

HOPPE-SEYLER'S ZEITSCHRIFT

für

PHYSIOLOGISCHE CHEMIE

unter Mitwirkung von

E. ABDERHALDEN-Halle, SVANTE ARRHENIUS-Stockholm, G. v. BUNGE-Basel, A. ELLINGER-Frankfurt a. M., G. EMBDEN-Frankfurt a. M., H. EULER-Stockholm, H. FISCHER-Wien, R. GOTTLIEB-Heidelberg, W. v. GULEWITSCH-Moskau, O. HAMMARSTEN-Upsala, S. G. HEDIN-Upsala, V. HENRIQUES-Kopenhagen, G. HOPPE-SEYLER-Kiel, O. KESTNER-Hamburg, F. KNOOP-Freiburg i. Br., L. KREHL-Heidelberg, Wm. KÜSTER-Stuttgart, CARL TH. MÖRNER-Upsala, F. v. MÜLLER-München, J. P. PAWLOW-St. Petersburg, C. A. PEKELHARING-Utrecht, F. PREGL-Graz, W. E. RINGER-Utrecht, E. SALKOWSKI-Berlin, M. SIEGFRIED-Leipzig, S. P. L. SÖRENSEN-Kopenhagen, H. STEUDEL-Berlin, H. THIERFELDER-Tübingen, H. WIELAND-München, R. WILLSTÄTTER-München, A. WINDAUS-Göttingen, E. WINTERSTEIN-Zürich, R. v. ZEYNEK-Prag

herausgegeben von

A. KOSSEL,

Professor der Physiologie in Heidelberg.

Einhundertundachter Band:

Fünftes Heft.

(Ausgegeben am 5. Dezember 1919.)

BERLIN und LEIPZIG 1919

VEREINIGUNG WISSENSCHAFTLICHER VERLEGER
WALTER DE GRUYTER & Co.

vormals G. J. Göschen'sche Verlagshandlung — J. Guttentag, Verlagsbuchhandlung — Georg Reimer — Karl J. Trübner — Veit & Comp.

EINHUNDERTUNDACHTER BAND FÜNFTES HEFT.

Inhalt.

Seite

Hammarsten, Olof. Studien über Chymosin- und Pepsinwirkung. VI. Mitteilung. Versuche zur Reindarstellung der Magen- enzyme nebst einigen Beobachtungen über ihre Wirkungen	243
Edlbacher, S. Über die freien Amidogruppen der Eiweißkörper. II. Mitteilung	287

Für die nächsten Hefte sind Arbeiten eingegangen von:

R. Fritsch, K. Brauhofer und J. Zellner (2), W. Patzschke,
H. Wieland und A. Kulenkampf, H. Wieland.

Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie
erscheint in Bänden von 6 Heften. Preis des Bandes 25 Mark.

Kurze Notizen oder Bemerkungen zu anderen Arbeiten werden in
der Regel am Schluß des Heftes und außerhalb der Reihenfolge des Ein-
gangsdatums mitgeteilt. — Bereits in anderen Zeitschriften veröffentlichte
Arbeiten, sowie Referate über bereits publizierte Arbeiten werden nicht
aufgenommen.

Das Honorar beträgt für den Druckbogen 40 Mark. Von jeder Arbeit
werden dem Verfasser 75 Separat-Abdrücke gratis geliefert.

In bezug auf die Rechtschreibung der Fachausdrücke sind bis auf
weiteres die Publikationen der Deutschen chemischen Gesellschaft maß-
gebend. In zweifelhaften Fällen wird der etymologische und internationale
Standpunkt vor dem phonetischen bevorzugt.

Studien über Chymosin- und Pepsinwirkung.

VI. Mitteilung.

Versuche zur Reindarstellung der Magenenzyme nebst einigen Beobachtungen über ihre Wirkungen.

Von

Olof Hammarsten.

(Der Redaktion zugegangen am 15. Oktober 1919.)

Inhalt:

1. Vorkommen einer hyalinen Substanz in den kalt bereiteten Infusionen. — 2. Darstellung der hyalinen Substanz aus Mageninfusionen. — 3. Stärke der Pepsinwirkung der hyalinen Substanz. — 4. Einige Beobachtungen über ihre Enzymwirkungen.

1. Das Vorkommen einer hyalinen Substanz in den kalt bereiteten Infusionen.

Infolge der in den letzten Jahren immer größer gewordenen Schwierigkeiten, ganz frische Tiermägen in hinreichender Menge hier in Upsala aufzubringen, wurde ich bei meinen mit Magenenzymen und Muskelsyntonin ausgeführten Untersuchungen — die ich in einem folgenden Aufsätze veröffentlichen werde — wiederholt genötigt, mit käuflichen Pepsin- und Chymosinpräparaten zu arbeiten. Die Anwendung solcher Präparate hatte übrigens auch den Zweck, zu ermitteln, inwieweit die Versuchsergebnisse durch Anwendung von in verschiedener Weise gereinigten Enzymen beeinflusst werden könnten.

Bei vergleichenden Versuchen mit solchen käuflichen Enzympräparaten verschiedenen Ursprunges hatte ich oft Gelegenheit, die in hohem Grade fehlende Parallelität der Pepsin-

und Chymosinwirkung zu konstatieren. Ein solcher Mangel an Parallelität kann nun wahrscheinlich verschiedene Gründe haben. Er kann z. B. davon herrühren, daß das zur Enzymdarstellung verwendete Ausgangsmaterial von vornherein — was z. B. mit dem wohl am meisten verwendeten Materiale, dem Kalbs- und Schweinsmagen, der Fall ist — einen ausgeprägten Mangel an Parallelität aufweist. Der Grund könnte aber auch vielleicht in der (unbekannten) Darstellungsmethode liegen, die wohl für verschiedene Präparate eine verschiedene sein dürfte. Gemeinsam für die allermeisten Methoden dürfte wohl indessen eine — im Interesse einer möglichst großen Ausbeute unternommene — mehr oder weniger langdauernde Selbstverdauung der Schleimhaut in Brutwärme sein. Dies ist um so mehr wahrscheinlich, als gerade ein solches Verfahren allgemein in der Literatur empfohlen worden ist. Zur Darstellung des bisher am reinsten gewonnenen Pepsins (Pekelharings) wird auch¹⁾ eine 4—5tägige Digestion der zerhackten Schleimhaut des Schweinsmagens mit 0,5%iger Chlorwasserstoffsäure bei 37° C. vorgeschrieben.

Nun ist es aber eine längst bekannte Tatsache, daß das Chymosin, namentlich dasjenige der Kalbsmagenschleimhaut, bei anhaltender Verdauung stark geschädigt werden kann, und zwar um so leichter, je höher der Säuregrad und die Temperatur ist und je länger die Einwirkung dauert. Es war also nicht ausgeschlossen, daß der Mangel an Parallelität der Enzymwirkungen wenigstens zum Teil von einer Schädigung des Chymosins infolge zu starker Säurewirkung herrühren könnte, und ich fand es deshalb von Interesse zu prüfen, ob es für das Verhalten der Enzyme gleichgültig ist, ob man die Schleimhaut mit Chlorwasserstoffsäure bei Zimmertemperatur, resp. bei noch niedrigeren Wärmegraden, oder bei Körpertemperatur digeriert. Infolge hiervon, und besonders weil ich es sehr wünschenswert erachtete, in der Fortsetzung meiner Untersuchungen ausschließlich mit Enzymen arbeiten zu können,

¹⁾ Vgl. Pekelharing, Diese Zeitschr. Bd. 22 u. 35, und Abderhalden, Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden Bd. III 1, S. 8 (1910).

deren Herkunft und Darstellungsmethode mir bekannt waren, ließ ich die bisherigen im Gange befindlichen Untersuchungen einige Zeit ruhen, während ich die Reindarstellung der Enzyme zum Gegenstand einiger experimentellen Untersuchungen machte. Hierbei kam es besonders darauf an, solche Einflüsse, die möglicherweise eine schädigende Wirkung auf die Enzyme ausüben könnten, und folglich auch die Bereitung der Infusionen bei Körpertemperatur, zu vermeiden.

Bei meinen Bemühungen, die Enzyme in verschiedener Weise zu reinigen, beobachtete ich nun ein mir früher unbekanntes Verhalten der sauren Infusionen bei Halbsättigung mit Chlornatrium. Wenn man eine mit Chlorwasserstoffsäure von 0,2% auf die Magenschleimhaut von Hund, Schwein, Kuh oder Pferd kalt bereitete, klar filtrierte Infusion mit dem gleichen Volumen einer gesättigten Lösung von reinem Chlornatrium ohne Umschütteln zusammenmischt, so kann das Aussehen allerdings, je nach dem Gehalte der Infusion an fällbarer Substanz, etwas wechseln; aber immer findet mehr oder weniger rasch die Ausscheidung einer hyalinen oder stark grobflockigen Masse statt, die, mit einer reichlichen Menge feinsten Luftbläschen gemischt, nach oben steigt und dort als eine zusammenhängende, über der klaren Flüssigkeit tagelang unverändert liegende Schicht sich ansammelt.

Am deutlichsten tritt dieses Verhalten des Gemenges hervor, wenn man die Flüssigkeiten in einem Reagenzglase, unter Vermeiden von jedem Umschütteln, durch leise Umdrehungen des Reagenzrohres zusammenmischt. Bei Gegenwart von nur kleinen Mengen der fraglichen Substanz sieht man anfangs nur, daß das wasserhelle Gemenge ein wenig dickflüssiger geworden ist, und erst später beobachtet man, wie eine an feinsten Luftbläschen reiche und sonst wohl kaum sichtbare Masse nach oben steigt oder richtiger sich zusammenzieht und zuletzt eine obere Schicht bildet. Bei größerer Konzentration wird das Gemenge fast sogleich opalisierend, mehr dickflüssig, und es findet rasch eine Ausscheidung der eigentümlichen Substanz statt. Arbeitet man mit größeren Mengen Infusion und Salzlösung unter Umrühren, so scheidet sich die Substanz

sehr grobflockig aus, steigt auch in diesem Falle nach oben und bildet zuletzt, wenn sie sich nicht weiter zusammenzieht, eine je nach ihrer Menge und der Weite des Gefäßes mehr oder weniger dicke, gallertähnliche Schicht.

Die so erhaltene Substanz kann man wiederholt in verdünnter Chlorwasserstoffsäure auflösen und durch Kochsalzlösung ausfällen, ohne daß sie ihre typische Beschaffenheit verliert. Sie fällt jedesmal als eine hyaline oder schleimähnliche Masse aus, die bei etwas größerer Konzentration der Lösung dem Inhalte des Reagenzrohres das Aussehen einer Gallerte oder eines großen Schleimklumpens gibt.

Diese Substanz kommt nicht in den bei Körpertemperatur bereiteten Infusionen vor. Läßt man einen Teil der kalt bereiteten sauren Infusion einige Zeit bei 37—38° C. stehen, so zeigt dieser Teil ebenfalls nicht das obengenannte Verhalten beim Zusammenmischen mit der Salzlösung. Es hat offenbar eine Denaturierung der Substanz stattgefunden, denn nach Zusatz von dem gleichen Volumen gesättigter Chlornatriumlösung erhält man erst nach einiger Zeit, bisweilen erst nach einigen Stunden, eine feine Fällung, die langsam zum Boden sinkt und dort als ein lockerer Bodensatz sich ansammelt. Nach einer, mehrere Tage andauernden Digestion erhält man meistens nur einen unbedeutenden Niederschlag. In ganz derselben Weise wie die saure Infusion verhält sich die saure Lösung der gefällten Substanz. Selbst nach kurzdauernder Digestion bei Körpertemperatur wird sie denaturiert und gibt mit Chlornatriumlösung nicht mehr die hyaline oder gallertähnliche Ausscheidung, sondern je nach der Konzentration eine mehr oder weniger reichliche, feine, lockere, zum Boden sinkende Fällung.

Die kalt bereiteten Infusionen enthalten also eine durch eine besondere physikalische Beschaffenheit gekennzeichnete Substanz, die bei Körpertemperatur in saurer Lösung denaturiert wird und infolge hiervon in den gewöhnlichen, im Brutofen bereiteten Infusionen fehlt. Es fragt sich nun, ob diese Substanz etwas mit den Enzymen zu tun hat.

Diese Frage kann man insoferne ohne Bedenken mit ja

beantworten, als die obengenannte, mit Chlornatrium aus saurer Lösung fällbare Substanz in hohem Grade ein Träger sowohl der Pepsin- wie der Chymosinwirkung ist. Man kann die Substanz allerdings nicht vollständig mit Chlornatriumlösung ausfällen; bei Halbsättigung mit dem Salze repräsentiert sie aber den allergrößten Teil des Enzymgehaltes einer Infusion, und nach Eintragen von festem Chlornatrium bis zur Sättigung ist das durch Dialyse von Chlornatrium befreite Filtrat beinahe oder vollständig pepsinfrei. Auf der anderen Seite kann man, wie oben gesagt, die Substanz durch wiederholtes Auflösen in verdünnter Säure und Ausfällen mit Chlornatrium (Halbsättigung) ohne merkbare Änderung ihrer physikalischen Beschaffenheit reinigen, und selbst nach 5maligem Wiederholen dieser Prozedur zeigt sie noch eine sehr kräftige enzymatische Wirkung.

Die Substanz ist also unzweifelhaft ein Träger der Enzymwirkungen der Mageninfusionen, und die nächste Frage ist folglich die, in welcher Beziehung sie zu den Enzymen steht.

Wenn man die Substanz in saurer Lösung bei Körpertemperatur erwärmt, so wird sie wie oben erwähnt denaturiert; wenn aber die Erwärmung nicht zu lange Zeit gedauert hat, wird die enzymatische Kraft der Lösung durch diese Denaturierung nicht vermindert. Da man ferner aus den im Brutofen bereiteten Infusionen, welche diese Substanz nicht enthalten, ein Pepsin (Pekelharings) von anderen Eigenschaften darstellen kann, folgt wohl schon hieraus, daß die obengenannte hyaline Substanz kein reines Enzym ist.

Am einfachsten und am meisten zusagend ist wohl die Annahme, daß es hier um eine besondere Proteinsubstanz sich handelt, von der bei ihrer Ausfällung das Pepsin (bzw. das Chymosin) wie von verschiedenen anderen Eiweißstoffen mit niedergerissen wird. Bemerkenswert ist aber in diesem Falle ihre sehr kräftige enzymatische Wirkung. Ich werde unten auf die Stärke ihrer Enzymwirkung näher eingehen, kann aber schon hier angeben, daß die Substanz in saurer Lösung noch in der Verdünnung 1 : 10000000 eiweißverdauend wirkt, was also, wenn es hier um eine mit Pepsin verunreinigte Protein-

substanz sich handelt, auf eine ungemein kräftige Wirkung des reinen Enzymes hindeuten würde. Dies kann natürlich nicht als Einwendung gegen die obige Annahme gelten; in Anbetracht dieser kräftigen enzymatischen Wirkung könnte man aber auch die Annahme machen, daß die oben erwähnte Proteinsubstanz gewissermaßen eine Muttersubstanz der Enzyme wäre, aus der die letzteren durch Spaltung oder in irgendeiner anderen Weise durch die Wirkung der Säure bei Körpertemperatur hervorgingen.

Zur Entscheidung der Frage, inwieweit die eine oder andere dieser Annahmen zutreffend ist, muß man natürlich in erster Linie die fragliche Substanz, soweit möglich, isolieren und reinigen, um dann ihre Wirkungen und Eigenschaften mit denjenigen des reinsten bisher bekannten Pepsins, desjenigen von Pikelharing, vergleichen zu können. Dies war auch der Zweck der in diesem Aufsätze mitgeteilten Untersuchungen. Mehr eingehende Untersuchungen zur Aufklärung der Beziehung dieser Substanz zu den Enzymen wie auch Untersuchungen über ihre chemische Natur habe ich bisher, wegen Mangels an Material, nicht ausführen können. In diesem Aufsätze muß ich mich deshalb darauf beschränken, die Darstellungsmethode zu beschreiben und einige Beobachtungen über die Enzymwirkungen der Substanz mitzuteilen.

Solange die Natur der Substanz und ihre Beziehung zu den Enzymen nicht ganz aufgeklärt sind, dürfte es kaum angezeigt sein, ihr einen besonderen Namen zu geben. Auf der anderen Seite kann man aus Bequemlichkeitsrücksichten eine Benennung derselben nicht ganz entbehren. Da nun die Substanz unzweifelhaft ein Enzymträger in dem Sinne ist, daß sie, ohne selbst ein reines Enzym zu sein, die Enzymwirkungen in sehr hohem Grade zeigt, und da sie ferner gegenüber den in warm bereiteten Mageninfusionen vorkommenden, enzymatisch wirkenden Denaturierungsprodukten eine native Proteinsubstanz ist, könnte man sie vorläufig als einen nativen Enzymträger bezeichnen. Da aber die genannten Denaturierungsprodukte allem Anscheine nach ebenfalls keine reinen Enzyme repräsentieren, sondern nur Enzymträger sind, habe ich es vorgezogen,

sie einfach die „hyaline Substanz“ zu nennen¹⁾, weil hierdurch nichts, sei es über ihre chemische Natur oder über ihre Beziehung zu den Enzymen, im voraus ausgesagt wird.

2. Darstellung der hyalinen Substanz aus Mageninfusionen.

Man kann allerdings die Infusionen auf Kalbsmägen in derselben Weise wie die Infusionen auf Mägen von erwachsenen Tieren verarbeiten. Da aber die Kalbsmageninfusionen in gewissen Hinsichten anders als die Mageninfusionen von erwachsenen Tieren sich verhalten, habe ich auch ein abweichendes Verfahren für die ersteren ausgearbeitet. Die folgende Beschreibung gilt deshalb vor allem für die Verarbeitung der Infusionen von Schwein, Kuh, Pferd und Hund.

Das Prinzip der Darstellung besteht darin, daß man aus der kalt bereiteten Infusion die Substanz durch Halbsättigung mit Chlornatrium ausfällt, die ausgefällte Masse auspreßt, in Chlorwasserstoffsäure von 0,2% bei Zimmertemperatur oder in der Kälte löst, das klare Filtrat mit gesättigter Chlornatriumlösung fällt, wieder in Säure löst, von neuem fällt usw. und die zuletzt erhaltene saure Lösung durch Dialyse gegen destilliertes Wasser von Salz und Säure befreit. Hierbei scheidet sich die Substanz aus und kann, eventuell nach Zentrifugieren, auf Filtra gesammelt und in fester Form gewonnen werden.

Zur Darstellung der Infusionen habe ich bisher immer Chlorwasserstoffsäure von nur 0,2% in dem Verhältnisse von 10–5, meistens jedoch von 10 Teilen Säure auf je 1 Teil Schleimhautsubstanz benutzt. Der Pylorusteil wurde immer abgetrennt und nur der übrige Teil der Magenschleimhaut — von dem Schweinsmagen nur die mittlere, dunkelgefärbte Partie — verwendet. Beim Hund, Schwein und Pferd wurde die Schleimhaut abpräpariert und in der Fleischmühle fein zer-

¹⁾ Der Name hyaline Substanz ist allerdings nicht ganz zutreffend, denn dieser Stoff ist nicht so typisch hyalin wie z. B. Rovidas Substanz; ich habe aber keinen besseren provisorischen Namen finden können. Die hyaline Natur tritt nach wiederholter Reinigung deutlicher hervor.

schnitten. Beim Verarbeiten des Kuhmagens wurde dagegen wie beim Kalbe die Drüsenschicht mit einem Uhrglase abgeschabt.

Die zerhackte Schleimhaut, bzw. die abgeschabte Drüsenschicht, wurde dann 2—3 Tage unter mehrmaligem Umschütteln in einem kalten Zimmer mit der Säure behandelt. Vor der Filtration kann man natürlich durch Zentrifugieren die Flüssigkeit von der Schleimhautmasse trennen, was die Filtration erleichtert. Auf der anderen Seite erhält man aber leichter ein völlig klares Filtrat, wenn man die Schleimhautreste mit auf die Filter bringt, und die Säure hat in diesem Falle während der langdauernden Filtration reichlich Gelegenheit, die hyaline Substanz noch vollständiger zu extrahieren. Das Filtrat muß klar sein, was man gewöhnlich nach einiger Zeit durch wiederholtes Zurückgießen des Filtrates auf das Filtrum erreicht.

Die Bereitung der Infusionen in einem besonders kalten Zimmer scheint übrigens nicht notwendig zu sein, denn bei Zimmertemperatur findet die Denaturierung kaum oder jedenfalls nur sehr langsam statt. So habe ich z. B. sowohl Hundewie Schweinsmageninfusionen ein paar Tage im Arbeitszimmer (15—17° C.) aufbewahrt, ohne eine sichtbare Denaturierung beobachten zu können. Bei Körpertemperatur findet die letztere dagegen schon in kurzer Zeit statt. Die Menge der anwesenden freien Säure ist jedoch hierbei von großer Bedeutung, denn während die kalt bereiteten, klar filtrierte Infusionen rasch denaturiert werden, kann man dagegen bisweilen die Schleimhautreste 3—4 oder mehrere Stunden bei Körpertemperatur digerieren, ohne daß eine vollständige Denaturierung stattgefunden hat. Das in dem letzteren Falle reichlich gelöste Eiweiß scheint bei dem niedrigen Säuregrade, 0,2%, so viel von der Säure zu binden, daß die Denaturierung hierdurch verzögert wird. Da es für mich besonders darauf ankam, jede Denaturierung so weit möglich zu verhindern, habe ich meine Infusionen regelmäßig in einem kalten Zimmer bei einer Temperatur unter 8—10° C. bereitet und filtriert.

Die Verarbeitung des Filtrates und also die Fällung mit

Chlornatrium geschah dagegen immer bei gewöhnlicher Zimmertemperatur. Die hierbei sich ausscheidende Substanz sammelt sich regelmäßig so rasch als eine obere, scharf begrenzte Schicht, daß man schon nach wenigen Stunden die untere, klare Flüssigkeit ohne nennenswerte Verluste an Substanz abheben kann. Auf der anderen Seite kann aber die letztere mehrere Tage ohne Schaden bei Zimmertemperatur ausgefällt stehen, bevor man die Flüssigkeit abhebt.

Wie oben erwähnt, kann man die hyaline Substanz nicht ganz vollständig durch Halbsättigung mit Chlornatrium ausfällen — wenigstens ist mir dies nicht gelungen — und wenn man die Infusion mit dem Salze vollständig oder fast vollständig sättigt, erhält man, wie zu erwarten, eine reichlichere Fällung. So betrug z. B. die aus einer Hundemageninfusion durch Halbsättigung erhaltene Fällung 4,4%, die durch nahe vollständige Sättigung mit dem Salze erhaltene dagegen 7,34% von den organischen Stoffen der Infusion. In dem letztgenannten Falle war das Filtrat auch pepsinfrei und die gesamte Enzymmenge war also ausgefällt worden, aber trotzdem hat es keinen wesentlichen Vorteil, die Infusion durch Sättigung mit Chlornatrium zu fällen.

Der Enzymrest, welcher im Filtrate zurückbleibt, ist nämlich auch bei Fällung durch Halbsättigung so klein, daß er ohne Bedeutung ist. In Versuchen mit Mageninfusionen von Hund und Schwein habe ich einige Male den Pepsingehalt des chlornatriumhaltigen Filtrates mit demjenigen der ursprünglichen Infusion in der Weise verglichen, daß ich das gleich große Volumen eines nicht filtrierten Gemenges von Infusion und Chlornatriumlösung gleichzeitig der Dialyse unter ganz denselben Bedingungen unterwarf und dann mit der Mettschen Probe beide Lösungen verglich. Es zeigte sich hierbei, daß die Menge des im Chlornatriumfiltrate zurückgebliebenen Enzymes regelmäßig weniger als 1% von der ursprünglichen gesamten Enzymmenge betrug. Unter solchen Verhältnissen, und da die erste Fällung bei Sättigung mit Chlornatrium stärker von anderen Stoffen verunreinigt wird als bei Halbsättigung, habe ich das letztere Verfahren vorgezogen. Man

kann die hyaline Substanz auch durch Halbsättigung mit Ammoniumsulfat ausfällen. Da aber auch in diesem Falle die erste Fällung stärker als bei Halbsättigung mit Chlornatrium verunreinigt wird, habe ich bisher nur mit dem letztgenannten Salze gefällt.

Ob man die Ausfällung durch Zusammenmischen von gleichen Volumina Infusion und Salzlösung oder durch Eintragen von der erforderlichen Menge des feingepulverten Salzes bewirkt, dürfte wohl gleichgültig sein. Beim Verarbeiten von größeren Mengen Infusion habe ich jedoch das letztere Verfahren vorgezogen. Zur Fällung benutzte ich zuerst reines Chlornatrium, aber später nur solches, welches in gewöhnlicher Weise durch Ausfällung der Calcium- und Magnesiumsalze mit Natriumcarbonat und Neutralisation mit Chlorwasserstoffsäure gereinigt worden war.

Die auf Filtra gesammelte hyaline Substanz kann man nicht gut mit halbgesättigter, saurer (0,2% HCl) Chlornatriumlösung auswaschen, denn sie ist in einer solchen nicht ganz unlöslich und quillt in ihr beim Auswaschen auf dem Filtrum leicht auf. Die ausgefällte Masse wird deshalb mit dem Filtrum zwischen Fließpapier stark ausgepreßt und kann nun mit einiger Vorsicht, ohne Verunreinigung mit Papierfasern und ohne sichtbare Verluste, als ein zusammenhängender Kuchen oder als eine dünne Haut von dem Filtrum entfernt werden. Die zerschnittene Masse wird dann in der Kälte oder bei Zimmertemperatur, also jedenfalls ohne Erwärmen, in Chlorwasserstoffsäure von 0,2% gelöst, was sehr gut, wenn auch etwas langsam geht.

Die zur Lösung verwendete Säuremenge braucht nicht groß zu sein, denn die Menge der gefällten Substanz ist, trotz ihres anscheinend großen Volumens, verhältnismäßig klein. Meistens löse ich die aus je 1 Liter Infusion erhaltene erste Fällung in 150—200 ccm Säure auf. Die Lösung filtriert leicht und muß ein ganz klares Filtrat geben. Sollte das letztere eine zu voluminöse Fällung mit der Chlornatriumlösung geben, kann man es mit einer passenden Säuremenge verdünnen. Zu der zweiten Ausfällung und den folgenden

wurde nie Salz in Substanz, sondern immer gesättigte Chlornatriumlösung verwendet.

Wie oft soll man die Auflösung in Säure und Ausfällung mit Chlornatriumlösung wiederholen, um ein reines Präparat zu erhalten? Diese Frage kann ich nur in der Weise beantworten, daß nach meiner Ansicht die hyaline Substanz kaum durch wiederholte Umfällung rein zu erhalten ist. Wenn es hier um eine von Enzym verunreinigte Proteinsubstanz sich handelt, muß man das Umfällen wiederholen, bis man ein enzymfreies Präparat erhält. Handelt es sich umgekehrt um ein von einer Proteinsubstanz verunreinigtes Enzym, resp. die Muttersubstanz eines solchen, so muß man die Umfällung wiederholen, bis die gereinigte Substanz eine Enzymwirkung von konstanter Stärke zeigt.

Nun habe ich allerdings die Substanz nicht mehr als 5mal gefällt; aber das Produkt zeigte in dem Falle noch eine so kräftige Pepsinwirkung, daß es aussichtslos war, ein enzymfreies Präparat (wenn überhaupt möglich), ohne das mir zugängliche Material vollständig zu verbrauchen, darstellen zu können. Derselbe Versuch zeigte aber, daß die Stärke der Pepsinwirkung durch die wiederholte Umfällung weder konstant geblieben war, noch zugenommen hatte. Im Vergleiche zu dem aus derselben Schweinsmageninfusion dargestellten, nur 2mal gefällten Präparate zeigte nämlich das 5mal gefällte eine etwas schwächere Enzymwirkung. In der Konzentration von 1:20000 wurden beide nach dem Mettschen Verfahren geprüft. Das 2mal gefällte Präparat hatte in 24 Stunden 7 mm und das 5mal gefällte 6 mm verdaut.

Das nach Pikelharings Verfahren aus Schweinsmageninfusionen dargestellte Pepsin, welches von Geselschap¹⁾ als Standardpepsin vorgeschlagen worden ist, verdaut in der Konzentration 0,5 mg in 10 cm, also 1:20000, in 24 Stunden 5,3—5,6 mm. Sowohl die 2- wie die 5mal gefällte hyaline Substanz hatte also in diesem Falle eine kräftigere Wirkung als das Pikelharingsche Pepsin, namentlich gilt dies von

¹⁾ Diese Zeitschrift Bd. 94, S. 205—226.

dem nur 2mal gefällten Präparate. Es muß aber schon hier hervorgehoben werden, daß ich in einigen Fällen die hyaline Substanz aus Schweinsmageninfusionen auch schwächer wirkend als das Pikelharingsche Pepsin gefunden habe. Nach dem nun Mitgeteilten ist es also ziemlich aussichtslos, durch mehrmals wiederholte Ausfällung ein reines Enzym von konstanter Wirkung durch die Kochsalzfällungsmethode zu erhalten, und dies um so mehr, als ich sogar die erste Fällung in ein paar Fällen von kräftigerer Pepsinwirkung als die dritte Fällung gefunden habe.

Dies deutet entschieden darauf hin, daß es hier um eine von Enzym verunreinigte Proteinsubstanz sich handelt, und wenn dies der Fall ist, kann die wiederholte Umfällung mit Chlornatrium zur Reingewinnung der Enzymsubstanz nicht empfohlen werden. Ich habe ferner gefunden, daß die erste Rohfällung (als wasser- und chlornatriumfrei berechnet) bisweilen, aber nicht immer, ebenso kräftig und sogar noch kräftiger als das Pikelharingsche Pepsin wirken kann — nämlich 6 mm bei der Konzentration 1 : 20000. Ich betrachte also das nun angegebene Fällungsverfahren nicht als eine Methode, um ein reines Enzympräparat zu gewinnen, sondern nur als ein Mittel, in sehr einfacher Weise und — wie wir später sehen werden — mit verhältnismäßig guter Ausbeute ein kräftig wirkendes, nicht denaturiertes Rohpräparat, welches als Ausgangsmaterial für weitere Untersuchungen dienen kann, zu gewinnen. Stellt man sich auf diesen Standpunkt, so dürfte ein 2- oder höchstens 3maliges Ausfällen mit Chlornatriumlösung genügend sein.

Die zuletzt erhaltene Fällung wird nach starkem Auspressen in einer passenden Menge Chlorwasserstoffsäure von 0,2% gelöst. Will man nur eine kräftig wirkende Pepsinlösung darstellen, so dialysiert man gegen Chlorwasserstoffsäure derselben Stärke. Will man aber die Substanz in festem Zustande erhalten, so dialysiert man gegen destilliertes Wasser. Nach Wegdialysieren des Chlornatriums und der Säure scheidet sich die Substanz hier nie in feinkörniger Form, sondern als eine gequollene, tonerdehydratähnliche oder noch mehr gallert-

ähnliche Masse aus, die man durch Zentrifugieren oder mittels Filtration durch gehärtete Filtra von der klaren, neutralen Flüssigkeit trennen kann.

Das Auspressen der tonerdehydratähnlichen Fällung und ihre Entfernung von dem Filtrum ohne Verluste sind jedoch bisweilen recht schwierig. Namentlich gilt dies von der hyalinen Substanz aus Pferdemageninfusionen. Diese Substanz ist nämlich nach der Ausfällung durch Dialyse so stark gequollen, daß man den Dialysatorinhalt kaum zentrifugieren kann. Durch die Filtration erhält man allerdings ein wasserhelles Filtrat; aber die auf dem Filtrum zuletzt restierende, schleim- oder gallertähnliche Masse hält noch so viel Wasser zurück, daß man sie nicht auspressen kann. Ich mußte sie deshalb in dünner Schicht auf Glasplatten zum Trocknen an der Luft aufstreichen. Da hierzu kommt, daß die hyaline Substanz des Pferdemagens regelmäßig ziemlich stark braungelb gefärbt ist und weniger kräftig enzymatisch als die entsprechende Substanz aus Kuh- oder Schweinsmageninfusionen wirkt, kann ich nicht die Pferdemagenschleimhaut als geeignetes Ausgangsmaterial für die Darstellung der hyalinen Substanz empfehlen.

Die aus Infusionen von Hund, Kuh und Schwein gewonnene, durch Dialyse gegen Wasser ausgefällte Substanz ließ sich dagegen immer auspressen und von dem Filtrum ziemlich leicht entfernen. Sie enthielt jedoch immer noch so viel Wasser, daß man sie nicht direkt zerreiben konnte. Läßt man sie an der Luft oder im Exsikkator eintrocknen, so wird sie hart, hornartig, ähnelt, in dünnerer Schicht eingetrocknet, trockener Gelatine und läßt sich nicht ohne bedeutende Verluste zerreiben. In verdünnter Chlorwasserstoffsäure lösen sich aber auch die harten, nicht zerriebenen Stückchen bei Zimmertemperatur oder in der Kälte vollständig, wenn auch langsam, auf, und die saure Lösung zeigt fortwährend ein typisches Verhalten beim Fällen mit Chlornatriumlösung.

Durch kurzdauernde Alkohol-Ätherbehandlung konnte ich dagegen leicht die Substanz als ein feines trockenes Pulver erhalten. Zu dem Ende zerrieb ich die durch Auspressen von

Wasser möglichst befreite Masse rasch mit Alkohol zu einem feinen Pulver, filtrierte rasch durch kleine Filtra, wusch mit Alkohol nach, verdrängte den Alkohol mit Äther, preßte zwischen Papier und zerrieb fein die leicht sich ablösende Fällung, wobei der Rest des Äthers entwich. Das so behandelte Präparat stellte ein sehr feines, weißes oder fast rein weißes Pulver dar, aber leider schien die verdauende Kraft trotz der nur kurze Zeit — 15—20 Minuten — dauernden Alkohol-Ätherbehandlung herabgesetzt zu sein. In einem Falle verdaute bei der Mettschen Probe in 24 Stunden die nicht alkohol-ätherbehandelte Probe 5,1 mm, die alkohol-ätherbehandelte dagegen nur 3,4 mm. Ich kann also dieses Verfahren gegenwärtig nicht empfehlen. Bemerkenswert ist aber, daß die hyaline Substanz durch die Alkohol-Ätherbehandlung nicht denaturiert worden ist. In Chlorwasserstoffsäure gelöst, gibt sie nämlich bei Halbsättigung mit Chlornatriumlösung eine ganz typische Fällung.

Die Schwierigkeit, die Substanz in geeigneter fester Form mit unverminderter Enzymwirkung zu erhalten, habe ich also noch nicht überwinden können. Für mich ist dies aber bisher von etwas untergeordneter Bedeutung gewesen, indem man viele der mich zunächst interessierenden Fragen sehr gut ohne solche Trockenpräparate studieren kann.

Da man die hyaline Substanz nicht vollständig durch Halbsättigung mit Chlornatrium ausfällen kann, muß natürlich die Ausbeute an solcher mit der Anzahl der Umfällungen und der Menge der zu jeder Auflösung angewendeten Menge Säure wechseln können. Die Ausbeute hängt natürlich auch von dem ursprünglichen Gehalte einer Infusion an solcher Substanz ab, und es schien mir nicht ohne Interesse zu sein, diesen Gehalt im Vergleich zu der Gesamtmenge organischer Substanz in derselben Infusion zu bestimmen. Hierbei mußte ich jedoch natürlich von der unbekanntem Menge absehen, welche bei dem Ausfällen noch in Lösung bleibt und nur den ausgefallten Teil bestimmen.

Bei dieser Bestimmung ging ich von der Erfahrung aus, daß man die mit Chlornatrium erzeugte Fällung nach starkem

Auspressen bei vorsichtiger Arbeit ohne sichtbare Verluste und ohne Verunreinigung mit Papierfasern von dem Filtrum als einen festen, anscheinend homogenen Kuchen trennen kann. Aus dem so erhaltenen, gewogenen Kuchen schnitt ich mit einem Messer an verschiedenen Stellen Streifen aus, in denen nach dem Wägen derselben der Gehalt an Wasser und Chlor-natrium bestimmt und daraus der Gehalt an organischer Substanz berechnet wurde. Da man für eine vollständige Homogenität des ganzen Kuchens keine sichere Gewähr hat, können die erhaltenen Zahlen natürlich nicht als genaue, sondern nur als annähernd richtige gelten. Nach diesem Verfahren habe ich in 8 Infusionen, je 2 von Hund, Schwein, Kuh und Pferd, die Menge der durch Halbsättigung ausgefällten Substanz bestimmt. In Prozenten von der Gesamtmenge organischer Substanz in den Infusionen war die Menge als Mittel 5,19% mit einem Minimum von 3,02% (in einer Kuhmageninfusion) und einem Maximum von 6,53% (in einer Schweinsmageninfusion). Der Gehalt der Infusionen an organischen Stoffen war als Mittel 0,982% mit einem Minimum von 0,759% in einer Infusion auf einem Hundemagen und einem Maximum von 1,266% in der obengenannten Kuhmageninfusion. Die an organischen Stoffen reichste Infusion enthielt also die relativ kleinste Menge hyaliner Substanz, was (wie auch die übrigen Zahlen) zeigt, daß keine bestimmte Relation zwischen der Menge der gesamten organischen Stoffe und der Menge der hyalinen Substanz besteht. Die Menge der (aus je 1 Liter) gefällten Substanz war als Minimum 0,340 g (in einer Hundemageninfusion) und als Maximum (in einer Kuhmageninfusion) 0,620 g. Als Mittel wurden rund 0,5 g gefunden, wobei jedoch zu beachten ist, daß die erste Fällung wohl regelmäßig auch andere Stoffe enthält, so daß die wahre Menge niedriger ist.

Nach Reinigung durch wiederholtes Auflösen und Ausfällen wird die Ausbeute, wie oben gesagt, selbstverständlich kleiner. Die größte Menge, die ich nach mehrmals wiederholtem Fällen aus 1 Liter Schweinsmageninfusion (entsprechend 100 g Schleimhaut) erhalten habe, war rund 0,2 g eines nicht

alkohol-ätherbehandelten, im Exsikkator getrockneten Präparates, welches in der Konzentration 1 : 20000 in 24 Stunden 5,1—5,2 mm nach Mett verdaute. Da Pikelharing¹⁾, dessen reines Pepsin in derselben Konzentration in derselben Zeit 5,3—5,6 mm verdaut, aus den Schleimhäuten von je 10 Schweinsmagen (das Gewicht der Schleimhäute nicht angegeben) „zwei ziemlich gleich große Portionen Pepsin, jede zu etwa 150—200 mg“ erhielt, kann man wohl die obige Ausbeute von 200 mg eines allerdings ein wenig schwächer wirkenden Präparates aus 100 g Schleimhaut als eine ziemlich befriedigende Ausbeute betrachten.

Wie oben erwähnt, benutze ich von der Schleimhaut des Schweinsmagens nur die enzymreichere, dunkler gefärbte Mittelpartie zur Bereitung der Infusionen. Es war deshalb nicht ohne Interesse zu prüfen, wie Infusionen auf andere Teile der Schleimhaut zu der obigen Darstellungsmethode der hyalinen Substanz sich verhalten, und ich habe auch ein paar orientierende Versuche in dieser Richtung angestellt.

In dem einen wurde ein Teil der blassen Fundusschleimhaut, der Kürze halber als Cardiateil bezeichnet, in gewöhnlicher Weise zur Bereitung einer Infusion verwendet. Es wurde auch hier eine Fällung von der gewöhnlichen Art mit Chlornatrium erhalten. Die 3 mal gefällte Substanz war rein weiß, hyalin. Nach der Dialyse ihrer sauren Lösung gegen Wasser enthielt der Dialysatorschlauch (Pergamentpapier) eine fast gummiähnliche Flüssigkeit, in welcher die Substanz so stark gequollen war, daß sie nicht gut sei es abzentrifugiert oder abfiltriert werden konnte. Es wurde deshalb in einem Teile der Flüssigkeit der Gehalt an festen Stoffen bestimmt und dann durch Verdünnung mit Säure und Wasser eine Lösung mit 0,005% festen Stoffen und 0,2% Chlorwasserstoffsäure bereitet. Die auf der roten Mittelpartie derselben Schleimhaut (als Fundusteil bezeichnet) bereitete Infusion wurde ganz ähnlich behandelt. Die 3 mal gefällte Substanz gab aber in diesem Falle nach der Dialyse eine tonerdehydratähnliche

¹⁾ Diese Zeitschr. Bd. 35, S. 11.

Fällung, die leicht abfiltriert werden konnte. Ein Teil des Dialysatorinhaltes wurde trotzdem durch Verdünnen mit Wasser und Umschütteln in eine homogene Flüssigkeit umgewandelt, deren Gehalt an festen Stoffen ebenfalls bestimmt wurde. Durch Verdünnung mit Säure und Wasser wurde auch hier eine Lösung mit 0,005% festen Stoffen und 0,2% Chlorwasserstoffsäure bereitet. Ein Vergleich der beiden Lösungen nach Mett ergab nach 22 Stunden für die Lösung aus dem Fundusteile 5,1 mm und für die Lösung aus dem Cardiateile 4 mm.

In einem anderen Versuche (mit der Schleimhaut von einem anderen Schweine) wurde die Schleimhaut des Pylorusteiles abpräpariert und die mittlere Partie derselben (etwa $\frac{1}{3}$) wie gewöhnlich verarbeitet. Die Infusion war fast farblos, aber selbst nach wiederholtem Filtrieren nicht klar. Sie gab mit Chlornatriumlösung eine reichliche, ziemlich kompakte und deshalb auch mehr weiße Fällung, deren Menge 10,29% von den festen, organischen Stoffen betrug. Die Infusion auf dem gefärbten Teil der Fundusschleimhaut gab eine Fällung, die nur 6,53% von den festen Stoffen repräsentierte. Der nach Verarbeitung des Pylorusteiles erhaltene Dialysatorinhalt war nicht so stark schleimig wie der des Cardiateiles (im vorigen Versuche), aber trotzdem wurde in diesem Falle mit dem Dialysatorinhalte von sowohl dem Fundus- wie dem Pylorusteile wie im vorigen Versuche verfahren. Die Pylorussubstanz wirkte jedoch so schwach, daß eine Lösung von 0,005% bei Metts Probe unwirksam war. Sie wurde deshalb in der Konzentration 0,120% geprüft. In dieser Konzentration wirkte dagegen die Fundussubstanz so kräftig, daß sie für die Mettsche Probe unbrauchbar war. Sie wurde deshalb in der Konzentration 0,005% geprüft. Das Resultat der Mettschen Probe war für die Fundussubstanz (0,005%) 5,9—6 mm und für die Pylorussubstanz (0,120%) 1,2 mm. Die Pylorussubstanz war nur 2mal, die Fundussubstanz dagegen 3mal gefällt worden.

Der Unterschied in Verdauungskraft war also außerordentlich groß, und die Substanz aus dem Pylorusteile wirkte so schwach, daß man vielleicht das Pylorusextrakt als Ma-

terial zur Darstellung der reinen hyalinen Substanz benützen könnte. Nach den Resultaten dieser zwei Versuche zu urteilen, ist es wohl kaum zu bezweifeln, daß die hyaline Substanz, trotz ihrer meistens sehr kräftigen Enzymwirkung, die Enzyme nur als Beimengung enthält.

Wie schon eingangs erwähnt wurde, kann man auch Kalbsmageninfusionen nach der oben beschriebenen Methode verarbeiten; das Resultat wird aber weniger befriedigend infolge davon, daß diese Infusionen in einigen Hinsichten ein etwas abweichendes Verhalten zeigen. Sie geben bei Halb-sättigung mit Chlornatrium nicht die oben beschriebene hyaline Ausscheidung¹⁾, die allmählich als eine obere, zusammenhängende, scharf begrenzte Schicht sich ansammelt und die fortgesetzte Arbeit so sehr erleichtert. Statt einer solchen Masse geben die Kalbsmageninfusionen mit dem Salze eine sehr lockere, grobflockige Fällung, die zum Teil mit Luftbläschen gemengt nach oben steigt, zum Teil aber in der Flüssigkeit schwebt und allmählich zum Boden sinkt. Diese Unannehmlichkeit ist jedoch von untergeordneter Bedeutung, denn man kann durch geeignete Manipulationen fast die gesamte Fällung durch Zentrifugieren als einen Bodensatz erhalten. Die Minderwertigkeit des Verfahrens beim Verarbeiten von Kalbsmageninfusionen liegt darin, daß ein zu bedeutender Teil der Enzyme in Lösung bleibt. Selbst wenn man mit Chlornatrium sättigt, enthält die mehr oder weniger weiße Flüssigkeit noch reichliche Enzymmengen, und bei der wiederholten Auflösung in Säure und Ausfällung mit Chlornatrium gehen weitere Mengen verloren, so daß die Ausbeute sehr klein wird.

Ich habe deshalb auch ein anderes Verfahren versucht, welches beim Verarbeiten der Infusionen von neugeborenen Kälbern oder jungen Saugkälbern als recht brauchbar sich

¹⁾ Erst nach wiederholter Reinigung wird die Substanz deutlicher hyalin.

erwiesen hat. Dieses Verfahren ist eine Kombination des in einem früheren Aufsatz¹⁾ beschriebenen Neutralisationsverfahrens mit der Salzhalbsättigungsmethode.

Durch Titration mit $\frac{n}{10}$ -Lauge bestimmt man die zur fast vollständigen Neutralisation (Lackmus) erforderliche Menge Alkali, neutralisiert dann den größten Teil der Säure durch vorsichtigen Zusatz einer stärkeren Lauge, z. B. $\frac{n}{2}$ (um eine unnötig starke Verdünnung zu vermeiden), und führt dann die Neutralisation mit $\frac{n}{10}$ -Lauge zu Ende. Die hierbei auftretende Fällung wird nach 12—18 Stunden abzentrifugiert, wobei sie sich sehr scharf absetzt. Diese, mit Wasser abgespülte Fällung wird dann in Chlorwasserstoffsäure von 0,2% gelöst und mit dem gleichen Volumen gesättigter Chlornatriumlösung gefällt. Die Fällung wird stark ausgepreßt (was gut geht), von neuem in Säure gelöst und gegen Wasser dialysiert.

Das Filtrat von der durch Neutralisation erhaltenen Fällung enthielt noch bedeutende Enzymmengen, die bei der Dialyse des Filtrates sowohl gegen fließendes wie destilliertes Wasser zum großen Teil mit der Eiweißfällung sich ausscheiden. Diese, durch Dialyse erhaltene, abzentrifugierte Fällung wird in ganz derselben Weise wie die Neutralisationsfällung behandelt. Es könnte natürlich einfacher erscheinen, die Infusion direkt zu dialysieren und die Fällung wie oben zu behandeln, und dies kann man auch tun. Da ich aber in Vorversuchen eine bessere Ausbeute nach dem obigen Verfahren als nach direkter Dialyse erhielt, habe ich nur nach dem erstgenannten Verfahren gearbeitet.

Die Substanz aus Kalbsmageninfusionen weicht von der aus den Mageninfusionen erwachsener Tiere erhaltenen auch darin ab, daß sie bei der Dialyse der zuletzt erhaltenen sauren Lösung gegen Wasser nicht als eine tonerdehydratähnliche oder überhaupt stark gequollene, grobflockige, sondern als eine sehr feinkörnige, weiße Fällung sich ausscheidet, die man sehr leicht sowohl abzentrifugieren wie abfiltrieren und mit Alkohol-äther behandeln kann. Untersucht man die von dieser Dialyse-

¹⁾ Mitt. III. Diese Zeitschr. Bd. 94.

fällung getrennte und klar filtrierte, neutrale Flüssigkeit, so zeigt sie immer Enzymwirkungen, namentlich eine recht starke Chymosinwirkung. Bei einem Vergleiche von den Wirkungen des Filtrates mit denjenigen der Fällung kann man auch einen bisweilen recht bedeutenden Mangel an Parallelität beobachten.

Als Beleg hierfür kann ich folgendes Versuchsergebnis anführen. Das Filtrat von der Dialysefällung enthielt 0,018% feste Stoffe, und ein Teil wurde durch Zusatz von Chlorwasserstoffsäure auf den Säuregrad 0,2% gebracht, wobei der Gehalt an festen Stoffen auf 0,017% herabging. Von einem Teile der feuchten Fällung wurde eine Lösung in 0,2% Chlorwasserstoffsäure mit ebenfalls 0,017% festen Stoffen bereitet. Diese Lösung verdaute in 24 Stunden 3 mm, während das Filtrat unwirksam war. Bei der Fibrinprobe zeigte die Lösung eine ungefähr 40mal kräftigere Wirkung als das Filtrat. Bei neutraler Reaktion und dem obengenannten Gehalte an festen Stoffen war die Wirkung auf Milch (1:10) für die Lösung 45 Sekunden und für das Filtrat 80 Sekunden. Die Relation der beiden Enzymwirkungen war also rund: Chymosin = 2:1 und Pepsin = 40:1.

Der Rest der Fällung wurde ausgepreßt, alkohol-ätherbehandelt, im Exsikkator getrocknet und 4 Monate später auf Löslichkeit in Wasser geprüft. Nach 2tägiger Einwirkung von Wasser (mit Toluol) in einem kühlen Zimmer enthielt das wasserhelle Filtrat 0,0248 also rund 0,025% feste Stoffe. Die neutrale Lösung koagulierte Milch in 62 Sekunden, war aber vollständig unwirksam bei der Mettschen Probe. Sie wirkte auch nur langsam auf Fibrin und wurde deshalb mit einer Lösung von Schweinspepsin (nach der Halbsättigungsmethode dargestellt) verglichen. Sie wirkte ungefähr so stark wie eine Lösung von Schweinspepsin in der Konzentration 1:3 000 000.

Diese Beobachtung ist von einem gewissen Interesse. Ich habe früher gezeigt, daß man durch kurzdauernde, schwache Alkalieinwirkung eine Chymosinlösung gewinnen kann, die bei der Mettschen Probe unwirksam ist und die man für gewisse Untersuchungen als praktisch pepsinfrei betrachten kann. Da

dies mit der unitarischen Auffassung schwer zu vereinbaren ist, hat man angenommen, daß infolge der Alkalibehandlung vielleicht Stoffe gebildet werden, die in saurer Lösung die Pepsinwirkung verhindern. Die obigen Beobachtungen zeigen nun, daß man ohne Alkalibehandlung Chymosinlösungen erhalten kann, die fast ohne Pepsinwirkung sind. Ob die Alkohol-ätherbehandlung hierbei eine Rolle spielt, wie auch, ob man auf diesem Wege eine Methode zur Darstellung pepsinfreier Chymosinlösungen ausarbeiten kann, habe ich noch nicht weiter prüfen können.

Gegen das oben beschriebene Verfahren zur Darstellung der Enzyme aus Kalbsmageninfusionen kann man einwenden, daß die Kalbsmageninfusionen oft (nämlich die Infusionen von etwas älteren Tieren) bei der Neutralisation fast keine oder jedenfalls eine nur unbedeutende Fällung geben. Für solche Fälle kann man entweder die obige Halbsättigungsmethode allein oder erst direkte Dialyse der Infusion und dann die Behandlung der Dialysefällung nach derselben Methode verwenden.

3. Stärke der Pepsinwirkung der hyalinen Substanz.

Die hyaline Substanz aus Pferdemageninfusionen war immer recht stark gefärbt, während sie aus anderen Infusionen farblos erhalten werden konnte. Sie war also offenbar unreiner, sie wirkte schwächer und gab bei der Dialyse eine mehr gelatinöse oder schleimähnliche Masse, die schwieriger zu verarbeiten war. Aus diesem Grunde habe ich die hyaline Substanz aus der Pferdemagenschleimhaut nicht zum Gegenstand weiterer Untersuchungen gemacht.

Gemeinsam für die hyaline Substanz von allen vier Tierarten war indessen, daß sie sowohl Pepsin- wie Chymosinwirkung zeigte.

Von dem reinsten Pepsin, demjenigen von Pikelharing, unterscheidet sich indessen die hyaline Substanz in zwei wesentlichen Hinsichten. Der eine Unterschied betrifft die physikalische Beschaffenheit. Das Pepsin Pikelharings scheidet sich bei der Dialyse ihrer sauren Lösung gegen Wasser

als eine feinkörnige Fällung aus, während die hyaline Substanz unter denselben Verhältnissen gallertähnliche Flöckchen oder eine tonerdehydratähnliche Fällung gibt. Der andere Unterschied ist das verschiedene Verhalten zu Chlorwasserstoffsäure von 0,02%. Das Pepsin Pikelharings hat bei diesem Säuregrade seine geringste Löslichkeit in Wasser und kann dementsprechend bei Säurezusatz zu 0,02% ausgefällt werden. Die hyaline, in Wasser aufgequollene Substanz löst sich dagegen rasch und vollständig nach Zusatz von 0,02% Chlorwasserstoffsäure.

Es handelt sich also hier, wie es scheint, um zwei wesentlich verschiedene Substanzen, die beide starke Enzymwirkungen zeigen, und die Frage, die mich in erster Linie interessierte, war deshalb die, wie die relative Stärke der Enzymwirkungen dieser zwei Substanzen sich verhält. Über die Stärke der Chymosinwirkung des Pikelharingschen Pepsins liegen keine mir bekannten bestimmten Angaben vor, wogegen über die Stärke seiner Pepsinwirkung ganz bestimmte Angaben vorliegen. Aus dem Grunde bezieht sich mein Vergleich der Intensität der Enzymwirkung beider Substanzen nur auf ihre Pepsinwirkung. Bei diesem Vergleiche habe ich die von Geselschap¹⁾ nach der Mettschen Methode gefundenen Standardzahlen für das Pikelharingsche Pepsin, 5,3 – 5,6 mm in 24 Stunden, bei der Konzentration 0,005% (1:20000) benutzt.

Bei der Prüfung der verschiedenen von mir dargestellten Präparate habe ich mich indessen nicht damit begnügt, die bei der Dialyse ausgefällte, abfiltrierte, gepreßte und getrocknete hyaline Substanz zu prüfen. Ich habe auch das von ihr getrennte, wasserhelle, neutrale Filtrat untersucht und dabei in vielen Fällen eine überraschend kräftige Enzymwirkung des letzteren beobachtet. Dies hat mich veranlaßt, mehrere Versuche in folgender Weise auszuführen. Ein Teil des Dialysatorinhaltes, durch Verdünnung mit Wasser auf ein bestimmtes Volumen gebracht, wurde durch Umrühren und Um-

¹⁾ l. c.

schütteln in eine so homogene Flüssigkeit umgewandelt, daß bestimmte Mengen von ihr genau abgemessen werden konnten. Diese abgemessenen Mengen wurden teils zur Bestimmung der festen Stoffe und teils zur Bereitung einer sauren Lösung von bekanntem Säuregrad und Gehalt an festen Stoffen verwendet. Der Rest des Dialysatorinhaltes wurde filtriert. Nach Bestimmung der festen Stoffe im Filtrate wurde auch von ihm eine Lösung von demselben Säuregrade und Gehalte an festen Stoffen bereitet, und die beiden Lösungen wurden dann nach dem Mettschen Verfahren, meistens in der Konzentration 0,005 %, miteinander verglichen. Bei der unten folgenden Besprechung der mit solchen Lösungen erhaltenen Versuchsergebnisse bezeichne ich diese zwei Arten von Versuchslösungen der Kürze halber als Dialysatorinhalt und Filtrat.

Mit der hyalinen Substanz aus Hundemageninfusionen habe ich nur wenige Versuche anstellen können, indem im ganzen nur vier Infusionen auf Hundemägen mir zugänglich gewesen sind und die Flüssigkeitsmenge jedesmal eine verhältnismäßig kleine war. Meine Erfahrung über die Substanz aus Hundemägen ist also sehr unbedeutend, aber trotzdem dürfte sie nicht ganz ohne Interesse sein.

Geselschap¹⁾, welcher das Pepsin des Hundes aus Magensaft nach Scheinfütterung dargestellt hat, fand dasselbe auffallend wenig wirksam. Für das direkt durch Dialyse des Magensaftes ausgefällte, wie für das so gewonnene, wieder in Säure gelöste und noch einmal durch Dialyse gefällte Pepsin hat er bei der Mettschen Probe in 24 Stunden in der Konzentration 0,005 % Werte von 1,27—2,6 mm erhalten. Durch Halbsättigung des von der Dialysefällung getrennten Filtrates mit Ammoniumsulfat erhielt er ein Pepsin von kräftigerer Wirkung, nämlich 4—4,8 mm, und nach einem etwas abgeänderten Verfahren ein Präparat, welches 4,8—5 mm verdaute. Ich habe ebenfalls Präparate von wechselnder, meistens schwacher Wirkung, nämlich 1,5—2,4 mm, erhalten. Bei der Untersuchung des Filtrates von der durch Dialyse erhaltenen

¹⁾ l. c.

Fällung fand ich aber in einem Falle in der Konzentration 0,005% eine Verdauung von 5,1 mm. Das Filtrat wirkte in diesem Falle kräftiger als die Fällung, denn der Dialysatorinhalt, direkt mit Säure versetzt und in der Konzentration 0,025% mit dem Filtrate (in derselben Konzentration) verglichen, ergab 7,4 mm, das Filtrat dagegen 9,5 mm. In einem anderen Falle wirkte dagegen das Filtrat ein wenig schwächer als die entsprechende, ausgepreßte und im Exsikkator getrocknete Fällung, nämlich bei der Konzentration 0,005%, Fällung = 1,5 und Filtrat = 1,3 mm.

Geselschap glaubt die schwache Wirkung der Mehrzahl seiner Präparate durch die Annahme einer Verunreinigung mit hemmend wirkenden Substanzen erklären zu können, und die Möglichkeit, daß diese Annahme richtig ist, kann ich natürlich nicht in Abrede stellen. Die schwache und inkonstante Wirkung meiner Präparate erkläre ich durch die Annahme, daß die hyaline Substanz in den verschiedenen Fällen eine wechselnde Menge Pepsin als Beimengung enthalten hat.

Eine Frage, die man in diesem Zusammenhange machen kann, ist die, ob die hyaline Substanz ein Bestandteil des normalen Magensaftes ist oder nicht, denn diese Frage kann wohl nur durch Untersuchung des natürlichen Hundemagensaftes erledigt werden. Da mir kein solcher Magensaft zugänglich gewesen ist, habe ich diese Frage nicht experimentell prüfen können; aber trotzdem glaube ich, daß sie verneinend zu beantworten ist. Wenn die hyaline Substanz in normalem Hundemagensaft vorhanden wäre, würde dies wohl schwerlich anderen Forschern entgangen sein, und die von Pekelharing und Geselschap bei direkter Dialyse des Hundemagensaftes erhaltene Fällung hatte offenbar nicht die Eigenschaften der hyalinen Substanz. Wenn nun die letztere, wie es scheint, in dem Magensaft fehlt, könnte man daran denken, daß sie schon bei der Sekretion oder unter Einwirkung des hohen Säuregrades bei Körpertemperatur im Magensaft denaturiert worden ist. Da ich nun beobachtet hatte, daß die hyaline Substanz sehr rasch denaturiert werden kann, machte ich einige hierauf sich beziehenden Versuche mit der Substanz

aus Hundemagenschleimhaut. Ich fand hierbei, daß selbst eine so konzentrierte Lösung, daß sie 0,250% in Chlorwasserstoffsäure von 0,4% enthielt, bei 38° C. in 5—6 Minuten vollständig denaturiert wurde. Bei Einwirkung derselben Temperatur während 3 Minuten und möglichst rascher Abkühlung war die Denaturierung fast vollständig, so daß bei Zusatz von Chlornatriumlösung nur eine unbedeutende, grobflockige, etwas hyaline Fällung entstand, während die Kontrollprobe zu einer schleimähnlichen Masse erstarrte. Um eine rasche Erwärmung und Abkühlung zu ermöglichen, wurden nur einige ccm in einem dünnwandigen Reagenzrohre zu dem Versuche verwendet.

Da ich natürlichen Hundemagensaft nicht erhalten kann, und da es außerdem sehr schwer ist, Hundemägen aufzubringen, beabsichtige ich nicht, weitere Versuche mit den Hundemagenenzymen anzustellen. Vielleicht werden andere, welche über das erforderliche Material verfügen können, diesen Fragen ihre Aufmerksamkeit widmen.

Über das Pepsin des Kuhmagens liegen meines Wissens keine besonderen Untersuchungen vor, und bezüglich der verdauenden Wirkung dieses Pepsins war ich also auf einen Vergleich mit dem Pikelharingschen Standardpepsin aus Schweinsmagen hingewiesen. Nun ist es allerdings fraglich, ob diese beiden Pepsine identisch sind, aber trotzdem oder eher gerade aus dem Grunde ist ein solcher Vergleich nicht ohne Interesse. Ich teile deshalb hier ganz kurz einige Beobachtungen über die Wirkung des Kuhpepsins mit.

Die hyaline Substanz des Kuhmagens ist, wie die von den anderen untersuchten Tieren, leicht löslich in Chlorwasserstoffsäure von 0,02% und unterscheidet sich hierdurch wie auch durch ihre physikalische Beschaffenheit von dem Schweinspepsin (Pikelharings). Mit dem letzteren verglichen, zeigt sie eine auffallend kräftige Wirkung. In meinen Versuchen mit der hyalinen Substanz aus Kuhmagen, der Kürze halber als Kuhpepsin bezeichnet, habe ich teils die bei der Dialyse entstandene abfiltrierte, ausgepreßte und an der Luft getrocknete Fällung, teils das von ihr getrennte Filtrat und endlich

auch den Dialysatorinhalt (wie in den Versuchen mit Hundepepsin) gesondert untersucht. Die ausgepreßte, gelatinöse, an der Luft getrocknete Fällung erhielt ich, wenn sie nicht mit Alkoholäther behandelt wurde, stets als durchsichtige, hornartige Lamellen oder Stückchen, die ich nicht ohne bedeutende Verluste pulverisieren und als Pulver im Exsikkator austrocknen konnte, und die folglich zur Darstellung von Lösungen sicher bekannter Konzentrationen weniger geeignet waren. Aus dem Grunde habe ich hauptsächlich das Filtrat und den Dialysatorinhalt benutzt, Lösungen mit demselben Gehalte an festen Stoffen und von demselben Säuregrade von beiden bereitet und miteinander nach dem Mettschen Verfahren verglichen.

Hierbei zeigte es sich, daß das Filtrat eine wesentlich kräftigere Wirkung als die ausgefällte Substanz besitzen kann. So zeigte z. B. ein Präparat, welches 2mal ausgefällt worden war, folgendes Verhalten. Der Dialysatorinhalt, auf den Säuregrad 0,2% Chlorwasserstoffsäure und einen Gehalt von 0,005% festen Stoffen gebracht, verdaute in 24 Stunden 5 mm. Das Filtrat, welches 0,048% feste Stoffe enthielt, wurde mit Wasser verdünnt und mit Säure zu 0,2% Chlorwasserstoffsäure und 0,005% festen Stoffen versetzt, und er verdaute unter ganz denselben Bedingungen in derselben Zeit 7 mm. Die Fällung wirkte also in diesem Falle offenbar schwächer, das Filtrat dagegen bedeutend kräftiger als das Pikelharingsche Standardpepsin. In einem anderen Falle mit einer ebenfalls 2mal gefällten Substanz war das Verhalten folgendes. Der Dialysatorinhalt verdaute in 24 Stunden 6,9 bis 7,1 mm und wirkte also viel kräftiger als das Pikelharingsche Pepsin. Das Filtrat wirkte aber noch kräftiger, indem es in derselben Konzentration (0,005% festen Stoffen) unter denselben Bedingungen 8 mm verdaut hatte.

In dem Vorigen wurde nur gesagt, daß das Filtrat kräftiger als die ausgefällte Substanz wirken „kann“, denn ein solches Verhalten kommt nicht immer vor. Ich habe nämlich auch zwei Fälle beobachtet, in welchen das Filtrat bei der Mettschen Probe unwirksam war. In dem 1. Falle, welcher

meinen ersten Versuch mit Kuhmageninfusionen betraf, wurde der Gehalt des Filtrates an festen Stoffen leider nicht bestimmt. In dem 2. Falle enthielt das Filtrat 0,025% feste Stoffe und war in dieser Konzentration während 24 Stunden unwirksam bei der Mettschen Probe. Die ausgefällte Substanz (wie oben als Dialysatorinhalt geprüft) hatte dagegen in der Konzentration 0,005% in derselben Zeit 6 mm verdaut.

Der wechselnde Gehalt der Filtrate an festen Stoffen in den verschiedenen Fällen, wie auch die sehr wechselnde Intensität der Wirkung sprechen wohl entschieden dafür, daß es hier nicht um eine einheitliche Substanz, sondern um ein Gemenge, resp. eine labile Verbindung zwischen Enzym- und Proteinsubstanz sich handelt, die unter verschiedenen, noch nicht näher untersuchten Bedingungen mehr oder weniger leicht zerfällt.

Bemerkenswert ist es jedenfalls, daß man unter Umständen Filtrate erhalten kann, die doppelt so kräftig (8 mm) wie das reinste Pikelharingsche Pepsin wirken, und dies, trotzdem diese Filtrate wahrscheinlich neben dem Enzym auch andere Stoffe enthalten. Dies könnte nun daher rühren, daß das Kuhpepsin nicht mit dem Schweinspepsin indentisch ist, eine Möglichkeit, die dadurch an Wahrscheinlichkeit gewinnt, daß das Chymosin des Kuhmagens, wie unten gezeigt werden soll, etwas anders als das Chymosin von Schwein und Hund sich verhält. Es kann aber natürlich auch daher rühren, daß das in den Filtraten gelöste Enzym eine reinere und aus dem Grunde auch kräftiger wirkende Substanz ist. Diese Frage gehört zu denjenigen, deren Lösung weiteren Untersuchungen überlassen werden muß. Aus den nun mitgeteilten Beobachtungen kann man jedenfalls den Schluß ziehen, daß auch die hyaline Substanz des Kuhmagens sehr gut als Ausgangsmaterial für fortgesetzte Studien über das Pepsin sich eignet.

Über die Wirkung der hyalinen Substanz des Schweinmagens, die bezüglich ihrer enzymatischen Wirkung natürlich mit dem Pikelharingschen Standardpepsin direkt ver-

gleichbar ist, findet man schon in dem Vorigen einige Angaben, aus denen erhellt, daß die hyaline Substanz eine wechselnde enzymatische Intensität zeigt. Das am schwächsten wirkende Präparat erhielt ich in einem Falle nach 3maligem Ausfällen mit Chlornatriumlösung. Die infolge der Dialyse ausgefällte, ausgepreßte und an der Luft getrocknete, hornartige Substanz verdaute nämlich in der Konzentration 0,005% nur 4 mm in 24 Stunden. In diesem Falle verdaute das Filtrat stärker als das Pikelharingsche Pepsin, nämlich (in der Konzentration 0,005%) 6 mm. Der Dialysatorinhalt verdaute in derselben Konzentration und in derselben Zeit (24 Stunden) 5,5—5,6 mm.

In einem anderen Falle wirkte das Filtrat von der Dialysefällung anscheinend noch kräftiger. Das Filtrat wurde allerdings in diesem Falle nicht in der gewöhnlichen Konzentration, sondern bei einem Gehalte von 0,0088% geprüft, es verdaute aber in 20 Stunden 9 mm. Auffallend war es, daß dasselbe, nicht angesäuerte Filtrat im Verhältnis zu der kräftigen Pepsinwirkung eine schwache Chymosinwirkung zeigte. Es koagulierte nämlich bei Körpertemperatur Milch in dem Verhältnisse 1 : 10 erst nach 8 Minuten. Die durch Dialyse erhaltene, abfiltrierte und an der Luft getrocknete, hornartige Fällung, in Chlorwasserstoffsäure von 0,2% gelöst, verdaute in der Konzentration 0,005% in 24 Stunden 5,7 mm und wirkte also ebenso kräftig wie das reinste Standardpepsin. Dieses Präparat war 3mal mit Chlornatriumlösung ausgefällt worden.

Von einem 3. Präparate, ebenfalls 3mal mit Chlornatriumlösung gefällt, wurde das Filtrat, welches 0,053% feste Stoffe enthielt, mit der abfiltrierten, ausgepreßten und im Exsikkator getrockneten, hornartigen Dialysefällung verglichen. Beide Lösungen enthielten 0,005% feste Stoffe und 0,2% Chlorwasserstoffsäure. Verdauung nach Mett in 24 Stunden: Filtrat 5,9—6 mm, Fällung 5,1—5,2 mm. In einem 4. Falle — ebenfalls 3maliges Ausfällen mit Chlornatriumlösung — verdaute das Filtrat (0,005% feste Stoffe) in 24 Stunden 5,6 mm und der Dialysatorinhalt unter denselben Bedingungen 5,1 mm.

Die abfiltrierte Fällung, welche in diesem Falle nicht an der Luft getrocknet, sondern mit Alkoholäther behandelt wurde, verdaute unter ähnlichen Bedingungen nur 3,4 mm.

Zu dem oben (S. 253) erwähnten Falle, in welchem ein Teil der hyalinen Substanz nur 2- und der Rest 5mal mit Chlornatriumlösung gefällt wurde, will ich bemerken, daß zu der Pepsinprobe nicht die durch Dialyse ausgefällte, abfiltrierte und getrocknete Substanz, sondern die zuletzt erhaltenen Lösungen verwendet wurden. Von der Lösung der 2mal gefällten Substanz in Chlorwasserstoffsäure von 0,2% wurde ein Teil bei etwas über 0° aufbewahrt, während der Rest zur wiederholten Fällung mit Chlornatriumlösung benutzt wurde. Die 5. Fällung wurde nach dem Auspressen in Chlorwasserstoffsäure von 0,2% gelöst und dann, ebenso wie die Lösung der 2. Fällung, gegen Chlorwasserstoffsäure von derselben Konzentration, zur Entfernung des Kochsalzes, dialysiert. Dann wurde ein Teil jeder Lösung zur Bestimmung der festen Stoffe benutzt und darauf von beiden neue Lösungen mit 0,005% festen Stoffen und 0,2% Chlorwasserstoffsäure bereitet. Mit diesen Lösungen wurde das oben (S. 253) erwähnte Resultat — 7 mm für die 2mal und 6 mm für die 5mal gefällte Substanz — erhalten.

Die Beobachtung, daß der Dialysatorinhalt und in noch höherem Grade die abfiltrierte Fällung wesentlich schwächer als das von dem Niederschlage getrennte Filtrat wirken kann, wie auch die in verschiedenen Fällen wechselnde Intensität der Enzymwirkung zeigen, daß die hyaline Substanz keine reine Enzymsubstanz und kein einheitlicher Stoff ist. Der Umstand, daß sowohl die nur 2mal gefällte hyaline Substanz wie das Filtrat in einigen Fällen kräftiger als das Pikelharingsche Pepsin gewirkt hat, dürfte wohl ferner zeigen, daß auch das letztere keine reine Enzymsubstanz sein kann. Die recht konstante Wirkung dieses letztgenannten Pepsins bei der Mettschen Probe, nämlich 5,2—5,6 mm, in der Konzentration 0,005%, im Vergleiche zu der mehr wechselnden Wirkung der hyalinen Substanz (4—7 mm) deutet vielleicht darauf hin, daß das Pikelharingsche Pepsin eine Verbindung

in ziemlich konstantem Verhältnis zwischen Enzym und einem Eiweißstoff ist, während die enzymatisch wirkende hyaline Substanz mehr den Eindruck eines Gemenges von Enzym und Proteinsubstanz gibt.

Es ist ferner vielleicht der Erwähnung wert, daß sowohl die obengenannten Filtrate wie die hyaline Substanz bei Gegenwart von 0,1–0,2% Chlorwasserstoffsäure die Pikelharingsche Pepsinreaktion (bei raschem Erhitzen der sauren Lösung) geben, wenn nur die Lösung nicht zu stark verdünnt ist. Ich kenne nicht die Empfindlichkeitsgrenze dieser Reaktion in Lösungen von Pikelharings Pepsin. In ein paar Versuchen mit hyaliner Substanz in saurer Lösung habe ich aber gefunden, daß die Empfindlichkeitsgrenze bei dem Säuregrade 0,2% Chlorwasserstoffsäure ungefähr bei der Konzentration 1:10000 oder etwas darunter liegt. In dieser Konzentration wurde die Lösung bei raschem Erhitzen zuerst nur opaleszent ohne sichtbare Fällung, nach dem Erkalten trat aber binnen kurzem eine geringfügige, sehr feine Fällung auf.

Wenn man die enzymatisch wirkende hyaline Substanz als ein Gemenge auffaßt, so liegt der Wert ihrer Darstellung hauptsächlich nur darin, daß sie ein leicht darstellbares Ausgangsmaterial für weitere Untersuchungen liefert. Da jedenfalls der allergrößte Teil der Enzyme in einer Infusion bei Halbsättigung mit Chlornatrium ausfällt, konnte man erwarten, daß schon diese erste Rohfällung eine kräftige Enzymwirkung zeigen soll. Dies ist nun, wie einige hierüber angestellte Versuche zeigen, in der Tat auch der Fall. Die erste Rohfällung enthält nach starkem Auspressen immer ziemlich viel Flüssigkeit, gewöhnlich mehr als 60%, und folglich auch Chlornatrium. Infolge dieses Gehaltes an Chlornatrium kann man sie in halbgetrocknetem Zustande leicht zerreiben und, nach weiterem Trocknen im Exsikkator, als ein sehr feines, blaßgelbliches Pulver gewinnen. In diesem, bis zu konstantem Gewicht im Exsikkator getrockneten Pulver habe ich den Gehalt an Chlornatrium bestimmt und den Rest als hyaline Substanz berechnet. Ich habe drei solche Präparate untersucht. Das Pulver wurde bei Zimmertemperatur in Chlor-

wasserstoffsäure von 0,2% gelöst und dann mit Säure so weit verdünnt, daß die zu prüfenden Lösungen immer 0,005% organische Substanz enthielten. Das Präparat 1, mit 32,5% Chlornatrium und 67,5% organischer Substanz, verdaute in 24 Stunden 6 mm. Das Präparat 2, mit 27,4% Chlornatrium und 72,6% organischer Substanz, verdaute 4,1 mm und das Präparat 3, mit resp. 29,7% Chlornatrium und 70,3% organischer Substanz, 5,2 mm.

Man kann also schon durch einmalige Ausfällung mit Chlornatrium Trockenpräparate von allerdings etwas wechselnder, in Einzelfällen aber sogar von etwas kräftigerer Enzymwirkung als derjenigen des Standardpepsins erhalten, und diese Trockenpräparate wirkten kräftiger als alle von mir geprüften käuflichen Pepsinpräparate. Diese Rohfällung kann man direkt zu vielen Untersuchungen über die Pepsinverdauung verwenden, denn das beigemengte Chlornatrium dürfte in Lösungen 1:20000 oder in noch stärker verdünnten Lösungen wohl ohne Belang sein. Dieses Rohpepsin wirkt nämlich sogar in der Verdünnung 1:10000000 noch verdauend auf ungekochtes Fibrin, in der Siedehitze fein koaguliertes, feuchtes Hühnereiweiß und in Verdauungssalzsäure gelöstes Kasein. So waren z. B. in 1%igen Lösungen von Kasein in Chlorwasserstoffsäure von 0,2% bei Körpertemperatur in einem Versuche mit dem Rohpräparate 1 bei der Pepsinkonzentration 1:10000000 im Laufe von 24 Stunden 19,6% und mit dem Präparate 3, welches etwas schwächer wirkte, 11,8% von dem Kasein in Albumosen übergeführt worden. Daß in allen Versuchen Kontrollversuche mit Säure allein angestellt wurden, dürfte wohl eigentlich selbstverständlich sein.

Löst man das Rohpräparat in Chlorwasserstoffsäure von 0,2% bei Zimmertemperatur oder in der Kälte, so kann man durch Dialyse gegen Säure derselben Konzentration leicht das Chlornatrium entfernen, und man erhält nun sehr kräftig wirkende Enzymlösungen, die viel reiner als die (von mir untersuchten) käuflichen Pepsinpräparate sind. Das Verfahren eignet sich also sehr gut zur Darstellung von Pepsinlösungen im Laboratorium, und aus den von der Infusion getrennten

Schleimhautresten, welche noch recht viel Enzym enthalten, kann man, nach nicht zu langdauernder Verdauung bei Körpertemperatur, durch Ausfällung mit Ammoniumsulfat und weitere Verarbeitung, hauptsächlich nach dem Verfahren von Pekelharing, noch weitere Mengen eines kräftig wirkenden Pepsins gewinnen.

Aus je 1 Liter Infusion, welcher 100 g Fundusschleimhaut entspricht, kann man, wie oben erwähnt, als Mittel 0,5 g eines Rohpräparates erhalten, welches unter Umständen ebenso kräftig oder sogar etwas kräftiger als das reinste Standardpepsin wirkt, während man zur Gewinnung einer etwa gleich großen Menge des letzteren 10 Schweinsmägen nach einem ziemlich umständlichen Verfahren verarbeiten muß. Dies ist natürlich ein großer Vorteil. Die größte Bedeutung des neuen Verfahrens liegt meines Erachtens auch darin, daß man nach ihm in sehr einfacher und wohlfeiler Weise ein enzymreiches Rohmaterial erhalten kann, welches neue Wege zum Studium der Magenenzyme eröffnet.

4. Einige Beobachtungen über die Enzymwirkungen der hyalinen Substanz.

Nach dem oben geschilderten Darstellungsverfahren erhält man die hyaline Substanz mit unveränderten physikalischen Eigenschaften, und eine schädigende Einwirkung der Säure bei Körpertemperatur ist jedenfalls ausgeschlossen. Es war deshalb von Interesse, die Enzymwirkungen der nach diesem Verfahren erhaltenen Lösungen mit den Wirkungen der in früher üblicher Weise erhaltenen Infusionen bzw. Enzymlösungen zu vergleichen, und ich habe einige orientierende Versuche in dieser Richtung ausgeführt.

Sieht man von der verschieden kräftigen Wirkung verschiedener Pepsinpräparate ab, so dürften wohl keine sicher festgestellten Unterschiede in der Wirkung des Pepsins der verschiedenen in dieser Hinsicht bisher untersuchten Säugtiere bekannt sein. Die Chymosinwirkung zeigt dagegen bekanntlich, z. B. bei Schwein und Kalb, ein so abweichendes Verhalten, daß man das Vorkommen eines besonderen Chymo-

sins, des sog. Parachymosins, angenommen hat¹⁾). Unter solchen Umständen schien es mir in erster Linie von Interesse zu sein, die Chymosinwirkung der hyalinen Substanz vom Schweine zu prüfen.

Für das Chymosin des Schweines ist es charakteristisch, daß es dem Zeitgesetze gegenüber anders als das Chymosin vom Kalbe sich verhält. Das Chymosin vom Schweine (das Parachymosin) folgt nämlich nur bei verhältnismäßig kurzen Gerinnungszeiten einigermaßen dem Gerinnungsgesetze, während seine Lösung schon nach mäßiger Verdünnung die Milch bei Körpertemperatur nicht koaguliert. Wie verhält sich nun die hyaline Substanz in dieser Hinsicht? Die folgenden Beispiele werden dies zeigen.

Zu den Gerinnungsversuchen mit Chymosin muß man unbedingt neutrale oder fast ganz neutrale Enzymlösungen verwenden. Ganz neutrale, salzfreie Lösungen habe ich durch Anwendung des nach Abfiltrieren der Dialysefällung gewonnenen neutralen Filtrates in einigen Fällen ohne weiteres erhalten. Sonst habe ich die saure Lösung, deren Säuregrad durch Titration genau festgestellt worden war, mit $\frac{n}{10}$ -Lauge bis auf 0,003—0,002% freie Chlorwasserstoffsäure neutralisiert. Für das Resultat schien es gleichgültig zu sein, ob ich mit der einen oder anderen Art von Lösungen arbeitete. Das im letzteren Falle vorhandene Chlornatrium schien ohne Einfluß auf das Hauptresultat zu sein. Eine Schwierigkeit bei Versuchen mit Schweinsenzym liegt jedoch darin, daß bei etwas längerer Gerinnungszeit die Koagulation nicht mit einem Schlage von statten geht. Es wird erst eine feine Fällung sichtbar; nach einiger Zeit sieht man größere oder kleinere Käseklümpchen, und nach längerem Stehen wird der Inhalt der Reagenzröhren mehr oder weniger fest. Man kann also in solchen Fällen keinen sicheren Zeitpunkt für die Koagulation feststellen. Ich habe den Zeitpunkt gewählt, wo die erste, ganz unzweifelhafte Fällung auftrat. In den Versuchen

¹⁾ Vgl. Ivar Bang, Deutsche med. Wochenschr. 1899, und Pflügers Archiv Bd. 79.

mit Kalbsenzym war dagegen der Zeitpunkt der Koagulation leicht festzustellen. Nach diesen vorausgeschickten Bemerkungen führe ich hier einige Beispiele von der Enzymwirkung der hyalinen Substanz vom Schweine an.

Eine neutralisierte Lösung mit 0,06% organischer Substanz (= 1 : 1666) wurde mit Wasser verdünnt und in den Konzentrationen: 1 (1 : 1666), $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$ und $\frac{1}{8}$ bei 38° C. mit Milch (1 : 10) geprüft. Die Gerinnungszeiten in Sekunden waren 1 = 90; $\frac{1}{2}$ = 220; $\frac{1}{4}$ = 4500 und $\frac{1}{8}$ = keine Koagulation in 3 Stunden. Wenn innerhalb 3—4 Stunden keine Zeichen einer beginnenden Koagulation zu sehen sind, findet eine typische Gerinnung bei weiterem Stehen der Proben bei Körpertemperatur nicht (ohne Säurebildung in den Proben) statt, und die Gerinnungszeit kann in solchen Fällen gleich ∞ gesetzt werden. Statt der nach dem Zeitgesetze zu erwartenden Relation der Gerinnungszeiten 1 : 2 : 4 : 8 wurden also die Zahlen 1 : 2,4 : 50 : ∞ erhalten. Die Lösung zeigte also das für das Parachymosin charakteristische Verhalten.

Zu einem anderen Versuche wurde das neutrale Filtrat von einer Dialysefällung verwendet. Dieses Filtrat enthielt 0,045% organische Substanz (= 1 : 2222). Es wurde mit Wasser verdünnt und in den Konzentrationen 1 (= 1 : 2222), $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$, $\frac{1}{16}$ mit Milch bei 38° C. geprüft. Die Gerinnungszeiten in Sekunden waren 1 = 60; $\frac{1}{2}$ = 150; $\frac{1}{4}$ = 480; $\frac{1}{8}$ = 10800 und $\frac{1}{16}$ = keine Koagulation. Die Relationszahlen waren also 1 : 2,5 : 8 : 180 : ∞ , und auch dieses Filtrat verhielt sich folglich wie eine Parachymosinlösung. In der Konzentration 0,005% (= 1 : 20000) verdaute es nach Mett 6 mm.

Da ein Vergleich mit der Wirkung des Kalbsenzymes von Interesse ist, habe ich auch solche Versuche angestellt, und es mag folgendes Beispiel angeführt werden. Eine neutralisierte Lösung der Substanz vom Schwein wurde mit einer Kalbsenzymlösung, die nach der Neutralisationsmethode¹⁾ aber ohne Alkalieinwirkung dargestellt worden war, verglichen. In der Konzentration 0,025% (1 : 4000) ergaben die Lösungen

¹⁾ Mitt. III. Diese Zeitschr. Bd. 94.

bei der Mettschen Probe nach 22 Stunden Kalb = 2 mm, Schwein = 12,1 mm. Die Relation der Pepsinmengen war also: Kalb : Schwein = 1 : 36. In den Milchversuchen war die Konzentration 1 beider Enzymlösungen 0,0125 % (1 : 8000) und sie wurden mit Wasser zu $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$ und $\frac{1}{8}$ verdünnt. Die Gerinnungszeiten in Sekunden bei 38° C. waren folgende:

Schwein 1 (1 : 8000) = 70; $\frac{1}{2}$ = 135; $\frac{1}{4}$ = 3000; $\frac{1}{8}$ keine Gerinnung,

Kalb 1 (1 : 8000) = 75; $\frac{1}{2}$ = 140; $\frac{1}{4}$ = 240; $\frac{1}{8}$ = 420.

Die Relationen der Gerinnungszeiten waren also für das Schweinsenzym = 1 : 1,9 : 43 : ∞ und für das Kalbsenzym 1 : 1,9 : 3,2 : 5,6.

Dieser Versuch gab also bezüglich des Schweinsenzymes ein ganz ähnliches Resultat wie die zwei vorigen. Er zeigt ferner das wesentlich verschiedene Verhalten des Chymosins von Kalb und Schwein, und endlich liefert er auch ein gutes Beispiel von der fehlenden Parallelität der beiden Enzymwirkungen. Beide Lösungen hatten dieselbe Konzentration und innerhalb der Grenzen, welche einen direkten Vergleich beider Wirkungen gestatteten, wirkten sie auch fast gleich kräftig auf Milch. Die Pepsinrelation war aber eine ganz andere, nämlich 1 : 36. Man findet es vielleicht auffallend, daß auch das Kalbsenzym nicht dem Zeitgesetze genau folgt, indem in den verdünnteren Lösungen (bei noch kräftiger Wirkung) die Gerinnungszeiten relativ etwas zu kurz waren. Dies ist aber ein Verhalten, dem man in Versuchen mit Kalbsmagenenzym bei Körpertemperatur oft begegnet und dessen Ursache noch nicht klar ist. Ähnliches kann man, bei geeigneten Konzentrationen, auch in Versuchen mit Kuh- oder Schweinsenzym beobachten; und ein mehr eingehendes Studium des Zeitgesetzes bei verschiedenen Temperaturen und verschiedenen Konzentrationen der Enzymlösungen scheint mir deshalb sehr erwünscht zu sein.

Anschließend an die mitgeteilten Versuche mit Schweinsenzym führe ich hier auch ein paar Versuche mit Kuhenzym an.

Eine saure Lösung von an der Luft im Exsikkator getrocknetem Kuhenzym wurde fast vollständig neutralisiert und in den Konzentrationen $1 = (1 : 3000)$, $1/2$, $1/4$ und $1/8$ mit Milch bei 38°C . geprüft. Die Gerinnungszeiten waren in Minuten $1 = 8$; $1/2 = 16$; $1/4 = 31$; $1/8 = 65$, und die Enzymwirkung folgte also innerhalb dieser Grenzen dem Zeitgesetze. Eine mit derselben Milch gleichzeitig geprüfte neutralisierte Lösung von Kalbsenzym ($1 : 3000$) — nach dem in diesem Aufsatze angegebenen Verfahren erhalten — wirkte 8mal so kräftig wie die Kuhenzymlösung. Beide Lösungen wurden in der Konzentration $1 : 3000$ (chlornatriumfrei) nach Mett geprüft. Nach 20 Stunden hatte das Kuhenzym 7,2 mm, das Kalbsenzym dagegen nichts verdaut. Bei der Karminfibrinprobe wirkte die Kuhenzymlösung 80mal so kräftig wie die Lösung von Kalbsenzym. Die Enzymrelationen waren also für das Pepsin: Kuh : Kalb = $80 : 1$ und für das Chymosin = $1 : 8$. Der Mangel an Parallelität war also höchst bedeutend.

Zu dem nun folgenden Versuche diente nicht eine neutralisierte Lösung von Kuhenzym, sondern das neutrale Filtrat eines Dialysatorinhaltes. Das Kalbsenzym war ein nach dem neuen Verfahren dargestelltes Trockenpräparat, dessen Lösung in Chlorwasserstoffsäure genau neutralisiert wurde. Beide Lösungen enthielten je $0,025\%$ organische Stoffe ($1 : 4000$). Sie wurden in den Konzentrationen $1 = (1 : 4000)$, $1/2$, $1/4$, $1/8$ und $1/16$ mit Milch bei $38-39^{\circ} \text{C}$. geprüft. Die Gerinnungszeiten, in Sekunden, waren folgende:

Kuh $1 = 122$; $1/2 = 228$; $1/4 = 360$; $1/8 = 930$; $1/16 = 2340$.

Kalb $1 = 40$; $1/2 = 62$; $1/4 = 100$; $1/8 = 165$; $1/16 = 330$.

Die Relationen der Gerinnungszeiten waren also für Kuh = $1 : 1,9 : 2,9 : 7,6 : 19$ und für Kalb = $1 : 1,6 : 2,5 : 4,1 : 8,3$.

Zu der Mettschen Probe diente die nicht vorher neutralisierte und also nicht chlornatriumhaltige Lösung des Kalbsenzymes, beide Lösungen also ohne Chlornatrium. Die Konzentration beider war $0,005\%$ ($1 : 20000$) und das Resultat nach 24 Stunden war folgendes: Kuhenzym = 8,1 mm; Kalbsenzym = 1,6 mm. Die Relation der Chymosinwirkungen war,

wenn man an die drei ersten, miteinander gut vergleichbaren Konzentrationen sich hält, als Mittel Kalb : Kuh = 3,4 : 1, während die Pepsinrelation 1 : 26 war. Auch in diesem Falle also fehlende Parallelität der beiden Enzymwirkungen. Sowohl das Kuh- wie das Kalbsenzym zeigte die obengenannte Abweichung von dem Zeitgesetze, daß nämlich die Gerinnungszeiten im Verhältnis zu den berechneten zu kurz waren; der Versuch zeigt aber, daß das Kuhenzym hinsichtlich ihrer Chymosinwirkung dem Zeitgesetze viel besser als das Schweinsenzym folgt. Diese zwei Versuche, die einzigen, die ich bisher mit Kuhenzym angestellt habe, sprechen also dafür, daß das Kuhenzym nicht mit dem Schweinsenzym identisch ist, sondern dem Kalbsenzym viel näher steht.

Das wesentlich verschiedene Verhalten des Kuh- und des Schweinsenzymes zu der Milchgerinnung geht noch deutlicher aus dem folgenden Vergleiche der Wirkung von zwei gleich konzentrierten Lösungen der beiden Enzyme hervor. Die Kuhenzymlösung war die im letzten Versuche erwähnte und die Schweinsenzymlösung dieselbe, die zu dem oben (S. 277) erwähnten vergleichenden Versuche mit Schweins- und Kalbsenzym gedient hatte. Beide Lösungen gaben bei 38° C. für die Milchgerinnung (1 : 10) folgende Zeiten in Sekunden:

Schwein	$\frac{1}{8000} = 70$	$\frac{1}{16000} = 135$	$\frac{1}{32000} = 3000$	$\frac{1}{64000} = \infty$
Kuh	$\frac{1}{8000} = 228$	$\frac{1}{16000} = 360$	$\frac{1}{32000} = 930$	$\frac{1}{64000} = 2340$

Die Wirkungen der beiden Enzymlösungen sind insofern nicht ganz vergleichbar, als sie nicht an demselben Tage und folglich nicht mit derselben Milch ausgeführt wurden. Dies ändert jedoch nicht das für die Resultate Wesentliche, nämlich die von der Konzentration $\frac{1}{16000}$ ab sehr wesentlich verlangsamte Gerinnung in den Proben mit Schweinsenzym, was zur Folge hat, daß die ursprünglich schwächer wirkende Kuhenzymlösung von dieser Konzentration ab kräftiger als die Schweinsenzymlösung wirkte, und zwar so viel kräftiger, daß sie in der Konzentration $\frac{1}{64000}$ die Milch in 39 Minuten koagulierte, während die Schweinsenzymlösung bei derselben Konzentration unwirksam war.

Die nun als Beispiele mitgeteilten, mit der hyalinen Substanz von Kuh, Kalb und Schwein erhaltenen Versuchsergebnisse zeigen unzweideutig, daß weder das verschiedene Verhalten der Enzyme zu dem Zeitgesetze noch die fehlende Parallelität der beiden Enzymwirkungen von einer Denaturierung infolge einer schädigenden Einwirkung der Chlorwasserstoffsäure bei Körpertemperatur herrühren kann. Die Versuchsergebnisse deuten vielmehr darauf hin, daß diese Verschiedenheiten ihren Grund in der Eigenart der Enzyme bei den verschiedenen Tieren haben.

Die nun angeführten Beobachtungen über das verschiedene Verhalten der Magenenzyme verschiedener Tiere zu dem Zeitgesetze beziehen sich, wie man aus dem Obigen ersieht, nur auf die Milchgerinnung bei Körpertemperatur oder, richtiger, bei Temperaturen von $38-39^{\circ}\text{C}$. Durch hinreichend langdauernde Einwirkung von Chlorwasserstoffsäure von $0,2-0,4\%$ bei diesen Temperaturen kann man bekanntlich das Kalbsenzym derart verändern, daß es die Milch bei Körpertemperatur nicht mehr koaguliert. Wie van Dam¹⁾ als erster gezeigt hat, kann ein so behandeltes, bei Körpertemperatur auf Milch unwirksames Enzym dagegen die Milch bei einer niedrigeren Temperatur koagulieren, und dementsprechend kann auch unter geeigneten Verhältnissen eine Enzymlösung rascher bei z. B. 30°C . als bei Körpertemperatur die Milch zur Gerinnung bringen. Ähnliches gilt auch in mehr oder weniger hohem Grade für die käuflichen Pepsinpräparate, deren neutrale Lösungen in passender Verdünnung bei 38°C . auf Milch unwirksam sein können, während sie bei 30°C . dieselbe Milch koagulieren und in einer weniger starken Verdünnung rascher bei dem niedrigeren als höheren Temperaturgrade wirken.

Da nun auch die kalt bereiteten, neutralisierten Infusionen sowohl von Hund wie Schwein, passend verdünnt, ein ähnliches Verhalten zu verschiedenen Temperaturen zeigen, kann dieses eigentümliche Verhalten natürlich nicht die Folge einer Denaturierung durch Säurewirkung sein, und es könnte

¹⁾ Diese Zeitschrift Bd. 64, S. 316.

wohl unter solchen Umständen eigentlich überflüssig sein, die hyaline Substanz in dieser Hinsicht zu prüfen. Dies habe ich trotzdem gemacht und werde als Beispiel nur die Resultate eines Versuches hier anführen.

Es handelt sich hier um den schon oben (S. 277) erwähnten Versuch mit Schweins- und Kalbsenzym. Gleichzeitig mit der bei 38° C. ausgeführten Versuchsreihe wurde eine andere mit derselben Milch bei 30° C. angestellt. Die Konzentration 1 war in beiden Lösungen 1 : 8000 und die Gerinnungszeiten in Sekunden für die verschiedenen Verdünnungen der Enzymlösungen bei 38° und 30° C. waren folgende:

38° C.	{	Schwein	1 = 70; 1/2 = 135; 1/4 = 3000; 1/8 = keine Gerinnung;
		Kalb	1 = 75; 1/2 = 140; 1/4 = 240; 1/8 = 420;
30° C.	{	Schwein	1 = 180; 1/2 = 300; 1/4 = 630; 1/8 = 1740;
		Kalb	1 = 210; 1/2 = 285; 1/4 = 465; 1/8 = 715.

Dieser Versuch zeigt in schlagender Weise, wie verschieden das Schweinsenzym bei den Temperaturen 30° und 38° C. wirkt. Anfangs, in den Konzentrationen 1 : 8000 und 1 : 16000, koaguliert das Schweinsenzym die Milch bedeutend rascher bei der höheren als bei der niedrigeren Temperatur. Bei der Konzentration 1 : 32000 ist das Verhalten schon umgekehrt, indem es hier bei 30° C. beinahe 5 mal so rasch als bei 38° C. wirkt, und bei der Konzentration 1 : 64000 ist der Unterschied noch größer. Hier wirkt es nämlich bei 30° C. in 1740 Sekunden, während es bei 38° C. die Milch gar nicht koagulierte. Das Kalbsenzym verhält sich anders, indem es in allen vier Konzentrationen langsamer bei der niedrigeren als bei der höheren Temperatur wirkte. Die Wirkung des Schweinsenzymes stimmte bei 30° C. entschieden besser mit dem Zeitgesetze als bei 38° C. Die Relationen der Gerinnungszeiten waren nämlich bei 30° C. = 1 : 1,7 : 3,5 : 9,6, bei 38° C. dagegen = 1 : 1,9 : 43 : ∞. Die Wirkung des Kalbsenzyms war weniger von der Temperatur abhängig. Sowohl bei 30° wie bei 38° C. zeigte aber das Kalbsenzym eine recht bedeutende Abweichung von dem Zeitgesetze, und zwar in dem oben angedeuteten

Sinne, daß die Gerinnungszeiten zu kurz waren; und diese Abweichung war noch etwas größer bei 30° als bei 38° C. Die Relationen der Gerinnungszeiten für die Versuche mit Kalbsenzym waren nämlich bei 38° C. = 1 : 1,9 : 3,2 : 5,6 und für 30° C. = 1 : 1,4 : 2,2 : 5,2.

Die hemmende oder koagulationsverhindernde Wirkung der höheren Temperatur erklärt v. Dam durch die Annahme einer mit steigender Temperatur zunehmenden schädigenden Einwirkung der Hydroxylionen der Milch auf das Enzym, eine Annahme, welche durch den Einfluß eines Säurezusatzes zu der Milch auf die Gerinnung gestützt wird. Durch Zusatz von Säure zu der Milch kann man nämlich die Gerinnungszeit stark abkürzen und das Verhalten der Enzymwirkung zu dem Zeitgesetze wesentlich verändern. Es war nicht meine Absicht, in diesem Aufsätze ausführlicher auf die Wirkung der Enzyme unter verschiedenen Bedingungen einzugehen, und ich beschränke mich deshalb darauf, nur mit einem Beispiele die Bedeutung einer verschiedenen Reaktion der Milch für die Gerinnung bei Anwendung eines sicher nicht durch Säurewirkung bei Körpertemperatur denaturierten Enzymes zu zeigen.

Eine neutrale Lösung der hyalinen Substanz vom Schwein in den Konzentrationen 1 = 0,00625% (= 1 : 16000), $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{6}$, $\frac{1}{16}$ und $\frac{1}{32}$ wurde teils mit gewöhnlicher und teils mit angesäuerter Milch (Zusatz von 0,020% Chlorwasserstoffsäure) bei 38° C. geprüft. Die Gerinnungszeiten, in Sekunden, waren die folgenden:

Gewöhnliche Milch: 1 = 135; $\frac{1}{2}$ = 3000 u. $\frac{1}{4}$ keine Gerinnung;
 Angesäuerte Milch: 1 = 26; $\frac{1}{2}$ = 55; $\frac{1}{4}$ = 114; $\frac{1}{8}$ = 220;
 $\frac{1}{16}$ = 435 und $\frac{1}{32}$ = 960.

Der Versuch zeigt, wie außerordentlich stark ein Säurezusatz, der an und für sich, ohne Enzym, nicht koagulierend wirkt, die Labgerinnung der Milch beeinflussen kann. In der Konzentration $\frac{1}{4}$ (= 1 : 64000) war die Enzymlösung unwirksam auf gewöhnliche frische Milch, während sie die angesäuerte Milch in 114 Sekunden koagulierte, und in der Konzentration

$\frac{1}{32}$ (= rund 1 : 510000) koagulierte sie die angesäuerte Milch in 960 Sekunden. Ich habe dieses Beispiel wesentlich deshalb angeführt, weil man leider zu oft die Bedeutung der Reaktion des Milchenzymgemenges nicht gebührend berücksichtigt. Es ist nämlich nicht ungewöhnlich, daß man zu den Gerinnungsversuchen nicht neutrale, sondern saure Enzymlösungen (0,1 bis 0,25 % Chlorwasserstoffsäure) verwendet, was leicht zu ganz fehlerhaften Schlüssen führen kann.

Aus dem nun mitgeteilten Versuche ergibt sich ferner, daß die Enzymwirkung durch Verminderung der Menge der Hydroxylionen in der Milch ihr Verhalten zu dem Zeitgesetze wesentlich verändern kann. Die Relation der Gerinnungszeiten war bei Anwendung von gewöhnlicher Milch = 1 : 22 : ∞ , bei Anwendung von angesäuerter Milch dagegen = 1 : 2,1 : 4,4; 8,5; 16,7 : 36,9 und im letzteren Falle folgte die Enzymwirkung also in der Hauptsache recht gut dem Zeitgesetze.

Die Anwendung von angesäuerter Milch zu den Gerinnungsversuchen ermöglicht auch einen viel besseren Vergleich zwischen den Enzymen verschiedener Tierarten, wie aus der folgenden Zusammenstellung ersichtlich ist. Die obige Schweinsenzymlösung wurde nämlich mit einer gleich stark konzentrierten Lösung von Kalbsenzym und derselben angesäuerten Milch bei 38° C. verglichen. Die Gerinnungszeiten, in Sekunden, waren:

Schwein	1 (1 : 16000) = 26; $\frac{1}{2}$ = 55; $\frac{1}{4}$ = 114; $\frac{1}{8}$ = 220;
	$\frac{1}{16}$ = 435; $\frac{1}{32}$ = 960;
Kalb	1 (1 : 16000) = 48; $\frac{1}{2}$ = 98; $\frac{1}{4}$ = 182; $\frac{1}{8}$ = 325;
	$\frac{1}{16}$ = 510; $\frac{1}{32}$ = 1080.

Die Relationszahlen für Schwein und Kalb waren bei den verschiedenen Konzentrationen folgende: 1 = 1 : 1,85; $\frac{1}{2}$ = 1 : 1,8; $\frac{1}{4}$ = 1 : 1,6; $\frac{1}{8}$ = 1 : 1,5; $\frac{1}{16}$ = 1 : 1,17; $\frac{1}{32}$ = 1 : 1,12. Die größten Schwankungen waren also 1 : 1,85 und 1 : 1,12 und das Mittel war 1 : 1,6. Die Chymosinwirkung des Schweinsenzymes war also in diesem Falle nicht doppelt so kräftig wie die des Kalbsenzymes, und man nicht also wenigstens einen annähernden Vergleich machen, während dies bei

Anwendung von nichtangesäuerter Milch unmöglich war. Dies ist von Wichtigkeit, wenn man Versuche bei fehlender Parallelität der Enzymwirkungen ausführen will.

Allen Abweichungen von dem Verhalten des Kalbsenzymes, die man bezüglich der Chymosinwirkung in Versuchen mit käuflichen Pepsinpräparaten oder warmbereiteten Schweinsmageninfusionen beobachtet hat, begegnet man auch in Versuchen mit der hyalinen Substanz, und dies zeigt also, daß diese Abweichungen jedenfalls nicht allein die Folge einer Denaturierung durch Säurewirkung bei Körpertemperatur sein können. Sie müssen eine andere Ursache haben. Daß eine solche Denaturierung oder Schädigung sowohl der Pepsin- wie namentlich der Chymosinwirkung bei nicht zu kurz dauernder Selbstverdauung der Infusionen stattfinden kann, ist indessen längst bekannt, und mit Rücksicht auf die Frage, ob die hyaline Substanz ein geeignetes Ausgangsmaterial für die Enzymdarstellung sein kann, war es von Interesse zu erfahren, inwieweit eine Veränderung oder Schädigung der Enzyme bei der Denaturierung dieser Substanz zu befürchten ist. Zu dem Ende habe ich saure Lösungen von hyaliner Substanz mehr oder weniger lange Zeit bei Körpertemperatur erwärmt und diese warmgehaltenen Lösungen (mit W bezeichnet) mit der kalt aufbewahrten Kontrollprobe (mit K bezeichnet) verglichen. Einige Beispiele mögen hier angeführt werden.

Eine Lösung von 0,020% hyaliner Substanz (aus Schweinsmagen) in Chlorwasserstoffsäure von 0,2% wurde 3 Tage (d. h. 3 mal 24 Stunden) bei 36°—38° C. im Brutofen erwärmt. Bei der Mettschen Probe wurden nach dieser Zeit erhalten: K = 6,5 und W = 6,4 mm. Es hatte also keine ganz sichere Herabsetzung der Pepsinwirkung stattgefunden. Die Milchprobe (mit den fast neutralisierten Lösungen) ergab bei 37° C. sowohl für K wie W keine Gerinnung nach 3 Stunden. Bei 30½° C.: K = 20½ und W = 75 Minuten. Die Relation war also zu 1 : 3,6 geändert worden. Nach weiteren 4 Tagen (insgesamt 7 mal 24 Stunden) war Mett für K = 6,5, für W = 5,2 mm, die Pepsinrelation also = 1,6 : 1. Die Milchprobe mit gewöhnlicher Milch bei 30½° C. ergab: K = 29 Minuten,

W keine Gerinnung in 6 Stunden. Nach insgesamt 3 Wochen ergab K 6,4 mm, W 3,2 mm. Die Pepsinwirkung war also in 3 Wochen auf $\frac{1}{4}$ der ursprünglichen Stärke herabgesunken.

In einem anderen Falle mit einer Lösung, die ebenfalls 0,020% hyaline Substanz in 0,2% Chlorwasserstoffsäure enthielt, war nach 4tägiger Selbstverdauung bei der Mettschen Probe K = 10 mm und W = 7,8 mm; die Relation war also zu 1,6:1 geändert worden. Nach 11 Tagen ergab Mett: K = 10 mm und W = 6,4 mm. Behufs der Milchprobe wurden die sauren Enzymlösungen mit der berechneten Menge $\frac{n}{10}$ -Lauge und so viel Wasser versetzt, daß die fast neutralen Lösungen auf die Konzentration $\frac{1}{2}$ verdünnt waren. Beide Lösungen waren nun unwirksam auf gewöhnliche Milch bei 38° C. während 4 Stunden. Bei 30° C. wirkte K in 27 Minuten, W war dagegen in 4 Stunden ohne Wirkung. Also auch in diesem Falle eine stärkere Herabsetzung der Chymosinal- als der Pepsinwirkung. Nach weiteren 7 Tagen (18mal 24 Stunden) ergab Mett für K 9,6 und für W 4 mm. Die Pepsinrelation war also nunmehr = 6,2:1. Für die Milchprobe wurden beide Lösungen, wie oben, fast neutralisiert und auf $\frac{1}{2}$ verdünnt. Da die Lösung W bei allen geprüften Temperaturen ohne Wirkung auf gewöhnliche Milch war, wurde mit angesäuerter Milch (0,020% Chlorwasserstoffsäure) geprüft. Die Gerinnungszeiten mit solcher Milch waren nun bei 38° C. für K 55 Sekunden und für W 960 Sekunden. Die Relation war also = 1:17. Dieser Versuch zeigt wiederum die außerordentlich große Bedeutung eines Säurezusatzes zu der Milch. Er zeigt ferner, daß auch bei der letztgenannten Versuchsanordnung die Chymosinwirkung stärker als die Pepsinwirkung herabgesetzt war.

Es wird allgemein angenommen, daß das Pepsin, wenn es nicht — wie im Magensaft oder in den Infusionen — durch die Gegenwart von Eiweißstoffen oder Albumosen genügend geschützt wird, sich selbst ziemlich rasch verdaut. Es ist deshalb bemerkenswert, daß in den sauren Lösungen der hyalinen Substanz, die frei von den reichlichen Eiweiß-

oder Albumosemengen des Magensaftes, resp. der Infusionen, sind und keine anderen Albumosen als die bei der Denaturierung dieser Substanz entstandenen enthalten können, das Pepsin eine so starke Widerstandsfähigkeit wie die oben gezeigte haben kann. Diese Resistenz gegen die Säurewirkung bei Körpertemperatur kommt auch in Versuchen mit sehr verdünnten Lösungen und relativ großem Säureüberschuß zum Vorschein. So ergab z. B. in einem Versuche mit einer Lösung von 0,005% in 0,2% Chlorwasserstoffsäure, nach 48 Stunden bei 36°—38° C. digeriert, die Mettsche Probe für K 5,7 und für W 5,6 mm.

Wenn man eine Lösung der isolierten hyalinen Substanz in Verdauungssalzsäure von 0,2% bei Körpertemperatur 24 Stunden erwärmt, hat man also keine nachweisbare Schädigung der Pepsinwirkung zu befürchten. Trotzdem kann man eine solche Lösung bei Körpertemperatur in viel kürzerer Zeit und jedenfalls innerhalb 12 Stunden so vollständig denaturieren, daß die hyaline Substanz ihre typischen Eigenschaften verloren und neue Produkte von ganz anderer Fällbarkeit geliefert hat. Da man nun ferner hoffen könnte, daß die Reinigung des Pepsins aus einer solchen Lösung kaum schwieriger als aus den an Verdauungsprodukten und Stoffen allerlei Art reichen, durch Selbstverdauung der Schleimhaut erhaltenen Infusionen sein würde, schien mir die hyaline Substanz ein geeignetes Ausgangsmaterial für weitere Pepsinstudien zu sein. Ich bin auch mit weiterer Verarbeitung des nach dem neuen Verfahren gewonnenen Rohpepsins beschäftigt.
