekehrt	Digerierende Wirkung in 48 Stunden		Bemerkungen
			volt	Std.		Kathode mm	Anode mm	
1	Phosphorsäure-NaOH-Mischung $p_H = 4,1$	Phosphorsäure-NaOH-Mischung $p_H = 4,1$	100	5	wie gewöhnlich <sup>1)</sup>	0	5,8	Über die Darstellung der Phosphorsäuremischung siehe meine Abhandlung, Diese Zeitschr., Bd. 17, S. 350 (1910).
2	0,00155	0,00136	120	5	„	0	4,4	
3	0,00369	0,00330	100	5	umgekehrt	0,5	4,5	
4	0,00621	0,00582	100	5	wie gewöhnl.	0,14	3,14	
5	0,00582	0,00582	80	5	„	0	3,8	
6	0,00640	0,00582	80	5	umgekehrt	0,48	3,5	
7	0,00993	0,01028	90	5	„	1,0	4,3	
8	0,01009	0,01009	80	5	wie gewöhnl.	0,2	3,4	
9	0,01688	0,01649	100	5	„	1,4	4,8	
10	0,01552	0,01649	80	5	„	0	3,04	
11	0,03143	0,02871	95	5	„	0	2,80	
12	0,02871	0,02910	90	5	umgekehrt	0	3,1	
13	0,05820	0,05820	80	5	wie gewöhnl.	0	2,4	
14	0,05955	0,05917	80	5	umgekehrt	0	2,3	
15	0,1180	0,1183	50	5	wie gewöhnl.	0	1,84	
16	0,2348	0,2357	20	5	umgekehrt	0	1,00	

Ich habe dann, so wie früher, einige Versuche angestellt mit Pepsin, zu welchem Aminosäuren oder Albumosen gegeben wurden. Als Albumosen wurde zum Teil eine Lösung von

<sup>1)</sup> Die Silberelektrode tauchte in gesättigte NaCl-Lösung, mit einigen Tropfen Salzsäure angesäuert.

Pepton-Grübler, zum Teil ein durch Digerieren von Fibrin mit Pepsin, Behandlung mit Alkohol, Dialyse und abermalige Behandlung mit Alkohol erhaltenes Präparat ( $\alpha$ ) gebraucht. Folgende Tabelle III gibt die erhaltenen Resultate. Aus dieser Tabelle sehen wir, daß im Gegensatz zu den in der vorigen Abhandlung erhaltenen Resultaten jetzt kleine Mengen Albumosen auf das Pepsin (C) keinen deutlichen Einfluß ausüben. Mit größeren Mengen (300 mg) dagegen kehrt sich auch jetzt die Bewegung um. Aminosäuren haben keinen Einfluß. Also, das Pepsin, womit ich jetzt die Versuche angestellt habe, und das sicherlich viel reiner war als das in den früheren Versuchen verwendete, bedarf zur Umkehrung seines elektrischen Verhaltens einer relativ viel größeren Menge von Albumosen. Das Pepsin verbindet sich nicht mit Aminosäuren; wahrscheinlich nur mit den Stoffen, worauf es seine enzymatische Wirkung ausüben kann. Die letzteren Stoffe sind in den Lösungen von den hier in Betracht kommenden Aciditäten immer positiv geladen und eine Bindung mit dem negativen Pepsin braucht uns also nicht zu wundern. Warum dieses sich aber mit den gleichfalls positiv geladenen Aminosäuren nicht verbindet (oder von diesen nicht adsorbiert wird), das vermag ich noch nicht zu erklären (siehe umstehende Tabelle).

Selbstverständlich ist der  $p_H$  in den mit Albumosen oder Aminosäuren versetzten Pepsinlösungen merklich vergrößert; wenn dennoch eine kathodische Bewegung stattfindet, so beweist dies um so mehr die Umladung.

Meine jetzigen Versuche haben also die früheren Resultate von Pikelharing und mir völlig bestätigt. Es fragt sich nun aber, ob das Verhalten des Pepsins im elektrischen Felde mit seinen übrigen Eigenschaften in Einklang steht. Und wenn wir uns diese Frage vorlegen, ist die Antwort vorläufig noch eine sehr schwierige. Aus der Darstellungsweise von den reinen Pepsinpräparaten geht schon hervor, daß es eine Acidität gibt, bei der die Löslichkeit am geringsten ist (Flockungsoptimum). Bei eiweißartigen Körpern (mit amphoterem Charakter) fällt der iso-elektrische Punkt mit dem Flockungsoptimum zusammen, wie es von Michaelis mit seinen Mitarbeitern in ihren wich-

Tabelle III.

Versuche mit Pepsin C unter Zugabe von Aminosäuren  
oder Albumosen.

Immer 1% Rohrzucker und 20 mg Pepsin auf 50 ccm.

Ver- suchs- Nr.	Zu der Pepsinlösung gegeben mg	Norma- lität der Pepsin- lösung	Norma- lität der Seiten- lösungen	Span- nung und Zeit- dauer		Digerierende Wirkung in 48 Stunden		Bemerkungen
				Volt	Std.	Kathode mm	Anode mm	
1	20 α	0,0324	0,03103	60	5	0	3,2	Das Eiweiß mit der Kathodenflüssigkeit nicht digeriert, son- dern an den Enden etwas durchsichtig.
2	20 α	0,01649	0,01552	80	5	0,2	1,64	
3	20 Grübler	0,03007	0,03007	60	5	0	2,1	Die Pepsin-Albumo- senlösung blieb zu- erst bei Zimmertem- peratur 3 Tage stehen.
4	100 α	0,03143	0,03007	50	5	1,0	1,60	
5	100 Grübler	0,03202	0,03007	50	5	0,2	1,7	
6	300 α	0,03103	0,03026	50	5	2,80	1,40	
7	400 Grübler	0,03492	0,03103	50	5	2,86	1,46	
8	100 Glykokoll	0,03300	0,03103	50	5	0	1,4	
9	500 „	0,03687	0,03007	50	5	0	0,8	
10	300 Leucin	0,03103	0,03103	50	5	0	1,4	

tigen Untersuchungen öfters bewiesen ist. Unser reines Pepsin ist aber ohne Zweifel im ganzen genommen ein Stoff mit eiweißartigen Eigenschaften. Das sehr eigentümliche Verhalten dieses merkwürdigen Stoffes, das Fehlen eines Ladungsminimums und Vorhandensein eines Flockungsoptimums muß einem sofort auffallen. Wir haben uns im übrigen noch einmal überzeugt, daß unsere Pepsinpräparate ein Flockungsoptimum zeigen bei einem  $p_H = 4$  bis 5 und zwar durch einige Versuchsreihen, wobei zu einer reinen Pepsinsalzsäurelösung steigende Mengen einer sehr schwachen NaOH-Lösung zugegeben wurden.

Nun will ich aber sofort bemerken, daß dieses Pepsin zwar im allgemeinen sicher den Eiweißkörpern sehr ähnlich ist, aber doch, auch abgesehen von seiner Enzymwirkung, ein



sehr besonderer Eiweißstoff ist. Dies geht schon aus einer sehr merkwürdigen Reaktion hervor, die schon von Pikelharing selbst entdeckt worden ist. Eine Lösung von diesem Pepsin in Salzsäure von etwa 0,05 n läßt bei schnellem Erhitzen einen starken Niederschlag entstehen. Diese Reaktion ist sehr empfindlich, kann einigermaßen als Reaktion auf Pepsin verwendet werden; mit der Koagulation parallel verschwindet die Aktivität. Bei sehr allmählichem Erhitzen bis zu 60 oder 70° bleibt der Niederschlag aus. Pikelharing zog den Schluß, daß sein Pepsin ein Eiweißkörper ist, aber von komplizierterer Zusammensetzung als die gewöhnlichen Eiweißstoffe.

Wir können also die für normale Eiweißstoffe gefundenen Verhältnisse nicht ohne weiteres auf Pepsin übertragen und das auf den ersten Blick recht auffallende Verhalten braucht uns nicht allzu sehr zu wundern. Indessen Pikelharing hat schon auf mancherlei Weise versucht, das eigentümliche Verhalten seines Pepsins näher zu beleuchten. Er hat, in der Vermutung, daß es vielleicht eine Verbindung sei vom eigentlichen Enzym mit einem Eiweißstoff, beide z. B. durch Verdauung zu trennen versucht.<sup>1)</sup> Bei diesen Versuchen stieß er aber zuletzt auf große Schwierigkeiten, so daß die Frage von der Natur seines Enzyms vorläufig offen gelassen werden mußte. Die Resultate der Untersuchungen über die elektrische Überführung lassen jetzt den Gedanken an eine derartige Verbindung wieder sehr in den Vordergrund rücken. Die Annahme, daß im Pepsin eine Bindung von eigentlichem Enzym mit einem Eiweißstoff vorliegt, läßt uns das eigentümliche Verhalten ziemlich leicht erklären. Man braucht nur anzunehmen, daß in saurer Lösung die Verbindung auseinander fällt, wobei das eigentliche Enzym, wohl durch Bindung von winzigen Mengen Anionen, sich negativ, der Rest, der Eiweißstoff, sich positiv lädt. Diese Annahme ist nicht so befremdend, denn Salze z. B. spalten sich doch auch zum größten Teil in entgegengesetzt geladene Ionen. Weiter kann man sich vorstellen, daß, wenn der Eiweißstoff in der Nähe des für diesen iso-elektrischen Punktes auszufallen anfängt, das Enzym mit

<sup>1)</sup> Archive des Sciences biologiques, Tome XI, S. 37.

niedergerissen wird. Ich habe mir viele Mühe gegeben, experimentelle Anhaltspunkte für eine derartige Auffassung zu finden, und meinte anfänglich, daß es mir ziemlich gelungen war. Bei meinen Untersuchungen über das Verhalten von Ptyalin im elektrischen Felde hatte ich gefunden, daß dieses Enzym einen iso-elektrischen Punkt besitzt, zwar abhängig in seiner Lage von der Regulatormischung,<sup>1)</sup> indem er in Phosphat- oder Acetatmischungen bei 37° bei  $p_H = 5,6$ , in Citratlösungen aber bei 6,86 bis 6,58, je nach der Konzentration der Citratlösung, liegt.<sup>2)</sup> Bei der Fortsetzung dieser Untersuchungen fand ich, daß man von der Verschiedenheit der iso-elektrischen Punkte von Ptyalin einerseits und Mucin, dem Haupteiweißstoff des Speichels, andererseits Gebrauch machen kann, um diese zwei Stoffe zu trennen. Theoretisch ist es immer möglich, gelöste Stoffe mit genügend auseinander liegenden Umladungspunkten im elektrischen Felde zu trennen, falls die Stoffe nicht energische Bindungen (oder Adsorptionen) eingehen. Findet schwache Bindung statt, dann könnte man durch wiederholte (fraktionierte) elektrische Trennung doch zum Ziele kommen. Praktisch scheidet die Methode vielleicht an der Schwierigkeit, auf diese Weise genügende Mengen zu bekommen. Wie dem auch sei, die Trennung von Ptyalin und Mucin erscheint möglich; der iso-elektrische Punkt der Mucine wird wohl nicht weit von dem eines anderen Eiweißstoffes mit saurer Natur, des Caseins ( $C_H = 2,4 \times 10^{-5}$ ,  $P_H = 4,62$ ), entfernt sein. Diese Eiweißstoffe haben stärker saure Natur als das verhältnismäßig schwach saure Ptyalin. Bei einem  $p_H = 4,9$  bis 5,0 ist Ptyalin schon positiv, Mucin dagegen noch negativ. Ein Versuch mit Speichel und Phosphatmischung möge hier beschrieben werden:

10 ccm der von mir immer gebrauchten Phosphorsäurelösung wurden mit so viel NaOH versetzt, daß nach Zugabe von Speichel  $p_H = 4,86$  war. Die als Seitenflüssigkeit ge-

<sup>1)</sup> Mitteilung auf dem IX. Physiologen-Kongreß zu Groningen (1913). Siehe auch die Abhandlung von Michaelis und Pechstein, Biochemische Zeitschrift, Bd. 59, S. 77 (1914).

<sup>2)</sup> Auch das Wirkungsoptimum ist in Citratlösungen von der Konzentration abhängig, siehe v. Trigt und Ringer in dieser Zeitschrift, Bd. 82, S. 484 (1912).

brauchte Phosphorsäuremischung hatte einen  $p_H = 4,94$ . Nach Stromdurchgang wurden Kathoden- und Anodenflüssigkeit beide gleich stark eingeengt (bei Zimmertemperatur und stark vermindertem Druck).

10 ccm einer Amylum-Phosphatlösung mit optimaler Reaktion und 5 Tropfen Anodenflüssigkeit: nach 45 Minuten bei  $37^\circ$  nicht die geringste Aufhellung;

10 ccm derselben Amylum-Phosphatlösung mit 5 Tropfen Kathodenflüssigkeit, in 10 Minuten wasserklar, nach 45 Minuten sehr starke Reduktion mit Fehlingscher Lösung.

Die unwirksame Anodenflüssigkeit gab aber sehr starke Eiweißreaktionen (Xanthoprotein-, Biuretreaktion).

Die wirksame Kathodenflüssigkeit gab gar keine Eiweißreaktionen.

Derartige Versuche habe ich nun auch mit den Pepsinlösungen angestellt. Hier liegt die Sache insoweit günstiger, als das Enzym immer negativ geladen ist. Man hat also den  $p_H$  nicht so sorgfältig abzumessen. Als ich nun eine starke Pepsinlösung in Salzsäure von etwa 0,025 n elektrolysierte, zeigte, wie ich jetzt schon im voraus wußte, die Anodenflüssigkeit starke Enzymwirkung, während die Kathodenflüssigkeit ganz unwirksam war. Die beiden Flüssigkeiten wurden bei Zimmertemperatur und stark vermindertem Druck eingeengt. Danach gab die Anodenflüssigkeit beim Kochen mit ein wenig  $HNO_3$  keine Verfärbung, mit Ammoniak in Überschuß sodann eine kaum wahrnehmbare Gelbfärbung.

Die Kathodenflüssigkeit gab, mit wenig Salpetersäure gekocht, einen gelben Niederschlag. Mit mehr  $HNO_3$  löste sich dieser beim Kochen. Mit  $NH_3$  sodann sehr starke Orangeverfärbung. Eine derartige Trennung bekam ich gar nicht bei schwacher Acidität (Phosphorsäuremischung,  $p_H = 4,1$ ); hierbei bewegte sich Enzym sowohl als alles Eiweiß nach der Anode.

Zur weiteren Analyse dieses vorläufig wichtig scheinenden Resultates mußte ich sodann größere Mengen der überführten Stoffe zu bekommen trachten. Dazu habe ich die Flüssigkeiten von einer größeren Anzahl Versuchen zusammen eingeengt; andererseits aber auch einen sehr großen Überführungsapparat mir anfertigen lassen. Auf diese Weise wurden Flüssigkeiten



erhalten, die einerseits (Anode) starke Enzymwirkung und verhältnismäßig schwache Eiweißreaktionen, andererseits (Kathode) schwache Enzymwirkung und sehr starke Eiweißreaktionen zeigten. Mit anderen Worten: die Trennung ist, wie eigentlich auch wohl zu erwarten, eine sehr unvollständige; bei den Flüssigkeiten eines einzelnen Versuchs zeigte sich das natürlich nicht so deutlich. Will man also die Konzentrationen vergrößern, so wird diese Unvollständigkeit der Trennung immer stärker störend. Bei der weiteren Untersuchung zeigte sich, daß die konzentrierte, stark aktive Anodenflüssigkeit beim Kochen in saurem Milieu die charakteristische Pepsinreaktion, also eine Trübung, gab; die Kathodenflüssigkeit gab diese Reaktion weit schwächer. Die Resultate dieser Versuche sind also vorläufig noch nicht beweisend. Die Frage nach der Natur des Pepsins ist hiermit noch nicht gelöst, wir werden bald sehen, daß sich aber noch eine weitere Stütze für die Annahme, daß im Pepsin eine Verbindung vorliegt, finden läßt. Vorläufig möchte ich also schließen, daß

1. das Pikelharingsche Pepsin ein einheitlicher Stoff ist. In salzsaurer Lösung verdaut es sich selbst, im elektrischen Felde bewegen sich die eiweißartigen Spaltungsprodukte kathodisch, das Unzersetzte aktive Enzym anodisch. Beim Betrachten des sehr eigentümlichen Verhaltens (kein iso-elektrischer Punkt, wohl ein Flockungsoptimum, Koagulation bei schnellem Erhitzen in salzsaurer Lösung) muß man bedenken, daß das Pepsin zwar vieles mit den Eiweißstoffen gemein hat, aber doch auch viele von den gewöhnlichen Eiweißstoffen abweichende Eigenschaften aufweist und daß man auf diesen sehr besonderen Körper nicht ohne weiteres die geläufigen Betrachtungen, die für gewöhnliche Eiweißstoffe gelten (über iso-elektrisches Verhalten und minimale Löslichkeit), übertragen darf;

2. daß noch die Möglichkeit offen gelassen werden muß, daß das Pepsin eine Verbindung ist von einem eiweißartigen Körper mit dem eigentlichen Enzym. Dieses letztere würde dann, im Gegensatz zu den amphoterer Stoffen, immer negative Ladung besitzen. In saurer Lösung würde die Verbindung zum größten Teil auseinander gefallen sein, im elektrischen Felde

bewegen sich dann die Komponenten in entgegengesetzter Richtung. Im Flockungsoptimum sind die beiden Komponenten praktisch völlig mit einander verbunden oder jedenfalls, wenn die Eiweißkomponente koaguliert, wird die Enzymkomponente mitgerissen.

Es schien mir wichtig, die Wasserstoff- und Anionenbindung unseres Pepsins zu studieren. Wenn das Pepsin, so wie wir es haben, nicht aus zwei Komponenten besteht, könnte man erwarten, daß dieser Stoff durch eine besonders starke (im Vergleich mit anderen Eiweißstoffen) Anionenbindung charakterisiert sein würde. Man würde sich die immer negative Ladung doch kaum anders als durch Anionenbindung vorstellen können. Eine derartige Anionenbindung hätte nichts Befremdendes, bindet sich das Ptyalin nach den Untersuchungen von Michaelis doch auch mit Anionen zu aktiven Verbindungen. Wenn das Pepsin sich aber in dieser Hinsicht nicht von anderen Eiweißstoffen unterscheiden würde, so könnte man darin einen weiteren Anhaltspunkt für die Vermutung, daß es eine Verbindung ist, erblicken. Das eigentliche Enzym könnte dann nur so winzige Anionenmengen binden, daß dies bei den Bestimmungen nicht zum Ausdruck käme. Ich habe darum die H- und Cl-Ionenbindung des Pepsins in salzsaurer Lösung studiert, und zum Vergleich dasselbe für Albumosen. Man könnte also erwarten, daß das Pepsin im Vergleich mit den Albumosen verhältnismäßig mehr Chlor- als Wasserstoffionen festlegen würde.

#### 4. Wasserstoff- und Chlorionenbindung an Pepsin und Albumosen.

In erster Linie war es erwünscht, die zu gebrauchenden Elektroden so klein wie möglich zu machen, denn man kann natürlich nicht über unbeschränkte Pepsinmengen verfügen. Es kostet bei Verwendung eines einzelnen Hundes schon lange Zeit und ziemlich viele Mühe, um ein Gramm reines und chlorfreies Pepsin darzustellen. Ich habe denn auch die Gefäße für die Wasserstoff- und Chlorelektroden sehr klein machen

lassen. Die Wasserstoffelektroden konnten, wenn nötig, mit etwa 8 Tropfen Flüssigkeit ganz zuverlässig arbeiten. Dazu wurde das Gefäß getrocknet, die Elektrode nach genügendem Auswaschen mit reinem Wasser vorsichtig am Rande mit Fließpapier von der Hauptmenge des Wassers befreit. Dann wurde etwa eine Stunde Wasserstoffgas durchgeleitet, wodurch die Elektrode weiter getrocknet wurde. Bei der Füllung brauchte dann nicht das Gefäß mit Elektrode zuvor gespült zu werden, sondern konnte gleich mittels einer Pipette die kleine Menge Flüssigkeit (dem Wasserstoffstrom entgegen) eingebracht werden. Das Gleichgewicht wurde nach Hasselbalch durch Schaukeln erreicht. Es zeigte sich, daß diese kleinen Elektroden an Zuverlässigkeit den von mir sonst gebrauchten viel größeren nicht nachstehen. Man hat hier noch den Vorteil, daß das Gleichgewicht wesentlich schneller erreicht wird. Im allgemeinen arbeiten die sogenannten Mikromethoden mit relativ größeren Fehlern, der Einfluß von kleinen Fehlern beim Wägen, Messen usw. macht sich viel mehr geltend. Bei dieser elektrometrischen Methode ist das aber keineswegs der Fall; die Genauigkeit des Arbeitens mit äußerst kleinen Elektroden braucht keineswegs kleiner zu sein.

Die Bestimmung der Chlorionenkonzentration geschah mittels Quecksilber-Kalomel-Elektroden. Das Quecksilber war zweimal nach Hulett destilliert, das Kalomel von Kahlbaum bezogen. Das Elektrodengefäß konnte, nachdem Quecksilber eingebracht war, noch etwa 0,4 ccm Flüssigkeit enthalten. Natürlich muß man mit solchen kleinen Mengen Flüssigkeit erstens sehr sauber arbeiten, aber weiter dafür Sorge tragen, daß nicht durch Verdampfung usw. Fehler auftreten. Auch muß man dafür sorgen, daß das Gleichgewicht zwischen Quecksilber, Kalomel und Lösung nicht von der Luft (Sauerstoff) gestört wird. Ich machte die Bestimmungen in folgender Weise. Zuerst wurde in das Elektrodengefäß Quecksilber gebracht. Dann wurde in einem kleinen Röhrchen die zu prüfende Flüssigkeit mit 50 mg  $\text{Hg}_2\text{Cl}_2$  und einem Tropfen Quecksilber ohne Luft geschüttelt und zwar eine Minute. Dann wurde die Flüssigkeit zusammen mit der Mischung von fein zerteiltem Queck-



silber und Kalomel in das Elektrodengefäß über das Quecksilber gebracht und zwar so, daß das Gefäß damit ganz angefüllt war. Dann wurde die Elektrode während 20 Minuten im Thermostaten belassen. Alle Messungen habe ich bei  $18^{\circ}$  ausgeführt. Einige Schwierigkeiten bereitete mir anfangs die Verbindung der Chlorionenelektrode mit der Normalelektrode. Ich konnte keine konstanten Ablesungen bekommen, als ich als Verbindungsflüssigkeit gesättigte Kaliumchloridlösung verwendete. Dies muß einer, sei es auch geringen Diffusion von Chlorionen in das Elektrodengefäß zugeschrieben werden. Dieses kleine Gefäß hat nur einen verhältnismäßig kurzen Heber (siehe Fig. 1), durch welchen leicht eine kleine Menge Chlorionen, auch während der kurzen Zeitdauer der Messungen, hindurch diffundieren

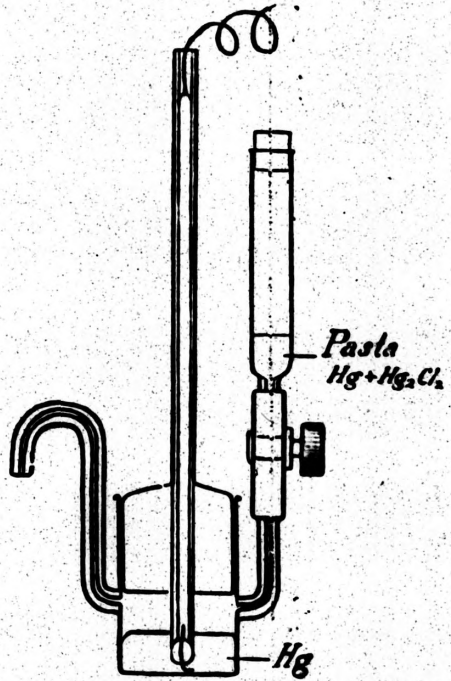


Fig. 1

*Chlorionen-Elektrode beim Füllen*

konnte. Ich habe dann die Verbindungsflüssigkeit erstarren lassen. Unter leichter Erwärmung wurden in 200 g Wasser zuerst 20 g Gelatine, dann 64 g KCl gelöst. Nach dem Erkalten wird der Gel ziemlich fest; der Heber der Elektrode und der der Normalelektrode berührten bei der Messung den Gel, bei dieser Anordnung waren dann Strömungen völlig ausgeschlossen. Die Potentialdifferenz blieb dann auch längere Zeit, bis zu 15 Minuten, genau dieselbe. Nach jeder Messung wurde der Gel mit gesättigter KCl-Lösung abgespült und mit Fließpapier getrocknet. Sollte er einige Zeit nicht gebraucht werden, dann wurde er unter gesättigter KCl-Lösung aufbewahrt. In dieser Weise war er lange haltbar. Mit dieser erstarrten Lösung wurden bei der Wasserstoffelektrode dieselben Resultate als mit der

gewöhnlichen gesättigten KCl-Lösung erhalten; wir können also, wie auch theoretisch zu erwarten, annehmen, daß die gelatinehaltende erstarrte Kaliumchloridlösung ebensogut wie eine wässrige gesättigte Lösung desselben Salzes das Diffusionspotential zu in den meisten Fällen zu vernachlässigenden Werten hinabdrückt.

Für die Berechnung der Chlorionenkonzentration mittels dieser Elektrode haben wir die Nernstsche Gleichung:

$$\pi = \frac{RT}{2\epsilon} \lg \frac{C}{C_{\text{Hg}_2}}, \quad \pi = \text{Potential der Lösung} - \text{Potential des Quecksilbers.}$$

$$\pi_1 = \frac{RT}{2\epsilon} \lg \frac{C}{1} = -1,027, \quad \text{d. h. wenn die Konzentration der Merkuro-Ionen } \text{Hg}_2 \text{ 1 beträgt, ist nach Wilsmore } \pi = -1,027 \text{ Volt.}$$

$$\pi + 1,027 = - \frac{RT}{2\epsilon} \lg C_{\text{Hg}_2}$$

In der an Kalomel gesättigten Lösung ist aber das (Löslichkeits-)Produkt  $C_{\text{Hg}_2} \times C_{\text{Cl}}^2$  konstant und = K, also  $\pi + 1,027$

$$= - \frac{RT}{2\epsilon} \lg \frac{K}{C_{\text{Cl}}^2} = 0,02884 \log_{10} \frac{K}{C_{\text{Cl}}^2}$$

Um K zu berechnen, muß die Löslichkeit des Kalomels bekannt sein. Nach den Bestimmungen von Behrend<sup>1)</sup> ist in einer reinen gesättigten Kalomellösung  $C_{\text{Hg}_2} = 2,24 \times 10^{-6}$ , in dieser Lösung ist  $C_{\text{Cl}} = 2 C_{\text{Hg}_2}$  und also ist  $K = 4 C_{\text{Hg}_2}^3 = 4 \times [2,24 \times 10^{-6}]^3 = 4,495 \times 10^{-17}$ .

Ich habe nun zuerst, um die Elektroden zu prüfen, einige Messungen mit reinen Lösungen von KCl und NaCl [Kahlbaum] angestellt. Geglühtes KCl und NaCl wurde (Korrektur auf luftleeren Raum) genau gewogen und so Lösungen hergestellt von KCl 0,005, 0,01 und 0,1 n; NaCl 0,01, 0,1 n. Die Messungen ergaben für diese Lösungen:

KCl 0,005 n, — 0,6776 Volt. Woraus sich berechnet für $p_{\text{Cl}}$ 2,125 und $C_{\text{Cl}}$ 0,0075		
0,01 n, — 0,6643	•	• 1,894 • 0,0127
0,1 n, — 0,6118	•	• 0,9849 • 0,1035
NaCl 0,01 n, — 0,6650	•	• 1,907 • 0,0124
0,1 n, — 0,6121	•	• 0,9895 • 0,1024

Wie man sieht, sind alle  $C_{\text{Cl}}$  zu hoch. Man kann fragen, ob die Löslichkeit des Kalomels genügend genau bekannt ist,

<sup>1)</sup> Zeitschrift für physikalische Chemie, Bd. 11, S. 466 (1893) und Bd. 35, S. 305 (1900).

oder ob das Potential — 1,027 von Wilsmore vielleicht etwas unrichtig ist. Ich glaube, daß die Abweichungen am ehesten durch eine sehr kleine Ungenauigkeit der Löslichkeitszahl von Kalomel erklärt werden können. Ich habe aus den eben genannten Messungen umgekehrt  $K$  berechnet und finde dafür im Mittel:  $2,432 \times 10^{-17}$ ). Mit diesem  $K$  findet man für:

				Aus der Leitfähigkeit berechnet:					
KCl	0,005 n	$p_{Cl}$	2,2573	$C_{Cl}$	0,00553	$p_{Cl}$	2,3206	$C_{Cl}$	0,00478
	0,01 n	„	2,0267	„	0,00940	„	2,0275	„	0,00939
	0,10 n	„	1,1234	„	0,0753	„	1,1066	„	0,0782
NaCl	0,01 n	„	2,0302	„	0,00933	„	2,0292	„	0,00935
	0,10 n	„	1,1217	„	0,0756	„	1,0735	„	0,0844

Die jetzt erhaltenen Zahlen stimmen mit den aus der Leitfähigkeit berechneten viel besser überein. Ich habe denn auch für Chlorionenbestimmungen in neutralen oder schwach sauren Lösungen diesen  $K$ -Wert benützt und damit, so weit ich es verfolgen konnte, immer gute Resultate bekommen. In stärker sauren Lösungen ist die Sachlage anders (für alkalische Lösungen läßt sich die Methode gar nicht anwenden, weil das Kalomel in solchen Lösungen sich umsetzt). Hierbei haben wir zuerst mit dem Einfluß der  $H$ -Ionen auf das Diffusionspotential zu rechnen, aber falls die  $C_H$  nicht zu groß ist, wird die gesättigte KCl-Lösung diesen Einfluß klein halten. Aber weiter haben auch die  $H$ -Ionen einen direkten Einfluß auf das Elektrodenpotential. In sauren Lösungen wird auch bei gleicher  $C_{Cl}$  die Quecksilberelektrode positiver sein als in neutraler Lösung. Dieser Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration geht sehr deutlich hervor aus folgenden Messungen, angestellt in Phosphorsäure-NaOH-Mischungen mit oder ohne Zugabe von KCl. Die Phosphorsäurelösung enthielt 52,91 g  $P_2O_5$  pro Liter, die NaOH-Lösung war 0,6132 normal.

<sup>1)</sup> Für  $C_{Hg_2}$  in reiner gesättigter Lösung finde ich sodann  $1,83 \times 10^{-6}$  statt Behrends Zahl  $2,24 \times 10^{-6}$ . Bei der Schwierigkeit, solche geringe Löslichkeiten zu bestimmen, scheint die Differenz  $0,41 \times 10^{-6}$  nicht allzu groß. Hier sei noch bemerkt, daß Kahlbaums Kalomel sich sehr rein zeigte. Ich habe Messungen mit 50 mg  $Hg_2Cl_2$  und mit sehr viel mehr angestellt, aber doch nur minimale Differenzen in der elektromotorischen Kraft gefunden. Um aber die Messungen möglichst einförmig zu gestalten, habe ich weiter immer 50 mg Kalomel verwendet.



Tabelle IV.

Messungen der Chlorionenkonzentration in Lösungen von verschieden saurer Reaktion, deren  $C_H$  von Phosphorsäure-NaOH-Mischungen fixiert war.

Ver- suchs- Nr.	Auf 100 ccm Phos- phor- säure ccm	NaOH ccm	$p_H$	auf 100 ccm ccm KCl	Gefunden		Bemerkungen
					$p_{Cl}$	$C_{Cl}$	
1	4	0	2	0	6,284	$5,20 \times 10^{-7}$	<p>Alle diese Lösungen sind praktisch chlorfrei. Die Messung täuscht aber je nach der Reaktion einen verschiedenen <math>p_{Cl}</math> vor. Je kleiner <math>p_H</math>, je mehr H-Ionen auf die Quecksilberelektrode niederschlagen, was denselben Effekt hat, als wenn viele positive <math>Hg_2</math>-Ionen niedergeschlagen wären, was also geringe <math>C_{Cl}</math> vortäuscht. In den alkalischen Lösungen sind die Resultate ganz unzuverlässig.</p> <p>gef. (6-1) = 0,00067 <math>C_{Cl}</math>            &gt; (7-1) = 0,00775            &gt; (8-2) = 0,000777            &gt; (9-2) = 0,00768            &gt; (10-3) = 0,007557            &gt; (11-4) = 0,00067            &gt; (12-4) = 0,00856            &gt; (13-5) = 0,0332</p>
2	4	5	$\pm 5,5$	0	4,579	$2,64 \times 10^{-5}$	
3	4	7	$\pm 6,8$	0	3,580	$2,63 \times 10^{-4}$	
4	4	10	$\pm 8,8$	0	2,796	$1,60 \times 10^{-3}$	
5	4	12	$\pm 11,7$	0	0,401	0,397	
6	4	0	2	10 von 0,01 n	3,173	$6,72 \times 10^{-4}$	
7	4	0	2	10 > 0,1 n	2,111	$7,75 \times 10^{-3}$	
8	4	5	$\pm 5,5$	10 > 0,01 n	3,096	$8,03 \times 10^{-4}$	
9	4	5	$\pm 5,5$	10 > 0,1 n	2,113	$7,71 \times 10^{-3}$	
10	4	7	$\pm 6,8$	10 > 0,1 n	2,107	$7,82 \times 10^{-3}$	
11	4	10	$\pm 8,8$	10 > 0,01 n	2,644	$2,27 \times 10^{-3}$	
12	4	10	$\pm 8,8$	10 > 0,1 n	1,993	0,01016	
13	4	12	$\pm 11,7$	10 > 0,1 n	0,366	0,4302	

Aus der Tabelle sieht man, einen wie großen Einfluß die Wasserstoffionen auf den Potentialsprung der Quecksilberelektrode haben. In Nr. 1 ist  $C_{Cl} = 5,20 \times 10^{-7}$ . Die  $C_{Hg_2}$  berechnet sich hier zu  $8,61 \times 10^{-5}$ . Das ist  $8,43 \times 10^{-5}$  größer als in einer reinen gesättigten Kalomellösung. Die H-Ionen täuschen hier also dieses Zuviel an  $Hg_2$ -Ionen vor. Nr. 4 gibt noch ein ziemlich brauchbares Resultat, aber in Nr. 5, wo die Reaktion etwas stärker alkalisch ist, versagt die Methode ganz. Ich habe in der letzten Vertikalreihe der Tabelle IV die Chlorionen-Konzentrationen aus den Differenzen der Messungen der KCl-haltigen Lösungen und den chlorfreien von derselben Acidität berechnet. Die Resultate sind sicher

nicht so gut wie in neutralen Lösungen, aber doch immerhin brauchbar; bei dieser Art der Bestimmung durch Vergleichung mit einer gleich sauren Lösung ohne Chlorionen haben auch die besonders bei höheren Aciditäten mehr Bedeutung bekommenen Diffusionspotentiale den geringsten Einfluß. Ich habe dergleichen Messungen viele angestellt mit auch anderen Puffergemischen. Eine Versuchsreihe mit Citratmischungen sei hier noch mitgeteilt. Hierbei wurde eine Lösung von Dinatriumcitrat 1,25 Molekular, NaOH 0,6132 n und  $H_2SO_4$  n = 0,252 verwendet.

Tabelle V.

Messungen der Chlorionenkonzentration in Lösungen von verschiedener säurer Reaktion, deren  $C_H$  von Citrat-Mischungen fixiert war.

Ver- suchs- Nr.	Auf 100 ccm $H_2SO_4$ ccm	2 ccm Citrat und NaOH ccm	Reaktion	Zugegeben KCl ccm	Gefunden		$C_{Cl}$ berech- net aus den Differenzen 5—1 usw.
					$P_{Cl}$	$C_{Cl}$	
1	10	0	stark sauer	0	4,8025	$1,58 \times 10^{-5}$	—
2	0	0	sauer	0	4,2606	$5,49 \times 10^{-5}$	—
3	0	2	schwach sauer	0	4,0116	$9,74 \times 10^{-5}$	—
4	0	4	sehr schwach sauer	0	3,7247	$1,89 \times 10^{-4}$	—
5	10	0	—	10 von 0,10 n	3,1221	$7,55 \times 10^{-4}$	0,000739
6	0	0	—	„	3,1221	$7,55 \times 10^{-4}$	0,000700
7	0	2	—	„	3,1280	$7,45 \times 10^{-4}$	0,000648
8	0	4	—	„	3,0806	$8,31 \times 10^{-4}$	0,000642
9	10	0	—	10 von 0,1 n	2,1406	$7,24 \times 10^{-3}$	0,00702
10	0	0	—	„	2,1217	$7,56 \times 10^{-3}$	0,00750
11	0	2	—	„	2,1307	$7,40 \times 10^{-3}$	0,00730
12	0	4	—	„	2,1214	$7,56 \times 10^{-3}$	0,00737

Man sieht hier dieselben Erscheinungen, nur ist, da die H-Ionenkonzentration im allgemeinen kleiner ist, auch deren Einfluß kleiner; jedoch wechselt der vorgetäuschte Cl-Ionengehalt von 1—4 noch sehr beträchtlich. Es ist sofort klar, daß besonders bei kleinen Cl-Ionenkonzentrationen der Einfluß der Reaktion

relativ am größten sein wird. Immerhin war es bei unseren Bestimmungen der Cl-Ionenbindung an Pepsin wünschenswert, nicht nur Messungen an den Pepsinlösungen, sondern auch an reinen Salzsäurelösungen von derselben Konzentration anzustellen und die erhaltenen Werte miteinander zu vergleichen. In dieser Weise werden Fehler beim Vernachlässigen des Diffusionspotentials sowie der Einfluß der H-Ionen auf die Quecksilberelektrode tunlichst eliminiert.

Was die Messungen der H-Ionenkonzentrationen anbeht, will ich bemerken, daß beim Gebrauch der gewöhnlichen Konstante der H-Elektrode, — 0,277 Volt, man zumal bei den stärker sauren Lösungen, z. B. Salzsäure von 0,05 n oder mehr, immer viel niedrigere Werte erhält, als man erwarten würde. Dies rührt sicherlich, wenigstens zum Teil, daher, daß für höhere  $C_H$  die gesättigte Kaliumchloridlösung das Diffusionspotential keineswegs mehr vollständig eliminiert. Zu welchem Teil die Elimination aber stattgefunden hat, kann man für jeden Fall nicht leicht berechnen. Wie ich fand, bekommt man in diesen Fällen bessere Werte, wenn man statt — 0,277 etwa — 0,2685 Volt benutzt. Es sei aber ausdrücklich bemerkt, daß nicht gemeint wird, daß diese Zahl im allgemeinen eine bessere Konstante für die H-Elektrode sei. Im übrigen hat die absolute Zahl keine große Wichtigkeit, weil ich doch immer die  $C_H$  in der Salzsäure vor und nach dem Lösen des Pepsins miteinander verglichen habe. In den stärker sauren Lösungen habe ich jedoch die Berechnung meistens mit Hilfe der Zahl — 0,2685 Volt gemacht.

Ich glaubte, daß, wenn eine besonders starke Anion- (also hier Chlorion-) Bindung überhaupt bestände, diese beim Gebrauch eines chlorfreien Präparates am besten zutage treten würde. Ich habe denn auch für diese Versuche Präparat D verwendet. Um die H- und Cl-Ionenverbindung an Pepsin richtig beurteilen zu können, habe ich sie verglichen mit denselben an chlorfreie Albumosen. Diese habe ich aus Fibrin dargestellt. Fein zerschnittenes Fibrin wurde zuerst längere Zeit gegen destilliertes Wasser dialysiert, dann wurde es mit chlorfreier Oxalsäure und Pepsin D digeriert. Die erhaltene Lösung wurde wieder



lange Zeit dialysiert, wobei ein nicht unbeträchtlicher Teil verloren ging. Zum Schluß wurden die Albumosen mit Alkohol niedergeschlagen. Ich konnte in diesem Präparat kein Chlor auffinden.

Für die Versuche wurden jedesmal 5 ccm Salzsäure (von 0,0292, 0,05967, 0,1156 und 0,2348 n) mit 50 mg Pepsin oder Albumosen versetzt. Dieses kleine Volumen genügte zu je zwei Bestimmungen von  $C_H$  und  $C_{Cl}$ . Das Pepsin löste sich bei 37° in der Salzsäure, besonders der niederen Konzentration, nicht ganz und zumal bei Abkühlung auf Zimmertemperatur schied sich ein Teil wieder ab. Die Lösung wurde filtriert und das Filtrat für die Bestimmungen verwendet. Das Filter wurde mit 30%igem Alkohol ausgewaschen. Nach Trocknen des auch früher schon gewogenen Filters konnte annähernd die Pepsinkonzentration der Lösung durch Wägung des nicht Gelösten bestimmt werden.

Umstehende Tabelle VI gibt eine Übersicht der Messungen und die daraus erhaltenen Resultate.

Wenn wir nun das Zahlenmaterial übersehen, so fällt uns erstens auf, daß die gebundenen H- und Cl-Ionen nicht ganz regelmäßig mit der Salzsäurekonzentration ansteigen. Wiederholung der Bestimmungen (bei 4, 7, 9, 11) gab aber keine Abweichung von den schon erhaltenen Zahlen. Das macht es etwas unsicher, ob man diese anscheinende Unregelmäßigkeit Messungsfehlern zuschreiben darf, obgleich die Messungen an diesen ziemlich stark sauren Lösungen bedeutende Schwierigkeiten aufboten und es außerdem sich um sehr kleine Mengen handelt. Jedenfalls ist die Übereinstimmung der Resultate der Messungen bei den einzelnen Lösungen eine sehr gute. Die letzte Vertikalreihe gibt aber die für uns jetzt wichtigsten Zahlen, und hier finden wir eine regelmäßige Anordnung. Wir sehen, daß im großen und ganzen das Verhältnis der Bindungen H/Cl bei Pepsin und Albumosen dasselbe ist. Wir sehen aber auch, daß außer bei der stärksten Salzsäure 0,235 n das Verhältnis bei Pepsin doch regelmäßig etwas kleiner ist. Müssen wir das dem Zufall zuschreiben oder hat dieser Befund doch eine Bedeutung? Weil es bei allen drei ersten Salzsäurekonzentrationen regelmäßig

Tabelle VI.  
Messung der an Pepsin (D) und Albumosen gebundenen H- und Cl-Ionen.

Ver- suchs- Nr.	Lösung von	Messung C <sub>H</sub>			Messung C <sub>Cl</sub>			Mittelwerte		Gebunden pro Liter		Verhältnis der gebundenen Ionen- mengen H/Cl
		π (-)	PH	C <sub>H</sub>	π (-)	PCl	C <sub>Cl</sub>	C <sub>H</sub>	C <sub>Cl</sub>	H	Cl	
1	reine Salzsäure, 0,0292 n	0,1808	1,520	0,0302	0,6355	1,527	0,0297	0,0302	0,0289			
2	dieselbe Säure mit 1% Albumosen	0,1628	1,833	0,0147	0,6414	1,631	0,0234	0,0146	0,0238	0,0156	0,0051	3,06
3	dieselbe Säure mit 0,7% Pepsin	0,1694	1,719	0,0191	0,6402	1,610	0,0246	0,0191	0,0251	0,0111	0,0037	3,00
4	reine Salzsäure, 0,0597 n	0,1978	1,226	0,0595	0,6175	1,217	0,0607					
		0,1977	1,228	0,0592	0,6171	1,210	0,0617	0,0594	0,0615			
5	dieselbe Säure mit 1% Albumosen	0,1895	1,370	0,0427	0,6232	1,315	0,0484	0,0421	0,0493	0,0173	0,0122	1,42
		0,1888	1,382	0,0415	0,6223	1,299	0,0502					
6	dieselbe Säure mit 7,2% Pepsin	0,1941	1,291	0,0512	0,6206	1,269	0,0538	0,0512	0,0554	0,0082	0,0061	1,34
		0,1941	1,291	0,0512	0,6192	1,245	0,0569					

Tabelle VI. (Fortsetzung.)

Ver- suchs- Nr.	Lösung von	Messung C <sub>H</sub>			Messung C <sub>Cl</sub>			Mittelwerte		Gebunden pro Liter		Verhältnis der gebundenen Ionenmengen H/Cl
		$\pi$ (-)	PH	C <sub>H</sub>	$\pi$ (-)	PCl	C <sub>Cl</sub>	C <sub>H</sub>	C <sub>Cl</sub>	H	Cl	
7	reine Salzsäure. 0,1156 n	0,2137	0,949	0,1124	0,6037	0,977	0,1051	0,1115	0,1087			
		0,2133	0,957	0,1105	0,6024	0,954	0,1112					
					0,6028	0,961	0,1095					
8	dieselbe Säure mit 1% Albumosen	0,2107	1,002	0,0995	0,6057	1,0109	0,0975	0,0990	0,0975	0,0125	0,0112	1,12
		0,2104	1,007	0,0984	0,6057	1,0109	0,0975					
9	dieselbe Säure mit 0,88% Pepsin	0,2116	0,986	0,1032	0,6041	0,983	0,1039	0,1037	0,1010	0,0078	0,0077	1,01
		0,2114	0,990	0,1023	0,6054	1,007	0,0985					
		0,2118	0,983	0,1041	0,6049	0,997	0,1008					
		0,2121	0,978	0,1052	0,6049	0,997	0,1008					
10	reine Salzsäure, 0,2348 n	0,2319	0,634	0,2322	0,5854	0,659	0,2193	0,2322	0,2210			
		0,2319	0,634	0,2322	0,5850	0,652	0,2227					
11	dieselbe Säure mit 1% Albumosen	0,2292	0,6808	0,2085	0,5887	0,717	0,1919	0,2085	0,1904	0,0237	0,0306	0,77
		0,2292	0,6808	0,2085	0,5895	0,731	0,1859					
					0,5885	0,714	0,1934					
12	dieselbe Säure mit 0,98% Pepsin	0,2303	0,663	0,2172	0,5867	0,681	0,2083	0,2142	0,2044	0,0180	0,0166	1,08
		0,2296	0,675	0,2112	0,5876	0,698	0,2004					



und in derselben Größenordnung zurückkehrt, möchte ich diesen Differenzen doch jede Bedeutung nicht enthalten. Daß es bei der stärksten Salzsäurekonzentration nicht zutrifft, braucht uns nicht allzusehr zu wundern, weil hier doch die Fehlerquellen der Methode am größten sind. Wenn wir dies annehmen, so lehren uns diese Versuche folgendes:

Im großen und ganzen ist die Bindung von H- und Cl-Ionen in Salzsäurelösungen an Pepsin und an Albumosen nicht verschieden; bei genauer Betrachtung jedoch zeigen sich doch kleine Differenzen insofern, als das Verhältnis der H- und der Cl-Ionenbindung bei Pepsin ein wenig kleiner ist, was darauf hinweist, daß relativ an Pepsin etwas mehr Cl-Ionen oder etwas weniger H-Ionen gebunden werden. Das würde für die Auffassung, daß im Pepsin eine Verbindung vorliegt, wichtig sein. Der, was das Gewicht anbetrifft, hauptsächlichste Bestandteil, der Eiweißstoff, verhält sich wie die Albumosen, das eigentliche Enzym dagegen bindet nur Cl-Ionen und ist also immer negativ geladen. Wir sehen also, daß diese Versuche eine nicht unwichtige Stütze für diese Auffassung beibringen. Aber auch wenn wir von den genannten kleinen Differenzen absehen, ist doch der Umstand, daß das Enzym immer negativ, das Pepsin im ganzen aber wegen des Verhältnisses  $H/Cl > 1$  positiv geladen ist, schwer mit der Annahme, daß es nicht eine Eiweißverbindung sei, in Einklang zu bringen.

Die Versuche zeigen uns weiter noch einmal, daß die Dissoziation des Eiweißchlorids bei zunehmender Säurekonzentration immer kleiner wird und schon bei einer Konzentration 0,116 n in dieser etwa 1%igen Eiweißlösungen den Wert 0 nähert, denn hier nähert sich das Verhältnis  $H/Cl$  dem Wert eins. Hier wird also das Eiweiß wieder allmählich ungeladen, was mit den Resultaten der Quellungs- und Viskositätsversuche völlig im Einklang steht. (Siehe weiter unten die Viskositätsbestimmungen in Eiweißlösungen.)

Zum Schluß möchten wir demjenigen, der auf die hier beigebrachten Gründe für die Hypothese, daß das Pepsin eine Eiweißverbindung sei, kein großes Gewicht legen möchte, be-

merken, daß das Pepsin während seiner Abscheidung immer mit Säure, es sei denn Salzsäure, es sei Oxalsäure in Berührung gewesen ist und daß die negative Ladung also von schon bei der Darstellung gebundenen Anionen herrühren könnte. Auch wenn wir jetzt keine Differenzen im Verhältnis H/Cl finden möchten, könnte also doch das eigentliche Enzym schon früher Anionen gebunden haben.

Fassen wir nun unsere bisherigen Resultate über das merkwürdige Verhalten des Pepsins zusammen, so können wir sagen:

1. Das Pikelharingsche Pepsin hat keinen iso-elektrischen Punkt, es ist in sauren Lösungen immer negativ geladen.

2. Das Pepsin bindet sich an Eiweißstoffe und Albumosen, kurz an die Körper, auf die es eine enzymatische Wirkung ausübt, zu einem größeren oder kleineren Teil. Es täuscht dann einen iso-elektrischen Punkt vor, ebenso wie die unreinen Handelspräparate. Auch in solchen Lösungen bewegt sich aber ein Teil (das nicht gebundene) zur Anode. Merkwürdigerweise bindet es sich nicht an Aminosäuren, obgleich die entgegengesetzte Ladung eine Bindung (oder Adsorption) erwarten lassen würde.

3. Die Bindung von H- und Cl-Ionen an Pepsin und Albumosen ist im großen und ganzen nicht verschieden, in schwach sauren Lösungen werden viel mehr H- als Cl-Ionen gebunden, bei zunehmender Säurekonzentration gleichen sich die Bindungen immer mehr aus, bis sie bei etwa 0,1 n HCl und 1% Eiweiß nahezu gleich sind. Dieses Verhalten des Pepsins ist mit seiner negativen Ladung nicht in Übereinstimmung; man wird geneigt sein, die alte Vermutung von Pikelharing, daß im Pepsin eine Verbindung vorliegt von einem zwar besonderen Eiweißkörper und dem Enzym, wieder aufzunehmen. Umsomehr als bei genauer Betrachtung das Pepsin doch vielleicht etwas mehr Chlor als die Albumosen bindet. Der Eiweißkörper würde sich, was die Ionenbindungen anbetrifft, wie die Albumosen, das Enzym aber anders verhalten, insofern dieses nur Cl- (im allgemeinen Anionen) Ionen bindet. Dessen Menge ist aber wohl sehr gering.

4. Mit dieser Hypothese ist das Verhalten im elektrischen Felde nicht im Widerspruch, das Enzym bewegt sich anodisch, die Hauptmenge des Eiweißes aber kathodisch. Die Verbindung ist wohl zum Teil immer auseinandergefallen.

5. Die Besonderheit, daß das Pepsin ein Flockungsoptimum besitzt, muß so erklärt werden, daß der Eiweißstoff dieses aufweist. Bei dieser Reaktion der Lösung ist aber das Enzym am Eiweiß gebunden, oder jedenfalls wenn das Eiweiß ausfällt, geht das Enzym mit in den Niederschlag (wenigstens zum größten Teil).

6. Die (von Pikelharing entdeckte) eigentümliche Pepsinreaktion, Koagulation bei schnellem Erhitzen in salzsaurer Lösung, völlig parallel der Zerstörung des Enzyms, wird wahrscheinlich von der Verbindung gegeben. Bei sehr langsamer Erwärmung jedoch tritt keine Koagulation auf.

Ich habe also jetzt die erste der zwei Fragen von Seite 197 beantwortet und zwar in bejahendem Sinne; und jetzt gehe ich an die zweite: kann man, falls die auf den ersten Blick sehr interessanten Betrachtungen über die Wirkungsbedingungen des Pepsins von Leonor Michaelis nicht alle aufrecht erhalten werden können, sich diese Bedingungen noch auf irgend eine andere Weise klar machen?

Die theoretischen Betrachtungen über die Wirkungsbedingungen der Enzyme und besonders des Pepsins von Michaelis sind oben schon in aller Kürze besprochen. Zusammen mit A. Mendelssohn<sup>1)</sup> hat er neuerdings das Reaktionsoptimum in Lösungen verschiedener Säuren (HCl, Weinsäure, Oxalsäure, HNO<sub>3</sub>) für die Pepsinwirkung studiert. Sörensen<sup>2)</sup> hatte in Salzsäurelösung für das Optimum etwa  $p_H = 1,6$ , Michaelis und Davidsohn hatten früher<sup>3)</sup>  $p_H = 1,8$  gefunden. Michaelis und Mendelssohn finden jetzt, daß die Pepsinwirkung wesentlich nur von der H-Ionenkonzentration abhängig ist, daß also die Säure-Anionen nur eine sehr untergeordnete

<sup>1)</sup> Biochemische Zeitschrift, Bd. 65, S. 1 (1914).

<sup>2)</sup> Biochemische Zeitschrift, Bd. 21, S. 131 (1909).

<sup>3)</sup> Zeitschrift für experimentelle Pathologie und Therapie, Bd. 8 (1910).



Rolle spielen. Das Reaktionsoptimum ist in Lösungen von allen genannten Säuren dasselbe und zwar etwa  $p_H = 1,398$ . Die Autoren haben weiter den Einfluß von einigen Neutralsalzen (NaCl, KCl, LiCl) studiert und gefunden, daß durch diese Salze eine minimale Verschiebung des Optimums nach der weniger sauren Seite zustande kommt. Wie schon oben gesagt, wird dieses Verhalten so gedeutet, daß die Pepsinwirkung von der Ladung abhängig sei. Die einwertig positiv geladenen Pepsinpartikeln (Kationen) wirken, vielleicht nicht die zweiwertigen, und so würde die Wirkungsabnahme bei zunehmender Säurekonzentration zu erklären sein. Michaelis vermutet, daß an der andern Seite des iso-elektrischen Punktes, wo das Pepsin also negativ geladen sei (Anionen), die Labwirkung ausgeübt wird.

Es fragt sich aber, wie diese Sachen stehen, wenn man annehmen muß, daß von einem iso-elektrischen Punkt bei Pepsin nicht die Rede sein kann. Aber auch übrigens fällt uns in diesen Anschauungen Michaelis auf, daß der Zustand der zu verdauenden Stoffe ganz außer acht gelassen wird. Es ist doch im voraus zu erwarten, daß dieser Zustand auch für die Enzymwirkung wichtig sein muß. Jedenfalls schien es mir erwünscht, die Untersuchungen von Michaelis mit unserem Pepsin zu wiederholen und auszubreiten. Dazu habe ich jetzt die Pepsinwirkung in Lösungen einer ziemlich großen Anzahl von Säuren, daneben auch den Einfluß von Salzen studiert. Dabei habe ich im speziellen auch dem Zustand des Substrats Rechnung getragen.

### Zweite Abteilung.

#### 5. Untersuchungen über die Wirkungsbedingungen des Pepsins in Lösungen verschiedener Säuren.

Die Pepsinwirkung in ihrem ganzen Umfang richtig zu studieren, ist keineswegs einfach. Nach einer Anzahl Vorversuchen habe ich für meine ersten Versuchsreihen mich der Methode von Grützner bedient, zumal da diese sich in unserem Laboratorium als sehr bequem und genügend zuverlässig herausgestellt hatte. Mit Karmin gefärbtes Fibrin wird einige

Zeit der Enzymwirkung überlassen, man filtriert und vergleicht kolorimetrisch die Farbintensität der Lösung mit irgend einer willkürlichen, aber in derselben Weise hergestellten Vergleichslösung. Die Methode hat für meinen Zweck Vorteile, aber auch Nachteile. Vorteile sind die Leichtigkeit der Ausführung, besonders aber die kurze Zeitdauer der Versuche. Demgemäß hat man einer Wirkungsabnahme des Pepsins durch Enzymzerstörung kaum Rechnung zu tragen. Ein Nachteil ist aber, daß man eigentlich nur die Lösung des Fibrins beobachtet, die tieferen Eiweißspaltungen aber sich der Beobachtung entziehen. Ich glaube aber, daß das Lösen des Fibrins auf wesentlich demselben Prozeß beruht wie die weiteren Spaltungen, und ich meine, daß man nicht berechtigt ist, wie bisweilen getan wird, die Lösung und die späteren Spaltungen als etwas wesentlich Verschiedenes anzusehen, ja sie sogar der Wirkung verschiedener Enzyme zuzuschreiben. Wenn man dies annimmt, dann gilt also dieser Nachteil der Grütznerschen Methode nicht. Die Lösung des Fibrins ist dann wirklich ein Maß für die Enzymwirkung. Ein weiterer Nachteil ist der, der für alle kolometrische Verfahren gilt, nämlich daß sie nicht sehr genau sein können. Ich habe aber für den vorliegenden Zweck, wobei es nicht auf absolute Werte, sondern nur auf vergleichende Bestimmungen ankommt, genügend genaue Resultate erhalten. Ein besonderer Vorteil der Methode ist noch, daß man im Volumen des Karminfibrins vor der Enzymwirkung ein Bild vom Zustande des Eiweißes hat. Selbstverständlich kann man keineswegs das absolute Volumen ablesen, aber man kann ziemlich genau den Quellungsgrad, bei verschiedenem Säuregrade z. B., mit einander vergleichen. Um den Einfluß der Säurekonzentration auf die Quellung, das Auftreten eines Quellungsmaximums und den Einfluß von Salzen für Vorlesungszwecke zu demonstrieren, mache ich auch von Karminfibrin Gebrauch. Ich fand, daß bei völlig gleicher Behandlung, Schütteln usw., der Quellungsgrad genügend verglichen werden kann. Nur bei sehr hohem spezifischen Gewicht der Lösung (große Säure- oder Salzkonzentration) muß man erwarten, daß das Fibrin sich weniger gut absetzt.

Das Karminfibrin wurde aus gut ausgewaschenem, sodann längere Zeit dialysiertem Fibrin dargestellt. Es wurde mit einer starken neutralen Karmin-Ammoniak-Lösung gefärbt, nachdem es in sehr feine Stückchen zerschnitten war. Nach dem Färben wurde es so lange (einige Tage) mit strömendem Leitungswasser (das hiesige Leitungswasser enthält nur Spuren von gelösten Stoffen) gewaschen, bis die äußerst geringe Farbe des ablaufenden Wassers nicht mehr abnahm. Dann wurde es noch einige Zeit mit destilliertem Wasser gewaschen. Sodann wurde es «in vacuo» getrocknet und zuletzt äußerst fein gepulvert. Dieses Präparat gab an Wasser und verdünnte Säuren in nicht allzu langer Zeit nur unmerkliche (wenigstens im Reagenzrohr) Spuren Farbstoff ab.

**Ausführung der Versuche.** In eine Reihe von möglichst gleich weiten Reagenzröhren wurden je 50 mg Karminfibrin gebracht, sodann Wasser und Säure in zunehmenden Mengen, aber so, daß das Gesamtvolumen von Wasser und Säure immer 8 ccm war. Unter zeitweiligem Schütteln ließ ich die Röhren 30 Minuten stehen. Dann wurden zu jedem Röhren 2 ccm einer Pepsinlösung (D) von 10 mg Pepsin in 50 ccm einer sehr verdünnten Lösung der betreffenden Säure zugegeben. Der Inhalt von jedem Röhren wurde nach einer genau bestimmten Zeit, für die meisten Versuchsreihen 5—10 Minuten, bisweilen aber mehr, in der jede Minute gründlich geschüttelt wurde, durch Glaswolle filtriert. Also in allen Röhren einer selben Versuchsreihe wirkte das Pepsin gleich lange Zeit, z. B. 5 oder 10 Minuten. Die Filtrate wurden mit Hilfe des sehr bequemen Grütznerschen Kolorimeters mit einer aus demselben Karminfibrin, derselben Säure und Pepsinlösung, im übrigen aber von einer willkürlichen, aber größeren Farbinintensität verglichen. Öfters wurde die  $C_H$  der Filtrate bestimmt. In einer besonderen Versuchsreihe, wobei eine durch sehr allmähliches Erhitzen inaktivierte, aber nicht koagulierte Pepsinlösung verwendet wurde, habe ich auch die  $C_H$  der Filtrate und somit der Lösungen vor der Pepsinwirkung bestimmt. In dieser Reihe waren die verschiedenen Säuren in ihren optimalen Konzentrationen gebraucht. In dieser Weise konnte ich auch ein



Bild der Änderung der Reaktion während der Pepsinwirkung bekommen. Um die Quellung des Fibrins in vergleichender Weise zu bestimmen, wurde öfters die Höhe der gequollenen Fibrinsäule gemessen. Diese Höhen wurden dann auf eine bestimmte Röhrenweite umgerechnet, weil die Reagenzröhrchen niemals genau gleich weit sind. Als Säuren habe ich Salzsäure, Oxalsäure, Milchsäure, Phosphorsäure, Schwefelsäure, Essigsäure und Citronensäure gebraucht. Die folgenden Tabellen geben zunächst die mit Salzsäure erhaltenen Resultate.

Tabelle VII.

Erste Versuchsreihe mit Salzsäure. Pepsinlösung: 10 mg in 50 ccm Salzsäure 0,005 n. 50 mg Karminfibrin. Zu jedem Röhrchen 2 ccm Pepsinlösung. Digestionsdauer 10 Minuten. Zimmertemperatur etwa 15°.

Ver- suchs- Nr.	Was- ser ccm	Salz- säure 0,25 n ccm	Quellung	Norma- lität Salz- säure	Skala Kolori- meter	Bemerkungen
1	8	0	0	0,0010	0	Spur gefärbt, nicht zu bestimmen.
2	7,9	0,1	stark zunehmend	0,0035	0	Etwas mehr gefärbt, nicht zu be- stimmen.
3	7,8	0,2	›	0,0060	0,4	Die Quellung nahm von 2 an stark zu. Das Maximum lag anscheinend bei 7. Die Quellung zeigte genau den- selben Verlauf wie die Pepsinwirkung. zuerst stark ansteigend, beim Maxi- mum einige Zeit gleich bleibend und dann sehr allmählich abnehmend.
4	7,7	0,3	›	0,0085	1,3	
5	7,6	0,4	›	0,0110	1,8	
6	7,5	0,5	›	0,0135	2,7	
7	7,4	0,6	maximal	0,0160	2,5	
8	7,2	0,8	etwas abnehmend	0,0210	2,2	
9	7,0	1,0	›	0,0260	2,3	
10	6,8	1,2	›	0,0310	2,1	

Wir sehen, daß  $C_H$  in 5 und 6 (Tabelle IX) wieder etwas abnimmt, ungeachtet, daß die Enzymwirkung hier etwas geringer ist. Weiter hat sich gezeigt, daß die Enzymwirkung und ebenso die Quellung zuerst mit steigender Säurekonzentration stark ansteigt. Nach Überschreitung des Maximums gehen beide nur sehr allmählich wieder zurück. Deshalb ist es schwierig, das Reaktionsoptimum genau zu bestimmen, man hat eine opti-

Tabelle VIII.

Zweite Versuchsreihe mit Salzsäure. Konzentrationen und Bedingungen wie in der Tabelle VII.

Ver- suchs- Nr.	Wasser ccm	Salz- säure 0,25 n ccm	Quellung	Norma- lität Salzsäure	Skala Kolori- meter	Bemerkungen
1	7,6	0,4	etwas zunehmend	0,0110	6,2	
2	7,55	0,45	›	0,0123	6,7	
3	7,50	0,50	›	0,0135	7,2	
4	7,45	0,55	›	0,0148	7,7	
5	7,40	0,60	maximal	0,0160	8,0	
6	7,20	0,80		0,0210	7,2	

Tabelle IX.

Dritte Versuchsreihe mit Salzsäure. Bedingungen wie in Tabelle VII.

Ver- suchs- Nr.	Was- ser ccm	Salz- säure 0,25 n ccm	Quellung	Nor- malität Salz- säure	Skala Kolori- meter	Bestimmung C <sub>H</sub> nach der Pepsinwirkung				ge- bunden
						π (--)	P <sub>H</sub>	C <sub>H</sub>	C <sub>H</sub> der Salz- säure	
1	7,55	0,45	etwas zunehmend	0,0123	4,7	0,1053	2,976	0,00106	0,01107	0,010
2	7,50	0,50	›	0,0135	5,0	0,1213	2,700	0,00200	0,01215	0,011
3	7,45	0,55	›	0,0148	5,1	0,1368	2,431	0,00371	0,01332	0,0096
4	7,40	0,60	maximal	0,0160	5,2	0,1376	2,417	0,00338	0,01440	0,0106
5	7,30	0,70	Spur abnehmend	0,0185	5,05	0,1354	2,455	0,00351	0,01665	0,0131
6	7,20	0,80	›	0,0210	4,9	0,1347	2,468	0,00341	0,01890	0,0155

male Reaktionsbreite. Schon aus diesen Versuchen wird man geneigt sein, den Schluß zu ziehen, daß das Reaktionsoptimum nicht vom Zustand des Enzyms, sondern vom Zustand des Eiweißes bedingt wird. Alle weiteren Versuche haben das bestätigt. Das maximal gequollene Eiweiß bietet zuerst dem Enzym die größte Oberfläche, daneben ist das Wasser, welches für die Spaltung benötigt ist, hier sozusagen schon in das

(geladene) Eiweißmolekül innig aufgenommen. In Lösungen von Salzsäure bei 10 Minuten Digestionsdauer und bei etwa  $15^{\circ}$  finde ich hier die optimale Wirkung bei einer Reaktion, die am Ende der Digestion  $p_H = 2,42$  oder  $C_H = 0,0038$  war. Wir werden später sehen, daß anfangs die Reaktion hier  $0,0088$  ( $p_H = 2,054$ ) beträgt. Ungeachtet der reaktionsregulierenden Wirkung des Eiweißes hat sich die Reaktion bei der Lösung und Digestion doch von  $0,0088$  bis  $0,0038$  verschoben. Ich möchte hier bemerken, daß man bei der jetzigen verhältnismäßig leichten und sehr genauen Bestimmung der  $C_H$  ein Mittel hat, um die Digestion durch Pepsin zu kontrollieren, wo die Formoltitrierung versagt.

Das Reaktionsoptimum bei  $15^{\circ}$  in Salzsäure, das ich hier gefunden habe, ist nicht zu sehr von demjenigen von Sørensen oder Michaelis verschieden.

Wir wollen nun sehen, wie es mit den anderen Säuren steht. Die folgende Tabelle gibt die Resultate der Versuche mit Oxalsäure.

Tabelle X.

Versuchsreihe mit Oxalsäure. Pepsinlösung: 10 mg in 50 ccm Oxalsäure 0,02 n. 50 mg Karminfibrin. Zu jedem Röhrchen 2 ccm Pepsinlösung. Digestionsdauer 10 Minuten. Temperatur etwa  $15^{\circ}$ .

Versuchs-Nr.	Wasser ccm	Oxal-säure 0,2 n ccm	Quellung ccm	Norma-lität Oxalsäure	Skala Kolori-meter	Bestimmung $C_H$ nach der Pepsinwirkung		
						$\pi$ (-)	$p_H$	$C_H$
1	7,5	0,5	starke Zunahme	0,014	0,7	0,0407	4,096	0,0000801
2	7,0	1,0	„	0,024	2,0	0,0814	3,392	0,000406
3	6,5	1,5	maximal	0,034	2,7	0,1406	2,364	0,00132
4	6,0	2,0		0,044	2,5	0,1508	2,187	0,00650
5	5,5	2,5	langsame Abnahme	0,054	2,3	0,1546	2,123	0,00754
6	5,0	3,0	„	0,064	2,1	0,1646	1,949	0,01124
7	4,5	3,5	„	0,074	2,0	—	—	—
8	4,0	4,0	„	0,084	1,5	0,1743	1,781	0,0166
9	3,0	5,0	„	0,104	1,4	—	—	—
10	2,0	6,0	„	0,124	1,3	0,1848	1,599	0,0252



Quellung und Enzymwirkung gehen wieder parallel. Die optimale Reaktion war hier nach Ablauf der Digestion 0,00432, also praktisch identisch mit der der Salzsäure. Das Oxalsäureanion übt also keine besondere Wirkung auf Quellung und Digestion aus. Die optimale Reaktion vor der Pepsinwirkung ist hier (siehe weiter unten)  $C_H = 0,00746$ .

Folgende Tabelle gibt die Resultate der Versuche mit Milchsäure.

Tabelle XI.

Erste Versuchsreihe mit Milchsäure. 10 mg Pepsin (D) in 50 ccm Milchsäure 0,021 n. Die zu den Versuchen verwendete Milchsäure war 3 n. Wieder 50 mg Karminfibrin. Digestionsdauer 5 Minuten. Temperatur 15°.

Ver- suchs- Nr.	Wasser ccm	Milch- säure 3 n ccm	Quel- lung cm	Norma- lität Milch- säure	Skala Kolori- meter	Bemerkungen
1	7,95	0,05	1,78	0,019	0,4	Hier, wo die Quellung gemessen ist, zeigt sich besonders deutlich der parallele Verlauf von Quellung und Pepsinwirkung; zuerst scharfer Anstieg, dann nur sehr langsame Abnahme.
2	7,70	0,30	3,08	0,094	3,3	
3	7,60	0,40	3,70	0,124	4,2	
4	7,40	0,60	3,76	0,184	3,8	
5	7,20	0,80	3,45	0,244	3,7	
6	7,00	1,00	3,59	0,304	3,3	Bei dieser Säure sieht man, daß die Normalität sehr hoch werden muß, um die Quellung und damit die Pepsinwirkung merklich herabzudrücken.
7	6,50	1,50	3,21	0,454	3,2	
8	4,00	4,00	2,78	1,204	1,7	
9	2,00	6,00	2,66	1,804	1,0	
10	0	8,00	2,05	2,404	0,8	

In Tabelle XII sieht man, daß die Quellungsreihe nicht ganz regelmäßig ist, das ist aber bei einer so rohen Methode auch wohl nicht immer möglich. Maxima von Quellung und Pepsinwirkung fallen aber zusammen. Das Reaktionsoptimum liegt hier bei  $C_H = 0,0023$ . Vor der Pepsinwirkung war die Reaktion dabei 0,00618. Man bekommt den Eindruck, daß bei Milchsäure das Optimum ein wenig niedriger als bei Salzsäure und Oxalsäure liegt. Es läßt sich aber nicht sehr genau bestimmen, weil die «Optimalbreite» so groß ist.

Tabelle XII.

Zweite Versuchsreihe mit Milchsäure. Bedingungen wie oben.

Ver- suchs- Nr.	Wasser ccm	Milch- säure 3 n ccm	Quel- lung ccm	Norma- lität Milch- säure	Skala Kolori- meter	Messungen von $p_H$ nach der Pepsinwirkung		
						$\pi$ (-)	p	$C_H$
1	7,80	0,20	2,63	0,064	4,4	0,0951	3,154	0,000701
2	7,70	0,30	3,12	0,094	5,65	0,1055	2,973	0,001064
3	7,60	0,40	3,46	0,124	5,70	0,1181	2,755	0,00176
4	7,50	0,50	3,28	0,154	5,80	0,1181	2,755	0,00176
5	7,40	0,60	3,49	0,184	6,00	0,1250	2,635	0,00232
6	7,30	0,70	3,33	0,214	5,60	0,1266	2,607	0,00247
7	7,20	0,80	3,24	0,244	5,50	0,1418	2,459	0,00348
8	7,00	1,00	3,25	0,304	5,30	0,1415	2,452	0,00353
9	6,50	1,50	3,30	0,454	5,20	0,1275	2,211	0,00616

Wir gehen jetzt zu den Versuchen mit Phosphorsäure über. Die gebrauchte Phosphorsäurelösung war 0,5945 n (als 2-basische Säure betrachtet). 10 mg Pepsin (wie immer D) wurden in 50 ccm Phosphorsäure 0,0594 n gelöst. Digestionsdauer 6 Minuten, Temperatur 15°.

Tabelle XIII.

Versuche mit Phosphorsäure. 50 mg Karminfibrin.  
Digestionsdauer 6 Minuten.

Ver- suchs- Nr.	Wasser ccm	Phos- phor- säure 0,5945 n ccm	Quel- lung ccm	Norma- lität Phos- phor- säure	Skala Kolori- meter	Messungen von $p_H$ nach der Pepsinwirkung		
						$\pi$ (-)	p	$C_H$
1	7,5	0,5	2,40	0,0417	2,8	0,1186	2,746	0,00179
2	7,0	1,0	2,90	0,0714	3,05	0,1471	2,253	0,00559
3	6,75	1,25	3,00	0,0863	3,25	0,1539	2,135	0,00733
4	6,5	1,5	2,90	0,1011	3,00	0,1590	2,045	0,00901
5	6,0	2,0	2,55	0,1309	2,90	—	—	—
6	5,0	3,0	2,30	0,1904	2,70	0,1771	1,732	0,01854
7	4,0	4,0	2,25	0,2498	2,20	—	—	—
8	3,0	5,0	2,10	0,3093	2,25	0,1872	1,556	0,02777

Maxima von Quellung und Digestion fallen wieder zusammen, auch übrigens ist hier der Parallelismus zwischen Quellung und Pepsinwirkung besonders treffend. Reaktionsoptimum 0,00733. Vor der Pepsinwirkung 0,0113. Hier ist das Optimum im Vergleich mit den vorigen Säuren ohne Zweifel nach der saureren Seite verschoben. Auch hier wieder die äußerst langsame Abnahme bei stärker saurer Reaktion.

Tabelle XIV.

Versuche mit Schwefelsäure. 50 mg Karminfibrin.  
Schwefelsäure 0,5135 n. 10 mg Pepsin (D) in 50 ccm Schwefelsäure 0,01 n.  
Digestionsdauer 120 Minuten.

Versuchs-Nr.	Wasser ccm	Schwefel- säure 0,5135 n ccm	Quellung	Normalität Schwefel- säure	Skala Kolori- meter	Messungen von pH nach der Pepsinwirkung		
						$\pi$	p	$C_H$
1	7,97	0,03	Läßt sich nicht messen, dazu ist sie zu gering. Man kann aber sehen, daß sie den gewöhnlichen Typus aufweist, schnelles Steigen, langsames Abklingen. Bei 3 ist sie sicher maximal.	0,00354	0,7	+ 0,1865	8,035	$0,922 \times 10^{-8}$
2	7,90	0,10		0,00714	3,1	+ 0,2521	9,173	$0,671 \times 10^{-9}$
3	7,80	0,20		0,01227	5,6	- 0,0507	3,924	$0,119 \times 10^{-3}$
4	7,70	0,30		0,01740	4,9	- 0,1102	2,892	$0,128 \times 10^{-2}$
5	7,50	0,52		0,02767	4,4	- 0,1520	2,167	$0,681 \times 10^{-2}$
6	7,20	0,80		0,04308	4,2	- 0,1701	1,853	$0,140 \times 10^{-1}$
7	7,00	1,00		0,05335	3,7	- 0,1799	1,684	$0,207 \times 10^{-1}$
8	6,50	1,50		0,07901	3,7	- 0,1909	1,493	$0,322 \times 10^{-1}$

Diese Versuche mit Schwefelsäure sind besonders wichtig. Wir wissen, daß das  $SO_4$ -Anion zu den stärksten hydrophilen Säuren gehört, daß es die Quellung sehr stark erniedrigt. Es war also im voraus zu erwarten, daß bei Schwefelsäure die Pepsinwirkung erstens bedeutend geringer und zweitens, daß das Reaktionsoptimum nach der Seite der kleineren Konzentrationen verschoben sein würde. Denn schon in ziemlich niedrigen Konzentrationen wird der Einfluß des zweiwertigen  $SO_4$ -Anions überwiegend und geht die Quellung und damit die Pepsinwirkung wieder zurück. Die Versuche bestätigen, wie man sieht, vollauf diese Erwartung. Das Optimum liegt hier bei etwa  $C_H = 0,00012$  nach und  $0,004$  vor der Pepsinwirkung.



Eine Besonderheit bei diesen Versuchen ist noch, daß bei sehr niedrigen Schwefelsäurekonzentrationen die Reaktion nicht nur nicht sauer, sondern deutlich alkalisch ist. Das muß wohl so erklärt werden, daß Schwefelsäure die kleine Menge Ammoniak, welche noch immer an das Karmin gebunden war, durch besondere Adsorptionswirkungen in Freiheit setzt. Im übrigen sehen wir aufs deutlichste, daß in Schwefelsäure, wo die Quellung so außerordentlich gering ist, auch die Enzymwirkung entsprechend klein ist.

Bei den anderen Säuren genügten 5 bis 10 Minuten, um eine sehr deutliche Wirkung zu bekommen, jetzt aber habe ich nicht weniger als 120 Minuten einwirken lassen müssen. Wir wollen hier gleich bemerken, was unten noch weiter an Versuchen gezeigt werden soll, daß sich von unserem Gesichtspunkt, daß zwischen Quellung und Pepsinwirkung ein inniger Zusammenhang besteht, sofort auch die Salzwirkungen klar machen lassen. Die Salze können erstens Einfluß auf die Wasserstoffionenkonzentration ausüben, aber weiter haben die Salze, das heißt die Salzionen, Kationen sowohl als Anionen, verschiedenen Einfluß auf die Quellung, man denke nur an die sogenannten lyophilen (hydrophilen) Salz- oder besser Ionenreihen. Es ist also zu erwarten, daß Salze mit Ionen, die besonders lyophil (hydrophil) sind, und die Quellung also besonders niederdrücken, auch die Pepsinwirkung sehr ungünstig beeinflussen müssen. Und nun ist schon lange bekannt, daß eben Sulfaten diese Eigenschaft in besonders hohem Grade zukommt. Wir wollen weiter unten sehen, wie man, was ihre Wirkung auf die Pepsinwirkung anbetrifft, die Salzionen auch in eine bestimmte Reihe, die parallel mit der Wirkung auf die Quellung geht, anordnen kann.

Ich komme jetzt zu den folgenden Säuren und zwar zur Essigsäure. Diese Säure hat mir auch ein charakteristisches Verhalten gezeigt. Es war bei dieser Säure nicht möglich, ein deutliches Maximum der Quellung zu beobachten. Ja, das Karminfibrin quillt in Eisessig noch sehr deutlich. Dieses Verhalten befremdete mich anfangs, aber es zeigte sich, daß Quellung nicht nur in Wasser mit wenig Essigsäure, sondern

auch in Essigsäure mit kleinen Mengen Wasser stattfindet. Beide Arten von Quellung gehen allmählich ineinander über, wenn man zu Wasser immer mehr Essigsäure gibt. Nun habe ich bei dieser Säure nur bis zu einer gewissen Essigsäurekonzentration einen Parallelismus zwischen Quellung und Pepsinwirkung gefunden, aber oberhalb dieser Konzentration geht zwar die Enzymwirkung zurück, aber die Quellung nicht. Ich glaube, dieses Verhalten in folgender Weise erklären zu müssen. In Essigsäure-Wassergemischen haben wir zweierlei Arten von Quellung. In wasserreichen Lösungen quillt das Eiweiß durch Wasseraufnahme, in essigsäurereichen-wasserarmen Lösungen durch Essigsäureaufnahme. Wasser und Essigsäure haben auch übrigens in physikalisch-chemischer Hinsicht Ähnlichkeit. Nun wirkt Pepsin nur auf das durch Wasseraufnahme gequollene Fibrin. Bei den sehr essigsäurereichen Lösungen findet zwar eine gewisse Fibrinlösung statt, aber diese rührt von Säurewirkung her, sie geht zum Schluß bei sehr kleinen Wassergehalten wieder zurück; in Eisessig (etwa 98% Säure) quillt zwar Fibrin, aber löst sich nicht mehr. Wir finden denn auch bei dieser Säure zwei Maxima der Digestion, das erste ist das von Pepsin, das zweite, bei sehr hohen Säurekonzentrationen ist der Säurewirkung zuzuschreiben. Diese würde also auch das durch Essigsäure gequollene Fibrin noch in Lösung bringen können.

Die umstehende Tabelle XV enthält die Resultate von unserer wichtigsten Versuchsreihe mit Essigsäure. Diese Säure war 10 n. Die Pepsinlösung enthielt 10 mg Pepsin auf 50 ccm Essigsäure 0,03 n. Die Digestionsdauer war 18 Minuten.

Das Reaktionsoptimum liegt hier bei 0,00084 nach oder 0,0028 vor der Pepsinwirkung; also ziemlich niedrig; das hängt mit der geringen Wasserstoffionenkonzentration in Essigsäurelösungen und dem eigentümlichen Verhalten von Essigsäure hinsichtlich der Quellung zusammen. Daß in den höher konzentrierten Lösungen die Pepsinwirkung wieder zurückgeht, ist (siehe oben) nach meiner Meinung dem Umstand zuzuschreiben, daß hier zwar die Quellung nicht zurückgeht, aber vom Eiweiß nicht mehr allein Wasser, sondern immer mehr auch Essigsäure aufgenommen wird.

Tabelle XV.

Versuchsreihe mit Essigsäure. 10 mg Pepsin in 50 ccm Essigsäure 0,03 n. Die Essigsäure ist 10 n. Versuchsdauer 18 Minuten. Temperatur etwa 15°. Zu jedem Röhrchen, wie in allen vorigen Versuchsreihen, 2 ccm Pepsinlösung.

Ver- suchs- Nr.	Wasser ccm	Essig- säure 10 n ccm	Quellung	Nor- malität Essig- säure	Skala Kolori- meter	Messungen von $p_H$ nach der Pepsinwirkung		
						$\pi$ (-)	p	$C_H$
1	7,95	0,05	1,1	0,056	0,7	0,0476	3,977	$0,1055 \times 10^{-3}$
2	7,90	0,10	1,35	0,106	1,1	0,0510	3,919	$0,1206 \times 10^{-3}$
3	7,70	0,30	1,80	0,306	3,8	0,0756	3,492	$0,3221 \times 10^{-3}$
4	7,40	0,60	2,50	0,606	7,1	0,0996	3,076	$0,8398 \times 10^{-3}$
5	7,00	1,00	2,80	1,006	6,5	0,1126	2,850	0,001413
6	6,50	1,50	etwa 3	1,506	5,1	0,1124	2,854	0,001400
7	6,00	2,00	› 3,6	2,006	2,5	0,1208	2,708	0,001959
8	5,50	2,50	› 3,6	2,506	1,2	0,1261	2,616	0,002421

Zum Schluß habe ich Versuche mit Citronensäure an-  
gestellt. Die Resultate gibt folgende Tabelle XVI.

Tabelle XVI.

Versuche mit Citronensäure. 10 mg Pepsin in 50 ccm Citronen-  
säure 0,03 n. Die Citronensäure ist 3 n. 50 mg Karminfibrin. Zu jedem  
Röhrchen 1 ccm Pepsinlösung. Digestionsdauer 6 Minuten.

Ver- suchs- Nr.	Wasser ccm.	Ci- tronen- säure 3 n ccm	Quel- lung ccm	Norma- lität Zi- tronen- säure	Skala Kolori- meter	Bemerkungen
1	7,9	0,1	1,5	0,036	1,6	Auch bei dieser Säure ist das Maximum der Quellung und der Enzymwirkung sehr unscharf. Von einer Normalität 0,1 bis zu 0,67 ändert sich wesentlich weder Quellung noch Digestion.
2	7,7	0,3	3,7	0,103	5,4	
3	7,4	0,6	3,6	0,203	6,6	
4	7,0	1,0	3,6	0,336	6,6	
5	6,5	1,5	3,8	0,503	5,7	
6	6,0	2,0	3,5	0,669	5,6	
7	5,0	3,0	3,15	1,003	5,3	
8	3,0	5,0	2,8	1,669	4,3	
9	0,0	8,0	2,7	2,669	3,7	



Folgende Tabelle XVII gibt noch eine zweite Versuchsreihe mit Citronensäure, wobei auch die H-Ionenkonzentrationen bestimmt wurden.

Tabelle XVII.

Zweite Versuchsreihe mit Citronensäure. Bedingungen wie in der ersten Reihe.

Ver- suchs- Nr.	Was- ser ccm	Citronen- säure 3 n ccm	Quel- lung ccm	Nor- malität Citronen- säure	Skala Kolori- meter	Messungen von $p_H$		
						$\pi$ (-)	P	$C_H$
1	7,8	0,2	2,2	0,069	3,0	0,0806	3,404	0,000394
2	7,7	0,3	2,9	0,103	3,7	0,1007	3,057	0,000878
3	7,5	0,5	3,1	0,169	4,6	0,1157	2,797	0,001599
4	7,3	0,7	2,8	0,236	4,0	0,1212	2,702	0,00199
5	7,1	0,9	3,0	0,303	4,1	0,1304	2,541	0,00288
6	6,9	1,1	2,9	0,369	4,0	0,1320	2,513	0,00307
7	6,7	1,3	3,0	0,436	3,9	0,1374	2,420	0,00380
8	6,5	1,5	3,0	0,503	3,7	0,1437	2,311	0,00489
9	6,2	1,8	2,7	0,603	3,75	0,1492	2,216	0,00609
10	5,7	2,3	2,9	0,769	3,7	0,1575	2,072	0,00848

Das Reaktionsoptimum läßt sich nicht genau bestimmen. Es liegt bei etwa  $C_H = 0,002$  nach und  $0,007$  vor der Pepsinwirkung.

Weiter habe ich zur näheren Vergleichung der Wirkungen der verwendeten Säuren Pepsin auf Karminfibrin in den Lösungen der Säuren bei den (so viel wie möglich) optimalen Reaktionen wirken lassen. Als Pepsinlösung diente eine von 10 mg Pepsin in 50 ccm Oxalsäure 0,008 n. Wenn von dieser Lösung 2 ccm auf ein Gesamtvolumen von 10 ccm gebracht werden, ist die Oxalsäurenormalität 0,0016 n. Diese wird nicht stören. Die folgende Tabelle XVIII gibt eine Übersicht über die Resultate.

Tabelle XVIII.

Vergleichung der Wirkung der 7 verwendeten Säuren bei den optimalen Reaktionen. Digestionsdauer 5 Minuten.

Säure und Normalität	Von der Säure verwendet ccm	Wasser ccm	Quellung cm	Normalität der Säure	Skala Kolorimeter	Verhältnis der Wirkung, die der Salzsäure = 1 angenommen	Messung der H-Ionenkonzentration			
							$\pi$ (-)	p	$C_H$	
Salzsäure	0,5016	0,32	7,68	3,1	0,01605	2,7	1	0,1225	2,679	0,0021
Oxalsäure	0,2	1,5	6,5	2,65	0,030	2,2	0,8	0,1262	2,615	0,00243
Milchsäure	1,8	1,0	7,0	3,54	0,180	2,7	1	0,1266	2,608	0,00246
Phosphorsäure	1,486	0,5	7,5	3,10	0,0743	2,5	0,9	0,1440	2,306	0,00495
Schwefelsäure	0,5135	0,2	7,8	0,58	0,01027	Spur	Spur	0,1401	7,232	$5,87 \times 10^{-4}$
Essigsäure	10,00	0,67	7,33	3,16	0,670	1,8	0,67	0,0937	3,178	0,000663
Citronensäure	3,00	0,89	7,11	2,77	0,267	2,3	0,85	0,1295	2,558	0,00277

Wir sehen also, daß Salzsäure und Milchsäure für die Pepsinwirkung am günstigsten sind; sie geben auch die stärksten Quellungen zusammen mit Phosphorsäure, die den beiden genannten Säuren auch in der Pepsinwirkung am nächsten steht. Dann kommen Citronensäure und Oxalsäure, auch was Quellung anbetrifft. Essigsäure ist für die Pepsinwirkung viel ungünstiger; die starke Quellung bei Essigsäure ist schon oben besprochen. Zuletzt kommt Schwefelsäure mit unvergleichlich viel schwächerer Pepsinwirkung und Quellung. Hier hat sich während der Wirkung des Pepsins die Reaktion wieder stark geändert; diese Sache ist auch schon oben besprochen.

Also auch bei dieser Vergleichung der Säuren hat sich der Parallelismus zwischen Pepsinwirkung und Quellung völlig bestätigt. Wir müssen also schließen, daß die optimale Reaktion bei den verschiedenen Säuren gar nicht die gleiche ist. Es sind nicht nur die Wasserstoffionen, sondern auch, und öfters in nicht geringerem Grade, die Säureanionen, die die Pepsinwirkung mitbestimmen, was sich von meinem Gesichtspunkte im voraus erwarten läßt. Denn von diesem Standpunkte muß man fragen, bei welchen Konzentrationen der verschiedenen Säuren tritt die maximale Quellung ein? Wir

wissen, daß dies in hohem Grade mit vom Anion abhängig ist. Daher braucht es uns nicht zu wundern, daß auch die Pepsinwirkung bei den verschiedenen Säuren bei ziemlich stark differierenden Konzentrationen der H-Ionen maximal ist.

Zum Schluß von diesen Versuchen mit verschiedenen Säuren habe ich die Versuchsreihe von Tabelle XVIII wiederholt, mit der Abänderung, daß statt aktiven, durch sehr allmähliches Erhitzen bis auf 70° inaktiviertes, aber nicht koaguliertes Pepsin verwendet wurde. Im übrigen wurde in der gleichen Weise verfahren; der Zweck war, die anfängliche Reaktion zu bestimmen.

Tabelle XIX.

Versuchsreihe mit inaktiviertem Pepsin, um die beim Anfang der Digestion herrschende H-Ionenkonzentration zu bestimmen.

Säure	Normalität	Messung der H-Ionenkonzentration		
		$\pi$ (—)	pH	C <sub>H</sub>
Salzsäure . . . . .	0,016	0,1585	2,054	0,0088
Oxalsäure . . . . .	0,030	0,1543	2,127	0,0075
Milchsäure . . . . .	0,180	0,1496	2,209	0,0062
Phosphorsäure . . . . .	0,074	0,1647	1,947	0,0113
Schwefelsäure . . . . .	0,010	0,1385	2,401	0,00397
Essigsäure . . . . .	0,670	0,1297	2,554	0,0028
Citronensäure . . . . .	0,267	0,1515	2,176	0,0067

Die p<sub>H</sub> oder C<sub>H</sub> am Anfang der Digestion gibt uns wohl den besten Ausdruck für die optimale Reaktion der gebrauchten Säuren, aber, es sei dies hier noch einmal besonders bemerkt, unter den hier vorliegenden Versuchsbedingungen. Also bei dieser kurzen Versuchsdauer von einigen Minuten und bei 15°. Bei längerer Versuchsdauer wird man im allgemeinen eine etwas andere optimale Reaktion finden; man denke nur an die dann eine größere Rolle spielende Pepsinzerstörung und an die Säurewirkung an sich, und es treten noch wohl andere Umstände dazu.



Ist also aus den genannten Versuchsreihen schon zur Genüge hervorgegangen, daß bei den Säuren die Wirkungsbedingungen des Pepsins nicht nur von der H-Ionenkonzentration, sondern ebenso gut von den Anionen abhängig sind, so wird diese Tatsache vielleicht noch schlagender aus den folgenden Versuchen, die ich angestellt habe, um die Salzwirkung zu studieren, an den Tag treten.

#### 6. Untersuchungen über die Wirkungsbedingungen des Pepsins bei Anwesenheit von Salzen.

Bekanntlich hemmen Salze die Pepsinwirkung. Im Meereswasser z. B. ist die Pepsinwirkung, auch bei im übrigen günstiger Reaktion, also nach Zusatz von Säure, nur sehr schwach.

Man weiß auch schon längst, daß einige Salze besonders stark hemmend wirken, und als solches Salz wird man sofort Sulfat nennen. Von meinem Standpunkt kann man voraussagen, daß im allgemeinen diejenigen Salze, welche in saurer Lösung die Quellung am meisten beeinträchtigen, auch die Pepsinwirkung am stärksten hemmen müssen. Man könnte also im voraus vermuten, daß Sulfate und Rhodanate eine starke Wirkung ausüben müssen. In den Versuchen hat sich dies völlig bestätigt.

Eine experimentelle Schwierigkeit ist, daß man durch Salze leicht die H-Ionenkonzentration ändern kann. Ich habe aber diese Schwierigkeit so viel wie möglich so zu umgehen versucht, daß ich die saure Reaktion durch Milchsäure so gut wie möglich fixiert habe. Aus Tabelle XI sieht man, daß sich in der Nähe der optimalen Reaktion die Milchsäuremenge und auch die  $C_H$  bedeutend ändern kann, ohne daß damit die Pepsinwirkung (und Quellung) sich merklich ändert. Wenn also durch Salzzugabe die Reaktion sich auch etwas ändern würde, so bedingt das an sich noch keine merkliche Änderung der Pepsinwirkung. Weiter hat Milchsäure als sehr schwache Säure den Vorteil, daß sie nicht leicht andere Säuren «in Freiheit» setzen wird, was z. B. der Fall sein würde, falls man Salzsäure gebraucht hätte und dann Acetat zufügte. Milchsäure, wovon man auch eine ziemlich große Menge zugeben

muß, war für meinen Zweck also wohl am besten geeignet. Ich habe 7 Salze und zwar, um die Bedeutung ausschließlich der Anionen ungestört hervortreten zu lassen, nur Natriumsalze verwendet. Es waren: das Chlorid, Citrat, Acetat, Chlorat, Nitrat, Rhodanat und Sulfat. Von diesen Salzen wurden Lösungen gemacht, die pro Liter gleiche Grammäquivalente enthielten: z. B. 0,1333 Grammolekeln NaCl,  $\frac{1}{3} \times 0,1333$  Grammolekeln Citrat usw. Ich habe mit diesen Salzen drei Versuchsreihen angestellt. In der ersten war der Salzgehalt 0,0067 äquivalent, in der zweiten 0,0133 äquivalent und in der dritten 0,04. Der Milchsäuregehalt war der, der die optimale Reaktion gab; dazu wurde auf 10 ccm 1 ccm Milchsäure 1,8 n gegeben. In der ersten Reihe mit den niedrigsten Salzkonzentrationen, welche wohl die Salzwirkungen am reinsten zeigte, wurden auch die  $C_H$  bestimmt und zwar vor und nach der Pepsinwirkung. Im letzten Falle war die verwendete Pepsinlösung durch sehr allmähliches Erhitzen, wobei die Lösung homogen bleibt, inaktiviert. Das Pepsin, 10 mg, wurde wieder in 50 ccm Oxalsäure 0,008 n gelöst. In der ersten Versuchsreihe wurden die verschiedenen Röhrchen verschieden lange Zeit digeriert, das mit Sulfat versetzte Röhrchen mußte längere Zeit digeriert werden, um eine meßbare Digestion zu erhalten. Die erhaltenen Ablesungen am Kolorimeter wurden aber auf 5 Minuten korrigiert (siehe umstehende Tabelle).

Man sieht aus dieser Tabelle XX, daß erstens die H-Ionenkonzentration nur unbedeutend variiert und daß in dieser milchsäurehaltigen Lösung durch diese Variationen an sich keine merklichen Änderungen der Quellung und der Digestion hervorgerufen werden können. Wir können also sagen, daß die Zahlen für Quellung und Digestion uns die Salzwirkungen, das heißt die Wirkungen der Kationen, aber besonders der verschiedenen Anionen, vorzeigen. In erster Linie sehen wir wieder aufs deutlichste den Parallelismus zwischen Wirkung auf Quellung und Pepsinwirkung. Nur ist diese beim Nitrat ein wenig höher als beim Chlorat, aber diese Differenz fällt wohl innerhalb der Versuchsfehler; die Differenz der Quellungen ist hier auch sehr gering.

Tabelle XX.

Versuche, um die Salzwirkungen zu studieren. Milchsäure 0,18 n. Salzkonzentration in allen Rührchen 0,0067 äquivalent. 15°.

Versuchs-Nr.	Salz Natrium	Quellung mm	Digestionsdauer Min.	Skala Kolorimeter	Skala Kolorimeter reduziert auf 5 Min.	Messung des p <sub>H</sub> vor der Pepsinwirkung			Messung des p <sub>H</sub> nach der Pepsinwirkung		
						π (-)	p	C <sub>H</sub>	π (-)	p	C <sub>H</sub>
1	Kein	34	5	5,85	5,85	0,1244	2,646	0,00226	0,1473	2,248	0,00565
2	Citrat	26,8	5	5,3	5,3	0,1217	2,692	0,00203	0,1374	2,420	0,00380
3	Acetat <sup>1)</sup>	26,5	5	5,1	5,1	0,1178	2,760	0,00174	0,1366	2,435	0,00367
4	Chlorid	25,4	5	4,8	4,8	0,1275	2,592	0,00256	0,1468	2,257	0,00553
5	Chlorat	25,0	5	4,6	4,6	läßt sich nicht messen, seiner oxydierenden Wirkung wegen.					
6	Nitrat	23,8	5	4,8	4,8	0,1301	2,548	0,00283	0,1471	2,253	0,00559
7	Rhodanat	18,1	9	2,0	1,1	0,1320	2,513	0,00307	0,1474	2,246	0,00567
8	Sulfat	11,7	20	2,8	0,7	0,1205	2,713	0,00194	0,1451	2,288	0,00516

Tabelle XXI.

Zweite Versuchsreihe mit Salzen. Bedingungen wie in Tabelle XX, aber die Salzkonzentrationen sind hier 0,0133 äquivalent. Digestionsdauer 8 Minuten.

Versuchs-Nr.	Salz Natrium	Quellung mm	Skala Kolorimeter	Bemerkung
1	Kein	34,7	6,9	Bei diesen zweimal größeren Salzkonzentrationen ist die Reihe ein wenig anders geordnet. Das Chlorid hemmt hier am wenigsten. Der Parallelismus zwischen Quellung und Digestion ist aber auch hier erhalten, wenn man von der kleinen Abweichung beim Citrat absieht. Die verhältnismäßig groben Methoden zur Bestimmung der Quellung und der Digestion in Betracht gezogen, ist die Übereinstimmung sehr genügend.
2	Citrat	21,3	4,9	
3	Acetat	20,6	5,3	
4	Chlorid	21,8	5,8	
5	Chlorat	20,1	4,3	
6	Nitrat	17,4	3,1	
7	Rhodanat	11,8	etwas mehr als Sulfat	
8	Sulfat	9,5	nicht zu bestimmen	

<sup>1)</sup> Das Natriumacetat war zuvor mit Essigsäure neutralisiert.



Tabelle XXII.

Dritte Versuchsreihe mit Salzen. Bedingungen wie in Tabelle XX, aber die Salzkonzentrationen 0,04 äquivalent. Digestionsdauer 18 Minuten.

Ver- suchs- Nr.	Salz Natrium	Quel- lung mm	Skala Kolorimeter	Bemerkung
1	Kein	37,5	5,4	Hier ist die Reihe der Digestionszahlen wie in der vorigen Tabelle, die der Quellungsgrößen weicht ein wenig ab. Weil hier aber die Quellung schon zu gering geworden ist, kann man auf diese Abweichung kein Gewicht legen.
2	Citrat	12	1,3	
3	Acetat	12,2	1,7	
4	Chlorid	13,5	3	
5	Chlorat	13	1,2	
6	Nitrat	11	0,8	
7	Rhodanat	7,5	etwas mehr als Sulfat	
8	Sulfat	7	nicht zu bestimmen	

Fassen wir die Resultate unserer Versuche zusammen, so können wir sagen, daß die Salzversuche Resultate gegeben haben, die meine Voraussetzungen nur weiter bestätigt haben. Beim Studium der Wirkungsbedingungen des Pepsins darf man also den Zustand des Substrats nicht vernachlässigen, ja man muß diesen vielleicht in erster Linie betrachten. Vom Zustande des eigentlichen Enzyms wissen wir zurzeit nur, daß es negativ geladen ist. Wo diese Ladung herrührt, das wissen wir nicht sicher, obgleich wir vermuten können, daß das Enzym sich mit den Anionen verbindet. Aber ob nun die Aktivität dieser Verbindungen mit dem Anion wechselt, das wissen wir noch nicht. Vorläufig scheint es mir, daß der Einfluß der gelösten Stoffe auf das Substrat die Hauptrolle spielt, denn wenn der Zustand des Substrats der gleiche ist, scheint auch die Pepsinwirkung die gleiche zu sein. Das Auftreten und die Lage des Reaktionsoptimums, die verschiedene Wirkung der verschiedenen Säuren und die Bedeutung von Salzen für die Pepsinwirkung, kurz alle Bedingungen der Pepsinwirkung lassen sich jetzt von einem Gesichtspunkt klar machen.

Wie ich schon zur Genüge bemerkt habe, sind die bisherigen Versuche insoweit noch etwas vorläufig, als die Methoden zur Bestimmung der Quellung und auch der Pepsin-

wirkung. noch nicht besonders genau sind. Im speziellen wurde die Quellung von mir nur annähernd gemessen. Dazu kam dann noch, daß ich bisher in inhomogenen Systemen arbeitete und man doch immer den Vorwurf machen kann, daß die Lösung des Fibrins nur ein besonderer Teil der Pepsinwirkung sei. Es ist also unbedingt notwendig, die Versuche mit genaueren Methoden und im homogenen System zu wiederholen. Um die Quellung von Eiweiß genau zu beurteilen, stehen uns verschiedene Wege offen. Es schien mir aber überaus wichtig, nach den vorigen Versuchen, wobei Pepsin auf ungelöstes Eiweiß wirkte, jetzt es auf gelöstes wirken zu lassen und so viel wie möglich dabei die weiter spaltende Wirkung zu studieren. Um in einer solchen Lösung den Quellungsgrad des Eiweißes genau zu beurteilen, ist es wohl am besten, die innere Reibung zu messen. Wir wissen doch aus den Untersuchungen von verschiedenen Autoren (besonders Wo. Pauli), daß mit der Quellung die Viskosität ansteigt und umgekehrt. Schwieriger ist es, den Fortschritt der Spaltung zu bestimmen. Die Formoltitration ist nicht brauchbar; ich hätte vielleicht durch fortgesetzte Bestimmung der H-Ionenkonzentration den Gang der Spaltung messen können, denn beim Weitergehen der Spaltung ändert sich diese, sei es auch nicht sehr stark, aber die Bestimmungsmethode ist jetzt ziemlich leicht und auch sehr genau, sodaß man eben diese nicht große Änderung doch verfolgen kann. Doch habe ich zurzeit einen anderen Weg eingeschlagen und nach dem Vorgang von S. P. L. Sörensen gearbeitet. Nach einer bestimmten Zeit habe ich die Digestionsflüssigkeit neutralisiert und mit Tannin versetzt, dann im Filtrat den Stickstoff bestimmt. Meine erste Versuchsreihe habe ich angestellt mit einer Lösung von längere Zeit hindurch dialysiertem krystallisiertem Serumalbumin. Diese aus Pferdeserum dargestellte Lösung enthielt 3,7% Eiweiß; 10 ccm dieser Lösung wurden mit Wasser und wechselnden Mengen Salzsäure bis zu 16 ccm versetzt, dann 4 ccm einer Pepsinlösung von 50 mg Pepsin in 50 ccm Oxalsäure 0,02 n zugegeben und sofort die Viskosität bei 18° bestimmt (mit einem für diesen Zweck geeigneten selbst ange-

fertigten Viskosimeter nach dem Ostwaldschen Prinzip). Die Ablaufzeiten variierten aber in der ganzen Reihe bei den sehr verschiedenen Säuregehalten nur von 120—124 Sekunden. Es zeigte sich also, daß das Pepsin in wenigen Minuten bei 18° eine erhöhte Viskosität wieder auf das Niveau der säurefreien Lösung zurückführt. Das heißt, die Lösungen mit mittleren Säuregehalten, die ohne Pepsin gewiß eine große Viskosität gezeigt haben würden, ließen, nachdem Pepsin zugefügt worden war und die Messung 5 Minuten nach dieser Zugabe ausgeführt wurde, nur die Viskosität der Lösungen ohne oder mit sehr wenig Säure an den Tag treten. Das gequollene Eiweiß wird also bei 18° schon in 5 Minuten vom Pepsin in der Weise angegriffen, daß die Quellung durch die Viskosität nicht mehr meßbar ist. Diese eigentümliche Pepsinwirkung, die bei 18° zu rasch verläuft, um sie verfolgen zu können, soll bei niedrigerer Temperatur studiert werden. Aber es hat sich also gezeigt, daß man auf diese Weise, auch bei noch so schnellem Arbeiten wie nur immer möglich, den Verlauf der Quellung mit dem Säuregrade nicht bestimmen kann. Ich bin dann auch bei der zweiten Versuchsreihe in der folgenden Weise verfahren. Zu einer ersten Reihe Lösungen wurde durch sehr langsames Erhitzen inaktiviertes Pepsin zugegeben, diese Reihe wurde für die Viskositäts-Messungen gebraucht. Zu einer zweiten Reihe wurde unter sonst gleichen Umständen aktives Pepsin zugefügt und diese Reihe wurde für die Bestimmung der Enzymwirkung benutzt.

Ich gebrauchte für diese Versuche dialysiertes und filtriertes Pferdeserum. Nach der Dialyse und Filtration war der Eiweißgehalt 5,3%. Für jeden Versuch wurden 10 ccm Eiweißlösung mit  $a$  ccm Salzsäure 0,5016 n und 10— $a$  ccm Wasser, dann mit 5 ccm aktivem oder inaktivem Pepsin versetzt. Wenn die Viskosität bestimmt werden sollte, wurde also inaktives Pepsin gebraucht und die Messung so bald wie möglich ausgeführt. Dazu waren Glasgefäße, Pipette, Viskosimeter und Lösungen zuvor genau auf 18° gebracht, sodaß sofort nach dem Mischen 10 ccm in das Viskosimeter pipettiert und die Messung angestellt werden konnte. Das Viskosimeter wurde nach jedem Versuch voll-



ständig rein und trocken gemacht. Diese schnelle Bestimmung ist auch hier, bei inaktivem Pepsin nötig, weil, besonders in den stärker sauren Flüssigkeiten, die innere Reibung auch ohne Enzym bald sehr merklich zurückgeht. Hier möge ein Versuch mitgeteilt sein, woraus diese Tatsache deutlich hervorgeht. Dazu braucht der Säuregehalt noch nicht einmal sehr groß zu sein.<sup>1)</sup>

Tabelle XXIII.

Abnahme der Viskosität von sauren Eiweißlösungen mit der Zeit. Salzsäuregehalt 0,00194 n. 18°.

Zeit Stunden	Viskosität Ablaufzeit des Viskosimeters	p <sub>H</sub>	Leitfähigkeit	Bemerkungen
0	155,4	3,460	$1,322 \times 10^{-3}$	
2	146,3	—	—	Ablaufzeit der säure- freien Lösung 124,3
4	142,6	—	—	
6	138,1	—	$1,319 \times 10^{-3}$	
24	131,1	—	—	
28	131,0	3,573	—	

Man sieht, daß die innere Reibung in kurzer Zeit sehr merklich abgenommen hat, besonders in der allerersten Zeit nach der Säurezugabe ist diese Abnahme stark. Dieser Prozeß wird durch Pepsin außerordentlich beschleunigt. Es ist wohl dieselbe Art der Eiweißzersetzung, die hier ohne Enzym langsam weiter geht, und die auch durch Pepsin hervorgerufen wird. Dieser Prozeß fängt mit einer Zersetzung der großen Eiweißteilchen an und ist anfangs mit Hilfe der sich rasch ändernden und besonders genau zu verfolgenden Viskosität, auch bei Abwesenheit des Katalysators zu messen. Für die weitere Zersetzung fehlt es uns an einer so empfindlichen Methode, um sie, wenigstens bei Abwesenheit des Pepsins messend zu verfolgen.

<sup>1)</sup> Comptes rendus du XI<sup>e</sup> Congrès International de Pharmacie, La Haye, 1913. Tome II, p. 915. Man sieht, wie, ebenso wie bei der Pepsinwirkung, mit der Viskosität auch der p<sub>H</sub> sich ändert.

Man sieht also auch in diesem Falle, daß, wenn man die Quellung bestimmen will und also die anfängliche Viskosität, man dann sehr schnell die Messungen anstellen muß. Ich habe dies denn auch 5 Minuten nach dem Zusammenbringen des Eiweißes und der Säure getan. Folgende Tabelle XXIV gibt die Resultate.

Tabelle XXIV.

Bestimmung der inneren Reibung von Eiweiß-Salzsäure-Lösungen. Dialysiertes filtriertes Pferdeserum; 5,32% Eiweiß. Inaktivierte Pepsinlösung, 50 mg Pepsin (D) auf 50 ccm Salzsäure 0,011 n. Temperatur 18°.

Ver- suchs- Nr.	10 ccm Serum + Wasser ccm	Salz- säure 0,5016 n ccm	Ablauf- zeit Viskosi- meter Sek.	Messung des p <sub>H</sub>		
				π	p	C <sub>H</sub>
1	10	0	127,2	+ 0,03351	5,383	4,137 × 10 <sup>-6</sup>
2	9,7	0,3	134,2	- 0,05246	3,893	0,000128
3	9,3	0,7	163,8	- 0,0958	3,141	0,000722
4	9,0	1,0	178,8	- 0,1215	2,695	0,002016
5	8,6	1,4	179,6	- 0,1468	2,257	0,00554
6	8,2	1,8	172,0	- 0,1632	1,973	0,01063
7	7,7	2,3	162,5	- 0,1764	1,744	0,01803
8	6,5	3,5	148	- 0,1942	1,436	0,03664
9	4,0	6,0	142,2	- 0,2107	1,150	0,0708

Ablaufzeit von reinem Wasser 108,8 Sekunden.

Figur II gibt die Viskositätskurve, p<sub>H</sub> als Abszisse (a). Man sieht bei abnehmendem p<sub>H</sub> den steilen Anstieg und den langsamen Abstieg nach Überschreitung des Maximums. Dieses letztere liegt bei p<sub>H</sub> = 2,5. Nach meiner Auffassung und wenn keine anderen Umstände störend herbeiträten, würde dieser Punkt wesentlich mit dem Reaktionsoptimum des Pepsins zusammenfallen. Sehen wir uns nun nach den Werten, die von Sørensen und Michaelis gefunden sind, um, so finden wir, daß der erste für das Optimum p<sub>H</sub> = 1,63 bis 2,26, der zweite 1,8 bis 1,4 angibt. Sørensen bemerkt ausdrücklich, daß, je

länger die Versuchszeit, desto mehr  $p_H$  nach der sauren Seite verschoben wird, er weist auf die Pepsinzerstörung bei niederen Säurekonzentrationen hin, wodurch bei längerer Versuchsdauer das Optimum nach der sauren Seite hinrücken muß. Ich fand in den obigen Versuchen mit Salzsäure das

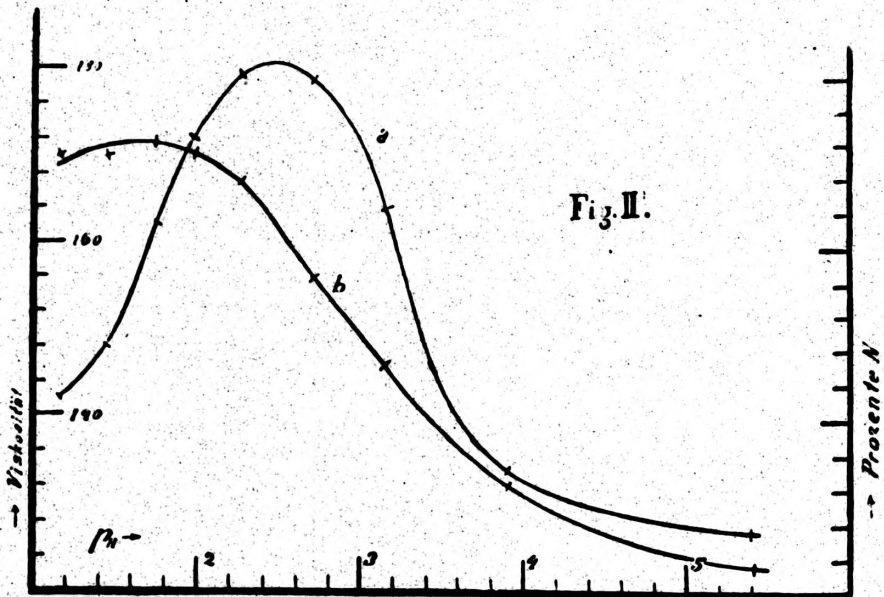


Fig. II.

Optimum bei etwa  $p_H = 2,05$  bei sehr kurzer Versuchsdauer (10 Minuten) und  $15^\circ$ . Tabelle XIX. Wir können also gleich feststellen, daß diese Werte sich nicht allzusehr von  $p_H = 2,5$  entfernen. Aber für die bestehenden Differenzen lassen sich mehrere Gründe anführen. Zuerst habe ich die Viskosität zwar beinahe in dem Moment der Darstellung der Lösungen gemessen, aber doch nicht ganz, und gerade in den ersten Minuten wird die Änderung der Viskosität mit der Zeit am größten sein. Das richtige Viskositätsmaximum muß also sicher ein wenig nach der Seite des kleineren  $p_H$  liegen. Denn die in den stärker sauren Lösungen besonders ausgeprägte Abnahme der Viskosität mit der Zeit macht, daß man das Maximum doch immer etwas zu hoch findet ( $p_H$  zu groß). Bei den Digestionsversuchen, besonders bei denen mit längerer Versuchsdauer, gibt es mindestens zwei Umstände, welche das Digestionsoptimum nach der Seite der kleinen  $p_H$  hinzurücken trachten. Der erste ist der schon von Sørensen angegebene, nämlich die Pepsinzerstörung, welche bei größeren  $p_H$  zu-



nimmt. Der zweite ist aber die Wirkung der Säure selbst, bei größeren Säuregehalten ist diese nicht mehr zu vernachlässigen. Daß die Maxima von Viskosität und Pepsinwirkung etwas auseinandergehen, braucht uns also nicht zu wundern, im Gegenteil, wir können es nichts anders erwarten. Ich will nun die zweite Versuchsreihe, mit aktivem Pepsin, beschreiben. Hierbei wurde dieselbe, aber jetzt unerhitzte, Pepsinlösung gebraucht und auch sonst alles wie in der ersten Versuchsreihe belassen. Von einigen der Lösungen wurde die Viskosität bestimmt und zwar in derselben Weise und Zeit wie in der ersten Reihe, wobei Viskosimeter, Pipetten, Lösungen usw. zuvor auf genau  $18^{\circ}$  gebracht wurden und gleich nach dem Zufügen der Säure und der Pepsinlösung die Messung angestellt wurde. Man sieht dabei wieder, wie das Enzym nahezu augenblicklich schon bei  $18^{\circ}$  die Viskosität auf diejenige der säurefreien Lösung zurückbringt. Weiter wurde die H-Ionenkonzentration bestimmt und zwar nach der Pepsinwirkung. Die Digestionsdauer betrug 4 Stunden. Nach dieser Zeit wurde ein Teil der Lösung auf Eis bewahrt bis zur Zeit der Gaskettenmessung und ein anderer Teil, 10 ccm, wurde in einen Meßkolben von 50 ccm gebracht, sofort mit der genau berechneten Menge NaOH neutralisiert, dann 2 ccm Natriumacetat (2 molekular) und 6 ccm Tanninlösung (15%) zugegeben und mit Wasser auf 50 ccm angefüllt. Nach 48 Stunden wurde filtriert (sogenannter Baryt-Filter von Max Dreserhoff) und in 25 ccm des Filtrats der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt. Diese 25 ccm wurden zuerst in kleinen Zersetzungskolben (50 ccm) im Wasserbade in trockenem  $\text{NH}_3$ -freiem Luftstrom nach Zugabe von mit  $\text{P}_2\text{O}_5$  versetzter Schwefelsäure bis auf ein sehr kleines Volumen eingengt, sodann über freier Flamme nach Zugabe von einem Tropfen Quecksilber zersetzt. Man vermeidet so jeden Verlust durch Stoßen der Flüssigkeit.

In der Tabelle XXV sehen wir, was die Viskosität anbetrifft, statt, wie in der vorigen Versuchsreihe, wo ich eine Steigung der Ablaufzeiten (die wir mit für uns genügender Genauigkeit proportional der inneren Reibung setzen) von 52,4 Sekunden fand, daß hier nur eine von 9,2 Sekunden auftritt. Daß das

## Tabelle XXV.

Bestimmung der Pepsinwirkung auf Serum-Säure-  
Gemische in 4 Stunden bei 37°.

Pepsinlösung wie in Tabelle XXIV, aber aktiv. 5 ccm Pepsinlösung.

Ver- suchs- Nr.	10 ccm Serum +	Salz- säure 0,5016 n ccm	Ablauf- zeit des Viskosi- meters Sek.	Pepsin- wirkung N nach der Wirkung durch Tan- nin nicht nieder- geschlagen %	Messung des p <sub>H</sub>		
	Wasser ccm				π	p	C <sub>H</sub>
1	10	0	124,4	1,53	+ 0,03803	5,462	3,454 × 10 <sup>-6</sup>
2	9,7	0,3	—	6,11	— 0,02279	4,407	3,915 × 10 <sup>-5</sup>
3	9,3	0,7	130,8	13,07	— 0,05587	3,834	1,466 × 10 <sup>-4</sup>
4	9,0	1,0	—	18,03	— 0,07368	3,525	2,985 × 10 <sup>-4</sup>
5	8,6	1,4	131,8	23,47	— 0,08975	3,246	5,67 × 10 <sup>-4</sup>
6	8,2	1,8	—	25,0	— 0,1150	2,809	0,00155
7	7,7	2,3	133,6	25,66	— 0,1516	2,175	0,00669
8	6,5	3,5	—	25,09	— 0,1829	1,632	0,0234
9	4,0	6,0	130,8	25,09	— 0,2060	1,231	0,0588

Maximum hier verschoben scheint, hat selbstverständlich bei der so schnellen Veränderlichkeit der Viskosität gar keine Bedeutung. Was nun das Wirkungsoptimum des Pepsins anbetrifft, so war bei genauer Arbeit nur eine Übereinstimmung mit den sehr zuverlässigen Daten von Sørensen zu erwarten und so konnte diese Versuchsreihe dann auch nichts wesentlich Neues liefern. Wir sehen denn auch, daß hier das Optimum bei p<sub>H</sub> = 2,2 am Ende und p<sub>H</sub> = 1,74 am Beginne der Digestion gefunden wird. Weiter sehen wir auch hier wieder die große optimale Reaktionsbreite. Zwischen p<sub>H</sub> = 2,8 bis 1,2 ändert sich unter meinen Versuchsbedingungen die Pepsinwirkung nur unbedeutend. Dieser Verlauf ist uns jetzt, da wir den der Viskosität und dazu die vielen störenden Umstände kennen, völlig begreiflich. Diese Umstände spielen aber besonders eine bedeutende Rolle bei den stärkeren Säurekonzentrationen und so sehen wir denn auch in Fig. II, wie die Digestionskurve (b) in ihrem aufsteigenden Ast parallel der Viskositätskurve (a) verläuft. Der andere Ast ist viel schwächer

absteigend. Fassen wir die Resultate der Untersuchungen über die Digestion von Sörensen, Michaelis und dieser Versuchsreihe zusammen, so glaube ich, daß, wenn man sie mit der Viskositätskurve vergleicht, sie meine Voraussetzung über Zusammenhang zwischen Pepsinwirkung und Zustand des Substrats, speziell die Quellung, recht gut bestätigen. Die verhältnismäßig geringen Abweichungen können ohne Zweifel durch die genannten Umstände leicht und ohne jeden Zwang erklärt werden.

In einer folgenden Mitteilung sollen diese Versuche an Eiweißlösungen fortgesetzt und auf andere Säuren ausgedehnt werden; dazu sollen dabei die Salzwirkungen in diesen homogenen Systemen näher mit meiner Hypothese geprüft werden.

Zum Schluß möchte ich bemerken, wie sehr die Viskositätskurve völlig den Typus von vielen Enzymwirkungskurven aufweist. Dies fällt beim Vergleichen z. B. mit den Ptyalinwirkungskurven<sup>1)</sup> und auch von anderen Enzymen sofort auf. Es scheint mir denn auch gar nicht unwahrscheinlich, daß bei diesen andern Enzymen der Einfluß der H-Ionenkonzentration auf die Wirkung größtenteils durch den Einfluß auf den Zustand des Substrats erklärt werden muß. Es liegt z. B. nahe, bei Trypsin daran zu denken, daß hierbei die Quellung im alkalischen Milieu eine Rolle spielen muß. Diese Fragen mögen aber in einer späteren Mitteilung näher diskutiert werden.

### Zusammenfassung der Resultate.

1. Das Pikelharingsche Pepsin hat keinen iso-elektrischen Punkt (Punkt der minimalen Aufladung), es ist in sauren Lösungen immer negativ geladen.

2. Das Pepsin bindet sich an Eiweißstoffe und Albumosen, nicht an Aminosäuren. Es verbindet sich also mit denjenigen Stoffen, auf die es eine enzymatische Wirkung ausübt. Hat man es an derartige Stoffe gebunden, so täuscht es einen iso-elektrischen Punkt vor; das tun auch die unreinen Handels-

---

<sup>1)</sup> Siehe z. B. die Abhandlung von van Trigt und mir, Diese Zeitschrift, Bd. 82, S. 495 (1912).



präparate. Das Enzym ist jedoch immer nur zu einem größeren oder kleineren Teil gebunden, nie ganz; deshalb bewegt es sich immer (der nicht gebundene Teil), auch bei Anwesenheit von Eiweiß oder Albumosen und stark saurer Lösung, zum Teil zur Anode. Merkwürdigerweise bindet es sich, wie gesagt, nicht an Aminosäuren, obgleich die entgegengesetzte Ladung eine Bindung (oder Adsorption) erwarten lassen würde.

3. Die Bindung von H- und Cl-Ionen an Pepsin und an Albumosen ist im großen und ganzen nicht verschieden; in schwachsauren Lösungen werden viel mehr H- als Cl-Ionen gebunden, bei zunehmender Säurekonzentration gleichen sich die gebundenen Mengen immer mehr aus, bis sie bei etwa 0,1 n HCl (bei etwa 1 Prozent Eiweiß),  $p_H =$  etwa 1, nahezu gleich sind. Dieses Verhalten des Pepsins ist mit seiner negativen Ladung nicht in Übereinstimmung, man wird geneigt sein, die alte Vermutung von Pikelharing, daß im Pepsin eine Verbindung vorliegt von einem Eiweißkörper und dem Enzym, wieder aufzufassen. Um so mehr, als bei genauer Betrachtung das Pepsin doch vielleicht etwas mehr Chlor als die Albumosen bindet. Der Eiweißkörper würde sich dann wie die Albumosen, das Enzym selbst aber anders verhalten, insoweit dieses nur Cl- (im allgemeinen Anionen) Ionen bindet. Dessen Menge ist aber verhältnismäßig wohl sehr gering.

4. Mit dieser Auffassung steht das Verhalten im elektrischen Felde nicht im Widerspruch, das Enzym bewegt sich anodisch, die Hauptmenge des Eiweißes aber kathodisch. Die Verbindung ist wohl zum Teil in saurer Lösung immer auseinandergefallen.

5. Etwas befremdend bleibt es nur, warum das Enzym sich verbunden mit gewöhnlichem Eiweiß oder mit Albumosen, wohl, mit dem eigentümlichen Eiweißkörper, mit dem es im Pikelharingschen Pepsin verbunden ist, aber niemals zur Kathode bewegt. Dies kann entweder durch die Mengenverhältnisse (denn wir haben gefunden, daß das reine Pepsin ziemlich großer Mengen Albumosen bedarf zur Umkehrung seiner Bewegung im elektrischen Felde) oder durch die Annahme, daß die Bindung mit dem ursprünglichen Eiweißkörper in

saurer Lösung nahezu ganz auseinandergefallen, die Bindungsavidität in saurem Milieu also nur sehr gering sei, erklärt werden.

6. Die Besonderheit, daß das Pepsin ein Flockungsoptimum besitzt, kann vielleicht so erklärt werden, daß die Eiweißkomponente dieses aufweist. Bei der Reaktion des Optimums würde dann entweder das Enzym an das Eiweiß gebunden sein, oder jedenfalls, wenn das Eiweiß ausfällt, das Enzym mit in den Niederschlag gehen (wenigstens zum größten Teil).

7. Die (von Pikelharing entdeckte) eigentümliche Pepsinreaktion, Koagulation bei schnellem Erhitzen in salzsaurer Lösung, völlig parallel der Zerstörung des Enzyms, wird wahrscheinlich von der Verbindung gegeben oder beruht wenigstens auf der Anwesenheit der Eiweißkomponente. Denn bei sehr langsamer Erwärmung tritt keine Koagulation auf. Hierbei wird die eine Komponente, das Eiweiß, sicher allmählich verdaut.

8. Die Löslichkeit des Merкуроchlorids in reinem Wasser wird wohl am besten durch die Zahl  $C_{Hg_2} = 1,83 \times 10^{-6}$  gegeben. Diese Zahl weicht ein wenig ab von der von Behrends gegebenen.

9. Die Dissoziation von «Eiweißchlorid» wird bei einer Salzsäurekonzentration von etwa 0,1 n HCl (und bei etwa 1% Eiweiß) und  $p_H = 1$ ,  $p_{Cl} = 1$  wieder nahezu zurückgedrängt. Bei dieser Säurekonzentration muß also die Ladung (und Quellung) des Eiweißes wieder sehr gering sein.

10. Beim Studium der Wirkungsbedingungen des Pepsins darf man den Zustand des Substrats nicht außer acht lassen. Über den Zustand des Pepsins in seiner Abhängigkeit von den Konzentrationen der Kationen, besonders Wasserstoffionen, und der Anionen wissen wir zurzeit wenig. Wir wissen nur, daß das eigentliche Enzym, wohl durch Bindung von winzigen Mengen Anionen, in sauren Lösungen immer negativ geladen ist; weiter, daß es sich mit dem Substrat, wenigstens zum Teil, verbindet. Den Zustand des Substrats kennen wir, in seiner Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Lösung, ziemlich gut, und dieser scheint maßgebend zu sein. Denn wenn der Zustand des Substrats der gleiche ist, dann scheint

auch die Pepsinwirkung, unabhängig von den Konzentrationen der H- oder anderen Ionen, dieselbe zu sein.

11. Es hat sich gezeigt, daß ein inniger Zusammenhang besteht zwischen Pepsinwirkung und Quellung der Eiweißstoffe. Dies ist eigentlich wohl zu erwarten, denn erstens bietet das Eiweiß bei stärkerer Quellung dem Enzym eine größere Oberfläche und zweitens ist das bei der Hydrolyse benötigte Wasser in gequollenem Zustand vom Eiweißkomplex schon aufgenommen und sozusagen zur Stelle anwesend.

12. Bei genauerer Betrachtung zeigt sich, daß der Verlauf der Wirksamkeit des Pepsins auf Eiweiß, entweder ungelöst oder in gelöstem Zustande, bei zunehmendem Säuregehalt parallel dem Quellungsgrade des Eiweißes geht. Das Auftreten eines Reaktionsoptimums hängt in erster Linie mit dem Auftreten eines Quellungsmaximums zusammen. Beide Maxima fallen nicht ganz zusammen, für diesen Umstand lassen sich aber mehrere Gründe anführen. Erstens die Zerstörung des Pepsins, die besonders bei größerem  $p_H$  bedeutender ist; zweitens die Unmöglichkeit, die Quellungskurve mit absoluter Genauigkeit zu bestimmen, und zwar weil in den Lösungen mit kleinerem  $p_H$  besonders in den ersten Minuten die Viskosität, die als Maß der Quellung dient, ziemlich schnell abfällt; durch diesen Umstand wird das scheinbare Quellungs optimum nach der Seite der größeren  $p_H$  verschoben. Dann kommt noch dazu die Wirkung der Säure, die bei größerer Konzentration nicht zu vernachlässigen ist, und die das Wirkungsoptimum des Pepsins, gleich so wie die Zerstörung des Enzyms in weniger sauren Lösungen, nach der stärker sauren Seite verschiebt. In Salzsäurelösungen wurde das Quellungsmaximum bei  $p_H = 2,5$ , das Wirkungsoptimum bei etwa 2,1 gefunden. Selbstverständlich werden die Zerstörung des Pepsins und die Säurewirkung an sich umsomehr Einfluß haben, je länger die Versuchsdauer.

13. Die Viskosität, die anfänglich im Quellungsmaximum sehr hoch ist, sinkt spontan, besonders in den ersten Minuten, ziemlich stark ab. Das muß einer Zersetzung der Eiweißkomplexe zugeschrieben werden, wobei Spaltstücke entstehen,



die die Viskosität weniger beeinflussen. Wir müssen aber annehmen, daß diese Spaltstücke, obgleich die Viskosität nicht mehr so hoch ist als anfangs, doch für sich auch stark gequollen sind, obgleich nicht die Quellungsmaxima des ursprünglichen Eiweißes und der allmählich entstehenden Abbauprodukte ganz bei der nämlichen Reaktion zu liegen brauchen. Die Quellung der Spaltstücke können wir aber mit dem Viskosimeter nicht so genau mehr verfolgen. Das Absinken der Viskosität wird vom Pepsin außerordentlich beschleunigt.

14. Das Reaktionsoptimum für die Pepsinwirkung ist in Lösungen von verschiedenen Säuren im allgemeinen verschieden. Weil die Pepsinwirkung maximal ist im Quellungsmaximum, so muß man fragen: bei welchen Konzentrationen der Säuren ist die Quellung maximal? Das hängt aber nicht nur von den H-Ionen, sondern ebenso von den Anionen ab. So fällt das Optimum der Pepsinwirkung bei Schwefelsäure, wegen der starken lyophilen (hydrophilen) Eigenschaften des  $\text{SO}_4$ -Ions, bei bedeutend niedriger H-Ionenkonzentration als bei z. B. Milchsäure oder auch Salzsäure. Ganz verständlich ist auch die überhaupt schwache Wirkung von Pepsin in Schwefelsäurelösungen.

15. Essigsäure bietet die Besonderheit, daß Quellung stattfindet in wasserreichen, aber auch noch in sehr wasserarmen Gemischen. Nur in den ersten, wo wahrscheinlich bei der Quellung Wasser aufgenommen wird, kann das Pepsin wirken, in den sehr wasserarmen Lösungen, wo wohl Essigsäure bei der Quellung aufgenommen wird, wirkt Pepsin nicht. Deshalb ist bei dieser Säure in den wasserarmen Lösungen kein Parallelismus zwischen Quellung und Digestion.

16. Die Wirkung von Salzen auf die Pepsinwirkung wird von unserem Gesichtspunkt auf einmal übersichtlich. Die Salze mit stark hydrophilen Ionen (in sauren Lösungen also besonders  $\text{SO}_4$  und  $\text{NCS}$ ) müssen die Pepsinwirkung am meisten hemmen. Die Versuche mit 7 Natriumsalzen ergaben, daß man diese Salze in folgender Reihe von zunehmender hemmender Wirkung auf die Pepsinverdauung ordnen kann: Citrat < Acetat < Chlorid < Chlorat < Nitrat < Rhodanat < Sulfat

(in größeren Konzentrationen kann sich die Reihe etwas ändern) und daß in derselben Ordnung die Quellung in zunehmendem Maße beeinflußt wird.

17. Es liegt nahe, auch bei anderen Enzymen daran zu denken, daß der Zustand des Substrats eine große Rolle spielen muß. Wenn man den Typus der Viskositäts-(Quellungs-) Kurve mit den Kurven der Enzymwirkung (Trypsin, Ptyalin) vergleicht, wird man sehr geneigt sein, für diese anderen Enzyme etwas derartiges wie bei Pepsin zu vermuten; z. B. bei Trypsin an die Quellung im alkalischen Milieu zu denken.

---