Kolloid-Zeitschrift

Zeitschrift für wissenschaftliche und technische Kolloidchemie

(früher „Zeitschrift für Chemie und Industrie der Kolloide“)

Organ für das Gesamtgebiet der reinen und angewandten Kolloidchemie

Herausgegeben von

Prof. Dr. Wolfgang Ostwald in Leipzig, Brandvorwerkstraße 77

Erscheint monatlich 1 mal

Verlag von THEODOR STEINKOPFF
Dresden und Leipzig

Preis für den Band M. 16.—

Die Bedeutung des Zustandes des Substrats bei der Pepsinwirkung.

III. Mitteilung: Studien am Pechelharing'schen Pepsin.¹⁾

Von W. E. Ringer.

(Eingegangen am 4. September 1916.)

(Aus dem physiologischen Laboratorium der Universität Utrecht.)

1. Einleitung.

Nachdem Wilh. Ostwald die Lehre von den Katalysatoren begründet hatte, waren für das Studium der Enzymwirkungen neue und viel versprechende Bahnen geöffnet. Diese sind denn auch von zahllosen Forschern betreten worden und die erhaltenen Resultate haben der gespannten Erwartung in vielen Hinsichten entsprochen. So wurde wenigstens in einigen Fällen die theoretisch zu erwartende Tatsache, daß die vom Enzym katalytisch beschleunigte Reaktion demselben Gleichgewichte als die unbeschleunigte zustrebt, und daß also auch bei der enzymatischen Reaktion dasselbe Gleichgewicht von beiden Seiten erreicht werden muß, experimentell bestätigt. Hiermit war auch auf einmal die synthetische Wirkung der Enzyme festgestellt, und man konnte im voraus sagen inwieweit ein Enzym eine bestimmte Synthese fördern könnte, und welche Umstände dabei günstig, welche ungünstig wirken müßten. Seitdem war es also nicht mehr mit unseren Einsichten übereinzubringen, das Bestehen von zwei Gruppen von Enzymen, spaltenden und synthetisierenden, anzunehmen, und wenn das von einigen Forschern doch getan wird, so ist das als ein Rückschritt zu betrachten, wie es so richtig von W. M. Bayliss²⁾ hervorgehoben wird. Wie außer-

ordentlich wichtig diese Betrachtungen über die Enzymwirkungen für unsere Kenntnisse der biologischen Reaktionen sind, daran brauche ich hier wohl kaum zu erinnern. Man lernte jetzt einsehen, wie je nach Umständen und Konzentrationen der betreffenden Stoffe ein Enzym spaltend oder synthetisierend wirken könnte, und man bekommt einigermaßen einen Eindruck, wie die mannigfachen Spaltungen und Synthesen in den Zellen je nach Bedarf zustande kommen können.

Allerdings ist man bei den betreffenden Untersuchungen auch vielen Schwierigkeiten begegnet. Besonders der Umstand, daß die Enzyme sowohl als die meisten zugehörigen Substrate zu den kolloiden Körpern gehören, hat daran Schuld. Denn bekanntlich ändern sich die Eigenschaften von kolloidgelösten Stoffen nicht nur öfters sehr bedeutend, wenn zugleich andere Stoffe, besonders Elektrolyte anwesend sind, sondern auch schon spontan mit der Zeit. Diese große Veränderlichkeit sowohl der Enzyme als der von diesen anzugreifenden Substrate im gelösten Zustande macht die Untersuchung des Reaktionsverlaufes wohl sehr schwierig. Dazu kommt noch, daß gerade die physiologisch wichtigsten enzymatischen Reaktionen, z. B. die Eiweißspaltungen, äußerst kompliziert sind, indem eine große Zahl von Spaltungen neben- oder nacheinander vom Enzym hervorgerufen wird. So darf es denn auch nicht wundernehmen, daß man nur in seltenen Fällen, und zwar in den einfachsten, die enzymatischen Reaktionen vom Standpunkte der

¹⁾ Erste Mitteilung: Zeitschrift für physiologische Chemie (Hoppe-Seyler), 75, 282 (1911); zweite Mitteilung: ibidem, 95, 195 (1915).

²⁾ Journ. of physiology: 43, 455 (1912); ibidem, 46, 236 (1913).

Lehre der Reaktionskinetik deuten konnte. In den meisten Fällen wurden kleinere oder größere Abweichungen vom erwarteten Reaktionsverlauf gefunden. Dabei hat es selbstverständlich an Erklärungen dieser eigentümlichen Verhältnisse nicht gefehlt. Denn gerade in diesen Abweichungen glaubte man öfters einen Hinweis auf das Wesen der Enzymwirkung zu finden. So glaubte H. P. Barendrecht³⁾, daß die Enzyme eine Art Strahlung aussenden; in dieser Weise seien, durch in Betracht ziehen von wirkender Strahlung und hindernder Absorption, viele Eigentümlichkeiten der Enzymwirkungen zu erklären. Für einige Enzyme hat man es wahrscheinlich machen können, daß sie selbst an den Reaktionen teilnehmen; in diesem Falle können auch die Gleichgewichte mehr oder weniger verschoben sein. Weiter hat man der Verdichtung (Adsorption) der reagierenden Stoffe auf die Oberfläche der kolloiden Enzyme eine Rolle zugeschrieben, besonders nach Analogie der kolloiden, metallischen, künstlichen „Enzyme“ (anorganische Fermente) Bredig's⁴⁾. Kann man sich so einigermaßen eine Vorstellung machen, auf welche Weise die Enzyme ihre eigentümlichen Wirkungen ausüben können, ja, hat man sogar einige Einsicht in die vorher völlig rätselhaften enzymatischen, spezifischen, „asymmetrischen“ Spaltungen und Synthesen bekommen, indem derartige Wirkungen, wie uns Bredig mit seinen Mitarbeitern gelehrt hat, auch in bestimmten, völlig bekannten chemischen Systemen zustande kommen können, so müssen wir doch noch immer gestehen, daß viel von dem eigentlichen Wesen der Enzyme und ihrer Wirkungen uns unbekannt ist.

Nun hat man in letzter Zeit die Untersuchung auch von anderer Seite angefaßt. Da es schien, daß das genaue Studium des Reaktionsverlaufes, wegen der kolloiden Beschaffenheit der Enzyme und der Reaktionskomponenten sowie wegen der Kompliziertheit der meisten betreffenden Reaktionen nicht zum erwünschten Resultate führen würde, hat man die Umstände, die Einfluß auf die Enzymwirkungen ausüben können, näher in die Augen gefaßt. Es war besonders S. P. L. Sørensen, welcher in dieser Richtung den größten Stoß gegeben hat. Dieser Forscher hat bekanntlich zum ersten Male in völlig klarer und zielbewußter Weise auf die große Bedeutung

der Reaktion der Lösung, d. h. nicht der zugegebenen Menge von Säuren oder Alkalien, sondern der Konzentration der Wasserstoff- oder Hydroxylionen für die Enzymwirkungen hingewiesen. Er konnte dabei zeigen, daß die von früheren Forschern bei einigen Enzymen erhaltenen verschiedenen Ansichten über die Reaktionskinetik dem Umstand zugeschrieben werden müßten, daß bei den betreffenden Untersuchungen den Konzentrationen der H- und OH-Ionen nicht genügend Rechnung getragen war. Als Sørensen dabei die schon von R. Höber in die Physiologie eingeführte Gaskettenmethode zur Bestimmung der Konzentration der genannten Ionen in treffender Weise ausgearbeitet hatte, diese sodann auf seine Veranlassung von K. A. Hasselbalch⁵⁾ noch weiter verbessert wurde, war wieder ein neues Arbeitsfeld geöffnet. Seitdem sind außer im Carlsberglaboratorium⁶⁾ unter Sørensen's Leitung besonders von Leonor Michaelis, Peter Rona und ihren Mitarbeitern eine Reihe von interessanten Arbeiten über dieses Thema erschienen⁷⁾. Indem Sørensen nur die große Bedeutung der H- und OH-Ionen für die Enzymwirkungen feststellt, ohne zu versuchen, zur Zeit dafür eine Erklärung zu geben, gehen letztgenannte Forscher weiter. Nachdem durch ausgedehnte Untersuchungen die Abhängigkeit dieser Wirkungen von der H-Ionenkonzentration in weitem Umfange festgestellt worden war und im Anschluß damit das Verhalten der Enzyme im elektrischen Felde ebenfalls studiert, meinen die Untersucher, daß die Ladung der Enzyme mit ihren Wirkungen im Zusammenhang steht, ja maßgebend für dieselbe ist. Die von ihnen untersuchten Enzyme weisen einen isoelektrischen Punkt auf, also sie verhalten sich in dieser Hinsicht wie amphotere Stoffe, z. B. Eiweißstoffe. Bei einer bestimmten H-Ionenkonzentration ist ihre elektrische Ladung minimal, dieser Punkt ist der Umschlagspunkt der Ladung. Zu beiden Seiten dieses Punktes, also bei ab- resp. zunehmender H-Ionenkonzentration nehmen die (entgegen-

³⁾ The Biochemical Journal, 7, 549 (1913).

⁴⁾ Man sehe z. B. über die verschiedenen Hypothesen zur Aufklärung der Enzymwirkungen die vorzügliche Uebersicht in R. Höber, Physikalische Chemie der Zelle (Leipzig 1914), 662.

⁵⁾ S. P. L. Sørensen, Biochem. Zeitschr. 21, 131 (1909); K. A. Hasselbalch, ibidem, 30, 317 (1910); ibidem, 49, 451 (1913); Leonor Michaelis und Davidoff, ibidem, 46, 131 (1912); auch Michaelis und Rona, ibidem, 18, 317 (1909); siehe weiter: Sørensen, Ergebnisse der Physiologie (1912); L. Michaelis, Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden (1911); Leonor Michaelis, Die Wasserstoff-Ionenkonzentration (Berlin 1914).

⁶⁾ Von Sven Palitzsch und L. E. Walbum, Biochem. Zeitschr. 47, 1 (1912).

⁷⁾ Ueber die Literatur siehe besonders: L. Michaelis, Die Wasserstoff-Ionenkonzentration (bis 1914).

gesetzten) Ladungen der Enzyme zuerst langsam, dann schneller zu. Aus der Lage der isoelektrischen Punkte einerseits, andererseits der Reaktionsoptima der Wirkung, sowie aus dem Verlauf der Kurven, welche die Abhängigkeit dieser Wirkung von der H-Ionenkonzentration darstellen, wird dann in interessanten und sinnreichen Betrachtungen die Theorie aufgestellt, daß man die Enzyme als amphotere Elektrolyte betrachten muß, indem das Enzym entweder bei negativer Ladung (als Anion) oder bei positiver Ladung (als Kation) seine Wirkung entfaltet, so daß die Stärke der Wirkung vom Dissoziationszustande des Enzyms bestimmt wird. Beim Pepsin z. B. würde die Sache so liegen, daß die freien Kationen die proteolytisch wirksamen Enzymteilchen seien. Das Auftreten eines Optimums der H-Ionenkonzentration für die Enzymwirkung würde sich dabei in folgender Weise erklären. Bei sehr schwach saurer Reaktion haben sich noch sehr wenig Pepsinkationen gebildet. Bei zunehmendem Säuregehalt nimmt deren Anzahl zu und die Enzymtätigkeit ebenfalls. Nimmt der Säuregehalt aber immer mehr zu, so werden allmählich mehr und mehr zweiwertige Pepsinkationen, die wieder unwirksam seien, gebildet; dadurch und auch durch die schädigende Wirkung der stärkeren Säure nimmt die proteolytische Tätigkeit jetzt wieder ab. Bekanntlich übt Pepsin bei äußerst kleinem Säuregrade Labwirkung aus. Michaelis spricht die Vermutung aus, daß das Pepsin jenseits des isoelektrischen Punktes, also wenn es negativ geladen ist, diese eigentümliche Wirkung ausübt; die Labwirkung würde also von Pepsinanionen abhängig sein. Damit wäre dann gleichzeitig die alte Streitfrage nach der Identität oder Nichtidentität von Pepsin und Labenzym gelöst⁸⁾.

Diese elektrochemischen Betrachtungen über die Enzymwirkungen würden also einen weiteren Schritt auf das noch immer dunkle Gebiet des Wesens dieser Wirkungen bedeuten. Ich habe eben hingewiesen auf den Umstand, daß die kolloide Beschaffenheit der Enzyme (denn so weit wir jetzt wissen, gehören diese Stoffe doch zu den typischen Kolloiden) und der meisten Substrate Schwierigkeiten bei der Untersuchung darbietet. Aber noch in anderer Weise als oben gesagt; bekanntlich gehört es zu den schwierigsten Aufgaben, Kolloide ganz rein darzustellen, indem die bei diesen Stoffen eine so große Rolle spielenden Adsorptionerschei-

nungen eine völlige Reinigung fast unmöglich machen. Man kann also im voraus sagen, daß man bei der Untersuchung der Enzymwirkungen wohl immer mit mehr oder weniger verunreinigten Stoffen arbeiten wird. Welchen Einfluß aber die Verunreinigungen auf die Eigenschaften und Wirkungen der Enzyme haben, läßt sich schwer beurteilen. Durch die Adsorptionen an der Oberfläche der Enzymteilchen, also da, wo auch wohl die Wirkung stattfindet, kann diese zusammen mit der Ladung und weiteren anderen Eigenschaften der Enzymteilchen auf verschiedene Weise beeinflusst werden. Auf Grund solcher Ueberlegungen war es, daß ich vor einigen Jahren mich entschloß, das Verhalten des Pekelharing'schen Pepsins von den neuen Gesichtspunkten aus zu studieren. Es ist nämlich vor etwa 20 Jahren Pekelharing⁹⁾ gelungen, aus Magenschleimhaut, oder besser noch aus reinem Magensaft von einem nach Pavlov operierten Hunde, Pepsinpräparate herzustellen, deren Wirksamkeit bei weitem die der sonstigen Handelspräparate übertrifft. Wir haben hier also entweder ein reines Enzym, oder jedenfalls eines der reinsten, die es bisher gibt, vor uns. Es war also sehr der Mühe wert, dem Verhalten dieses Enzyms nachzugehen. Bei der betreffenden Untersuchung hat dieses Pepsin ein von dem von Michaelis und seinen Mitarbeitern gebrauchten abweichendes Verhalten gezeigt. Dabei konnte ich dann auch nicht mehr an den Anschauungen von Michaelis über den Zusammenhang zwischen elektrischer Ladung und Pepsinwirkung festhalten; aber eine andere wichtige Frage drängte sich in den Vordergrund, die Frage nach einer möglichen Bedeutung des Zustandes des Substrats für die Pepsinwirkung. Eine derartige Bedeutung war wohl als wahrscheinlich zu erachten und da wir über den Zustand von Eiweißstoffen und deren Derivaten unter verschiedenen Umständen jetzt, durch die Arbeiten von vielen Forschern, in letzter Zeit besonders von Wolfgang Pauli und seiner Schule, ziemlich gut unterrichtet sind, so schien die Untersuchung nach einem möglichen Zusammenhang zwischen Pepsinwirkung und dem Zustand des Substrats lohnend. Dabei haben die erhaltenen Resultate gelehrt, daß wirklich unter Umständen die Enzymwirkung stark vom Zustande des Eiweißes abhängig sein kann, und so sehen wir, daß die neueren kolloidchemischen Betrachtungen, die sich schon in so vielen Hinsichten sehr nützlich gezeigt haben, auch für das Studium der Enzym-

⁸⁾ Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Therap. 8, 2 (1910); Biochem. Zeitschr. 16, 486 (1909); ibidem, 28, 1 (1910); ibidem, 58, 315 (1913); ibidem, 65, 1 (1914).

⁹⁾ C. A. Pekelharing, Zeitschr. f. physiol. Chem. 22, 233 (1896); ibidem, 35, 8 (1902).

wirkungen von großer Bedeutung sind. Sehr gern habe ich denn auch dem Ersuchen der Redaktion dieser Zeitschrift, eine Uebersicht über die bezüglichlichen Untersuchungen für die Koll.-Zeitschr. zu geben, Folge geleistet. Seit meiner letzten Mitteilung habe ich die Untersuchung weiter fortgesetzt, die dabei erhaltenen Resultate sollen hier auch mitgeteilt werden; der zweite Teil dieser Abhandlung ist also ganz Originalabhandlung.

2. Ueber die Darstellung und die Eigenschaften der gebrauchten Pepsinpräparate.

Nachdem Pekelharing und ich bei den ersten Versuchen¹⁰⁾ Pepsin aus Schweinemagenschleimhäuten dargestellt hatten und sich dabei gezeigt hatte, daß für das genaue Studium der Eigenschaften (z. B. elektrische Ladung) dieses Enzyms, zwar bisweilen genügend reine Präparate zu erhalten sind, aber doch auch öfters das Enzym als noch nicht rein genug sich erweist, entschloß ich mich, bei der weiteren Fortsetzung das Pepsin immer so rein wie möglich anzufertigen, und das ist nach Pekelharing nur aus reinem Magensaft, z. B. eines nach Pavlov operierten Hundes, möglich. Ich fand dabei, daß zwar die Aktivität dieses reinsten Pepsins die der Schleimhautpräparate nicht merklich übertrifft; doch war das Verhalten im elektrischen Felde öfters anders. Die im übrigen sicher sehr geringen Verunreinigungen des Schleimhautpepsins genügen also doch, um die Ladung zu beeinflussen. Ich möchte aber hier noch einmal darauf hinweisen, daß falls es nicht auf größte Reinheit ankommt und man nur äußerst wirksame Pepsinpräparate sich herstellen will, man das auch ohne nach Pavlov operierte Tiere machen kann. Man braucht dazu nur die Fundus-Schleimhäute von Schweinemagen aus dem Schlachthaus abzupräparieren und diese nach Pekelharing zu verarbeiten. Daß so ein jeder sich auch ohne besondere Hilfsmittel äußerst wirksames Pepsin herstellen kann, scheint nicht immer genügend beachtet, denn noch immer wird von verschiedenen Forschern mit den weit weniger wirksamen Handelsprodukten gearbeitet. Ich gebrauchte also jetzt aus Hundemagensaft dargestelltes Pepsin. Auf die Besonderheiten der Darstellung kann ich hier nicht eingehen¹¹⁾, nur sei bemerkt, daß die Abscheidung des Pepsins auf dem

Umstand beruht, daß es bei einer bestimmten sehr niedrigen H-Ionenkonzentration zum Teil ausfällt. Mit diesen reinsten schneeweißen Präparaten (beiläufig sei bemerkt, daß nachdem Pekelharing schon früher gezeigt hatte, daß Phosphor kein Bestandteil des reinen Enzyms ist, dasselbe jetzt von mir auch für das Chlor gezeigt werden konnte) wurde jetzt in erster Linie untersucht, ob der frühere Befund von Pekelharing und mir, daß Pepsin keinen isoelektrischen Punkt besitzt, sich bestätigen würde. Ich habe mir sehr viele Mühe gegeben, die technisch immerhin etwas schwierigen Versuche so zu gestalten, daß die Existenz oder Nicht-Existenz dieses Punktes ein für allemal festgestellt wurde. So wurde der gebrauchte Apparat (nach L. Michaelis) etwas abgeändert und bei konstanter Temperatur gearbeitet; weiter wurde dafür Sorge getragen, daß nicht durch Konvektion der Flüssigkeiten oder auch durch Erschütterungen die Resultate getrübt werden konnten¹²⁾. Aus den vielen Ueberführungsversuchen nun ging unzweideutig hervor, daß Pepsin keinen isoelektrischen Punkt aufweist. L. Michaelis und Davidsohn geben für Pepsin einen isoelektrischen Punkt bei $p_H = 4,26$ ¹³⁾. Ich fand das Enzym aber bei Reaktionen der Lösungen, deren p_H zwischen 4,1 und etwa 0,7 wechselte, immer negativ geladen. Dieses Auseinandergehen der Resultate der genannten Forscher und von mir glaube ich der größeren Reinheit des von mir gebrauchten Enzyms zuschreiben zu müssen. Ich glaube also aus meinen Versuchen mit Sicherheit schließen zu müssen, daß im Pepsin ein Enzym ohne isoelektrischen Punkt vorliegt, das im Gegenteil bei allen in Betracht kommenden Reaktionen negativ geladen ist. Dieses Resultat ist nicht nur deswegen, daß die meisten anderen Enzyme wohl einen solchen Punkt zu besitzen scheinen, etwas auffallend, sondern auch dadurch, daß unser Pepsin sehr wohl ein Flockungsoptimum aufzuweisen scheint. Nun gehen bekanntlich isoelektrischer Punkt und Flockungsoptimum vielfach parallel, wie L. Michaelis und seine Mitarbeiter für verschiedene eiweißartige Stoffe bewiesen haben und wie auch im voraus für amphotere Körper zu erwarten ist. Um diesem also etwas eigentümlichen Verhalten des Pepsins noch etwas näher zu treten, habe ich das Verhalten im elektrischen Felde noch etwas näher studiert.

¹²⁾ Siehe über die Besonderheiten dieser Ueberführungsversuche meine zweite Mitteilung loc. cit.

¹³⁾ p_H ist bekanntlich der negative Logarithmus der H-Ionenkonzentration.

¹⁰⁾ Erste Mitteilung, loc. cit.

¹¹⁾ Siehe darüber meine zweite Mitteilung loc. cit.

Dabei fand ich, daß bei nicht zu geringem Säuregrade im elektrischen Felde die proteolytisch wirksame Substanz zwar immer zur Anode geht, daß daneben aber eine eiweißartige Substanz sich hauptsächlich in der entgegengesetzten Richtung bewegt. Nach dem Stromdurchgang bekommt man also an der Anodenseite eine Flüssigkeit mit starker Wirksamkeit, aber kaum Eiweißreaktionen, an der Kathodenseite eine solche mit starken Eiweißreaktionen, aber unwirksam. Es ist mir vorläufig noch nicht gelungen, die Trennung in genügend großen Mengen durchzuführen, aber ich glaube doch, daß dieses Resultat darauf hinweist, daß das reine Pikelharing'sche Pepsin doch noch eine Verbindung (oder Adsorption) vom eigentlichen negativen Enzym und einem besonderen eiweißartigen Stoff, der bei genügend stark saurer Lösung positiv sich ladet, ist. Die Verbindung kann in ihren Lösungen zu einem gewissen Teil auseinandergefallen sein. Daß im Pikelharing'schen Pepsin jedenfalls ein Eiweißstoff mit sehr besonderen Eigenschaften vorliegt, das geht, auch abgesehen von seiner proteolytischen Wirksamkeit, aus dem eigentümlichen Verhalten beim schnellen Erhitzen in salzsaurer Lösung, wobei eine Koagulation auftritt, hervor. Eine derartige Koagulation in ziemlich stark salzsaurer Lösung gibt kein anderer Eiweißstoff. Ich habe weiter noch die Bindung von H- und Cl-Ionen des Pepsins in salzsaurer Lösung studiert. Hierdurch konnte ich hoffen, noch etwas Näheres in bezug auf die Frage nach der Einheitlichkeit in Erfahrung zu bringen. Wenn nämlich im Pepsin eine Verbindung von einer (wahrscheinlich geringen) Menge des eigentlichen Enzyms mit einer relativ großen Menge eines Eiweißstoffes vorläge, so wäre zu erwarten, daß im großen und ganzen das Präparat, was die Ionenbindung anbetrifft, sich wie Eiweiß verhalten würde. Wäre es aber ein einheitlicher Stoff, dann müßte, seiner negativen Ladung wegen, doch wohl immer die Menge der gebundenen Anionen etwas größer als die der Kationen sein, weil die negative Ladung wohl von Anionenbindung herrühren wird. Jedenfalls könnte dann in saurer Lösung die Menge der gebundenen H-Ionen nicht merklich größer als die der gebundenen Cl-Ionen sein, so wie es bei gewöhnlichem Eiweiß der Fall ist. Das Resultat dieser Bestimmungen der Ionenbindungen¹⁴⁾ war, daß das Pikelharing'sche Pepsin sich, was die Ionenbindung anbetrifft, im großen und ganzen wie gewöhnliche

Eiweißstoffe verhält; im ganzen wurden also mehr H- als Cl-Ionen gebunden, was bei der Negativität des Enzyms doch wohl schwer mit der Annahme, daß unser Pepsin einheitlich sei, vereinbar ist. Vorläufig möchte ich also schließen, daß das Pikelharing'sche Pepsin eine Verbindung (oder Adsorption) vom eigentlichen Enzym mit einem (relativ in größerem Gewicht anwesenden) Eiweißstoff ist.

In weiteren Versuchen hat es sich gezeigt, daß, wenn zu Pepsinlösungen Eiweiß oder dessen Spaltstücke, Albumosen, zugegeben werden, das Enzym je nach der Menge des Eiweißes oder der Albumosen im elektrischen Felde mehr oder weniger mit zur Kathode mitgerissen wird. Wenn die zugefügte Menge ziemlich groß ist, dann kann das Enzym sogar überwiegend sich zur Kathode bewegen. Unter solchen Umständen weist es scheinbar einen isoelektrischen Punkt auf. Von Aminosäuren wird das Pepsin nicht gebunden, es scheint sich nur an diejenigen Stoffe, auf die es seine Wirkung ausübt, zu binden. Man wird geneigt sein zu fragen, warum auf Zusatz von fremdem Eiweiß das Pepsin umgeladen wird, während es doch selbst zum Teil aus einer Eiweißkomponente besteht. Die Antwort lautet, daß dies einstweilen in den besonderen Eigenschaften dieses Eiweißes (die noch unbekannt sind), aber auch in der relativen Menge dieser Komponente seinen Grund haben kann. Es zeigte sich, daß zu einer einigermaßen deutlichen Umladung des Pepsins eine nicht zu geringe Menge Eiweiß zugegeben werden muß.

Nachdem nun diese Eigenschaften unseres Pepsins festgestellt waren, fragte es sich, wie es nun mit den Auffassungen von Michaelis stände. Dieser, zusammen mit A. Mendelssohn¹⁵⁾ hatte in einer seiner letzten Mitteilungen angegeben, daß in Lösungen von Salzsäure, Weinsäure, Oxalsäure und Salpetersäure das Wirkungsoptimum immer bei $p_H =$ etwa 1,4 liege. Es seien also nur die H-Ionen, welche die Pepsinwirkung bedingen, während die Anionen wesentlich nur sehr untergeordnete Bedeutung haben sollen. Durch Neutralsalze (NaCl, KCl, LiCl) wird denn auch nur eine minimale Verschiebung des Optimums (nach der weniger sauren Seite) bewirkt. Die Abhängigkeit der Wirkung von p_H wird dann auch, wie ich oben schon sagte, in der Weise gedeutet, daß die einwertig positiv geladenen Pepsinpartikel (Kationen) enzymatisch wirken. Diese Deutungs-

¹⁴⁾ Siehe die zweite Mitteilung loc. cit. 213.

¹⁵⁾ L. Michaelis u. A. Mendelssohn, Biochem. Zeitschr. 65, 1 (1914).

weise von Michaelis kann, weil jetzt feststeht, daß Pepsin immer negativ geladen ist, doch wohl nicht aufrecht erhalten werden. Aber auch sonst fällt uns doch wohl in den Betrachtungen Michaelis auf, wie auch schon oben bemerkt, daß nur vom Zustande des Enzyms, aber gar nicht von demjenigen des Substrats die Rede ist. Und doch könnte man erwarten, daß auch letzterer für die Enzymwirkung nicht gleichgültig sein kann. Ich habe mich denn auch bemüht, die Bedeutung des Zustandes des Substrats für die Proteolyse zu untersuchen; man könnte hoffen, dabei weitere Gesichtspunkte für das eigentliche Wesen der Pepsinwirkung zu erhalten.

3. Abhängigkeit der Pepsinwirkung vom Zustande des Substrats.

Daß der Zustand des Substrats für die Enzymwirkung von Wichtigkeit ist, haben schon mehrere Autoren vermutet. So sagt T. Brailsford Robertson¹⁶⁾: „Der Einfluß der Konzentration des zugesetzten NaCl auf die von ihm hervorgebrachte Beschleunigung der tryptischen Hydrolyse ist von großem Interesse, da er, soweit sich meine Beobachtungen ausgedehnt haben, von derselben Natur ist, wie ihr Einfluß auf den Quellungsgrad, dem sich Gelatineplatten unterziehen, wenn sie in Wasser eingetaucht werden. Die Hydrolysenbeschleunigung, welche durch das zugesetzte NaCl verursacht wird, nimmt nicht mit wachsender Konzentration des NaCl zu, sondern zeigt (ebenso wie die Quellung) bemerkenswerte Maxima und Minima.“ Hier ist also schon ausgesprochen, daß zwischen der (tryptischen) Spaltung und der Quellung des Eiweißes unter Umständen eine gewisse Parallelität bestehen kann. Sehr deutlich geht der Einfluß des Zustandes des Substrats aus den Resultaten, die Johanne Christiansen (unter Wo. Pauli) bei ihren Untersuchungen erhielt, hervor¹⁷⁾. Bekanntlich

¹⁶⁾ T. Brailsford Robertson, Die physikalische Chemie der Proteine, Uebersetzung von F. A. Wynken (Dresden 1912), 379.

¹⁷⁾ Ich hatte die interessante Abhandlung, Biochem. Zeitschr. 47, 226 (1912), von J. Christiansen zur Zeit meiner zweiten Mitteilung leider übersehen. Es darf im übrigen nicht wundernehmen, daß vom bekannten Laboratorium von Wo. Pauli, aus welchem so viele Mitteilungen über Zustandsänderungen von Kolloiden stammen, die Frage nach der Bedeutung des Zustandes des Eiweißes für die Enzymwirkung gestellt wurde. Die Resultate von J. Christiansen werden, so weit sie reichen, von den meinigen bestätigt.

haben Lösungen von Emulsoiden und darunter Eiweiß im allgemeinen eine hohe innere Reibung. Bei Zusatz von Säuren oder Alkalien geht diese innere Reibung bei Eiweißlösungen durch ein Maximum¹⁸⁾, nach der Annahme von Pauli dadurch, daß bei bestimmten H- oder OH-Ionenkonzentrationen, wobei die Ladung des Eiweißes maximal ist (maximale Bildung von Eiweißionen), auch die Hydratation und damit die innere Reibung durch ein Maximum geht. E. J. Spriggs¹⁹⁾ (unter Kossel) fand nun schon, daß durch Pepsinwirkung diese hohe innere Reibung herabgesetzt wird. Christiansen konnte jetzt zeigen, daß diese Herabsetzung mit einer Geschwindigkeit, nur abhängig von der Größe der inneren Reibung, verläuft. Eiweißlösungen, mit ganz verschiedenem Salzsäuregehalte, aber gleicher innerer Reibung werden vom Pepsin gleich schnell angegriffen. Sie schließt, „daß falls überhaupt ein Aziditätsoptimum dieser Pepsinwirkung existiert, ein solches in der Nähe des Viskositätsmaximums, also eben beim Ionisationsoptimum des Eiweißes gelegen sein muß“. Zu demselben Schluß kommt sie auch, als sie die Verdauung mittelst der Bestimmung der Zunahme der gebundenen Salzsäure verfolgt und ebenfalls als sie die Geschwindigkeit der Bildung von Azidalbumin in Lösungen von Serumalbumin durch Pepsin bestimmt. Sie meint denn auch, daß „der Ionisierung des Eiweißes durch Säurezusatz für die Bildung der ersten Abbauprodukte eine große und noch nicht genügend berücksichtigte Bedeutung zukommt“. Als sie die Pepsinwirkung mittelst der Mett'schen Methode bestimmte, kam sie zu anderen Resultaten“; das kann uns aber nicht verwundern, denn bei dieser Methode liegen so eigentümliche Verhältnisse vor, daß sie wohl als besonders ungeeignet zu diesem Zwecke angesehen werden darf.

Wir sehen also, daß aus den bisherigen Untersuchungen schon vermutet worden war, daß entweder die Quellung oder die Ionisation des Eiweißes für die Spaltung oder wenigstens für die ersten Spaltungen von Bedeutung sei. Das ist nun auch wohl im voraus zu erwarten, denn damit hängt erstens die Oberfläche des Substrats, besonders des noch nicht gelösten, zusammen und weiter ist man geneigt, anzunehmen, daß die Quellung selbst so zu sagen der erste Schritt auf dem Wege der Lösung

¹⁸⁾ Wo. Pauli und H. Handovsky, Biochem. Zeitschr. 18, 340 (1909); ibidem, 24, 239 (1910).

¹⁹⁾ E. J. Spriggs, Zeitschr. f. physiol. Chem. 35, 465 (1902).

und vielleicht auch der weiteren Spaltung durch Wasseraufnahme sei.

Es fragt sich nun aber, geeignete experimentelle Verfahren ausfindig zu machen, um die Wirkung des Pepsins in ihrer Abhängigkeit vom Zustande des Substrats genügend genau zu erforschen. Das ist keineswegs eine leichte Aufgabe. Sehen wir uns die verschiedenen gebräuchlichen Methoden zur Bestimmung der Pepsinwirkung an, so fällt es auf, daß die meisten nur den Anfang der Verdauung angeben können. Es wird entweder die Menge des in Lösung gegangenen Eiweißes bestimmt (Mett, Grützner) oder es wird die Menge des schon anfangs vollständig gelösten Eiweißes, die nach einer gewissen Zeit noch niedergeschlagen werden kann, festgestellt. Ueber die weitere Wirkung des Pepsins, nachdem es ungelöstes Eiweiß gelöst, oder gelöstes einigermaßen gespalten hat, sagen diese Methoden nichts aus. Nun glaube ich zwar, daß kein Grund vorliegt, in dieser ersten Wirkung, z. B. der lösenden, einen anderen Prozeß als in den nachfolgenden weiteren Spaltungen zu erblicken, obgleich das von einigen Autoren wohl getan ist, und man sogar die Lösung und die späteren Spaltungen der Wirkung verschiedener Enzyme zugeschrieben hat. Obgleich man also z. B. die Pepsingehalte von verschiedenen Lösungen richtig nach Mett oder Grützner miteinander vergleichen kann, ändert sich die Sache, wenn es gilt, näheres über das Wesen der Wirkung dieses Enzyms zu erforschen. Denn besonders wenn sich zeigen wird, daß der Zustand des Substrats von Wichtigkeit für die Wirkung ist, sieht man leicht ein, daß man zu ganz anderen Resultaten kommen könnte, falls man einerseits die Wirkung an dem in Lösung gehen von Eiweiß, andererseits an den Spaltungen von z. B. Albumosen studieren wollte. Diese verschiedenen Substrate haben ganz andere Eigenschaften; man muß annehmen, daß die Oberfläche des Eiweißes relativ klein ist, durch die Quellung (Hydratation des geladenen Eiweißes) wird verhältnismäßig diese Oberfläche nicht unbedeutend vergrößert. Dabei entstehen so große Komplexe, daß die innere Reibung sehr merklich in die Höhe geht. Die Albumosen dagegen, deren Teilchen in Lösung viel kleiner sind, haben schon ohne gequollen zu sein eine sehr große Oberfläche, so daß für diese die Quellung in dieser Hinsicht nicht viele Bedeutung mehr hat. Hier wird auch die innere Reibung ebenso wenig als bei der Hydratation von Salzionen, bei der Ladung der Albumosenteilchen merklich vergrößert, obgleich

man doch annehmen muß, daß die geladenen Albumosenionen ebenso gut als die Eiweißionen sich hydratisieren. Ich konnte zeigen, daß eines der ersten Spaltstücke des Eiweißes, die sogenannte Heteroalbumose bei Säurezugabe noch ein Maximum der inneren Reibung, obgleich schon von viel geringerer Höhe als Eiweiß, aufweist. Bei den kleineren Spaltstücken, Proto- und Deuteroalbumosen konnte ich keine Zunahme der inneren Reibung mehr auffinden ebenso wenig als bei Aminosäuren. Wenn wir nun einmal die Annahme machen, daß einer von den vielen Umständen, wodurch die Pepsinwirkung bestimmt wird, die Oberfläche des Substrats sei, dann sehen wir, daß bei ungelöstem oder auch bei gelöstem Eiweiß die Quellung für die ersten Spaltungen sehr wichtig sein muß, daß aber, sobald niedrigere Albumosen entstanden sind, die Bedeutung der Quellung wahrscheinlich in den Hintergrund rücken wird, daß dann aber andere Umstände in den Vordergrund rücken könnten. Es wird also sicher geboten sein, die Pepsinwirkung auf verschiedene Weisen zu studieren, damit man allmählich die verschiedenen Umstände, die von Wichtigkeit sind, kennen lernt. Ich habe nun in erster Linie die Pepsinwirkung auf ungelöstes Eiweiß, dann aber auf gelöstes und weiter auch noch auf verschiedene Albumosen studiert. Ueber die Ergebnisse wird in den folgenden Kapiteln berichtet.

a) Versuche mit ungelöstem Eiweiß.

Um die Wirkung des Pepsins auf ungelöstes Eiweiß zu studieren, habe ich mich der Grützner'schen Methode bedient. Das Prinzip dieser Methode beruht auf folgendem: Mit Karmin gefärbtes Fibrin wird mit einer verdünnten Säure während einer halben Stunde quellen gelassen, nach dieser Zeit ändert sich die Quellung praktisch nicht mehr. Sodann wird eine (sehr kleine) Menge einer Pepsinlösung zugegeben, welche man unter regelmäßigem Schütteln (z. B. jede halbe Minute) eine kurze Zeit (fünf bis zehn Minuten) wirken läßt. Man filtriert dann über Glaswolle und vergleicht die Farbe des Filtrats mit einer in derselben Weise hergestellten Vergleichslösung von ziemlich willkürlicher Farbintensität. Diese Methode ist für die Bestimmung des Pepsins (selbstverständlich vergleichender Weise), ihrer Einfachheit und Leichtigkeit der Ausführung wegen wohl am meisten zu empfehlen²⁰⁾. Für

²⁰⁾ Siehe: L. J. Gesellschaft, Zeitschr. f. physiol. Chem. 94, 205 (1915).

meinen Zweck hatte diese Methode noch den Vorteil, daß man sich unmittelbar ein Bild des Zustandes des Eiweißes in der Weise machen kann, daß man die (scheinbaren) Volumina des Eiweißes (annähernd) miteinander vergleichen kann. Je größer die Quellung, um so größer das (scheinbare) Volum des Eiweißes. Um den Einfluß von Säurekonzentration auf die Quellung, das Auftreten eines Quellungsmaximums sowie den verschiedenen Einfluß von verschiedenen Salzen für Vorlesungszwecke zu demonstrieren, machte ich auch von Karminfibrin Gebrauch. Ich fand, daß wenn man richtig dargestelltes, gut ausgewaschenes homogenes Karminfibrin verwendet, und immer in genau derselben Weise arbeitet, daß dann das scheinbare Volum dem Quellungsgrade genügend genau parallel ist. Nur wenn das spezifische Gewicht der Lösung (große Säure- oder Salzkonzentration) merklich erhöht ist, und daher das Fibrin sich weniger

gut abzusetzen anfängt, muß man mit der Beurteilung etwas vorsichtig sein.

Aus den Versuchen mit dem Karminfibrin²¹⁾ hat sich ergeben, daß der Angriff des Pepsins auf ungelöstes Eiweiß in erster Linie vom Quellungsgrade abhängig ist. Die Menge des gelösten Eiweißes war immer proportional dem (scheinbaren) Volum des Eiweißes. Ich habe Versuchsreihen mit sieben Säuren: Salzsäure, Oxalsäure, Milchsäure, Phosphorsäure, Schwefelsäure, Essigsäure und Zitronensäure angestellt; in jeder Versuchsreihe stieg die Enzymwirkung mit der Quellung bis zum Quellungsmaximum, bei noch größerer Säurekonzentration nahm die Quellung und auch die Enzymwirkung wieder ab und zwar einander proportional. Maxima von Quellung und Optima der Enzymwirkung fielen immer zusammen. Als Beispiel sei hier eine Versuchsreihe mit Phosphorsäure mitgeteilt.

Tabelle I.

Versuchsreihe mit Phosphorsäure. 50 mg Karminfibrin. Verdauungszeit 6 Minuten. Zimmertemperatur. Die Quellung ist in Zentimetern angegeben. (Höhe des Fibrins.)

Nr.	Wasser ccm	Phosphor- säure 0,5945 n. ccm	Quellung cm	Normali- tät der Phosphor- säure	Verdau- ung (Skala des Kolori- meters)	Messung des p_H nach der Pepsinwirkung			
						π (Volt) (—)	p_H	c_H	
1	7,5	0,5	2,4	0,042	2,8	0,1186	2,746	0,0018	<div style="display: flex; align-items: center; justify-content: center;"> <div style="font-size: 4em; margin-right: 10px;">{</div> <div> <p>vor der Pepsinwirkung</p> <p>$p_H = 1,947$</p> <p>$c_H = 0,0113$</p> </div> </div>
2	7,0	1,0	2,9	0,071	3,05	0,1471	2,253	0,0056	
3	6,75	1,25	3,0	0,086	3,25	0,1539	2,135	0,0073	
4	6,5	1,5	2,9	0,101	3,00	0,1590	2,045	0,0090	
5	6,0	2,0	2,6	0,131	2,90	—	—	—	
6	5,0	3,0	2,3	0,190	2,70	0,1771	1,732	0,0185	
7	4,0	4,0	2,3	0,250	2,20	—	—	—	
8	3,0	5,0	2,1	0,309	2,25	0,1872	1,556	0,0278	

Man sieht, daß das Maximum der Quellung und der Verdauung bei $p_H = 1,947$ vor und 2,135 nach der Verdauung liegt, also im Mittel bei $p_H = 2,04$. Selbstverständlich sind beide Maxima nur annähernd festgestellt, besonders weil weder die Quellung noch die Verdauung ein sehr ausgeprägtes Maximum zeigen, vielmehr besteht gewissermaßen eine optimale Breite des Säuregehalts. Das aber geht aus dieser Versuchsreihe, sowie aus den anderen hier nicht mitgeteilten mit genügender Sicherheit hervor, daß Quellung und lösende Kraft parallel gehen. Besonders wichtig in dieser Hinsicht war die Versuchsreihe mit Schwefelsäure; die Quellung war hier äußerst gering und in Uebereinstimmung damit die Pepsinwirkung. Während bei den anderen Säuren fünf oder höchstens zehn Minuten genühten, um die für die Bestimmung erwünschte

Enzymwirkung zu erhalten, mußte ich bei Schwefelsäure nicht weniger als 120 Minuten wirken lassen. Bei den Versuchen mit Essigsäure zeigte sich eine Besonderheit. Hier verliefen Quellung und Enzymwirkung nur bei kleinen Säurekonzentrationen parallel, bei größerer Konzentration aber ging zwar die Enzymwirkung aber nicht die Quellung zurück. Sogar in gewöhnlichem Eisessig quillt Karminfibrin noch sehr deutlich. Bei dieser Säure findet Quellung nicht nur in Wasser mit wenig Säure, sondern auch in Säure mit wenig Wasser statt. Beide Arten von Quellung gehen allmählich ineinander über, wenn man zu Wasser immer mehr Essigsäure gibt. Es sieht also so aus, als ob das Eiweiß in den wasserreichen Gemischen vom aufgenommenen Wasser, in den

²¹⁾ Näheres über die Besonderheiten der Ausführung siehe in meiner zweiten Mitteilung loc. cit.

säurereichen Gemischen aber von der aufgenommenen Säure quillt. In physikalisch-chemischer Hinsicht haben auch im übrigen Wasser und Essigsäure Ähnlichkeit. Nun scheint aber das Pepsin nur auf das durch Wasseraufnahme gequollene Fibrin lösend zu wirken. Bei den sehr essigsäurereichen Lösungen findet zwar eine gewisse Fibrinlösung statt, aber diese rührt von Säurewirkung her; bei äußerst kleinen Wassergehalten hört auch diese auf. Ich fand bei Essigsäure zwei Maxima der Fibrinlösung, eine durch Pepsin- die zweite durch Säurewirkung. Das Reaktionsoptimum für die Enzymwirkung liegt bei Essigsäure bei etwas größerem p_H als bei den übrigen Säuren; das läßt sich so erklären: Die H-Ionenkonzentration in Essigsäurelösungen ist sehr gering, zur Erreichung einer etwas größeren H-Ionenkonzentration muß schon viel Essigsäure zugegeben werden. Dann aber fängt das Eiweiß an von der Säure aufzunehmen und die Enzymwirkung wird gehemmt. Bevor die H-Ionenkonzentration den Wert erreicht hat, die sie bei z. B. Salzsäure im Reaktionsoptimum hat, geht bei Essigsäure die Enzymwirkung wieder zurück, obgleich die Quellung noch keineswegs abnimmt. Folgende Tabelle II gibt die Lage der Maxima von Quellung und Verdauung der verschiedenen Säuren.

Tabelle II.

Säure	Maximum der Quellung p_H	Maximum der Verdauung p_H als Mittel vor und nach der Wirkung.
Salzsäure	2,05	2,23
Oxalsäure	2,13	2,24
Milchsäure	2,21	2,42
Phosphorsäure	1,95	2,04
Schwefelsäure	2,40	3,16
Essigsäure	2,55	2,81
Zitronensäure	2,18	2,36

In dieser Tabelle ist als optimaler p_H der Verdauung das Mittel aus p_H vor und nach der Verdauung gegeben; bei Schwefelsäure war p_H nach der Verdauung stark verschoben, das rührt vielleicht von einem eigentümlichen Verhalten dieser Säure gegenüber dem Karminfibrin her; 3,16 als Mittel wird wohl zu groß sein. Im übrigen sehen wir, daß die Lagen der Optima nicht alle identisch sind, p_H ist am kleinsten bei Phosphorsäure und Salzsäure, am größten bei Essigsäure und Schwefelsäure. Essigsäure ist schon besprochen, bei Schwefelsäure macht sich wohl die starke Lyophilie des SO_4 -Ions geltend.

Deutlich zeigt sich der Parallelismus zwischen Quellung und Enzymwirkung, wenn man die sieben Säuren in ihren optimalen Konzentrationen ihrer Wirkung nach vergleicht. Die Reihenfolge der Säuren, nach der Größe der in denselben stattfindenden Quellung ist folgende:

Milchsäure > Salzsäure = Phosphorsäure > Zitronensäure > Oxalsäure > Schwefelsäure, wobei Essigsäure ihres abweichenden Verhaltens wegen fortgelassen ist.

Die Reihenfolge der Säuren, nach der Größe der in derselben erhaltenen Pepsinwirkung ist folgende:

Milchsäure = Salzsäure > Phosphorsäure > Zitronensäure > Oxalsäure > Schwefelsäure. Hier zeigen Milchsäure und Salzsäure sich einander gleichwertig, obgleich die Quellung in Milchsäure ein wenig stärker als in Salzsäure war. Aber die Milchsäurelösung war stärker als die Salzsäurelösung, und deshalb kann bei weniger gut abgesetztem Fibrin sich die Quellung bei Milchsäure etwas größerorgetäuscht haben. Ziehen wir das in Betracht, dann sind die beiden Reihen dieselben.

Vielleicht noch deutlicher geht der Zusammenhang zwischen Quellung und Pepsinwirkung aus den Versuchen mit Salzen hervor.

Versuche mit Salzen.

Nach dem vorhergehenden können wir voraussagen, daß diejenigen Salze, welche die Quellung des Eiweißes am meisten beeinträchtigen, auch den größten Einfluß auf die Pepsinwirkung haben werden. Nun ist der Einfluß von Salzen auf Eiweiß von der Ladung dieses letzteren abhängig; die Reihenfolge der Anionenwirkung auf positives Eiweiß in saurer Lösung ist gerade die entgegengesetzte von derjenigen der Wirkung auf negatives Eiweiß in alkalischer Lösung. Die Fällung von Eiweiß in saurer Lösung wird z. B. von Anionen gemäß der folgenden Reihe gefördert:

In alkalischer Lösung ist die Reihe genau umgekehrt²²⁾. Für die Pepsinwirkung brauchen wir saure Lösungen und wir können also für die Salzanionenwirkung die erste Reihe erwarten. Ich habe nun sieben Salze und zwar alle Natriumsalze verwendet, nämlich:

Chlorid, Zitrat, Azetat, Chlorat, Nitrat, Rhodanat und Sulfat.

²²⁾ R. Höber, Physikalische Chemie der Zelle (Leipzig 1914), 322.

Beim Salzzusatz hatte ich möglichst darauf zu achten, daß die H-Ionenkonzentration sich nicht ändere. Denn nur wenn diese praktisch unverändert bleibt, kann man den Einfluß der Salzanionen richtig beurteilen. Darum habe ich die für die Pepsinwirkung gewünschte saure Reaktion durch Milchsäure so gut wie möglich fixiert. Die Milchsäure hat als sehr schwache Säure den Vorteil, daß sie nicht leicht andere Säuren „in Freiheit setzen“ wird, was z. B. wohl der Fall sein würde, falls ich Salzsäure gebraucht und dann u. a. Azetat zugegeben hätte.

Die gebrauchte Milchsäurekonzentration war die optimale. Bei dieser optimalen H-Ionenkonzentration bedingt eine kleine Aenderung von dieser nur eine sehr kleine der Pepsinwirkung; also auch falls durch die Salzzugabe die Reaktion sich doch noch etwas ändern würde, war eine merkliche Aenderung der Pepsinwirkung dadurch nicht zu befürchten. Bei den Versuchen zeigte sich, daß die Reihenfolge der Salze nach ihrem Einfluß auf Pepsinwirkung und Quellung bei höheren Konzentrationen der Salze sich etwas ändern kann. Die niedrigste Salzkonzentration gibt die Salzanionenwirkung wohl am reinsten; dann sind die Aenderungen in der H-Ionenkonzentration sowie in dem spezifischen Gewicht der Lösungen (Einfluß des spezifischen Gewichts

auf das Absetzen und das scheinbare Volum des Karminfibrins) am geringsten. Ich gebe hier noch einmal die Resultate der Versuchsreihe mit den niedrigsten Salzkonzentrationen²⁹⁾. Die Messung des p_H vor der Pepsinwirkung geschah in einer Parallelversuchsreihe, wobei das Pepsin durch allmähliches Erhitzen inaktiviert worden war. Bei diesem langsamen Erhitzen koaguliert das Pepsin nicht. Die Pepsinwirkung in den Lösungen mit Rhodanat und Sulfat mußte länger als in den übrigen Lösungen fortgesetzt werden, weil sonst keine meßbare Wirkung sich ergeben hätte. Die Pepsinwirkung wird wieder durch die Zahl des (Grützner-schen) Kolorimeters angegeben, in der sechsten Vertikalreihe sind diese Zahlen auf dieselbe Zeit (5 Minuten) der Wirkung umgerechnet unter der Voraussetzung, daß die (lösende) Wirkung des Enzyms proportional der Zeit ist. Die Milchsäurekonzentration war 0,18 n., die Salzkonzentrationen 0,0067 äquivalent (also vom Zitrat z. B. $\frac{1}{3} \times 0,0067$ Gramm-Molekeln pro Liter). Die Messung des p_H war in der chlorathaltigen Lösung nicht gut möglich (Oxydation an der Elektrode), die nitrathaltige Lösung ließ sich bei der sauren Reaktion noch messen.

Tabelle III. Versuche mit Salzen.

Nr.	Salz	Quellung	Dauer der Pepsinwirkung Minuten	Skala- Kolorimeter	Umgerechnet auf 5 Minuten	p_H	
	Natrium-	mm				vor der Pepsinwirkung	nach
1	Kein	34	5	5,85	5,85	2,25	2,65
2	Zitrat	26,8	5	5,3	5,3	2,42	2,69
3	Azetat	26,5	5	5,1	5,1	2,44	2,76
4	Chlorid	25,4	5	4,8	4,8	2,26	2,59
5	Chlorat	25,0	5	4,6	4,6	—	—
6	Nitrat	23,8	5	4,8	4,8	2,25	2,55
7	Rhodanat	18,1	9	2,0	1,1	2,25	2,51
8	Sulfat	11,7	20	2,8	0,7	2,29	2,71

Man sieht aus dieser Tabelle, daß die H-Ionenkonzentration durch die Salzzugabe nur unbedeutend geändert wird, nur beim Zitrat und Azetat ist p_H etwas vergrößert, aber auch diese Verschiebung kann auf die Pepsinwirkung kaum Einfluß haben. Weiter ergibt sich, daß die Reihenfolge der Lösungen nach der Quellung und nach der Pepsinwirkung wieder die gleiche ist. Nur ist die Pepsinwirkung beim Nitrat

eine Spur größer als beim Chlorat, aber diese Differenz fällt innerhalb der Bestimmungsfehler des Kolorimeters; die Differenz der Quellungen ist hier auch sehr gering. Wenn wir in Betracht ziehen, daß die Quellung nur annähernd und vergleichsweise bestimmt ist, so können wir sagen, daß aus den Salzversuchen auch wieder deutlich hervorgeht, daß für die lösende Wirkung des Pepsins die Quellung des Eiweißes in erster Linie maßgebend ist. Die Reihenfolge der Salze nach ihrer hemmenden Wirkung auf die Pepsinwirkung:

²⁹⁾ Für nähere Besonderheiten siehe meine zweite Mitteilung, loc. cit. 242.

Zitrat < Azetat < Chlorid < Chlorat
< Nitrat < Rhodanat < Sulfat

geht parallel ihrem fällungsbefördernden Einfluß auf Eiweiß in saurer Lösung.

$\text{CH}_3\text{COO} < \text{Cl} < \text{NO}_3 < \text{Br} < \text{J} < \text{SCN}$ (Höber).

Wir haben also gesehen, daß die lösende Wirkung des Pepsins auf ungelöstes Eiweiß vom Quellungsgrade abhängig ist. Wir wollen nun sehen, was die bisherigen Versuche über die Bedeutung des Zustandes des Substrats, wenn dieses von vornherein gelöst ist, gelehrt haben.

b) Versuche mit gelöstem Eiweiß.

Wir sahen schon, daß die Resultate der Versuche von J. Christiansen gezeigt haben, daß der erste Teil der Pepsinwirkung auf gelöstes Eiweiß, insoweit dieses sich durch die Viskositätsabnahme messen läßt, von der Größe dieser inneren Reibung, das heißt also von der Quellung abhängig ist. Das gelöste noch ungespaltene Eiweiß verhält sich also im ersten Anfang der Verdauung so wie noch ungelöstes Eiweiß. Das Lösen und die ersten Spaltungen des gelösten Eiweißes bis zu Protalbumosen, werden also in ihrer Geschwindigkeit beide vom Quellungsgrade bedingt. Die Spaltung des natürlichen gelösten Eiweißes bis zu Protalbumosen ist also ein Vorgang, der ganz mit dem Lösungsvorgang von z. B. Fibrin zu vergleichen ist, bei beiden findet eine enorme Oberflächenvergrößerung statt. Ich glaubte anfangs, daß auch für die weiteren Spaltungen der Hydratationszustand des Substrats maßgebend sein würde, aber es hat sich gezeigt, daß bei diesen weiteren Spaltungen sicher andere Umstände von größerer Bedeutung sind. Wenn das Substrat schon eine so große Oberfläche als bei den Protalbumosen erhalten hat, wobei also die Beziehungen zwischen Substratteilchen und Wasser auch sehr innig sind und keine nennenswerten Unterschiede in diesen Beziehungen in der Mitte und an der Peripherie dieser Teilchen mehr bestehen, dann scheint die Bedeutung der Hydratation der Teilchen in den Hintergrund zu geraten. Wenigstens können wir bald sehen, daß bei länger fortgesetzter Pepsinwirkung die Beziehung zwischen Quellung und Verdauung undeutlicher wird. Als ich das gefunden hatte, habe ich mir die Frage vorgelegt, ob für den Anfang der Verdauung doch noch nicht eine derartige Beziehung aufzufinden wäre, und das hat sich unzweideutig gezeigt. Bei der Untersuchung nach der Pepsinwirkung auf gelöstes Eiweiß hat man die

schwierige Aufgabe diese Wirkung zu messen. Die Lösung dieser Aufgabe wird immer eine sehr unvollkommene sein, die Pepsinwirkung in ihrem Verlauf richtig zu verfolgen ist wohl nicht möglich. Ich habe zur Zeit die auch von S. P. L. Sørensen gebrauchte Tannin-Methode verwendet, welche für den vorliegenden Zweck noch eine der geeignetsten Methoden zu sein scheint. Nach Neutralisation der Verdauungsflüssigkeit wird eine nicht zu geringe Menge Natriumazetat und sodann ein Ueberschuß an Tannin zugegeben. Ich füllte immer mit Wasser bis auf ein bestimmtes Volum an und bestimmte in einem Teil des Filtrats (nach zwei oder drei Tagen wurde filtriert) den Stickstoff nach Kjeldahl.

Um nun mögliche Beziehungen zwischen Quellung und innerer Reibung so deutlich als möglich an den Tag treten zu lassen, habe ich einerseits durch geeignete Salzzugabe große Unterschiede in der inneren Reibung hervorgerufen, andererseits die Verdauungszeit so kurz wie möglich gewählt. Um aber mit der Tanninmethode Resultate zu bekommen, muß die Verdauung weiter fortgeschritten sein als bis zu dem Punkte, wo die innere Reibung wieder zu derjenigen der säurefreien Lösung des Eiweißes herabgesunken ist. Dieses Absinken der inneren Reibung bedeutet nur den allerersten Teil der Spaltungen, es wird schon von Spuren Pepsin in kurzer Zeit hervorgerufen. Ich mußte eine kräftigere Wirkung haben und machte die Versuche in folgender Weise: Dialysiertes und filtriertes Rinderserum (Stickstoffgehalt 5,34 mg pro ccm) diente als Substrat; 10 ccm wurden in Meßkölbchen von 25 ccm gebracht. Mit Wasser und Milchsäure nebst Salzlösung wurde das Volum bis auf 21 ccm gebracht. Die Lösung wurde dann zu gleicher Zeit mit einer Pepsinlösung (100 mg in 50 ccm Milchsäure 0,169 n.) auf 37° gebracht. Als die Lösungen die Temperatur 37° angenommen hatten, wurden 4 ccm Pepsinlösung zu der Eiweißlösung gegeben und genau fünf Minuten verdaut, während welcher Zeit jede Minute geschüttelt wurde. Dann wurden 10 ccm in ein Meßkölbchen von 50 ccm gegeben, in welches zuvor die berechnete zur Neutralisation benötigte Menge Natronlauge und 5 ccm einer zweimolekularen Natriumazetatlösung gebracht waren. Dadurch wird die Verdauung sofort abgebrochen. Sodann wurden 5 ccm 15 proz. Tanninlösung und Wasser bis auf 50 ccm zugegeben. Nach zwei Tagen wurde in 25 ccm des Filtrats der Stickstoff bestimmt. Eine zweite Versuchsreihe aber mit unwirksamem Pepsin

Tabelle IV. Versuche mit kurzer Versuchsdauer.

Nr.	Salz	Innere Reibung				Verdauung			
		Ablaufzeit Sekunden	Messung des p_H			Prozente Stickstoff nicht vom Tannin niedergeschlagen	Messung des p_H		
			π (Volt)	p_H	c_H		π (Volt)	p_H	c_H
1	Kein	145,4	0,4273	2,502	0,0032	8,63	0,4376	2,681	0,0021
2	NaCl	119,0	0,4321	2,584	0,0026	7,47	0,4385	2,696	0,0020
3	Na ₂ SO ₄	111,7	0,4295	2,540	0,0029	7,04	0,4385	2,696	0,0020

Die gesamte Milchsäurekonzentration war 0,2068 n; die Salzkonzentration 0,028 äquivalent.

diente zur Bestimmung der inneren Reibung. Die Tabelle IV gibt die Resultate.

Aus der Tabelle sieht man, daß Quellung und Verdauung in gleicher Richtung gehen. Die Verdauung ist hier aber schon weit über den Punkt hinaus, wo die innere Reibung ganz abgesunken sein würde, hier ist schon 7 bis 8,6 Prozent Stickstoff nicht mehr durch Tannin zu fällen. Der Salzeinfluß ist dann auch relativ klein, viel kleiner als z. B. der Einfluß von 0,0067 äquivalent Sulfat beim ungelösten Eiweiß (Tabelle III, S. 262). Diese Versuchsreihe lehrt uns den Uebergang zu den noch weiter fortgeschrittenen Verdauungen kennen, wo der Salzeinfluß nahezu verschwindet, wie wir unten sehen werden. Auch schon während der Versuchsdauer war der Salzeinfluß hier noch sehr deutlich zu sehen. Bei der Pepsinwirkung auf Serum entsteht als eines der ersten Spaltstücke ein in Wasser und selbst in verdünnten Säuren ziemlich schwerlöslicher Stoff (vielleicht Stoffe), dem man den Namen Heteroalbumose geben kann. Die Bildung dieses Stoffes veranlaßt eine Trübung der Verdauungsflüssigkeit. Während der fünf Minuten nun wurde 1 immer mehr trübe, bis es am Ende stark trübe war; 2 dagegen wurde bedeutend weniger trübe und 3 blieb nahezu klar. Die geringe Salzkonzentration könnte die gebildete Heteroalbumose nicht in Lösung gehalten haben.

Dergleichen Einfluß von Salzen habe ich auch noch bei Versuchen mit Edestin beobachtet.

Dazu wurde Edestin in Milchsäure gelöst und Pepsin zugegeben. Nach einer gewissen Zeit wurde dann mit Natriumchlorid oder Ammonsulfat bis zur halben Sättigung kein Niederschlag mehr erhalten. Diese Zeit war nach Zugabe von Natriumchlorid oder besser Sulfat ein wenig verlängert. Wir wollen nun sehen, wie die Verdauung bei längerer Versuchsdauer und mit verschiedenen Säuren und unter Zugabe von Salzen sich gestaltet. Ich habe mit denselben Säuren und Salzen, welche früher

beim ungelösten Eiweiß gebraucht waren, Versuchsreihen angestellt. Als Substrat diente lange dialysiertes und filtriertes Pferde- oder Rinderserum. Zur Bestimmung der Pepsinwirkung wurde die Tanninmethode gewählt. Die Verdauungszeit war meistens eine Stunde, die Temperatur 37°. Die Bestimmung der inneren Reibung geschah mit einem nach dem Ostwald'schen Prinzip selbst hergestellten Inneren-Reibungsmesser von geeigneter Form, die Temperatur bei diesen Bestimmungen war meistens 18°; an heißen Sommertagen habe ich auch einige Versuchsreihen bei 25° angestellt. Selbstverständlich wurde das Pepsin in den Lösungen, die zur Bestimmung der inneren Reibung dienen sollten, unwirksam gemacht und zwar durch Erhitzen der sauren Lösung und zwar sehr langsam bis etwa 80°. Dabei bleibt die Pepsinlösung klar. Im übrigen war die Einrichtung der Versuche nach dem Schema, das schon oben beschrieben wurde.

* * *

Erste Versuchsreihe mit Salzsäure-Serum enthält 5,74 mg Stickstoff pro ccm. Pepsinlösung 100 mg in 50 ccm Salzsäure 0,0116 n. 10 ccm Serum, Wasser, Salzsäure, 4 ccm Pepsinlösung, Gesamtvolum 25 ccm. In der Tabelle ist die Differenz der relativen inneren Reibung der Lösung und der der Salzsäure angegeben (siehe Tabelle V).

Ablaufzeit des inneren Reibungsmessers mit Wasser 111,4 Sek. Die Berechnung der inneren Reibung als Differenz derjenigen der Lösung und der reinen gleich konzentrierten Salzsäurelösung geht von der Annahme aus, daß die gesamte innere Reibung sich additiv aus zwei Teilen zusammensetzt, einem vom Eiweiß, und einem von der Salzsäure herrührend. Das ist keineswegs den Tatsachen entsprechend, schon darum nicht, weil ein Teil der Salzsäure gebunden ist, aber ich habe in dieser Weise doch noch den Anteil des Eiweißes an der inneren Reibung

Tabelle V. Versuchsreihe mit Salzsäure²⁴⁾.

Nr.	Normalität der Säure	Ablaufzeit Sekunden	Innere Reibung, 18°			Verdauung, 37°			pH Mittel vor und nach der Verdauung
			$\left[\frac{St}{S_0 t_0}\right] - \left[\frac{St}{S_0 t_0}\right]$ Lösung Säure	π Volt	Messung p _H c _H	Prozente Stickstoff nicht vom Tannin niedergeschlagen	Messung p _H nach d. Verdauung π Volt	p _H c _H	
1	0,0019	119,7	0,082	0,5768	5,093	8,07×10 ⁻⁶	0,5923	5,363	4,34×10 ⁻⁶
2	0,0079	137,0	0,238	0,4855	3,563	2,73×10 ⁻⁴	0,5200	4,109	7,77×10 ⁻⁵
3	0,0139	159,3	0,430	0,4526	2,940	0,00115	0,4940	3,658	2,20×10 ⁻⁴
4	0,0169	169,0	0,508	0,4364	2,659	0,00219	0,4853	3,507	3,11×10 ⁻⁴
5	0,0199	168,6	0,497	0,4262	2,483	0,00329	0,4768	3,360	4,36×10 ⁻⁴
6	0,0239	164,2	0,458	0,4111	2,221	0,00601	0,4652	3,159	6,93×10 ⁻⁴
7	0,0279	156,8	0,392	0,4038	2,095	0,00804	0,4478	2,857	1,39×10 ⁻³
8	0,0360	153,3	0,361	0,3907	1,867	0,013	0,4171	2,325	0,00473
9	0,0460	145,8	0,295	0,3800	1,681	0,021	0,3949	1,940	0,0115
10	0,0721	136,8	0,215	0,3636	1,397	0,040	0,3710	1,526	0,0298
11	0,1390	131,7	0,172	0,3478	1,124	0,075	0,3524	1,203	0,0626
12	0,2024	130,9	0,168	0,3341	0,885	0,130	0,3350	0,902	0,125

Tabelle VI. Versuchsreihe mit Oxalsäure.

1	0,0032	121,6	0,099	0,5567	4,745	1,80×10 ⁻⁵	0,5451	4,544	2,86×10 ⁻⁵	4,644
2	0,0232	137,6	0,243	0,4559	2,997	0,00101	0,4854	3,509	3,10×10 ⁻⁴	3,253
3	0,0332	147,8	0,336	0,4349	2,634	0,00232	0,4712	3,263	5,46×10 ⁻⁴	2,949
4	0,0432	150,3	0,357	0,4191	2,360	0,00436	0,4604	3,075	8,41×10 ⁻⁴	2,718
5	0,0592	148,8	0,344	0,4031	2,083	0,00827	0,4358	2,649	0,00224	2,366
6	0,0672	147,7	0,335	0,3982	1,997	0,0101	—	—	—	—
7	0,0752	146,2	0,321	0,3941	1,926	0,0119	—	—	—	—
8	0,0784	—	—	—	—	—	0,4074	2,156	0,00698	1,971
9	0,0952	141,5	0,278	0,3852	1,772	0,0169	—	—	—	—
10	0,1092	138,3	0,250	0,3811	1,701	0,0199	—	—	—	—
11	0,1232	138,1	0,248	0,3784	1,654	0,0222	—	—	—	—
12	0,1264	—	—	—	—	—	0,3843	1,756	0,0175	1,676
13	0,2433	135,8	0,226	0,3606	1,346	0,0451	—	—	—	—
14	0,4432	135,7	0,224	0,3488	1,142	0,0722	—	—	—	—
15	0,4464	—	—	—	—	—	0,3498	1,158	0,0695	1,138
16	1,0064	—	—	—	—	—	0,3334	0,874	0,134	0,874
17	2,0064	—	—	—	—	—	0,3217	0,672	0,213	0,672

²⁴⁾ Die in meiner zweiten Mitteilung angeführte Versuchsreihe mit Salzsäure kommt in ihren Resultaten ganz mit der jetzigen überein; nur ist die Verdauung, der längeren Versuchszeit entsprechend, etwas weiter fortgeschritten. (Siehe Kurve I, Figur 2, Seite 269.)

Tabelle VII. Versuche mit Milchsäure.

Nr.	Normalität der Säure	Ablaufzeit Sekunden	Innere Reibung, 18°			Prozente Stickstoff nicht vom Tannin niedergeschlagen	Verdauung			pH Mittel vor und nach der Verdauung
			$\left[\frac{St}{S_{0,t}} \right] - \left[\frac{St}{S_{1,t}} \right]$ Lösung Säure	π Volt	Messung pH		π Volt	Messung pH nach d. Verdauung	C_H	
1	0,0137	127,4	0,146	0,4983	3,732	—	—	—	—	—
2	0,0652	153,5	0,375	0,4606	3,079	18,87	0,4695	3,233	$5,84 \times 10^{-4}$	3,11
3	0,0789	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4	0,1166	159,8	0,423	—	—	23,26	0,4605	3,077	$8,39 \times 10^{-4}$	2,96
5	0,1304	—	—	—	—	—	—	—	—	—
6	0,1681	168,6	0,497	0,4411	2,741	23,78	0,4524	2,937	0,00116	2,83
7	0,1818	—	—	—	—	—	—	—	—	—
8	0,2196	178,4	0,582	—	—	—	—	—	—	—
9	0,2710	179,0	0,582	0,4324	2,590	—	—	—	—	—
10	0,3568	184,0	0,592	0,4343	2,622	—	—	—	—	—
11	0,3705	—	—	—	—	25,60	0,4373	2,676	0,00211	2,58
12	0,5283	191,0	0,620	—	—	—	—	—	—	—
13	0,7136	—	—	—	—	23,12	0,4228	2,423	0,00377	2,31
14	0,9571	200,2	0,602	0,4057	2,127	20,92	—	—	—	—
15	0,9708	—	—	—	—	—	0,4146	2,281	0,00524	2,16
16	1,3997	242,4	0,744	0,3816	1,709	11,69	0,3861	1,788	0,0163	1,74
17	1,6134	—	—	—	—	—	—	—	—	—
18	3,9787	495,0	1,859	0,3586	1,311	—	—	—	—	—
19	3,9924	—	—	—	—	2,47	0,3601	1,336	0,0462	1,32

Die zur Bestimmung der inneren Reibung benutzten Lösungen wurden nicht alle elektrometrisch untersucht;
der pH wurde für die Kurve interpoliert.

Tabelle VIII. Versuchsreihe mit Phosphorsäure.

1	0,0071	124,2	0,123	0,5177	4,068	$8,54 \times 10^{-5}$	4,16	0,5457	4,554	$2,79 \times 10^{-5}$	4,311
2	0,0309	165,0	0,489	0,4490	2,877	0,00133	13,90	0,4823	3,456	$3,50 \times 10^{-4}$	3,167
3	0,0428	—	—	—	—	—	20,40	0,4688	3,221	$6,02 \times 10^{-4}$	2,945
4	0,0547	177,3	0,595	0,4230	2,427	0,00374	23,00	0,4533	2,952	0,00112	2,689
5	0,0785	172,8	0,552	0,4092	2,188	0,00649	—	—	—	—	—
6	0,1023	172,8	0,549	0,4002	2,032	0,0929	25,73	0,4160	2,306	0,00494	2,169
7	0,1260	167,2	0,494	0,3945	1,934	0,0117	—	—	—	—	—
8	0,1498	166,2	0,482	0,3905	1,864	0,0137	25,60	0,4011	2,048	0,00896	1,955
9	0,1851	160,8	0,427	0,3854	1,775	0,0168	—	—	—	—	—
10	0,3043	156,7	0,373	0,3744	1,585	0,0260	25,73	0,3800	1,681	0,02083	1,633
11	0,4827	155,0	0,330	0,3647	1,416	0,0384	—	—	—	—	—
12	0,6611	—	—	—	—	—	25,08	0,3611	1,355	0,0442	1,335
13	1,1961	—	—	—	—	—	24,04	0,3477	1,121	0,0757	1,111

Tabelle IX. Versuchsreihe mit Schwefelsäure. Pepsinlösung 100 mg in 50 ccm Schwefelsäure 0,0205 n.

Nr.	Normalität der Säure	Ablaufzeit Sekunden	Innere Reibung, 18°			Verdauung, 37°. Eine Stunde			pH Mittel vor und nach der Verdauung
			$\left[\frac{St}{S_0 t_0}\right] - \left[\frac{St}{S_0 t_0}\right]_{\text{Lösung}}$	π Volt	Messung pH	Prozente Stickstoff nicht vom Tannin niedergeschlagen	π Volt	Messung pH nach d. Verdauung	
					pH	c _H		pH	c _H
1	0,0033	122,5	0,108	0,5427	4,502	$3,15 \times 10^{-5}$	0,5545	4,707	$1,96 \times 10^{-5}$
2	0,0115	130,2	0,176	0,4750	3,329	$4,69 \times 10^{-4}$	0,4972	3,713	$1,94 \times 10^{-4}$
3	0,0197	131,6	0,187	0,4325	2,593	0,00256	0,4693	3,230	$5,90 \times 10^{-4}$
4	0,0278	—	—	—	—	—	0,4404	2,729	$1,87 \times 10^{-3}$
5	0,0442	130,2	0,171	0,3876	1,814	0,0154	—	—	—
6	0,0647	—	—	—	—	—	0,3828	1,730	0,0186
7	0,1056	130,5	0,167	0,3616	1,363	0,0433	0,3655	1,430	0,0371
8	0,2080	129,2	0,143	0,3439	1,056	0,0878	0,3453	1,079	0,0833
9	0,4820	—	—	—	—	—	0,3252	0,732	0,185

Tabelle X. Versuchsreihe mit Essigsäure.

1	0,0933	132,4	0,197	0,4949	3,674	$2,12 \times 10^{-4}$	0,5082	3,905	$1,25 \times 10^{-4}$	3,79
2	0,4823	165,5	0,448	0,4635	3,129	$7,43 \times 10^{-4}$	0,4750	3,329	$4,69 \times 10^{-4}$	3,23
3	0,8712	194,6	0,665	0,4511	2,914	0,00122	0,4628	3,117	$7,65 \times 10^{-4}$	3,02
4	1,259	213,0	0,786	0,4435	2,783	0,00165	0,4541	2,966	0,00108	2,83
5	1,649	228,8	0,881	0,4384	2,695	0,00202	0,4490	2,878	0,00132	2,79
6	2,038	245,4	0,991	0,4333	2,606	0,00248	0,4427	2,769	0,00170	2,69
7	2,815	268,5	1,129	0,4248	2,459	0,00348	—	—	—	—
8	3,593	296,3	1,302	0,4170	2,324	0,00475	0,4236	2,437	0,00366	2,38
9	4,372	318,8	1,436	0,4109	2,217	0,00607	0,4158	2,302	0,00499	2,26

Tabelle XI. Versuchsreihe mit Zitronensäure.

1	0,0163	125,6	0,135	0,5129	3,986	$1,03 \times 10^{-4}$	0,5310	4,300	$5,018 \times 10^{-5}$	4,143
2	0,1181	159,8	0,432	0,4481	2,863	0,00137	0,4690	3,225	$5,95 \times 10^{-4}$	3,044
3	0,2198	170,8	0,516	0,4330	2,600	0,00251	0,4498	2,892	0,00128	2,746
4	0,3217	176,1	0,552	0,4240	2,445	0,00359	—	—	—	—
5	0,4233	179,4	0,568	0,4175	2,332	0,00465	0,4304	2,555	0,00279	2,444
6	0,6268	183,1	0,576	0,4089	2,183	0,00656	0,4201	2,377	0,00420	2,280
7	1,0338	193,2	0,615	0,3974	1,984	0,0104	0,4065	2,141	0,00722	2,062
8	1,4408	202,4	0,648	0,3898	1,852	0,0141	0,3978	1,990	0,0102	1,921
9	2,2548	224,3	0,710	0,3776	1,640	0,0229	0,3838	1,748	0,0179	1,694

am besten hervorbringen können. Dies war besonders bei den Säuren, welche in großen Konzentrationen gebraucht werden müßten, wichtig (Milchsäure, Essigsäure, Zitronensäure). Die in den Tabellen angeführten elektromotorischen Kräfte (π) beziehen sich auf Messungen gegen Normal-Quecksilber-Kalomelektroden. Da während der Verdauung p_H sich etwas ändert, habe ich zu den Kurven die Mittel der p_H vor und nach der Verdauung als die richtige betrachtet.

Die Tabelle VI gibt eine Uebersicht der Versuche mit Oxalsäure. Pepsinlösung 100 mg in 50 ccm Oxalsäure 0,02 n.

Die Tabelle VII gibt die Resultate der Versuchsreihe mit Milchsäure. Pepsinlösung 100 mg in 50 ccm Milchsäure 0,0858 n, zum Teil auch 0,1715 n. Die Deutung der inneren Reibung ist hier schwierig, weil von dieser Säure ziemlich große Konzentrationen gebraucht werden müßten und die Lösungen der Säure selbst eine hohe innere Reibung haben. Letztere wurde in reinen Milchsäurelösungen bestimmt, so wie ich es bei allen Säuren getan habe. Wir werden später sehen, daß unsere Berechnung insofern zum Ziele führt, als die berechnete Kurve noch ein Maximum aufweist. Ich habe auch versucht, die Quellung in Milchsäurelösungen auf andere Weise festzustellen. Gelatinescheibchen, etwa 20 mg schwer, aus lange dialysierter Gelatine, wurden während vier Stunden in den betreffenden Milchsäurelösungen bei 18° gelassen. Nach sorgfältigem Abwischen wurde sodann die Gewichtszunahme bestimmt, selbstverständlich unter den nötigen Kautelen, um Verdampfung vorzubeugen. Ich konnte in dieser Weise ein Maximum der Quellung bei $p_H = 2,3$ feststellen, während aus der inneren Reibung dieses bei $p_H = 2,4$ gefunden wurde. Diese Wägemethode zeigte sich aber doch nicht sehr genau und ich habe sie dann auch nicht weiter verwendet.

Die Tabelle VIII enthält die Resultate der Versuchsreihe mit Phosphorsäure. Pepsinlösung 100 mg in 50 ccm Phosphorsäure 0,0446 n. (als zweibasische Säure betrachtet).

Ich komme jetzt an die Schwefelsäure. Wegen der geringen Quellung in deren Lösungen hatte ich zuerst eine Versuchsreihe mit drei Stunden Verdauungszeit angestellt. Als es sich aber zeigte, daß die Verdauung dabei weit fortgeschritten war, habe ich sodann eine zweite mit nur einer Stunde Verdauungszeit ausgeführt. Die Verdauungskurven für drei und für eine Stunde gehen parallel, auch die Maxima der

Verdauung befinden sich bei demselben p_H , nur liegt die Kurve für drei Stunden bedeutend höher. Hier werden nur die Resultate der Reihe mit einer Stunde Verdauungszeit angeführt.

Die Quellung oder innere Reibung steigt nur sehr wenig an, die größte Steigung ist nur 0,079. Dennoch ist die Verdauung in einer Stunde nicht geringer als in den Lösungen der anderen Säuren. Auch die Lage des Optimums ist (im Gegensatz zu den Versuchen mit ungelöstem Eiweiß, siehe S. 259 ff.) hier dieselbe als bei den anderen Säuren, jedenfalls ist das optimale p_H nicht größer.

Die Tabelle X gibt die Resultate der Versuche mit Essigsäure. Pepsinlösung 100 mg in 50 ccm Essigsäure 0,5833 n. Dialysiertes, filtriertes Serum, 7,16 mg Stickstoff pro ccm. Jedesmal 10 ccm der Verdauungslösung in Kölbchen von 100 ccm, in welchen NaOH und Natriumazetat, Tannin und Wasser bis 100 ccm. Zur Stickstoffbestimmung 50 ccm des Filtrats.

Die innere Reibung steigt bei den hier gebrauchten Säurekonzentrationen fortwährend stark an. Wenn die Konzentration 7-normal ist, zeigte sich die innere Reibung von nahezu derselben Größe als in Nr. 9 der Tabelle. Nur bei äußerst hohen Konzentrationen fällt die Quellung wieder etwas ab. Dieses ist alles in Uebereinstimmung mit den früheren Befunden beim ungelösten Eiweiß: starke Quellung sowohl in wasserreichen als in essigsäurereichen Lösungen, in letzteren wohl durch Essigsäure. Von einem Maximum der Quellung bei $p_H =$ etwa 2,5 ist eigentlich nichts zu spüren²⁵⁾. Indessen ebenso wie beim ungelösten Eiweiß zeigt sich auch hier ein Optimum der Verdauung und zwar bei großem p_H (niedrigem Säuregrad). Bei sehr niedrigen Aziditäten, z. B. $p_H = 3,8$ ist die Wirkung in Essigsäurelösungen größer als in denjenigen der anderen Säuren; bei größeren Aziditäten dagegen, z. B. bei $p_H = 2,3$, bei welchem die Wirkung bei einigen anderen Säuren nahezu maximal, ist diese bei Essigsäure wieder nahezu unterdrückt.

Wir kommen jetzt zu unserer letzten Säure, der Zitronensäure. Pepsinlösung, 100 mg in 50 ccm Zitronensäure 0,1018 n.

Die Kurve der inneren Reibung Fig. 1 hält bei dieser Säure die Mitte zwischen denjenigen von Milchsäure und Essigsäure. Sie weist noch einen gewissen Knick auf, so daß man sich

²⁵⁾ Die innere Reibung von Essigsäure-Wassergemischen weist ein Maximum auf.

noch einigermaßen über die Lage der maximalen Quellung ein Bild machen kann.

Die Fig. 1 gibt eine Uebersicht über die Bestimmungen der inneren Reibung, p_H als Abszisse und die berechnete relative innere Reibung als Ordinate. Fig. 2 gibt die Resultate der Verdauungsversuche, p_H als Abszisse, und die Prozente Stickstoff als Ordinate. Bei der Betrachtung dieser Figuren ist zu bedenken, daß nicht alle Versuchsreihen mit demselben Serum gemacht sind. Zu den Versuchen mit Salzsäure, Oxalsäure, Milchsäure, Phosphorsäure und Schwefelsäure wurde ein Serum mit 5,735 mg Stickstoff pro ccm, zu den Versuchen mit Essigsäure und Zitronensäure ein solches mit 7,16 mg pro ccm oder 1,25 mal mehr genommen. Dadurch werden vielleicht die Kurven für Viskosität und für Verdauung eine Spur höher geworden sein. Das Pepsin war bei allen Versuchsreihen dasselbe Präparat, welches sich trocken und im Dunkeln vorzüglich aufbewahren läßt²⁶⁾. Unterschiede in der Wirksamkeit können also nur der Art der verwendeten Säure zugeschrieben werden. Ich glaube im Ganzen die Kurven der Figuren für den vorliegenden Zweck miteinander vergleichen zu können.

Wenn wir uns nun zuerst nach der Reihenfolge der Kurven der inneren Reibung umsehen, so sehen wir, daß diese von den gebrauchten Säuren in folgender Weise gefördert wird (Fig. 1):

Milchsäure > Phosphorsäure > Zitronensäure > Salzsäure > Oxalsäure > Schwefelsäure,

wobei Essigsäure wegen ihres eigentümlichen Verhaltens fortgelassen ist. Inwieweit die Kurven für Milchsäure und Zitronensäure ein Bild der vom Eiweiß herrührenden inneren Reibung (und Quellung) geben, ist auch etwas fraglich. Jedenfalls scheinen die Differenzen zwischen den inneren Reibungen in den Lösungen der Säuren, Milchsäure, Phosphor-

²⁶⁾ Siehe die Abhandlung von L. J. Geselschap, loc. cit.

säure und Zitronensäure in der Gegend des Maximums nur klein.

Die Verdauung geht in abnehmendem Maße weit in den Lösungen der Säuren (Fig. 2):

Phosphorsäure = Milchsäure > Zitronensäure = Schwefelsäure > Salzsäure > Oxalsäure > Essigsäure.

Wenn man im allgemeinen in beiden Reihen auch einen gewissen Zusammenhang nicht verkennen möchte, sicher ist, daß die Schwefel-

säure ganz aus der Reihe fällt. Obgleich die innere Reibung der Eiweißlösung von dieser Säure kaum etwas erhöht wird, wirkt sie auf die Verdauung sogar günstiger als die Salzsäure. Wir sehen hier bei ziemlich weit fortgesetzter Verdauung also ein ganz anderes Verhalten als beim Lösen des ungelösten Eiweißes. Wir wollen nun sehen, wie es mit den Reaktionen für die maximalen Quellungen und die optimalen Verdauungen steht.

Tabelle XII.

Maxima der inneren Reibung und Verdauung bei gelöstem Eiweiß²⁷⁾.

Säure	Maximum der		Maximum der	
	inneren Reibung bei p_H	Verdauung bei p_H	Quellung bei p_H aus früheren Versuchen, siehe S. 261	Lösung p_H im Mittel
Phosphorsäure	2,4	1,9	1,95	2,04
Milchsäure	etwa 2,4	2,65	2,21	2,42
Zitronensäure	2,3 (?)	2,5	2,18	2,36
Schwefelsäure	etwa 2,8	1,6	2,4	3,16 (?)
Salzsäure	2,65	1,95	2,05	2,23
Oxalsäure	2,36	1,9	2,13	2,24
Essigsäure	?	3,12	2,55	2,81

Aus dieser Tabelle sehen wir, daß die Maxima der inneren Reibung und der Verdauung bei den starken Säuren: Phosphorsäure, Schwefelsäure, Salzsäure, auch noch bei Oxalsäure, ziemlich stark auseinandergehen, indem die Maxima der inneren Reibung bei geringerem Säuregrade gelegen sind. Bei den schwachen Säuren: Milchsäure, Zitronensäure und wahrscheinlich auch bei Essigsäure, obgleich hier die Lage der maximalen inneren Reibung nicht bekannt ist, scheinen sich die beiden Maxima einander ziemlich zu nähern. Die Lage der maximalen inneren Reibung geht bei den verschiedenen Säuren nicht sehr weit auseinander, die Lage der maximalen Verdauung wechselt dagegen viel stärker, zwischen 1,6 und 3,12. Aus der Fig. 2 sehen wir noch, daß die Kurven für die schwachen Säuren: Milchsäure, Zitronensäure und Essigsäure viel schärfer zum Maximum gehen, die „optimale Reaktionsbreite“ ist hier viel kleiner als bei den starken Säuren.

Sodann habe ich einige Versuchsreihen angestellt, um den Einfluß von Salzen auf die Verdauung von gelöstem Eiweiß bei längerer Verdauungszeit kennen zu lernen. Dazu habe

ich wieder dieselben Natriumsalze, die auch früher von mir beim ungelösten Eiweiß verwendet waren, gebraucht, also Zitrat, Azetat, Chlorid, Chlorat, Nitrat, Rhodanat und Sulfat. Eine dieser Versuchsreihen sei hier beschrieben.

Um die H-Ionenkonzentration festzulegen, habe ich wieder Milchsäure gebraucht, Gesamtkonzentration 0,2212 n. Die Salzkonzentrationen waren in der hier vorgeführten Versuchsreihe 0,007 äquivalent. Pepsinlösung 200 mg in 100 ccm Milchsäure 0,1482 n. Verdauungszeit 30 Minuten. Tabelle XIII gibt die Resultate.

Die Aenderungen der H-Ionenkonzentration durch die Salzzugabe sind klein, höchstens bei Zitrat und Azetat können diese einigermaßen einen Einfluß auf die Verdauung haben. Diese ist aber zu vernachlässigen (siehe Fig. 2, Kurve für Milchsäure). Etwas größer kann der Einfluß auf die innere Reibung sein. Der Einfluß der Salze auf die Verdauung in 30 Minuten ist klein. Doch ist er noch zu sehen. Das Sulfat hat am meisten hemmend gewirkt; das Rhodanat hat sicher mehr hemmend gewirkt als aus der Tabelle ersichtlich ist, denn ich fand, daß Rhodanate den Kjeldahl-Stickstoffwert erhöhen, gleich so wie Nitrate. Deshalb ist auch der Wert 17,23 für NaNO_3 entschieden zu hoch. Wenn wir das in Betracht ziehen, dann sehen wir, daß die die Quellung in saurer Lösung am meisten beeinträchtigenden Salze, Sulfat und Rhodanat,

²⁷⁾ Seizaburo Okada (Tokio) gibt, The Biochemical Journal 10, 126 (1916), neuerdings für die optimale Reaktion in Salzsäure $c_H = 4 \times 10^{-2}$. Zwischen $1,7 \times 10^{-2}$ und $5,8 \times 10^{-2}$ änderte sich die Wirkung nicht wesentlich.

Tabelle XIII. Versuchsreihe mit Salzen.

Nr.	Salz	Innere Reibung, 18 °				Verdauung, 37°. 30 Minuten				p _H Mittel vor und nach der Verdauung
		Ablauf- zeit Sekunden	Messung p _H			Prozente Stickstoff nicht vom Tannin niedergeschlagen	Messung p _H nach d. Verd.			
			π Volt	p _H	c _H		π Volt	p _H	c _H	
1	Kein	195,1	0,4274	2,503	0,00314	17,34	0,4395	2,713	0,00194	2,608
2	Na Cl	172,4	0,4279	2,512	0,00308	17,13	0,4402	2,726	0,00188	2,619
3	Na CNS	164,1	0,4287	2,525	0,00298	16,27	0,4395	2,713	0,00194	2,619
4	Na ₂ SO ₄	160,1	0,4279	2,512	0,00308	16,05	0,4405	2,730	0,00186	2,621
5	Na NO ₃	170,3	0,4283	2,519	0,00303	17,23	0,4402	2,726	0,00188	2,622
6	Na Cl O ₃	173,9	0,4283	2,519	0,00303	16,27	0,4402	2,726	0,00188	2,622
7	Na-Zitrat	174,6	0,4342	2,622	0,00239	16,49	0,4452	2,812	0,00154	2,717
8	Na-Azetat	174,8	0,4354	2,642	0,00228	16,27	0,4452	2,812	0,00154	2,727

hier die Verdauung auch am meisten gehemmt haben. Ich habe weitere Versuchsreihen mit größeren Salzkonzentrationen und auch längeren Verdauungszeiten angestellt; bei den ersteren wirken die auftretenden Aenderungen im p_H störend und bei längerer Versuchsdauer ist der Einfluß der Salze kaum mehr zu verkennen. Nachdem also aus dem bisher Mitgeteilten deutlich hervorgegangen war, daß die Verdauungskurven für den Anfang und den weiteren Verlauf nicht dieselben sein können, habe ich mir die Aufgabe gestellt, die Pepsinwirkung auf die verschiedenen Gruppen von Spaltstücken etwas genauer zu studieren. Die Resultate von den ersten Versuchsreihen in dieser Richtung kann ich hier schon mitteilen.

c) Pepsinwirkung auf Albumosen.

Ich habe mir drei Gruppen von Albumosen hergestellt. Eine große Menge wiederholt ausgewaschenes und nahezu farbloses Fibrin wurde mit Pepsin-Salzsäure verdaut, bis das Eiweiß nahezu gelöst war. Die Hälfte der Lösung wurde sodann zum Kochen erhitzt und Natronlauge zugegeben, bis der iso-elektrische Punkt des gebildeten sogenannten Azidalbumins erreicht war. Sofort wurde heiß filtriert; im Filtrat setzte sich beim Abkühlen eine erste Fraktion der sogenannten Heteroalbumose ab. Diese wurde abfiltriert, ausgewaschen und sodann in siedendem Wasser gelöst und zum zweiten Male durch Abkühlen niedergeschlagen, sodann ausgewaschen und in Vakuo über Schwefelsäure getrocknet (Erste Gruppe von Albumosen: Heteroalbumosen).

Das Filtrat der Heteroalbumose wurde mit Ammonsulfat halb gesättigt, wodurch der Rest der Heteroalbumose und die sogenannten Protalbumosen niedergeschlagen werden. Der

Niederschlag wurde dialysiert und mit etwas Alkohol versetzt, wodurch Heteroalbumose sich absetzt, Protalbumosen gelöst bleiben. Im Filtrat dieser Heteroalbumose werden die Protalbumosen durch mehr Alkohol gefällt. Die zweite Hälfte der Verdauungsflüssigkeit wurde nach 48 Stunden in derselben Weise verarbeitet, wobei keine nennenswerte Menge Heteroalbumose, auch nur wenig Protalbumosen, aber viel Deuteroalbumosen erhalten wurden, welche letzteren durch völlige Sättigung mit Ammonsulfat der betreffenden Lösungen gefällt wurden. Alle Fraktionen wurden durch Dialyse und durch zweimaliges Fällern mit Alkohol gereinigt. Mit diesen drei Gruppen von Albumosen habe ich nun Verdauungsversuche angestellt.

Für die Versuchsreihe mit Heteroalbumosen wurde eine 4,3prozentige Lösung in Salzsäure 0,0275 n. gemacht. Bei 37° war diese Lösung ganz klar. Der Stickstoffgehalt war 6,79 mg pro ccm. Pepsinlösung 125 mg Pepsin in 50 ccm Salzsäure 0,012 n. Weil die Heteroalbumosen ziemlich schwer angegriffen werden, wurde 60 Minuten verdaut. Die Bestimmung der inneren Reibung geschah bei 25°; Ablaufzeit mit Wasser 96,0 Sekunden.

Bei den Heteroalbumosen war noch ein deutliches Maximum der inneren Reibung zu erkennen; bei den Protalbumosen ist die innere Reibung bei allen Säuregehalten gleich (die kleine Erhöhung bei Nr. 6 rührt vom großen Säuregehalt her). Die Tabelle XVI gibt die Resultate der Versuche mit Deuteroalbumosen. Die Lösung derselben enthielt 4,38 Proz. und 0,0039 n. Salzsäure; Stickstoffgehalt 5,28 mg pr ccm. Pepsinlösung 125 mg Pepsin in 50 ccm Salzsäure 0,0121 n. Verdauungszeit 30 Minuten.

Tabelle XIV. Versuchsreihe mit Heteroalbumosen.

Nr.	Normali- tät der Salzsäure	Innere Reibung, 25 °					Verdauung, 37°. 60 Minuten					p _H Mittel vor und nach der Verdauung
		Ablaufzeit Sekunden	Messung p _H			Prozente Stickstoff nicht vom Tannin niedergeschlagen	Messung p _H nach d. Verdg.					
			π Volt	p _H	c _H		π Volt	p _H	c _H			
		η										
1	0,0129	125,6	0,307	0,5004	3,769	$1,70 \times 10^{-4}$	5,77	0,5126	3,980	$1,047 \times 10^{-4}$	3,874	
2	0,0189	132,8	0,365	0,4629	3,119	$7,65 \times 10^{-4}$	11,68	0,4854	3,508	$3,10 \times 10^{-4}$	3,314	
3	0,0280	133,9	0,379	0,4183	2,345	0,00452	12,68	0,4534	2,954	0,00111	2,650	
4	0,0390	130,4	0,343	0,3936	1,917	0,01211	12,36	0,4112	2,222	0,00599	2,070	
5	0,0731	124,3	0,283	0,3661	1,440	0,0363	12,47	0,3714	1,532	0,0294	1,486	
6	0,1333	118,9	0,229	0,3470	1,110	0,0776	11,90	0,3489	1,143	0,0720	1,127	
7	0,2336	117,3	0,215	0,3315	0,841	0,144	11,10	0,3334	0,874	0,134	0,858	

Unter η sind die Differenzen $\left[\frac{\text{St}}{S_0 t_0} \right]_{\text{Lösung}} - \left[\frac{\text{St}}{S_0 t_0} \right]_{\text{Salzsäure}} \cdot$ verzeichnet.

Tabelle XV enthält die Resultate der Versuche mit Protalbumosen. Die Lösung dieser Albumosen enthielt 4,3 Proz. und 0,00386 n. Salzsäure; 5,84 mg Stickstoff pro ccm. Pepsinlösung 125 mg Pepsin in 50 ccm Salzsäure 0,0120 n.

Tabelle XV. Versuchsreihe mit Protalbumosen.

Nr.	Normali- tät der Salzsäure	Innere Reibung, 25°				Verdauung, 37°. 30 Minuten				p _H Mittel vor und nach der Verdauung
		Ablaufzeit Sekunden	Messung p _H			Prozente Stickstoff nicht vom Tannin niedergeschlagen	Messung p _H nach d. Verd.			
			π Volt	p _H	c _H		π Volt	p _H	c _H	
1	0,0034	103,5	0,5607	4,814	1,54×10 ⁻⁵	22,44	0,5651	4,891	1,29×10 ⁻⁵	4,852
2	0,0094	103,5	0,5107	3,948	1,13×10 ⁻⁴	28,01	0,5184	4,082	8,28×10 ⁻⁵	4,015
3	0,0185	103,3	0,4568	3,013	9,70×10 ⁻⁴	29,02	0,4772	3,368	4,29×10 ⁻⁴	3,190
4	0,0636	102,9	0,3707	1,520	0,0302	27,34	0,3744	1,584	0,0261	1,552
5	0,1238	104,0	0,3491	1,145	0,0716	25,29	0,3504	1,169	0,0678	1,157
6	0,8962	107,5	0,2969	0,241	0,574	10,94	0,2955	0,217	0,607	0,229

Tabelle XVI. Versuchsreihe mit Deuteroalbumosen.

Nr.	Normali- tät der Salzsäure	Innere Reibung, 25°				Verdauung, 37°. 30 Minuten				p _H Mittel vor und nach der Verdauung
		Ablaufzeit Sekunden	Messung p _H			Prozente Stickstoff nicht vom Tannin niedergeschlagen	Messung p _H nach d. Verd.			
			π Volt	p _H	c _H		π ° Volt	p _H	c _H	
1	0,0035	102,5	0,6957	7,154	7,01×10 ⁻⁸	29,94	0,7011	7,249	5,64×10 ⁻⁸	7,202
2	0,0095	104,1	0,5791	5,134	7,34×10 ⁻⁶	32,59	0,5824	5,191	6,44×10 ⁻⁶	5,163
3	0,0186	104,4	0,5130	3,988	1,03×10 ⁻⁴	42,47	0,5189	4,089	8,14×10 ⁻⁵	4,039
4	0,0637	103,3	0,3787	1,659	0,0219	42,05	0,3827	1,728	0,0187	1,693
5	0,1239	104,0	0,3511	1,180	0,066	40,77	0,3526	1,207	0,0621	1,194

Auch bei den Deuteroalbumosen ist, wie zu erwarten war, von einer Steigung der inneren Reibung nicht die Rede. Also nur noch bei den dem ursprünglichen Eiweiß am nächsten stehenden Heteroalbumosen haben die Teilchen noch eine derartige Größe, daß sie bei der Hydratation die innere Reibung noch merklich beeinflussen, bei den niedrigeren Spaltstücken, den Prot-

albumosen und Deuteroalbumosen ist das nicht mehr der Fall. Natürlich ist das noch weniger bei den noch niedrigeren Abbauprodukten, wie Peptonen und Aminosäuren (die bei der Pepsinwirkung in sehr kleinen Mengen abgespalten werden) der Fall. Beim Alanin habe ich es noch einmal untersucht und keine Spur einer Zunahme der inneren Reibung bei Säurezugabe

Fig. 3

gefunden. In Fig. 1 ist die innere Reibung der Heteroalbumosen verzeichnet. Fig. 3 gibt uns die graphische Darstellung der Resultate, mit den verschiedenen Albumosen erhalten; hier ist wieder p_H Abszisse und die Prozente Stickstoff sind die Ordinate. Besonders bei der Gruppe der Deuteroalbumosen sind Stoffe, die auch ohne Enzymspaltungen vom Tannin nicht mehr niedergeschlagen werden, die Kurve liegt deshalb im ganzen hoch. Im übrigen sind die Kurven überaus interessant. Erstens sind sie sehr flach, die optimale Reaktion hat eine große Breite, aber zweitens ist die Lage der optimalen Reaktionsbreite nicht bei allen Albumosen dieselbe und auch eine andere als beim Serumeiweiß. Die optimale Reaktion für letzteres in salzsaurer Lösung befindet sich etwa bei $p_H = 1,9$; für die Heteroalbumose bei etwa $p_H = 2,2$, für Protalbumosen bei $p_H = 2,8$ und für Deuteroalbumosen bei $p_H = 2,9$. Weitere Versuche müssen lehren, inwieweit die gewählte Methodik hier Einfluß haben könnte. Wenn diese Resultate sich aber bestätigen, dann geht hieraus hervor, daß die Lage der optimalen Enzymwirkung von der Art des Substrats abhängig ist. Daß der Zustand des Pepsins also eine Rolle spielen würde, wird unwahrscheinlich. Denn beim Anfang der Verdauung hat die Quellung des Eiweißes die größte Bedeutung; wenn diese gleich groß, dann ist auch die Pepsinwirkung gleich. Und jetzt sehen wir, daß auch für die weiteren Spaltungen der Zustand und die Art des Substrats die Lage der optimalen Wirkung bestimmt. Das Pepsin ist, wie wir sahen, in sauren Lösungen immer negativ geladen; wenn diese Ladung von Bindung negativer Ionen herrührt, dann hat doch die Art dieser Anionen keine große Bedeutung, insofern deren Einfluß auf das Pepsin selbst in Betracht kommt (man vergleiche Tabelle II, Seite 261). Aus den Kurven für die Verdau-

ung der Albumosen würde man schließen, daß falls man Eiweiß längere Zeit verdaute, die Lage der optimalen Reaktion sich nach der weniger sauren Seite verschieben würde; aus den Untersuchungen Sørensens jedoch geht unzweideutig hervor, daß bei längerer Verdauungszeit die optimale Reaktion sich nach der sauren Seite verschiebt. Zwar sind meine Bestimmungen alle bei verhältnismäßig kurzer Versuchsdauer (30 oder 60 Minuten) ausgeführt, so daß weitere Versuche mit längerer Versuchsdauer vielleicht noch neue Gesichtspunkte liefern können. Jeden-

falls kann die Verschiebung der optimalen Reaktion bei einer Verdauungszeit von z. B. einer Stunde durch die weitere Verdauung der Albumosen, wenn man die sehr große optimale Reaktionsbreite (Fig. 3) der Verdauungskurven bei dieser Verdauungszeit ansieht, nicht sehr bedeutend sein²⁸⁾.

Um die Resultate noch etwas besser beurteilen zu können, habe ich untersucht, inwieweit bei den hier in Betracht kommenden Säuregraden eine Zerstörung des Pepsins eine Bedeutung haben könnte. Von den betreffenden Versuchen seien hier zwei mitgeteilt. Es wurden zwei Pepsinlösungen hergestellt, beide von 10 mg Pepsin, aber das eine Mal in 50 ccm Salzsäure 0,0005 n., das zweite Mal in 50 ccm Salzsäure 0,3 n. Beide Lösungen wurden mit einer Spur Thymol versehen und in geschlossenen Gefäßen auf 37° gehalten. Die Aziditäten sind hier außer den Grenzen derjenigen in den obigen Versuchsreihen gebraucht; denn die erste Lösung reagierte Lackmus gegenüber gar nicht sauer und die zweite, in welcher nur eine unbedeutende Säuremenge von den 10 mg Pepsin gebunden sein konnte, war entschieden saurer als je eine der in den Versuchsreihen gebrauchten. Jeden Tag wurde nun die Wirksamkeit der Pepsinlösungen bestimmt und zwar mittelst der Grützner'schen Methode. Es wurde also die fibrinlösende Kraft des Pepsins bestimmt, und wie ich oben schon gesagt habe, glaube ich,

²⁸⁾ Das Reaktionsoptimum der Eiweißverdauung hatte sich bei vier Stunden Verdauungszeit (in Salzsäure) nicht verschoben. (Siehe Kurve I, Fig. 2, S. 269.) Diese Versuchsreihe war schon früher ausgeführt (2. Mitteilung). Auch bei einer Versuchsreihe mit Schwefelsäure und drei Stunden Verdauungszeit, welche ich zuerst angestellt hatte, in der Meinung, daß die Verdauung in Schwefelsäure niedrig sein würde, war das Optimum nicht verschoben. Nun sind allerdings drei oder vier Stunden noch immerhin relativ kurze Verdauungszeiten.

daß man in dieser Weise sehr gut die Wirksamkeit verschiedener Pepsinlösungen untereinander vergleichen kann. Wenn mit der Grützner'schen Methode gefunden wurde, daß nach einigen Tagen die Wirksamkeit der Pepsinlösungen nicht abgeschwächt war, dann glaube ich, daß auch die verdauende Kraft, gelöstem Eiweiß gegenüber und z. B. mit der Tanninmethode bestimmt, sich als unverändert gezeigt hätte. Jeden Tag wurde nun zum Vergleich eine Pepsinlösung (10 mg) von Standardpepsin (trocken und im Dunkeln aufbewahrt) in 50 ccm Salzsäure von 0,2 Proz. gemacht und zwar immer in genau derselben Weise. Ich fand, daß die nahezu neutrale Pepsinlösung ihre Wirksamkeit am besten behielt. Diese war in drei Tagen (37°) nur auf 93 Proz. gesunken. Weit weniger haltbar zeigte sich die stark saure Lösung, indem ihre Wirksamkeit in drei Tagen bis auf 36 Proz. gesunken war. In erster Annäherung würde das einen Verlust an Wirksamkeit von 0,1 resp. 0,9 Proz. pro Stunde bedeuten. Wenn also wirklich auf diese Weise ein zuverlässiges Bild der verdauenden Kraft des Pepsins gefunden wurde, dann können wir schließen, daß bei Verdauungszeiten von etwa einer Stunde nur in den Lösungen mit den größten Säuregehalten das Absinken der Pepsinwirksamkeit eine übrigens noch immer geringe Rolle spielen kann. Unsere Verdauungskurven können also von der Enzymzerstörung nur insoweit beeinflußt sein, daß dadurch die absteigenden Aeste an der sauren Seite etwas zu niedrig und die optimale Reaktion ein wenig nach der weniger sauren Seite verschoben ist. Bei einer Stunde Versuchsdauer ist die Verschiebung aber sicher klein.

Diskussion der bisherigen Resultate.

Wenn wir die Resultate der Untersuchungen von den verschiedenen Autoren über dieses Thema der Pepsinverdauung noch einmal übersehen, so können wir folgendes schließen: Das Pepsin hat, wenn es so rein wie jetzt möglich dargestellt ist, keinen iso-elektrischen Punkt, sondern ist in sauren Lösungen immer negativ geladen. Wenn es mit Eiweiß oder Albumosen zusammengebracht wird, verbindet es sich zum Teil mit diesen Stoffen und es kann bei genügender Menge von diesen einen iso-elektrischen Punkt vortäuschen. Mit Aminosäuren verbindet sich Pepsin nicht, obgleich die Ladung in sauren Lösungen eine entgegengesetzte ist und man eine Verbindung oder Adsorption erwarten würde. Wo die negative Ladung herrührt, wissen wir nicht, aber man

kann vermuten, daß Verbindung oder Adsorption mit Anionen dafür verantwortlich ist. Man würde dann aber auch vermuten, daß die Art dieser Anionen für die Wirksamkeit von Bedeutung sei, aber das scheint nicht der Fall zu sein. Die lösende Kraft von Pepsin ist in Lösungen von den verschiedensten Säuren dieselbe, falls nur der Zustand des zu lösenden Eiweißes derselbe ist. Ebenso ist die spaltende Wirkung auf gelöstes Eiweiß unabhängig von der Menge Anionen, insoweit man nur die ersten Spaltungen (durch Messung der Abnahme der inneren Reibung) in Betracht zieht (J. Christiansen). Auch Zugabe von den verschiedensten Anionen zu der Verdauungsflüssigkeit ändert die verdauende Kraft nur unwesentlich. Inwieweit die für die Verdauung wichtigen H-Ionen den Zustand des nicht amphoteren Pepsins und dessen Wirksamkeit beeinflussen können, läßt sich schwer sagen, aber bis auf weiteres möchte man schließen, daß für die Wirksamkeit des Pepsins nicht so sehr der Zustand des Pepsins als wohl derjenige des Substrats ins Auge zu fassen sei²⁹⁾.

Es hat sich nämlich gezeigt, daß die lösende Kraft des Pepsins, das heißt die Geschwindigkeit, mit der es ungelöstes Eiweiß zur Lösung bringt, nur vom Quellungsstande dieses Eiweißes und gar nicht von der Art der anwesenden Ionen abhängt. Bei jeder Säure fallen Maximum der Quellung und der Lösungsgeschwindigkeit zusammen (ausgenommen bei Essigsäure, in deren Lösungen die Quellung Besonderheiten darbietet) und bei verschiedenen Säuren ist letztere auch wieder nur abhängig vom Quellungsstande. Die Reihe der Säuren nach ihrem quellungbefördernden Einfluß ist auch diejenige der Geschwindigkeiten der in ihren Lösungen stattfindenden Eiweiß-Auflösungen. Die Reihe der Salze, nach ihrer hemmenden Wirkung auf die Verdauung, ist dieselbe als diejenige der quellunghemmenden Wirkung in saurer Lösung. Die Reihenfolge der Salze nach ihrer hemmenden Wirkung auf die Pepsinwirkung ist z. B.

Zitrat < Azetat < Chlorid < Chlorat < Nitrat < Rhodanat < Sulfat.

Aber nicht nur was die Wirkung auf ungelöstes Eiweiß anbetrifft, sondern auch die erste spaltende

²⁹⁾ J. Christiansen, Biochemische Zeitschrift, 46, 257 (1912) gibt an, daß die optimale Azidität für menschliches Pepsin bedeutend niedriger liegt als für tierisches. Sie hat aber nicht mit reinem Pepsin gearbeitet, sonst würde dieser Befund doch wieder auf einen Zusammenhang zwischen Art oder Zustand des Pepsins und optimale Reaktion hinweisen.

Wirkung auf gelöstes Eiweiß wird anscheinend nur vom Zustande dieses bestimmt. Denn J. Christiansen (unter Wo. Pauli) hat zeigen können, daß diese Spaltungen in ihrer Geschwindigkeit nur vom Quellungsstate des Eiweißes, gemessen durch die innere Reibung, abhängig sind. Weiter habe ich gezeigt, daß die Geschwindigkeit der Verdauung für die erste Zeit wieder besonders von denjenigen Ionen gehemmt wird, die die Quellung am meisten beeinträchtigen. Und für die tryptische Verdauung weist T. Brailsford Robertson auf den Zusammenhang zwischen der Wirkung von NaCl auf die Geschwindigkeit der Verdauung und auf die Quellung hin.

Wenn die Verdauung weiter fortschreitet, ändern sich die Verhältnisse. Die Verdauungsversuche mit verschiedenen Säuren lassen dann noch wohl einigen Zusammenhang mit der Quellung des Eiweißes verkennen, aber hier treten doch sicher andere Faktoren ins Spiel, denn die Schwefelsäure z. B., in deren Lösungen die Quellung des Eiweißes, insoweit man diese aus der inneren Reibung beurteilen kann, nur gering ist, hat sich für die weiter fortgesetzte Verdauung als gar nicht ungünstig erwiesen. In Uebereinstimmung damit wird die weiter fortgesetzte Verdauung von quellungshemmenden Ionen, SO_4 , CNS, auch nur sehr wenig beeinflusst. Die Auflösung von unlöslichem Eiweiß und die ersten Spaltungen von gelöstem Eiweiß bis zu dem Punkt, wo die erhöhte innere Reibung wieder gang herabgefallen ist, sind also analoge Vorgänge; bei beiden ist die Geschwindigkeit vom Quellungsstate bedingt. Wenn aber das Eiweiß so weit gespalten ist, daß die Spaltstücke auch im hydratisierten Zustande keinen Einfluß mehr auf die innere Reibung ausüben, dann scheinen andere Umstände von größerer Wichtigkeit zu werden. Nun bedeuten die Auflösung und auch die genannten ersten Spaltungen sicher nur einen sehr kleinen Teil der Pepsinwirkung. Bei meinen Verdauungsversuchen wurde meistens 8 mg Pepsin in 25 ccm Eiweißlösung 30 oder 60 Minuten wirken gelassen, dabei wurde dann in 60 Minuten bei der optimalen Reaktion etwa 20 Proz. des Stickstoffs vom Tannin inkoagulabel. Die innere Reibung in ihrem Maximum einer solchen Eiweißlösung, also bei der für die Quellung günstigsten Reaktion, wurde aber von 0,1 mg Pepsin in 60 Minuten bis zu der Höhe, die sie in der säurefreien Lösung hatte, herabgeholt. Hieraus kann man schließen, daß diese ersten Spaltungen, wobei die Quellung

die größte Bedeutung hat, etwa $\frac{1}{80}$ der sonstigen in meinen Versuchen erreichten Verdauungshöhen bedeuten.

Aus den Versuchen über die Verdauung von Hetero- Proto- und Deuteroalbumosen ist hervorgegangen, daß die Verdauungskurven (p_H wie Abszisse) im allgemeinen noch dieselbe Form wie diejenigen der Eiweißverdauungskurven haben. Nur sind sie bedeutend in die Breite gezogen und haben sich die optimalen Reaktionen verschoben (bis zu $p_H = 2,9$). Obgleich hier bei der enormen Oberflächenausbreitung die Bedeutung des Quellungsstates und dessen Änderungen nur eine geringe sein kann, begegnen wir hier doch auch wieder Verdauungskurven von einem denjenigen der ersten Eiweißspaltungen ähnlichen Habitus. Daß die Kurven sich mit der Art des Substrats ändern, spricht dafür, daß auch hier das Substrat und dessen Zustand die Form der Kurve bestimmt. Können wir uns jetzt schon über den Einfluß des Zustandes und der Art des Substrats bei diesen weiteren Spaltungen einigermaßen eine Erklärung machen? Darüber, daß die H-Ionen große Bedeutung haben, kann kein Zweifel bestehen, und da diese Ionen, so viel wir jetzt wissen, keine Bedeutung für den Zustand des Enzyms haben, und da weiter auch die Hydratation der geladenen Albumosenteilchen keine Rolle zu spielen scheint, so wird man geneigt sein, dieser Ladung selbst eine Bedeutung zuzuschreiben. Daß die Verdauung von stark die Quellung herabsetzenden Ionen (SO_4) wenig beeinflusst wird, braucht nicht mit dieser Annahme streitig zu sein, denn obgleich diese Ionen die Hydratation oder Quellung merklich erniedrigen, scheinen sie die Ladung nur wenig herabzusetzen. Die Ladung, die z. B. Albumosen in salzsauren Lösungen annehmen, geht zum Teil aus meinen früheren H- und Cl-Ionenbindungs-Bestimmungen

Fig. 4

hervor³⁰⁾. Fig. 4 gibt das Verhältnis der gebundenen Ionenmengen $\frac{H}{Cl}$ als Funktion von p_H .

³⁰⁾ Siehe meine zweite Mitteilung, loc. cit.

Dieses Verhältnis ist ein Maß der Ladung; wenn es eins ist, ist die Albumose ungeladen. Wir sehen nun, wie bei $p_H = 1$ die Ladung stark abgenommen hat. Auch alle Verdauungskurven, auch der Albumosen, sind bei $p_H = 1$ absteigend. Bei unseren Versuchen wirkte wenig Pepsin (z. B. etwa 8 mg) auf relativ viel Eiweiß oder Albumosen (etwa 400 oder 500 mg), und man wird geneigt sein, anzunehmen, daß nur ein Teil des Eiweißes in jedem Augenblick mit dem Pepsin verbunden ist. Das wird wohl in erster Linie der geladene Teil des Eiweißes sein. Sobald nun dieser geladene Teil zu klein wird, und das kann bei p_H etwas kleiner als 1 sehr wohl der Fall sein, muß die Pepsinwirkung stark abnehmen. In dieser Weise wäre zu erklären, warum, obgleich Maximum der Ladung und Quellung bei etwa $p_H = 2,4$ bis $2,6$ liegen, doch bei der fortgesetzten Verdauung p_H viel kleiner werden muß, soll die Verdauung merklich absinken. So erklärt sich auch einigermaßen, warum bei den meisten Säuren die Verdauungskurven eine größere Breite als diejenigen der inneren Reibung haben und auch warum die Verdauungskurven bei den Albumosen so besonders in die Breite gezogen sind. Haben doch letztere ein sehr großes Säurebindungsver-

mögen und es ist sehr wahrscheinlich, daß z. B. bei $p_H = 4$ bei Albumosen schon viel mehr Säure gebunden und also auch viel mehr geladene Teilchen gebildet sind, als bei den genuinen Eiweißstoffen. Weitere Versuche über den Einfluß von den relativen Mengen von Pepsin und Substrat, sowie über die Bedeutung von Entladung durch stark adsorbierende negative Ionen können hier weiteres Licht bringen. Daß jedenfalls auch noch andere Einflüsse sich geltend machen können, geht aus den eigentümlichen Verdauungskurven für Milchsäure, Zitronensäure und Essigsäure hervor. Der rapide und vorzeitige Abstieg bei kleinerem p_H rührt wohl von der sehr großen Menge der zugefügten Säuren her. In welcher Weise diese große Menge aber hemmend wirkt, ob das eine Oberflächenwirkung ist oder irgend eine andere Ursache hat, darüber läßt sich jetzt noch nichts aussagen. Unerklärt ist auch noch die Tatsache, daß bei längerem Verdauen die Lage der optimalen Reaktion nach der sauren Seite rückt (Sörensen). Auch hierüber können weitere Versuche mit verschiedenen Spaltprodukten und langer Versuchsdauer Neues bringen. Die Untersuchung wird mit Pepsin, sodann aber auch mit anderen Enzymen fortgesetzt.

Ueber eine kolloidchemische Erscheinung als maßanalytischer Indikator.

Von J. F. Sacher (Düsseldorf).

(Eingegangen am 28. Sept. 1916.)

Bei der maßanalytischen Bestimmung des Bleies nach der von mir modifizierten und beschriebenen¹⁾ Molybdat-Methode von A. Schindler, die ich zur Ermittlung des Bleigehaltes von Bleisalzen, Bleiaschen und Bleifarben ihrer raschen Ausführbarkeit und hohen Genauigkeit wegen, seit zwölf Jahren ausschließlich anwende, habe ich vor einiger Zeit eine Beobachtung gemacht, die es gestattet, die Titration der Bleilösung mit Ammonium-Molybdat auch ohne den sonst erforderlichen Tanninindikator auszuführen. Fällt man eine mit Essigsäure angesäuerte heiße Bleiazetatlösung mit einer geringeren Menge Ammonium-Molybdatlösung, als zur vollkommenen Ausfällung des Bleies erforderlich ist, so wird man nach Umrühren und kurzem Absetzenlassen des gebildeten Niederschlages wahrnehmen, daß die überstehende Flüssigkeit stets trüb ist und auch

weiterem Stehenlassen in der Kälte oder bei Wasserbadtemperatur trüb bleibt. Fügt man nun allmählich mehr Ammonium-Molybdatlösung hinzu und läßt nach dem jedesmaligen Zusatze das gebildete Bleimolybdat zwecks Beobachtung der überstehenden Flüssigkeit kurze Zeit (1 — 2 Minuten) sich absetzen, so gelangt man schließlich zu einem Punkte, wo die überstehende Flüssigkeit plötzlich klar und durchsichtig wird. Dieser Punkt entspricht, wie ich an Hunderten von Bleibestimmungen festgestellt habe, genau dem Endpunkte der Umsetzung zwischen dem gelösten Bleisalz und der Ammonium-Molybdatlösung. Es kann wohl keinem Zweifel unterliegen, daß ein Teil des gebildeten Bleimolybdates zunächst in kolloider Form gefällt wird, der erst auf weiteren Zusatz des Fällungsmittels in die kristallinische Form übergeht. Erwähnenswert erscheint mir, daß die Konzentration der zu titrierenden Lösung an Essigsäure hierbei gänzlich belanglos ist.

¹⁾ Chem.-Zeitg. 1909, 1257 — 1258.