



# Die Verdauung bei den Fischen

<https://hdl.handle.net/1874/288502>



*4 apr 1928, 1927*

# DIE VERDAUUNG BEI DEN FISCHEN

## PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN  
DOCTOR IN DE WIS- EN NATUURKUNDE  
AAN DE RIJKSUNIVERSITEIT TE UTRECHT,  
OP GEZAG VAN DEN RECTOR MAGNIFICUS  
Dr. A. NOORDTZIJ, HOOGLEERAAR IN DE  
FACULTEIT DER GODGELEERDHEID, VOL-  
GENS BESLUIT VAN DEN SENAAAT DER  
UNIVERSITEIT TEGEN DE BEDENKINGEN  
VAN DE FACULTEIT DER WIS- EN NATUUR-  
KUNDE TE VERDEDIGEN OP MAANDAG  
4 APRIL 1927, DES NAM. TE VIJF UUR

DOOR

HERBERTUS JOHANNES VONK

GEBOREN TE ALKMAAR

BIBLIOTHEEK DER  
RIJKSUNIVERSITEIT  
UTRECHT.

---

VERLAGSBUCHHANDLUNG JULIUS SPRINGER  
IN BERLIN · 1927











AAN MIJNE OUDERS

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK UTRECHT



3969 3407

*Diss. Utrecht 1927*

# DIE VERDAUUNG BEI DEN FISCHEN

## PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN  
DOCTOR IN DE WIS- EN NATUURKUNDE  
AAN DE RIJKSUNIVERSITEIT TE UTRECHT,  
OP GEZAG VAN DEN RECTOR MAGNIFICUS  
Dr. A. NOORDTZIJ, HOOGLEERAAR IN DE  
FACULTEIT DER GODGELEERDHEID, VOL-  
GENS BESLUIT VAN DEN SENAAT DER  
UNIVERSITEIT TEGEN DE BEDENKINGEN  
VAN DE FACULTEIT DER WIS- EN NATUUR-  
KUNDE TE VERDEDIGEN OP MAANDAG  
4 APRIL 1927, DES NAM. TE VIJF UUR

DOOR

**HERBERTUS JOHANNES VONK**

GEBOREN TE ALKMAAR

BIBLIOTHEEK DER  
RIJKSUNIVERSITEIT  
UTRECHT.

---

VERLAGSBUCHHANDLUNG JULIUS SPRINGER  
IN BERLIN • 1927







## Voorwoord.

Het is mij aangenaam aan het einde van mijn studietijd een woord van dank te kunnen richten tot allen, die tot mijn wetenschappelijke vorming hebben bijgedragen.

Hooggeleerde Van Romburgh, Ornstein en Kruyt, Zeergeleerde Moll en Strengers, veel heb ik uit Uw colleges, voordrachten en practica mogen leeren, dat mij van groote waarde was voor mijn natuurwetenschappelijke ontwikkeling in het algemeen, veel ook, dat onmisbaar is voor den bioloog, die zich op physiologisch terrein gaat begeven. Voor dit alles mijn hartelijken dank. U, Hooggeleerde Kruyt dank ik bovendien voor de mij verleende gastvrijheid in Uw laboratorium.

Hooggeleerde Went. Hoewel ik mij later meer tot de dierphysiologie voelde aangetrokken, denk ik met dankbaarheid aan den tijd, waarin ik gelegenheid had mij onder Uwe leiding in de botanische morphologie en physiologie te bekwamen. In het bijzonder heb ik de wijze, waarop gij Uwe studenten inwijdt in de oorspronkelijke literatuur en de vele moeite, die gij U getroost om hen te brengen tot de studie daarvan, ten zeerste gewaardeerd.

Hooggeleerde Pulle. Ofschoon mijn tegenwoordige studierichting mij wel ver van het door U gedoceerde onderdeel der biologie heeft verwijderd, was het mij een voorrecht, ook in mijn latere studiejaren nog op het gebied der plantensystematiek mijn kennis te mogen verruimen. Ook aan Uwe colleges over phytografie denk ik met veel genoegen terug.

Hooggeleerde Nierstrasz. Met niet minder genoegen denk ik aan de uren, waarop ik Uwe colleges over vergelijkende anatomie volgde en waarin gij de groote lijnen van die wetenschap zoo duidelijk naar voren bracht en critisch wist te belichten. Ook Uw tegemoetkomende houding tegenover nieuwere richtingen in de zoölogie heb ik zeer gewaardeerd. Erkentelijk ben ik U, Zeergeleerde Hirsch voor Uw steun bij de practische beoefening der anatomie en de belangstelling, die gij daarvoor wist op te wekken.

Hooggeleerde Ringer. Nadat het aanhooren Uwer interessante en overzichtelijke colleges mijn reeds aanwezige neiging voor den chemischen kant der physiologie had versterkt, mocht ik in Uw laboratorium vele der methoden leeren kennen, die mij bij het bewerken van dit proefschrift onmisbaar waren. Voor alles wat ik in dien tijd op het gebied der enzymechemie, zoowel door practisch werken als in gesprekken met U, mocht leeren, ben ik U ten zeerste erkentelijk,

evenzeer als voor den steun, dien gij mij bij het verrichten van dit onderzoek hebt willen verleen. Ondanks Uw drukke werkzaamheden, stelt gij steeds Uwen tijd voor mij beschikbaar. Hierdoor en door de vriendelijke hulpvaardigheid van Uwe medewerkers en Uwen amanuensis zal ik aan den tijd, in Uw laboratorium doorgebracht, een aangename herinnering bewaren.

Hooggeleerde Jordan, Hooggeachte Promotor. Van het begin van mijn studietijd af, werd ik geboeid door de wijze, waarop gij een inzicht weet te geven in den gecompliceerden samenhang der levensverschijnselen en hun evenwicht. Het enthousiasme, waarmee gij, eerst door onderzoek, later door onderwijs een nieuwe, of liever te lang verwaarloosde richting in de zoölogie hebt trachten naar voren te brengen, is uwen studenten een aansporing om te besproeven ook zelf iets tot den vooruitgang van deze aan problemen nog zoo rijke wetenschap bij te dragen. De vrijheid en zelfstandigheid, die gij hun daarbij laat, heb ik op hoogen prijs gesteld. Gij weet bovendien een indruk te geven van de grenzen, die aan het natuurwetenschappelijk onderzoek en de conclusies, waartoe het leidt, zijn gesteld, zoowel als van het wezen ervan en van de plaats, die het in den kring der wetenschappen behoort in te nemen. Wanneer ik daarnaast Uw vriendelijken omgang met Uwe studenten gedenk, ook op de tijden, dat gij en Mevrouw Jordan Uw huis voor mij openstelt, behoeft ik U wel niet te zeggen, hoe erkentelijk ik U ben voor het vele, dat gij mij in mijn studietijd hebt gegeven. Ook voor den steun bij het bewerken van dit proefschrift mijn hartelijken dank. Tenslotte verheugt het mij, dat door mijn functie als Uw hoofdassistent mijn promotie nog geen afscheid beteekent uit een universitair milieu.

Eindelijk een woord van dank aan U, geachte Heer Prijs, voor de uitvoering der teekeningen en aan de Heeren Van Norden en Kreugel voor velerlei technische hulp, mij bij de uitvoering van mijn werk verleend.



## Inhaltsübersicht.

	Seite
Kapitel I.	
<b>Einleitung</b> . . . . .	445
<p>Anatomie des Fischdarmkanals S. 445. — Stand unserer Kenntnisse von der Verdauung bei den niederen Vertebraten S. 447. — Die Nahrung der Fische S. 456. — Vergleichende Physiologie und neuere Resultate der Enzymforschung S. 456. — Probleme S. 558.</p>	
Kapitel II.	
<b>Die Amylasen</b> . . . . .	460
<p>Allgemeine Methodik S. 460. — Methodik speziell für die Amylasen S. 462. — <i>Cyprinus carpio</i>: Pankreasamylase; ihr <math>pH</math>-Optimum bei verschiedener Versuchsdauer und Temperatur S. 463. — Darm von <i>Cyprinus</i> S. 472. — Aktivierung durch Natriumchlorid S. 474. — Wirkung der Galle von <i>Cyprinus</i> S. 474. — <i>Petromyzon</i>: Darm S. 475. — <i>Esox lucius</i>: Pankreas und Darm S. 475. — <i>Rana</i>: Pankreas und Darm S. 478. — <i>Acanthias vulgaris</i>: Pankreas S. 480.</p>	
Kapitel III.	
<b>Die Maltasen</b> . . . . .	481
<p><i>Esox</i>: Pankreas und Darm S. 482. — <i>Cyprinus</i>: Darm S. 483. — <i>Cyprinus</i>: Pankreas S. 485. — Galle von <i>Cyprinus</i> S. 489. — <i>Cyprinus</i>: Saccharase S. 489. — <i>Rana</i>: Pankreas und Darm S. 490. — Zusammenfassung über Amylasen und Maltasen S. 490.</p>	
Kapitel IV.	
<b>Trypsin und Erepsin</b> . . . . .	496
<p>Einleitung S. 496. — Trypsin und Erepsin bei den Säugetieren S. 497. — Methodik S. 499. — Vorläufige Versuche am Karpfen S. 500. — <math>pH</math>-Optimum der Wirkung des Karpfendarmextraktes auf Glycylglyzin und definitive Versuche an <i>Cyprinus</i>, <i>Esox</i>, <i>Acanthias</i> und <i>Rana</i> S. 501. — Zusammenfassung über Trypsin und Erepsin. Vergleichung mit den Resultaten, welche bei Amylasen und Maltasen erhalten wurden S. 506.</p>	
Kapitel V.	
<b>Reinigung und Wirkung des Pepsins und Trypsins von <i>Acanthias vulgaris</i></b> . . . . .	511
<p>Einleitung S. 511. — Bereitung des Pepsins S. 511. — Eigenschaften des Pepsins S. 513. — Zusammenfassung über Pepsin S. 516. — Bereitung des Trypsins S. 517. — Eigenschaften des Trypsins S. 519. — Zusammenfassung über Trypsin S. 524.</p>	

## Kapitel VI.

<b>Die Lipasen . . . . .</b>	<b>526</b>
Wirkung in Rohextrakten S. 526. — Verfahren von Rosenheim S. 527.	
— Zusammenfassung S. 528.	

## Kapitel VII.

<b>Die Wasserstoffionenkonzentration im Darmkanal der Fische . . . .</b>	<b>528</b>
Einleitung S. 528. — Methodik S. 531. — Resultat der Messungen S. 535.	

## Kapitel VIII.

<b>Zusammenfassung der Resultate . . . . .</b>	<b>542</b>
<b>Literatur. . . . .</b>	<b>544</b>

## Kapitel I.

### Einleitung.

Anatomie des Fischdarmkanals — Stand unserer Kenntnisse von der Verdauung bei den niederen Vertebraten — Die Nahrung der Fische — Vergleichende Physiologie und neuere Resultate der Enzymforschung — Probleme.

Bei der Untersuchung der Verdauungserscheinungen bei den niederen Vertebraten haben die Vorgänge im Magen fast alles Interesse der Untersucher auf sich gezogen, so daß eine ziemlich große Anzahl Arbeiten (von denen die meisten freilich mit stark veralteten Methoden ausgeführt wurden) uns darüber unterrichten, während über die Dünndarmverdauung nur sehr wenige Tatsachen bekannt sind. Es schien mir darum eine Untersuchung der Dünndarmverdauung bei den Fischen nicht nur um ihrer selbst Willen der Mühe wert zu sein, sondern auch dringend erwünscht, um die neueren Resultate bezüglich der Magenverdauung damit zu vergleichen und so einen Gesamtüberblick über den Verdauungsvorgang bei den Fischen zu bekommen. Bevor wir uns zur Einleitung orientieren, wie es mit unseren bisherigen Kenntnissen dieses Verdauungsvorganges steht, möge zum besseren Verständnis eine kurze Bemerkung über die Anatomie des Fischdarmkanals hier ihren Platz finden.

*Anatomie des Fischdarmkanals*<sup>1)</sup>. Am Darmtraktus der Fische läßt sich ein Vorderdarm, Mitteldarm und bisweilen noch ein Enddarm unterscheiden. Wir übergangen eine Besprechung der Fangvorrichtungen, womit diese Arbeit sich nicht beschäftigen wird. Der Vorderdarm gliedert sich dann in Ösophagus und Magen (beide oft mit starken Längsfalten versehen) und endet beim Pylorussphinkter. Der Magen ist oft V-förmig gebogen, so daß man ihn in eine weitere Pars cardiaca

<sup>1)</sup> Siehe besonders die eingehenden Arbeiten von JACOB SHAGEN (39, 40, 41).



und eine engere Pars pylorica einteilen kann. Bei manchen Gruppen kommt es zur Bildung eines Magenblindsackes, der sich bis zum letzten Körperdrittel erstrecken kann. Mit wenigen Ausnahmen fehlen Drüsen im Ösophagus. Im Magen sind sie in großer Zahl vorhanden; man kann aber keinen Unterschied machen zwischen Haupt- und Belegzellen, wie man es bei den übrigen Vertebratengruppen tut. Bei einigen Gruppen, unter anderen bei den Cypriniden, fehlt ein Magen vollkommen und mündet der (sehr enge) Ösophagus gleich in den vorn etwas erweiterten Mitteldarm aus.

Die Teile des Mitteldarms sind oft wenig voneinander differenziert. In vielen Fällen kann man Mittel- und Enddarm unterscheiden, die dann durch eine deutliche Klappe, die Valvula Bauhini, getrennt sind. Merkwürdig ist, daß echte mehrzellige Drüsen nach den Angaben der Histologen dem Mittel- und Enddarm vollkommen fehlen. Es wird nur die Anwesenheit von Schleimzellen erwähnt. Eine Ausnahme bildet die Gruppe der Gadiden, wo eine Reihe von Untersuchern das Vorkommen von echten LIEBERKÜHNSCHEN Drüsen, wie sie für die übrigen Wirbeltiere charakteristisch sind, nachwiesen. Bei den Selachiern ist bekanntlich der Mitteldarm mit der großen Spiralklappe versehen.

Weit mehr Besonderheiten als Mittel- und Enddarm selbst, zeigen die ihnen anhängenden Gebilde. Gleich hinter dem Pylorus befindet sich bei sehr vielen Fischarten eine Anzahl eigentümlicher Ausstülpungen, die sogenannten Appendices pyloricae. Sie mangeln den Selachiern, sowie den magenlosen Fischen und auch einer großen Anzahl von Magenfischen unter den Teleostiern. Ihre Zahl kann wechseln von 1 bis über 900; sie können jede für sich, oder mehrere zugleich in den Darm ausmünden; ihre Wandungen (das Epithel einbegriffen) sind aufgebaut wie beim Mitteldarm. Bei den Gadiden kommen also auch in den Appendices die LIEBERKÜHNSCHEN Drüsen vor. Bei Acipenser ist die ganze Masse fest zusammengewachsen, jedoch wird das Organ niemals drüsenartig.

Die Leber der Fische ist stark gelappt, eine Gallenblase ist vorhanden, und der Ductus choledochus mündet in geringer Entfernung vom Pylorus. Zusammen mit ihm oder in seiner Nähe mündet der Ductus pancreaticus. Diese Ausfuhröffnungen findet man vor, zwischen, oder hinter den Appendices. Der geringe morphologische Wert, den man diesen Punkten, ihrer inkonstanten Lage wegen, beimessen kann, ist Ursache, daß man in neuerer Zeit die Unterscheidung eines Zwischendarmes (Bursa Entiana) vom Pylorus bis zum Duct. chol. aufgegeben hat.

Das Pankreas hat man längere Zeit hindurch bei vielen Fischen vermißt. Bei den Selachiern kannte man ein deutliches und kompaktes Pankreas, und CUVIER stellte die Theorie auf, daß die Appendices pyloricae überall da vorkommen, wo ein Pankreas fehlt. Es hat bis 1873 ge-



dauert<sup>1)</sup>, ehe durch die Arbeiten von LEGOUIS (55) und später von LAGUESSE (53, 54) gezeigt wurde, daß allen Fischen ein Pankreas zukommt, auch denen, welche Appendices besitzen. Das Organ ist aber kein kompaktes Gebilde, sondern in viele feine Stränge zerteilt, die den ganzen Darm entlang sich verzweigen. Es folgt den Blutgefäßen und dringt bei einigen Formen mit ihnen in die Leber ein, was KRUKENBERG veranlaßte, von einem Hepatopankreas zu sprechen; mit Unrecht aber, denn die Organe vermischen sich gar nicht, obwohl sie einander durchdringen.

*Stand unserer Kenntnisse von der Verdauung bei den niederen Vertebraten*<sup>2)</sup>. Am Ende des vorigen Jahrhunderts beschäftigte man sich lebhaft mit der Frage, ob von den Haupt- und Deckzellen der Magenschleimhaut die einen Pepsin und die anderen Salzsäure produzieren und zog auch Amphibien und Reptilien in den Kreis der Untersuchungen. Die Lösung dieser Frage vornehmlich im Hinblick auf die menschliche Physiologie, nicht auf die Biologie der untersuchten Tiere, stand dabei im Vordergrund. So entstand eine ausführliche Polemik, die bis in unsere Tage noch fort dauert. Daneben hatte man sich dem Studium der Magenverdauung der Fische zugewendet. Die Resultate der hierdurch entstandenen Literatur sind von BIEDERMANN in WINTERSTEINS Handbuch der vergleichenden Physiologie (Bd. 2, erste Hälfte) und von YUNG (147), WEINLAND (129—130) und VAN HERWERDEN (36) etwas früher in ihren Arbeiten zusammengefaßt, so daß ich für eine eingehende Besprechung der älteren Abhandlungen auf diese Übersichten verweise. Nur die bestbegründeten Resultate will ich kurz hervorheben und dann einige Arbeiten besprechen, die seit dem Erscheinen von BIEDERMANN'S Handbuch veröffentlicht worden sind.

Die Frage der Haupt- und Beleg- (oder Deck-)zellen scheint mir entschieden zu sein zugunsten der Auffassung, daß die Hauptzellen Pepsin, die Beleg- oder Deckzellen Salzsäure abscheiden und daß diese beiden Zellarten bei Säugetieren, Vögeln, Reptilien und Amphibien vorkommen. Dies ist in einer der letzten ausführlichen Publikationen, die sich auch besonders mit den niederen Vertebraten beschäftigt, von KRANENBURG (49) gezeigt worden. Eine breite historische Übersicht über diese Frage wird man da ebenfalls finden.

Bei den Fischen kann man, wie wir schon sahen, keine Haupt- und Deckzellen unterscheiden. WEINLAND und VAN HERWERDEN versuchten

<sup>1)</sup> Wenn man von der unbeachtet gebliebenen Erwähnung des Organes durch STELLER in einem nachgelassenen Werk (etwa 1830) absieht.

<sup>2)</sup> Hierunter verstehe ich die poikilothermen. Ich teile zur Vergleichung einiges über Amphibien und Reptilien mit, da ich auch im Laufe der Untersuchung einige Versuche an *Rana* anstellte.



die Art der Magensäure bei den Selachiern zu ermitteln und kamen zu verschiedenen Ergebnissen. Während WEINLAND findet, daß die Hauptmenge der Säure organischer Natur ist (wahrscheinlich Ameisensäure), nimmt VAN HERWERDEN auf Grund ihrer Untersuchungen eine reichliche Salzsäureabscheidung an. Das Identifizieren einer Säure in einem so zusammengesetzten Gemisch, wie es ein Mageninhalt darbietet, ist eine sehr schwierige analytisch-chemische Aufgabe und verlangt eine gründliche Prüfung der Methodik für alle Störungen, die man durch Meerwasser, Eiweiß und seinen Abbauprodukten, um von völlig unbekannten Faktoren nicht zu sprechen, erwarten kann. WEINLAND hat die Methode VAN HERWERDENS kritisiert; darauf hat RINGER (37) mit einer eigens ausgearbeiteten Methode die Anwesenheit von HCl von neuem bestätigt. VAN HERWERDEN findet bei Teleostiern weit weniger Säure im Magen als bei Selachiern; auch SULLIVAN (125) hat viele Messungen der Säuremenge ausgeführt, aber nur bei Selachiern. Seitdem man durch die Arbeiten von SÖRENSEN und seinen Nachfolgern die Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration für physiologische Prozesse kennen lernte, haben diese Zahlen für die titrierbare Säuremenge nicht so großen Wert mehr, wie früher, und scheint mir auch die Frage nach der Natur der Säure etwas von ihrer Bedeutung verloren zu haben. WEINLAND (130) erhielt ein merkwürdiges Resultat bei Rochen, indem er fand, daß bei ihnen der Mageninhalt bald sauer, bald alkalisch reagieren kann. Die Abscheidung von Säure und Alkali steht hier unter dem Einfluß von Sphinkteren, die besonders an den Magenvenen vorkommen. Bei geschlossenen Sphinkteren entsteht alkalisches, bei geöffneten saures Sekret. Es kommt hier auch eine Diastase vor, die nur bei alkalischer Reaktion gefunden wird.

Über die Eiweißverdauung im Magen sind die Autoren (unter denen, außer den genannten, RICHTER und YUNG zu erwähnen sind) ziemlich einig, daß sie peptischer Natur sei. Die Einwirkung der Temperatur auf die Wirkung des Fischpepsins ist nach allen Autoren eine andere als die, welche auf Säugetierpepsin ausgeübt wird. Alle Autoren sind darüber einig, daß bei niederen Temperaturen das Fischpepsin relativ besser verdaut als das Säugetierpepsin. Über den genauen Zusammenhang der Wirksamkeit mit der Temperatur herrschen zwei oder drei verschiedene Meinungen. Nach der ersten (von FICK und MURISIER und von HOPPE-SEYLER), erreicht das Fischpepsin schon bei etwa 15° seine maximale Verdauungskraft und es bleibt dann diese Wirksamkeit unverändert bis 40°; nach der zweiten von LUCHAU und KRUKENBERG hat es sein Optimum bei 40°, wie das Säugetierferment und würde die relativ größere Wirksamkeit bei 0°, verglichen mit dem Säugetierpepsin den einzigen Unterschied ausmachen; die Untersuchungen sind aber nie von einem Autor bei sehr verschiedenen Temperaturen ausgeführt



worden, so daß die Möglichkeit offen bleibt, daß das Optimum der Wirkung (für eine bestimmte Versuchsdauer) zwischen  $15^{\circ}$  und  $40^{\circ}$  liegt. Wir hoffen uns später mit dieser Frage ausführlicher zu beschäftigen.

Erwähnen wir noch, daß einige Autoren (REDEKE und VAN HERWERDEN) Andeutungen für das Bestehen einer Fettresorption im Magen fanden und daß die Anwesenheit einer Magenlipase durch VAN HERWERDEN erwiesen ist, sowohl für Teleostier als für Selachier. Auf dem Höhepunkt der Verdauung kann ihre Wirkung aber nicht groß sein, da die Fettspaltung durch kleine Mengen HCl schon erheblich gehemmt wird.

Über die Fermente des Pankreas herrscht wenig Übereinstimmung in der Literatur. Soviel ist wohl sicher, daß Pankreasextrakte eine Amylase enthalten. Für diese Amylase hat KNAUTHE (45) ein Temperaturoptimum von  $23^{\circ}$  angegeben; aber diese Angabe ist mit Recht stark angegriffen worden von KRÜGER (50), da KNAUTHE für seine Versuche das Hepatopankreas, also Pankreas zusammen mit Lebergewebe verwendet hat und es ist klar, daß das Glykogen der Leber und seine Spaltung durch die Leberenzyme ohne genauere Analyse zu fehlerhaften Schlüssen über die Wirkung der Pankreasdiastase führen muß. Überdies sind die Resultate der bei verschiedenen Temperaturen angestellten Versuche nicht vergleichbar, da diese mit verschiedenen Extrakten angestellt wurden.

Trypsin ist von einigen Autoren nachgewiesen worden, sein Vorkommen im Haifischpankreas wird merkwürdigerweise von RICHET (98) bestritten. YUNG (147) findet die Extrakte bald tryptisch wirksam, bald nicht. Das alles ist leicht erklärlich durch die ungenügenden Kenntnisse die man zur Zeit von RICHETS und von YUNGS Arbeiten hatte von der Aktivierung des Trypsinogens durch Enterokinase der Darmschleimhaut. SULLIVAN (125) und auch SELLIER (112) haben diese Tatsachen bestätigt; sie finden, daß Pankreasextrakt am besten durch Extrakt der Spiralklappe, weniger gut durch Auszüge aus der Darmwand selbst aktiviert wird; daß also im allgemeinen die Sache sich verhält wie bei den Säugetieren.

Etwas mehr Arbeit ist auf die Enzyme der Appendices pyloricae und des Mitteldarmes verwendet worden. Leider haben die Autoren, die sich hiermit beschäftigten, fast nie zu gleicher Zeit das Pankreas ihrer Fische untersucht und immer aus dem Vorhandensein eines Enzymes in einem Extrakte der Darmschleimhaut den Schluß gezogen, daß dieses Enzym nun auch von der Darmschleimhaut abgeschieden wird, ohne einmal zu überlegen, ob es vom Pankreas herkommen könnte. Auch nachdem die Existenz eines Pankreas für alle Fische sicher gestellt war (LEGOUIS 1873, LAGUESSE 1889—1895) und die Saccharase,



Laktase und Maltase des Säugetierdarmes bekannt geworden waren (zwischen etwa 1875 und 1895), hat keiner der späteren Untersucher daran gedacht, quantitative Vergleichen zu machen zwischen dem Gehalt des Pankreas und dem des Darmes an bestimmten Fermenten. Und keiner (SULLIVAN ausgenommen) suchte nach den Darmenzymen, wie sie bei den Säugetieren vorkommen. So ist die ganze Literatur über die Enzyme von Appendices und Mitteldarm voller Widersprüche und fast unmöglich in kurzen Zügen zusammenzufassen. Dennoch wollen wir dies versuchen, da eine detaillierte Besprechung aller erschienenen Arbeiten uns viel zu weit führen würde.

Am meisten herrscht noch Übereinstimmung in den Arbeiten über die Appendices pyloricae. Diese wurden besonders untersucht von BLANCHARD (11), STIRLING (124), und BOUDOUY (13). Die Resultate sind, daß Extrakt der Appendices bei neutraler und schwach alkalischer Reaktion Fibrin verdaut und ebenso gekochte Stärke. Es enthält keine Lipase. STIRLING beschreibt bei *Gadus morrhua*, womit er arbeitet, ein Pankreas; aber dieses ist zu klein zum Extrahieren. BOUDOUY erwähnt, daß wenn ein Pankreas im interstitiellen Gewebe (zwischen den Appendices) vorhanden ist, dieses schneller verdaut als die Appendices selbst. Dies weist schon darauf hin, daß die Enzyme der Pylorusanhänge vom Pankreas herkommen können und in den Anhängen adsorbiert werden, und adsorbiert bleiben, auch wenn man die Appendices ihres Inhaltes beraubt. Daß Lipase nicht gefunden wurde, kann an der Schwierigkeit ihres Nachweises oder an einer ungeeigneten Reaktion des Milieus liegen. LIEBERT (56) hat 1913 die Fischerei-technische Bedeutung der Appendices erwiesen. Sie bleiben beim „Kaken“<sup>1)</sup> der Heringe in diesen Fischen erhalten; ihre Enzyme (adsorbiert oder autochthon) spielen eine große Rolle beim „Reifen“ der Heringe, wodurch sie zur menschlichen Nahrung geeignet werden; wenn man die Organe entfernt, so werden die Fische hart und ungenießbar; es treten dann auch keine Leucin- und Tyrosinkristalle auf, wie das bei richtig konservierten Tieren nach einiger Zeit der Fall ist. Die Reaktion des Appendicesinhaltes wird von einzelnen Autoren schwach sauer, von anderen schwach alkalisch befunden. Ebenso sind die Autoren darüber uneinig, ob Nahrung in die Appendices eindringt oder nicht, und ob ihnen resorptive Funktion zukommt. JACOB SHAGEN, dessen eingehende Studien über den Fischdarm schon erwähnt wurden, hält das Eindringen von Chymus für erwiesen.

Die Autoren, deren Arbeiten über die Wirkung des Mitteldarmtraktes sich am besten unter einem Gesichtspunkt vereinigen lassen [HOMBURGER 1877, LUCHAU 1878, KNAUTHE 1897, SELLIER 1902 (Literatur-

<sup>1)</sup> Unter „Kaken“ versteht man das Entfernen der Eingeweide aus den Heringen vor dem Einsalzen, aber so, daß die App. pyl. erhalten bleiben.



liste bzw. Nr. 37a, 60, 45, 112)] fanden Verdauung von Fibrin in alkalischem, neutralem, bisweilen sehr schwach saurem Milieu, und von Stärke bei neutraler Reaktion. Nur KNAUTHE findet Lipasewirkung. Dagegen läßt nach RICHET (98) und BOUDOUY (13) Darmextrakt jede Wirkung auf Fibrin, Stärke und Fett bei verschiedener Reaktion vermissen. Nach BOUDOUY hat Darminhalt dahingegen Diastasewirkung, was dann wieder auf die Anwesenheit des entsprechenden Pankreasenzymes zurückzuführen sein wird.

KRÜGER (50) erwähnt die erepsinartigen Eigenschaften eines Darmextraktes, sagt aber nicht worin diese bestehen, so daß bei der Schwierigkeit der Unterscheidung von Trypsin, besonders bei kleinen Mengen, die Möglichkeit einer Trypsinwirkung offen bleibt.

Sonderbare Auskünfte haben die Arbeiten von DECKER (18) und die von KRUKENBERG (51, 52) geliefert. Der erstere findet Pepsinwirkung in 0,1 vH HCl nicht nur im Magen, sondern auch durch den ganzen Darm, und sogar auch im Darne der Cypriniden (*Cyprinus carpio* ausgenommen). Alle untersuchten Ösophagi zeigten Pepsinwirkung, eine Wahrnehmung, die seitdem nie bestätigt wurde.

Von KRUKENBERGS sich widersprechenden Resultaten kann ich keine bessere Übersicht geben als diejenige, die ich in BLANCHARDS Arbeit fand: „Ses observations“, sagt B., „faites sur un grand nombre d'espèces, l'amènèrent aux résultats les plus invraisemblables, dont le résumé suivant donnera une idée exacte: Suivant lui, les appendices pyloriques produiraient tout à la fois de la diastase, de la pepsine et de la trypsine chez *Acipenser sturio*, *Motella tricirrhata* et *Lophius piscatorius*; ils produiraient de la pepsine et de la trypsine chez *Trachinus draco*, *Scorpaena scrofa* et *Zeus faber*; ils produiraient de la pepsine, mais non de la trypsine chez *Umbrina cirrhosa*, *Uranoscopus scaber* et *Chrysophrys aurata*; ils produiraient de la trypsine et de la diastase, mais non de la pepsine chez *Dentex vulgaris*; ils produiraient de la trypsine, sans Pepsine ni Diastase chez *Alosa flinta* et *Trigla hirundo*; ils produiraient enfin de la trypsine, mais non de la pepsine chez *Boöps vulgaris*.“

Kein einziger Autor außer SULLIVAN (125) hat nach den Enzymen gesucht, welche die Kohlehydrate am tiefsten spalten (Maltase und Invertase), obgleich hier gerade, mit der Frage nach dem Erepsin, der Punkt ist, wo bei den Fischen wichtige Abweichungen zu erwarten sind, wegen des Fehlens echter Darmdrüsen. SULLIVAN findet weder Amylase noch Lipase und Protease, weder im Darmextrakt noch im Auszug der Spiralklappe und keine invertierende Wirkung. Welcher Zucker zu den letzten Versuchen benutzt wird, sagt er nicht. Wahrscheinlich aber war es Rohrzucker und wurde die wichtigere Maltose zur Untersuchung nicht verwendet. Überhaupt werden in dieser verdienstvollen Arbeit leider nur die Resultate der Versuche konstatiert, diese aber nicht eingehend beschrieben.

Etwas ausführlicher möchte ich nun einige neuere Arbeiten besprechen, deren Zusammenfassung noch nicht in Handbüchern oder Abhandlungen zu finden ist.



Die erste ist von OSWALD POLIMANTI: Untersuchungen über die Topographie der Enzyme im Magen-Darmrohr der Fische (94). Er benutzt eine Methode von HAMBURGER, wobei Agarsäulchen mit dem Epithel in Berührung gebracht werden; die Enzyme diffundieren dahinein und werden später durch Lösen der Säulchen in Wasser befreit. Er untersucht *Scyllium canicula*, *Box salpa* und *Conger vulgaris*. Die Pepsinmenge wird mittels der Methode von METT an verschiedenen Stellen des Magens bestimmt, die größte Menge findet sich in den Regionen, wo die Nahrung am längsten verbleibt, unabhängig von der Form des Magens. Die Topographie vom Chymosin gleicht vollkommen derjenigen des Pepsins, was auf Identität dieser beiden Enzyme hinweist. Diese vielumstrittene Frage wird uns weiter nicht beschäftigen. Die Anwesenheit einer Magenlipase wird mittels Monobutyrynsplaltung angezeigt<sup>1)</sup>. Ihre Verteilung gleicht der des Pepsins. Auf Amylase wird mit gefärbter koagulierter Stärke reagiert. Sie ist nicht anwesend; VAN HERWERDEN hatte keine, WEINLAND eine Diastase bei alkalischer Sekretion gefunden. Im Magen ist keine Invertasewirkung. Im Dünndarm wird Enterokinase gefunden, ihre Menge nimmt ab vom Duodenum (?) nach dem Anus. Erepsin wurde nach VERNON kolorimetrisch bestimmt. Die Menge nimmt nach hinten zu, wie auch HAMBURGER für den Hund, FALLOISE für das Schwein fand. Die andern Darmenzyme (Maltase wäre von Interesse gewesen!) wurden nicht untersucht und ebensowenig die Enzyme des Pankreas. Die Möglichkeit bleibt also wieder offen, daß die sogenannte Erepsinwirkung von adsorbiertem Trypsin herrührt, zumal da auch nicht gezeigt wird, daß die Darmextrakte keine Wirkung auf natives Eiweiß haben.

RAKOCZY (Hecht- und Hundepsin (95)) hat sich wieder der Frage zugewandt, ob ein Unterschied besteht zwischen den Fermenten der Kalt- und Warmblüter hinsichtlich der Beeinflussung ihrer Wirksamkeit durch die Temperatur. Er benutzt ein Pepsinpräparat aus getrockneter pulverisierter Magenschleimhaut mit Thymolzusatz. Aus Hechtmagen werden Infuse erhalten, welche einige Male stärker sind als die aus Hundemagen (bei niedriger Temperatur verglichen). Das Optimum des Säuregrades liegt für Hecht- und Hundepsin bei  $\frac{1}{20}$  N HCl (bei 15—16°). pH-Messungen wurden bei diesen Versuchen leider nicht ausgeführt, ebensowenig wird erwähnt, für welche Zeitdauer der Versuche diese Wahrnehmung gilt. Bei diesem Säuregrade wird bei 39° nach zweistündigem Stehen die Wirkung des Hechtpepsins mit der Zeit geringer, die des Hundepsins nicht (wie lange fortgesetzt?). Um gleiche Bedingungen der Konzentration an Beimischungen der Extrakte herzustellen, wird jedem Hechtinfus ein gleiches Volum gekochtes Hunde-

<sup>1)</sup> In Übereinstimmung mit VAN HERWERDENS Resultaten.



infus zugesetzt und umgekehrt; die Lösungen werden verdünnt mit einer gekochten Mischung der Infuse zu gleichen Teilen. Die Pepsinwirkung wird kolorimetrisch gemessen durch Einwirkung auf getrocknetes Karminfibrin. Hält man die Infuse gleiche Zeiten bei 39° und bei verschiedener Acidität, dann macht sich von einer Acidität höher als  $\frac{1}{40}$  N HCl an eine vernichtende Wirkung der Temperatur beim Hechtinfus geltend, nicht aber beim Hundepinfus. Wie lange die Versuche fortgesetzt wurden, wird nicht erwähnt; nach längerer Zeit würde bei dieser Temperatur doch auch wohl das Hundepepsin an Kraft verlieren müssen, und sich so der Unterschied bloß als ein Unterschied in der *Schnelligkeit* der Vernichtung manifestieren. Auch HAMMARSTEN hat in einer Publikation von 1908 (43) über die Identität von Pepsin und Chymosin einige Versuche mit der Schleimhaut des Hechtmagens ausgeführt und Resultate erhalten, die mit denjenigen von RAKOCZY übereinstimmen. Ob man nach diesen Publikationen die Frage als gelöst betrachten darf, wage ich nicht zu entscheiden. Wir werden etwas später sehen, wie wenige exakte Tatsachen man über den Temperatureinfluß auf Enzyme, auch an den besser untersuchten höheren Tiere bisher gesammelt hat und wie vielen Umständen man hier Rechnung tragen muß.

Wichtige Aufschlüsse über die Zeit und den Grad der Verdauung bei dem Haifisch haben DONALD D. VAN SLYKE und G. F. WHITE gegeben (116). Sie fütterten die Fische mit einer bestimmten Fleischmenge und töteten sie nach 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden. Die Teile des Darmtrakts wurden voneinander abgebunden und ihr Inhalt zentrifugiert. Sodann bestimmte man den Stickstoffgehalt des ungelösten Eiweißes nach KJELDAHL und von der erhaltenen Flüssigkeit den Aminostickstoff nach VAN SLYKES gasometrischem Verfahren. Zugleich wurde der Totalstickstoffgehalt und der Aminostickstoff nach totaler Hydrolyse der Flüssigkeit (ausgeführt durch zweitägiges Kochen mit 20 vH HCl) bestimmt. Der Quotient vom  $\text{NH}_2$  nach totaler Hydrolyse und des  $\text{NH}_2$  der Digestionsflüssigkeit gibt dann ein Maß für die mittlere Länge der Peptidketten in dieser Flüssigkeit. Es stellte sich nebenbei heraus, daß die Flüssigkeit des Darmes einen erheblichen Ureumgehalt hatte. Es wurde erwiesen, daß dieser nicht als Produkt der Verdauung, noch als zurückgeflossener Kloakeninhalt (Urin) aufzufassen war, sondern daß der Harnstoff aus der Galle stammte. In dieser war 1,7 vH N vorhanden, wovon 72,3 vH als Ureum.

Es verliefen 2 bis 3 Tage, ehe die Verdauung einer Fleischmenge, mit 1,3—2 g N, beendet war. Nach den ersten 6 Stunden war im Magen neben Eiweiß viel gelöster Stoff; im Darne war nur sehr wenig Inhalt. Da in diesem Stadium der totale N-Gehalt des Darmes nur ungefähr 75 vH der verfütterten Menge beträgt, schließen die Autoren, daß 25 vH



im Magen resorbiert wurde. (Ich weiß nicht, ob dieser Schluß ganz zulässig ist: es könnte in den ersten Verdauungsstunden auch allmählich Mageninhalt in den Darm übergehen, um dort fast momentan resorbiert zu werden.) Die Größe der Peptone in der durch Zentrifugieren erhaltene Flüssigkeit war die von Pentapeptiden. Der Gehalt an freien Aminogruppen dieser Peptone war etwas höher als der von WITTE-Pepton. In der Zeit von 6—12 Stunden findet ein reichlicher Übergang des verdauten und unverdauten Eiweißes in den Darm statt: es findet sich nach 12 Stunden 30—45 vH des Totalstickstoffs im Darmtraktus; Pepton im Magen von der Größe eines Tripeptids, im Darm etwas weiter gespalten. Nach 24 Stunden ist 40—70 vH des N verschwunden; 65 bis 85 vH des N im Magen ist in gelöstem Zustande. Das Magenpepton ist im Di- und Tripeptidstadium. Weiter gespalten wird es im Magen nicht. Nach 3 Tagen ist entweder aller N verschwunden oder wenigstens bis auf 10 vH des verfütterten N; dieser Rest ist fast ganz löslich. Die Peptidgröße im Darm ist fast nicht weiter verringert als die nach 24 Stunden im Magen. Nach meiner Meinung wird das damit zusammenhängen, daß das Erepsin (dem nach den Untersuchungen von WALDSCHMIDT-LEITZ und Mitarbeitern [siehe später] die Aufgabe der Di- und Tripeptidspaltung zukommt) vorwiegend intrazellulär arbeiten soll, wie einige Autoren mutmaßen.

VAN SLYKE und WHITE vergleichen dann ihre Resultate mit denen von SCHMIDT-MÜLHEIM, ABDERHALDEN und LONDON c. s. am Hunde. Die Hälfte vom N ist beim Hunde schon nach  $1\frac{1}{2}$  Stunde im Darm und in 5 Stunden ist der Magen leer. Der Temperaturunterschied bei Hund und Haifisch beträgt  $20^{\circ}$ ; das kann theoretisch einen 4—9fachen Unterschied in der Reaktionsgeschwindigkeit ausmachen. Tatsächlich geht die Verdauung beim Haifisch etwa achtmal langsamer. Auch bei Säugetieren kommt nach den genannten Autoren ein Teil des Eiweißes in ungelöstem Zustande an. „It appears probable, that cleavage proceeds as far in the canal of the fish as in that of the dog,“ meinen VAN SLYKE und WHITE. Die größeren Unterschiede im Zustand des Speisebreis, die sich in den verschiedenen Teilen des Hundedarmkanals ergeben, würden durch die größere Komplikation dieses Darmtraktus erklärt werden müssen.

Aus neuester Zeit ist die Publikation von BODANSKY und ROSE: Digestion in Elasmobranchs and Teleosts (12) zu erwähnen. Extrakte der Magenschleimhäute von *Squalus acanthias*, *Pristis pectinatus*, *Torpedo galvani* und von vier Teleostiern wurden filtriert und auf ihre Eigenschaften untersucht. Das Optimum der Gelatineverflüssigung (nach einer Methode von DERNBY gemessen) wurde bei pH 3 gefunden. Pulverisiertes koaguliertes Eiweiß wird schlecht angegriffen, viel schlechter als es von käuflichem Pepsin verdaut wird. Neutralisierter Extrakt von



einigen Arten enthält Lab, von anderen nicht; innerhalb einer Art sind die Resultate konstant.

Ein Glycerin-Wasser-Extrakt der Appendices von *Lutjanus aya* wird angefertigt. Es findet sich ein schwaches Optimum der Gelatinspaltung an der sauren Seite; ein stärkeres an der alkalischen Seite, aber auch dort ist die proteolytische Wirksamkeit nur gering. Quantitative Vergleichen mit dem Pankreas werden nicht angestellt; ich bin wieder der Meinung, daß die beobachteten proteolytischen Wirkungen von adsorbiertem Pepsin und Trypsin herkommen. Stärke wird vom Darmextrakte ziemlich gut gespalten. Es kommt keine Inulinase, Maltase oder Laktase und nur eine Spur von Invertase vor. Leider werden nicht alle Versuche völlig mit Zahlen erwähnt. Die Schlußfolgerung der Autoren aber: „It therefore appears, that the secretions of the pyloric appendages of *Lutjanus aya* contain most of the enzymes, which are usually found in the pancreatic juice of higher vertebrates“ scheint mir gänzlich unzulässig. Es ist mir unbegreiflich, daß man einen derartigen Schluß ziehen kann, wenn man die Existenz des Teleostierpankreas ganz außer Betracht läßt. Direkt ist die Sekretion der Appendices wohl schwierig zu beweisen; indirekt würde man sie annehmlich machen können durch Vergleichung der Enzymquanta von Pankreas und Appendices, wenn nämlich die Quanta der verschiedenen Enzyme in den letzteren Organen höher sein würden. Diese Vergleichung wurde aber gar nicht angestellt.

Die letzte zu erwähnende Arbeit betrifft nicht die Verdauung bei den Fischen, sondern die bei Rana; ich führe sie an, weil sich vielleicht auf die Dauer vieles von der Verdauung bei den kaltblütigen Wirbeltieren unter einen Gesichtspunkt bringen läßt. SMIRNOW (117, 118) hat bei Fröschen Magen fisteln angelegt; zwar entwickelte sich, wenn viel Verlust von alkalischem Schleim bei breiter Fistelung stattfand, zwischen dem fünften und zehnten Tage nach der Operation eine tödliche Hautnekrose, aber er hat auch Tiere mit Fisteln erhalten, die 6—12 Monate am Leben blieben. Der Magensaft wird erst abgeschieden 40 bis 50 Minuten nachdem die Nahrung verschluckt worden ist; eine psychische Sekretion fehlt also. Das Zentralnervensystem wird hier bloß für das Aufsuchen der Nahrung, nicht für die Vorbereitung des Magens auf ihren Empfang benutzt. Nach Verschlucken von Kork und Gummi wird immer Magensaft sezerniert. Durchschneiden des Vagus am Halse hat keinen Einfluß auf die Sekretion. Die Reaktion im Magen ist sauer. Die Magenwandung ist reich an Pepsin, das sein Wirkungsoptimum bei 40° hat. (Diese Angabe ist bei Nichterwähnung der Wirkungszeit und der Wasserstoffionenkonzentration nicht zu verwerten. Siehe später S. 457.) Die Magensäure wirkt beim Frosch wie bei den höheren Tieren als Regulator für den Übergang des Speisebreies aus dem Magen in den Dünndarm.



*Die Nahrung der Fische.* Über die spezielle Nahrung der verschiedenen Arten kann man den Fischereizeitschriften und BREHMS Tierleben mancherlei Tatsachen entnehmen. Eine Zusammenstellung findet sich außerdem bei BIEDERMANN (7) und eine ausführliche Aufzählung der Tatsachen in der Arbeit von EGGELING (20). Da wir uns hauptsächlich mit der enzymatischen Verdauung bei den Fischen beschäftigen werden, kommt es für uns nur darauf an zu wissen, zu welchen der großen Gruppen, nämlich der Karnivoren, der Omnivoren oder Herbivoren, die untersuchten Arten gerechnet werden müssen. Die Einteilung, welche die Fischereiliteratur gibt, in Raubfische und Friedfische, ist eine rein praktische: die Raubfische nähren sich von so großen Beuteobjekten, daß sie der Fischerei schaden; die Friedfische schaden der Fischerei nicht, können aber ebenso ausgesprochene Karnivoren und Räuber sein und sind es auch meistens. Denn die überwiegende Mehrzahl der Fische sind echte und ausschließliche Karnivoren. Daneben gibt es wenige Omnivoren, wie den Karpfen und einige andere Cyprinoiden; reine Pflanzenfresser sind sehr selten. Vielleicht ist *Box boops* die einzige Form, von der mit Sicherheit gesagt werden kann, daß sie rein herbivor ist. Auch andere Arten der Gattung *Box* sind wahrscheinlich in derselben Lage. Leider konnte ich keinen Vertreter dieser Gattung untersuchen. Das wäre von Interesse gewesen, weil *Box* auch Appendices besitzt. Diese fehlen den Omnivoren, die fast alle zu der Gruppe der Cyprinoiden gehören. *Box* hätte also Aufschluß über die Verteilung der Diastase zwischen Appendices, Pankreas und Darm geben können. Die karnivoren Fische haben, wie wir sehen werden, nur geringe Mengen Diastase, sind also zu diesem Vergleich weniger geeignet.

Von den echten Raubfischen kamen Hecht und *Acanthias* zur Untersuchung. Von den Omnivoren der Karpfen.

*Vergleichende Physiologie und neuere Resultate der Enzymforschung.* Da wir uns in dieser Arbeit vorwiegend mit den Enzymen der Fische beschäftigen werden, muß ich einige Bemerkungen vorausschicken über die Weise, worin die neueren Resultate der Enzymforschung die bisher gebräuchlichen Methoden der vergleichenden Physiologie auf die Dauer werden beeinflussen müssen.

Erstens muß ich bemerken, daß die Methoden der Reinigung von Enzymen, wie sie besonders in allerletzter Zeit von WILLSTÄTTER und seinen Schülern so sehr verbessert worden sind, bei den niederen Tieren meistens wegen der geringen Menge und der Kostspieligkeit des Materials nicht angewandt werden können, obgleich ich dank einigen glücklichen Umständen gerade imstande war, Methoden von PEKELHARING bzw. von MICHAELIS auf die Reinigung des Pepsins und Trypsins von *Acanthias* zu verwenden.



Außer neuen Reinigungsmethoden hat die Enzymchemie ungefähr seit dem Anfang dieses Jahrhunderts zwei große Fortschritte gemacht, nämlich die exakte Kenntnis des Einflusses der Temperatur und die der Wasserstoffionenkonzentration auf die Enzymwirkung. Schon lange hatte man den Einfluß der Temperatur auf die Enzymwirkung erkannt; man wußte, daß bei  $0^{\circ}$  die Wirkung sehr gering war und bis zu einem gewissen „Optimum“ durch die erhöhte Temperatur sehr begünstigt wurde, dann bei noch größerer Temperatursteigerung sich eine rapide Senkung der Wirksamkeit zeigte.

1899 zeigte DUCLAUX (19) für Diastasen, daß die experimentell gefundene Temperatur-Optimumkurve sich aus zwei Kurven zusammensetzen läßt: nämlich aus der theoretischen Temperaturkurve, die man nach dem VAN 'T HOFFschen Gesetz für jede chemische Reaktion konstruieren kann und aus einer Kurve von entgegengesetzter Richtung, die das Wachsen eines schädlichen Einflusses mit der Temperatur darstellt. Es war dann 1905 BLACKMAN (10), der an dem Beispiel der Kohlensäureassimilation darlegte, daß diese Betrachtungsweise mit großem Erfolg für die Erklärung des Temperatureinflusses auf die Intensität der Lebensprozesse sich verwenden ließ. Im Besonderen wies er nach, daß, je länger man die Dauer des Prozesses beim Versuch wählt (oberhalb einer bestimmten noch gerade nicht schädlichen Temperatur), bei desto niedrigerer Temperatur das Optimum gefunden wird. Letzteres ist also für irgendeinen solchen Prozeß wie Assimilation, Atmung, Enzymwirkung, kein fixer Punkt, sondern hat für jede Zeitdauer einen andern Wert. [Siehe auch die Zusammenstellung bei BAYLISS: *Nature of Enzymreaction* (3) S. 103—106.]

SÖRENSEN bewies 1909 (123), daß die Konzentration an freien Wasserstoffionen auf die Wirksamkeit eines Enzyms einen weit größeren Einfluß ausübte, als die Gesamtacidität der Lösung, die bisher in dieser Hinsicht für maßgebend gehalten wurde.

Er schlug als Ausdruck für diese  $H^+$ -Ionenkonzentration ( $C_H$ ) das Symbol  $p_H$  vor, definiert als negativer Logarithmus der  $C_H$ , ein Symbol, das seitdem, seiner Bequemlichkeit wegen, überall Eingang gefunden hat. SÖRENSEN, MICHAELIS und zahlreiche Mitarbeiter und Nachfolger bestimmten dann für viele Enzymreaktionen das sogenannte  $p_H$ -Optimum und stellten die Abhängigkeit der Wirksamkeit eines Enzymes vom  $p_H$  in einer Kurve dar ( $p_H$ -Aktivitätskurven). Auch hier hat sich aber mit der Zeit herausgestellt, daß dieses Optimum kein fester Punkt ist, sondern bei einer bestimmten Temperatur wieder abhängig ist von der Zeitdauer der Einwirkung. Bei längerer Versuchsdauer verschiebt sich das Wirkungsoptimum immer mehr nach dem  $p_H$ -Optimum der Resistenz, um schließlich bei sehr langer Dauer damit zusammenzufallen. Für Trypsin liegt bei einer Versuchsdauer von 11 Minuten



das Wirkungsoptimum bei  $p_H = 11$ , während das Resistenzoptimum bei  $p_H 4-4,5$  liegt. Für die Diastase von *Phaseolus* liegt das Wirkungsoptimum bei  $p_H 5,2$ , das Resistenzoptimum bei  $p_H 6-7$  [SJÖBERG (115)]. Ebenso wird man erwarten können, daß bei konstant gehaltener Einwirkungsdauer die Lage des  $p_H$ -Optimums sich mit zunehmender Temperatur nach dem Resistenzoptimum verschieben wird. In dieser Richtung wurde noch nicht viel gearbeitet, aber eine Untersuchung von SJÖBERG (l. c) über Phaseolusamylase weist schon in diese Richtung.

Außer dem  $p_H$  behalten die verschiedenen Ionen, deren Einfluß man schon länger kannte, ihre Bedeutung, ja ihrerseits veranlaßten sie c. p. wieder eine Verschiebung des  $p_H$ -Optimums, je nachdem man dies bei der Anwesenheit dieses oder jenes Ions bestimmt.

Diese verwickelten Bedingungen sind in erster Linie von Interesse für die physikalische Chemie und allgemeine Physiologie der Enzyme; doch wird auch die vergleichende Physiologie mit ihnen rechnen müssen. Wir haben schon den verschiedenen Einfluß derselben Temperatur auf die Enzyme der Kalt- und Warmblüter besprochen, der nach vielen Autoren bestehen soll. Es ist nun ohne weiteres klar, daß alle früheren Untersuchungen, wobei man weder  $p_H$ , noch gleiche Zeitdauer, noch quantitative Messung der Endprodukte berücksichtigte, wertlos sind, wenigstens keine exakte Entscheidung bringen.

Weiter hat von jetzt an die vergleichende Physiologie, bei Anwendung genügender Kautelen, in den  $p_H$ -Optimumkurven ein sehr gutes Mittel zur Definierung eines Enzyms. Dabei gaben uns die Untersuchungen der letzten 30 Jahre über die Chemie der Stärke und des Zuckers bequeme Methoden in die Hand, die Zuckerarten zu definieren, z. B. mittels der Osazone. Auch die Kenntnis der Eiweißspaltungsprodukte lieferte uns Methoden, um die verschiedenen eiweißspaltenden Enzyme (z. B. Trypsin von Erepsin mittels Glycyl-glyzin) voneinander zu unterscheiden. Auch diese Methoden wurden in der vergleichenden Physiologie noch fast nicht verwertet.

*Probleme.* Die behandelte Literatur lehrte uns, daß zwar einige Tatsachen feststehen, besonders über die Magenverdauung (peptischer Charakter, titrierbare Säuremenge), daß man aber von der Rolle von Pankreas und Dünndarm, besonders von der Lokalisierung der Enzyme in diesen Organen und von ihrer wahren Natur, wenig mehr als eine sehr vorläufige Ahnung hat. Um die hier vorhandenen Probleme zu lösen, genügt es denn auch nicht, für Proteasen die lösende Wirkung auf Fibrin zu zeigen, oder für Diastase das Verschwinden der Jodreaktion in einer Stärkelösung. Erst mit Hilfe der oben besprochenen neuen Methoden kann man die Menge der Fermente der Organe untereinander und bei verschiedenen Tieren quantitativ vergleichen und ihren wahren Charakter so weit als möglich bestimmen.



Aus den vorhergehenden Betrachtungen ergeben sich die folgenden ungelösten Probleme für die Verdauung bei den Fischen:

1. Vergleichung der Pankreasenzyme, besonders der Teleostier mit denen der Säugetiere. Erwartet werden können: Amylase, Trypsin, Lipase und vielleicht Maltase.

2. Festzustellen, ob sich im Darms dieselben Enzyme vorfinden, und ob ihre Menge derart ist, daß sie als selbständige Sekretionsprodukte des Darmes oder bloß als adsorbierte Pankreasenzyme betrachtet werden müssen.

3. Untersuchung des Darmes auf die Enzyme (Maltase und Erepsin), die beim höheren Tiere die Kohlehydrat- und Eiweißverdauung vollenden.

4. In gleicher Weise wie unter 2 und 3 angegeben, die Appendices pyloricae zu untersuchen.

Die Punkte 2 bis 4 sind von Wichtigkeit, weil nach den Histologen eigentliche sezernierende Drüsen (ausgenommen bei den Gadiden) in Appendices und Darm nicht vorkommen, und die bisher dort gefundenen Enzyme alle dem Pankreas entstammen können.

5. Den Einfluß der Temperatur auf die Enzyme der Fische und Warmblüter zu vergleichen.

6. Den Säuregrad im Darmkanal zu bestimmen und zu sehen, inwieweit die gefundenen Werte übereinstimmen mit den gefundenen pH-Optima der untersuchten Enzyme.

7. Schließlich kann man, wenn die enzymatischen und Säureverhältnisse im Darms bekannt sind, zum Studium der Resorption übergehen.

In Übereinstimmung mit dem schon auf S. 458 Al. 5 bemerkten, habe ich es für vorteilhafter gehalten, an einigen wenigen Arten alle Teile des Darmkanals zu berücksichtigen, als ein Organ bei sehr vielen Arten zu untersuchen. Für die Verhältnisse im Magen gibt oft die Literatur gute Auskunft.

Zur Untersuchung kamen einige leicht zu beschaffenden Süßwasserfische (hauptsächlich Hecht und Karpfen) und einige Meeresfische, wovon *Acanthias vulgaris* am eingehendsten. *Esox* ist ein Magenfisch ohne Appendices, der Karpfen ein magenloser (ohne Appendices wie alle Magenlosen); *Acanthias* hat als Selachier ein kompaktes Pankreas und eine Spiralklappe. Von allen physiologisch wichtigen Typen des Darmbaues habe ich also einen Vertreter gewählt, ausgenommen einen Magenfisch mit Appendices, wofür der Barsch in Betracht gekommen wäre.

Doch sind die im letzten Abschnitt dieses Kapitels umschriebenen Aufgaben sehr umfangreich, besonders wenn man alle Enzyme auch nach ihren pH-Optima charakterisieren will. Daher sind alle diese Punkte in einer Arbeit schwerlich in gleicher Weise zu berücksichtigen. Aus dem Folgenden wird sich ergeben, welchen mehr und welchen weniger Aufmerksamkeit zuteil wurde.

---



## Kapitel II.

## Die Amylasen.

Allgemeine Methodik — Methodik speziell für die Amylasen — *Cyprinus carpio*: Pankreasamylase; ihr  $pH$ -Optimum bei verschiedener Versuchsdauer und Temperatur — Darm von *Cyprinus* — Aktivierung durch Natriumchlorid — Galle von *Cyprinus* — *Petromyzon*: Darm — *Esox lucius*: Pankreas und Darm — *Rana*: Pankreas und Darm — *Acanthias vulgaris*: Pankreas.

*Allgemeine Methodik.* Das zu untersuchende Gewebe wurde mit gut gereinigten Instrumenten isoliert, auf Filtrierpapier gesammelt, dazwischen oberflächlich trockengepreßt und dann gewogen. Darauf wurde es so weit wie möglich mittels Schere oder Messer in einem kleinen Mörser zerkleinert und dann mit gut ausgewaschenem Quarzsand zerrieben, unter Hinzufügung einer bestimmten Menge unverdünnten Glycerins (KAHLBAUM: spez. Dichte 1,26, also fast wasserfrei). Der Gebrauch von unverdünntem Glycerin macht es möglich, die Extrakte unbestimmte Zeit ohne Zusatz eines Antiseptikums aufzubewahren<sup>1)</sup>, und erlaubt auch, falls, wie bei diesen Versuchen, die Menge des Glycerins diejenige des Gewebes um das zehn- bis zwanzigfache übertrifft, die Hinzufügung einiger Kubikzentimeter destillierten Wassers, um das Gemisch flüssiger zu machen<sup>2)</sup>. Nachdem der Extrakt wenigstens 4 Tage sich selbst überlassen worden war, wurde er durch ein lockeres Tuch kolliert, und das Volum des so von Quarzkörnern und Gewebsresten befreiten Extraktes gemessen. Man weiß dann, daß a cem Glycerin eine Menge Enzym enthält, die herrührt von der Extraktion von m Gramm Gewebe, daß also jedes Kubikzentimeter eine Menge enthält, herstammend von  $\frac{m}{a}$  Gramm oberflächlich getrockneten Gewebes. Das Enzym kann nun für die Versuche auf verschiedene Kolben oder Reagenzgläser verteilt werden, sei es als solches, sei es, daß man eine bestimmte Menge vorher mit destilliertem Wasser oder einem Puffergemisch verdünnt, wodurch die Verteilung selbstverständlich genauer wird.

Natürlich ist diese Methode keineswegs quantitativ exakt, aber dennoch genügt sie vollkommen für meinen Zweck, die Unterschiede an Enzymgehalt derselben Organe bei mehreren Tieren, oder die von verschiedenen Organen eines Tieres miteinander zu vergleichen. Kann man doch in dieser Hinsicht keine Schlußfolgerungen ziehen, wenn es sich nicht um einen zwei- bis fünffachen Unterschied handelt. Zwar kann man durch Herstellung eines trockenen Organpulvers nach WIECHOWSKI (133) ein Präparat von weit größerer Konstanz erhalten, aber bei den kleinen Mengen, welche uns die Fische liefern können, würde dieses Verfahren zu kostspielig werden.

Um nun die enzymatische Wirksamkeit eines Extraktes zu bestimmen oder bei verschiedenen Beimischungen zu vergleichen, wird die Wirkung einer bestimmten Menge z. B. mittels einer Titriermethode verglichen mit dem Wert, welchen ein ähnlich zusammengesetztes Gemisch aufweist, dem eine gleiche Menge Extrakt zugesetzt wurde, das zuvor 10 oder 12 Minuten auf einem Wasserbad bei 100° gehalten worden war. Da diese Titrationen natürlich nicht gleichzeitig erfolgen können, muß die Enzymwirkung durch Kochen abgebrochen

1) Über die Resistenz von Enzymen in Glycerin, siehe u. a. VERNON (128).

2) Für die Extraktion größerer Mengen der Fermente bei höheren Tieren verwendet man z. B. 2 Gewichtsteile nicht ganz konzentriertes Glycerin auf 1 Teil Drüse.



werden, damit sie in allen Gemischen sich während einer gleichen Zeit entfalten kann. Wenn man nun nicht das Verdauungsgemisch als Ganzes untersuchen will, sondern nur eine bestimmte Menge, z. B. um Doppelbestimmungen ausführen zu können, oder um die Spaltungsprodukte weiter zu untersuchen, so hat man zu bedenken, daß beim Aufkochen die Flüssigkeit in nicht unbedeutendem Maße konzentriert wird, und daß alle Nummern der Serie in gleichem Maße dieser Volumveränderung unterliegen müssen. Sie müssen also genau gleiche Zeiten gekocht werden und die Gefäße müssen von gleicher Form und Inhalt sein, damit dieselbe Menge verdunstet. Wünscht man z. B. die Wirkung eines Extraktes bei sechs verschiedenen pH-Werten zu bestimmen, so macht man die Gemische zuvor fertig bis auf die Zufügung des Enzymes und des gekochten Extraktes und kann nun so verfahren, daß man zu Nr. 1 die erwünschte Enzymmenge zusetzt, zu Nr. 2 eine Viertelstunde später, usw. Will man nun nach 4 Stunden den Versuch abbrechen, so setzt man Nr. 1 (ohne Stöpsel!) ins kochende Wasserbad und kocht genau 10 Minuten; eine Viertelstunde später verfährt man ebenso mit Nr. 2 usw. Man erreicht so eine genau gleiche Wirkungszeit, muß aber sehr gut auf die Zeiten achten. Wenn man vor der Verteilung den Extrakt verdünnt mit destilliertem Wasser oder Puffermischung, so hat man zu bedenken, daß das Enzym nun nicht länger von Glycerin geschützt wird und falls  $1\frac{1}{2}$ —2 Stunden zwischen dem Einsetzen von Nr. 1 und Nr. 6 oder 8 verstreichen, der Extrakt schon an Wirksamkeit verlieren kann.

Wenn man nur dasselbe Enzym unter verschiedenen Umständen wirken lassen will, so kann man, bei nicht zu kurzer Wirkungszeit, auch so vorgehen, daß man schnell hintereinander die Kolben mit der Enzymmenge versieht und in den Thermostat stellt. Hat man schon einige Erfahrung über den mutmaßlichen Ausschlag des Versuches, so fängt man dabei mit dem Kolben an, worin man die geringste Wirkung vermutet. Nach Ablauf der Versuchsfrist hängt man nun die Kolben in ihrem Gestell in ein genügend großes Wasserbad mit kochendem Wasser, und erzielt in der Weise den Vorteil, daß die Einwirkung der Kochtemperatur für alle genau gleich ist. Die Ungenauigkeit liegt hier beim Ansetzen der Versuche (Anfangszeit). Diese Methode braucht weniger Zeit und Sorge als die vorige und ist daher vorzuziehen. Wenn die Einwirkungszeit kurz war, so daß Unterschiede in der Anfangszeit nicht vernachlässigt werden durften, so benutzte ich immer die erstere Methode. Übrigens wird bei den Versuchen angegeben, welche Methode befolgt worden ist. Ich bin auf diese Einzelheiten so ausführlich eingegangen, weil es nur mit ihrer Kenntnis möglich ist, zu einer Schätzung der Versuchsfehler zu kommen und danach festzustellen, inwieweit man aus den erhaltenen Zahlen zulässige Schlüsse ziehen kann.

Alle benutzten Glassachen waren aus Jenaglas, das vor dem Gebrauch der Einwirkung eines warmen Gemisches aus Kaliumbichromatschwefelsäure ausgesetzt wurde und nach den Versuchen mit 40 proz. Kalilauge gereinigt und wiederholt mit Leitungswasser, schließlich mit destilliertem Wasser ausgespült, oder mittels halbstündiger Durchführung von Wasserdampf von Elektrolyt befreit wurde.

Während immer Kontrollen mit gekochtem Enzym angestellt wurden, hielt ich durch Hinzusetzung von Toluol in geeigneten Mengen von etwa 1 vH<sup>1)</sup> Bakterieneinwirkung fern. Fast nie wurden die Versuche über eine Frist von 24 Stunden hinaus fortgesetzt. Die Kolben oder Reagenzgläser wurden meistens mittels

1) Für ausländische Leser sei bemerkt, daß die Zeichen vH (vom Hundert) und vT (vom Tausend) jetzt vielfach statt prozent bzw. promille benutzt werden.



Gummipfropfen geschlossen, so daß eine Verdunstung des Toluols ausgeschlossen war.

Wenn für eine angestellte Versuchsreihe elektrometrische pH-Bestimmungen ausgeführt werden sollten, so wurden die Verdauungsgemische fertig gestellt bis auf die Zufügung des Toluols. Von jedem gut geschüttelten Kolben wurden nun 10 ccm in entsprechend numerierte Reagenzgläser übergebracht und danach zum Hauptversuch das Toluol zugesetzt. Die pH-Bestimmung wurde dann in den toluolfreien Gemischen vorgenommen, da bekanntlich Desinfektantia in der Wasserstoffelektrode Störungen verursachen.

Für einige Einzelheiten über die benutzten Puffergemische, den Grad der Zuverlässigkeit der pH-Messungen usw. siehe Kapitel VII.

Die benutzten Thermostaten, mit guter Rühreinrichtung versehen, gestatteten die Konstanzhaltung der Temperatur bis auf wenigstens 0,1°. Gelegentliches Einhalten anderer Grenzen für die Temperaturkonstanz wird immer im Text erwähnt.

Die bisher besprochene Methodik gilt für alle Versuche in dieser Arbeit, so weit nichts anderes dabei angegeben wird.

*Methodik speziell für die Amylasen.* Ich muß nun noch einige Bemerkungen einschalten über die Methoden, die für die Untersuchung der Amylasen und anderer Karbohydrasen verwendet wurden.

Als Substrat zum Anzeigen einer Amylasewirkung habe ich meistens eine 1 proz. Stärkelösung benutzt, hergestellt aus der sogenannten löslichen Stärke von KAHLBAUM. Hieraus kann man ganz klare Lösungen erhalten, die man nicht zu filtrieren braucht. Man kann sie im Eisschrank ohne Zusatz von Antiseptikum wenigstens eine Woche gut halten. Die Stärke wurde in einem Exsikkator aufbewahrt, da sie sehr viel Wasser anzieht.

Für die Bestimmung der Zuckermengen, die bei der Einwirkung von Diastasen auf diese Stärkelösungen entstehen, habe ich die beiden Methoden benutzt, die von SCHOORL ausgearbeitet worden sind (111, 111a). Beide beruhen auf der teilweisen Reduktion einer bestimmten Menge FEHLINGScher Lösung von ganz genau bekanntem Kupfergehalt. Diese Lösung wird zusammen mit der abgemessenen Menge der zu untersuchenden Flüssigkeit (das Gesamtvolum soll immer 50 ccm betragen) während genau 10 Minuten gekocht und dann abgekühlt. Nach der einen Methode (einer Modifikation derjenigen von BERTRAND [6]) trennt man nun den Niederschlag von  $\text{Cu}_2\text{O}$  von der Lösung des nichtreduzierten Kupfers, wäscht ihn unter den nötigen Kautelen aus und löst in Ferrialaun. Hiernach setzt man Schwefelsäure zu: das Kupferoxydul reduziert eine entsprechende Menge des Ferrisalzes zu Ferrosalz und dieses wird mit 0,1 N Permanganatlösung titriert. Bei der anderen Methode wird die Menge des nichtreduzierten Kupfersalzes bestimmt durch Ermittlung der Menge Jod, die nach Zusatz von Jodkaliumlösung durch das Kupfersalz aus dem KJ freigemacht wird. Hierfür wird Schwefelsäure hinzugefügt und die Lösung mit 0,1 N Thiosulfat titriert, wobei Stärke als Indikator dient. Bei dieser Methode ist es nötig eine Kontrollbestimmung auszuführen, um die Menge Thiolösung zu ermitteln, die von dem gleichen Volum nicht reduzierter Fehlinglösung verbraucht wird. Zieht man davon den Wert der Hauptbestimmung ab, so findet man die Menge Thiosulfat, die mit der vom Zucker reduzierten Kupfermenge übereinstimmt. Die erstere Methode ist umständlicher, die zweite aber etwas ungenauer, wenn es sich um kleine Unterschiede handelt, da hier der Titer durch Abzug zweier einander naheliegender Werte gefunden wird. Für den gefundenen Titerwert kann man nun in der von SCHOORL ausgearbeiteten Tabelle die entsprechende Menge Zucker nach-



schlagen. Hier ist zu bemerken, daß für eine bestimmte Menge Kupfersalz die Reduktion nicht direkt proportional der zugesetzten Zuckermenge ist, sondern weniger stark wächst als diese; dies muß man bei der Berechnung der Versuchsergebnisse im Auge behalten.

Eine andere, zwar für Vergleichen weniger genaue, aber sehr demonstrative Methode der Diastasebestimmung ist die von WOHLGEMUTH<sup>1)</sup>. Er verteilt das Enzym durch eine geeignete Verdünnungsmethode über etwa zehn Reagenzgläser, derart, daß jedes folgende auf 1 ccm Flüssigkeit die Hälfte der Enzymmenge des vorhergehenden enthält (anzufangen mit 1 ccm) und setzt nun allen Gläsern 5 ccm 1 proz. Stärkelösung zu. Nachdem die Wirkung im Thermostat eine bestimmte Zeit sich entfaltet hat, wird sie unterbrochen durch Anfüllung der Gläser mit kaltem Wasser und nun jedem Glas 1 Tropfen Jodlösung zugefügt. Ist die Versuchszeit richtig gewählt, so wird in den letzten Gläsern Blaufärbung eintreten, in einigen der ersteren wird die Stärke verschwunden sein, und zwischen beiden wird sich ein Reagenzglas finden, das eine Erythro-dextrinreaktion zeigt. WOHLGEMUTH nennt dieses Gläschen „Limes“; sei dies z. B. das fünfte, so überlegt WOHLGEMUTH folgendermaßen: in diesem Röhrchen Nr. 5 ist noch nicht alle Stärke verdaut, in Nr. 4 aber ist sie gänzlich verschwunden. Nr. 4 enthält  $\frac{1}{8}$  ccm Enzym;  $\frac{1}{8}$  ccm kann 5 ccm 1 proz. Stärke verdauen, 1 ccm kann also  $8 \times 5$  ccm = 40 ccm verdauen. Diese Zahl 40 nennt er nun die Diastasezahl der untersuchten Fermentlösung und schreibt dafür das Symbol  $D_{24h}^{38^\circ} = 40$ , falls der Versuch bei  $38^\circ$  ausgeführt wurde und 24 Stunden gedauert hat. Verwendet man eine 1 vT Stärkelösung bei 3 Stunden Dauer und  $27^\circ$ , so wird z. B. geschrieben:  $d_{3h}^{27^\circ}$ . Auf diese Weise kann man nur finden eine Lösung sei halb so stark,  $\frac{1}{4}$  mal so stark wie eine Vergleichslösung (usw.), keine feineren Unterschiede. Will man diese bestimmen, so wird man in der Nähe der gefundenen Grenze eine Versuchsreihe aufstellen müssen, wo 1 ccm, 0,9 ccm, 0,8 ccm von dem Enzym in geeigneter Verdünnung zugefügt wird, aber so wird das Verfahren etwas umständlich und ich würde, wenn solche Genauigkeit erwünscht wird, Zuckertitration weit vorziehen.

Die Methode von WOHLGEMUTH ist recht demonstrativ. Besonders für die vergleichende Physiologie scheint sie mir von großem Wert zu sein; man kann, um in der Sprache der Physik zu reden, direkt vergleichen, von welcher „Ordnung“ die Diastasemengen verschiedener Tiere und Organe sind.

Vor der früher gebräuchlichen Methode, den Diastasegehalt verschiedener Lösungen zu vergleichen durch Bestimmung der Zeit, welche nötig ist um die Jodreaktion zum Verschwinden zu bringen, bietet sie einen gewissen Vorzug. Wenn eine Lösung 1 Stunde, eine andere 10 Stunden braucht um den achromatischen Punkt zu erreichen, so ist die zweite viel längere Zeit dem schädlichen Einfluß der Temperatur ausgesetzt gewesen und ein Verhältnis an Wirksamkeit von 10 bis 1 ist sicher zu ungünstig für die wenig wirksame Lösung. Bei WOHLGEMUTHS Methode wird dieser Fehler gänzlich vermieden.

*Cyprinus carpio*: Pankreasamylase; ihr  $p_H$ -Optimum bei verschiedener Versuchsdauer und Temperatur. Nach einigen Vorversuchen ergab sich, daß das Pankreas vom Karpfen von den untersuchten Fischen an Amylase weitaus am reichhaltigsten war, und ich habe daher diese Amylase für eine ausführlichere Untersuchung gewählt.

<sup>1)</sup> WOHLGEMUTH: Grundriß der Fermentmethoden. Berlin 1913.



Der Darmkanal des Karpfens ist sehr stark gewunden und das Pankreas verläuft zwischen diesen Windungen in feinen stark verzweigten Strängen und dringt auch reichlich in das Lebergewebe ein. Daher bekommt man von einem Tiere nur eine geringe Menge der Drüse, da man den mit der Leber verwachsenen Teil selbstverständlich nicht isolieren kann. So lieferten mir vier große Tiere von zusammen 8—10 Pfund Gewicht 1,99 g Pankreas. An Mikrotomschnitten habe ich mich überzeugt, daß die Gewebe, die ich nach ihrer makroskopischen Beschaffenheit für Pankreas hielt, auch wirklich zur Bauchspeicheldrüse gehörten.

Die diastatische Wirksamkeit wurde auf folgende Weise gezeigt: Man rieb 630 mg Pankreas fein mit Quarzsand und übergieß es mit 12,5 ccm Glyzerin und 2,5 ccm dest. Wasser. Nach 4 Tagen wurde das Gemisch kolliert und lieferte etwas mehr als 9 ccm Filtrat; 6 ccm davon wurden mit destilliertem Wasser zu etwas mehr als 10 ccm verdünnt und hiermit folgender Versuch angestellt bei 38° (wie bemerkt + oder — 0,05° höchstens) und einer Dauer von 24 Stunden. Titration oxydimetrisch nach SCHOORL. 19./20. VI. 1925.

Versuch	Inhalt des Kölbchens	ccm 0,107 N Permanganat pro 5 ccm unt. Flüssigkeit	ccm Permanganat auf Rechnung d. Enzymwirkung	vH der Stärkelösung, der in Zucker verwandelt wurde
A	8 ccm $\frac{M}{15}$ prim. K-phosphat <sup>1)</sup> ; 12 ccm $\frac{M}{15}$ sec. Na-phosphat; 25 ccm 1 proz. Stärkelösung; 5 ccm Extrakt, herkommend von etwa 200 mg Pankreas	5,28	4,78	nach Schätzung etwa 80 <sup>2)</sup>
AA	wie A; Extrakt vor dem Versuch 10 Min. auf 100°	0,50		

Aus diesem Versuch ersieht man, daß unter diesen Umständen (die einem pH von ungefähr 7 und einem Salzgehalt von ungefähr 4 vT entsprechen) der Pankreasextrakt des Karpfens kräftig amylytisch wirkt, so daß in 24 Stunden etwa 80 vH der Stärkelösung in Zucker verwandelt ist<sup>2)</sup>.

1) In allen Tabellen und Versuchen bedeutet M Mol.  $\frac{M}{15}$  ist also eine Lösung, die  $\frac{1}{15}$  des Molekulargewichtes eines Stoffes zu einem Liter gelöst enthält. N hat die gewöhnliche Bedeutung der Normalität.

2) Genau ist das nicht anzugeben, wegen der zu gleicher Zeit stattfindenden Maltasewirkung, die wir später besprechen werden. Man weiß nicht, wieviel Maltose und Glykose nebeneinander anwesend sind, da die Amylase und Maltase in sehr verschiedener Konzentration nebeneinander vorkommen.



Da der Extrakt so kräftig wirksam war, genügte weit weniger für einen Versuch. Mit den übrigen 3 ccm wurde vorläufig versucht, etwas vom Einfluß des  $p_H$  auf die Wirkung zu erfahren bei  $38^\circ$  und einer Zeitdauer von  $4\frac{1}{4}$  Stunden. Das Totalvolum in den Kölbchen war wieder 50 ccm. Auf jedes kam eine Menge entsprechend 50 mg Pankreas. Daß hier eine 2 proz. Stärkelösung verwendet wurde, ist Zufall.  $p_H$  wurde elektrometrisch bestimmt.

Versuch	Inhalt	$p_H$	ccm 0,107 N Permanganat pro 5 ccm unt. Flüssigkeit	ccm Permanganat auf Rechnung d. Enzymwirkung
A	18 ccm $\frac{M}{15}$ primäres Phosphat; 2 ccm $\frac{M}{15}$ sec. Phosph.; 25 ccm 2 proz. Stärke; Enzym von 50 mg Pankreas; bis 50 ccm mit dest. Wasser	5,84	8,05	7,64
B	14 ccm prim.; 6 ccm sec. Phosphat, Stärke u. Enzym wie o.	6,57	7,99	7,58
C	8 ccm prim., 12 ccm sec. Phosphat, Stärke usw. wie o.	6,99	7,57	7,16
BB	wie B; Enzym vor dem Versuch 10 Min. bei $100^\circ$		0,41	

Bei einem  $p_H$  von ungefähr 6 und 6,6 ist die Wirkung gleich stark, um bei  $p_H=7$  etwas zu sinken. Hier ist auch etwa 80 vH der Stärke in Zucker verwandelt und es fällt auf, daß bei einer Enzymmenge, die  $\frac{1}{4}$  von der im vorigen Versuche angewandten beträgt, und bei einer sechs-mal kürzeren Wirkungs-dauer ein so hoher Umsatz erreicht wird. Dies erklärt sich natürlich hieraus, daß besonders im ersteren Versuch die Menge Enzym zu groß war für eine vergleichende Bestimmung: das Enzym war im Überschuß vorhanden. Später werden wir mit noch geringeren Mengen Enzym vergleichende Bestimmungen ausführen.

Ich habe nun weiter an einem anderen Extrakt die Diastasezahl nach WOHLGEMUTH bestimmt. Die Gesamtflüssigkeitsmenge in jedem Röhrchen hatte hierbei ein NaCl-Gehalt von ungefähr 1,5 vT, d. h. etwas weniger als der Salzgehalt betrug in einer ganzen Reihe von Versuchen, die mit einem dritten Extrakt ausgeführt wurden, und wo er durch Puffergemische hergestellt etwa 2 vT betrug.

Für die Bestimmung nach WOHLGEMUTH wurde 2,3 ccm kolliertes Extrakt (von etwa 50 mg Pankreas stammend) filtriert um die Trübung zu entfernen und in Übereinstimmung zu bleiben mit einigen später zu

besprechenden Versuchen an *Rana*. Von dem Filtrat brachte ich 1 ccm ins Röhrchen Nr. 1 und gab dazu 1 ccm einer physiologischen Kochsalzlösung für *Cyprinus* von doppelter Konzentration (16 vT NaCl). Von diesem Gemisch wurde nach Schütteln 1 ccm in Nr. 2 gebracht und dazu 1 ccm einer normalstarken physiologischen Lösung für *Cyprinus* zugesetzt usw. In dieser Weise erhielten alle Röhrchen die gleiche Salzkonzentration. Nr. 6 stellte sich als Limes heraus; da Nr. 1 nur  $\frac{1}{2}$  ccm Extrakt (25 mg) enthielt, war  $D_{24}^{38^\circ}$  für den Extrakt = 160 und auf 1 g Drüsensubstanz berechnet = 3200.

Mit dem erwähnten dritten Extrakt wurden nun die folgenden Versuche zur Ermittlung des pH-Optimums dieser Diastase bei verschiede-

**Tabelle A.** Bestimmung des pH-Optimums der *Cyprinus*-Pankreasdiastase bei  $38^\circ$  und 24 Stunden (I) bzw.  $27^\circ$  und 24 Stunden (II) und etwa 4 vT Salzgehalt. 4,5 ccm des Extraktes verdünnt mit destilliertem Wasser bis auf 45 ccm und von diesem Gemisch 5 ccm pro Kolben. Jeder Kolben enthält also eine Menge Extrakt, herstammend von etwa 50 mg Pankreas. Zuckertitration: jodometrisch. pH-Bestimmung: elektrometrisch. Verdauung abgebrochen durch 10 Minuten gleichzeitiges Erhitzen auf  $90^\circ$ . 29. und 30. September bzw. 1. und 2. Oktober 1925.

Versuch	Inhalt	pH	I		II	
			ccm $\frac{N}{10}$ Thio-sulf. pro 10 ccm unt. Flüssigkeit	ccm Thio auf Rechn. Enzym-wirkung	ccm $\frac{N}{10}$ Thio-sulf. pro 10 ccm unt. Flüssigkeit	ccm Thio auf Rechn. Enzym-wirkung
A	20 ccm $\frac{M}{15}$ primäres Phosphat; 25 ccm 1 vH Stärkelösung; 5 ccm verd. glyc. Pankreasextr. (etwa 50 mg)	5,40	14,68	12,14	19,40	7,16
B	18 ccm prim. Phosphat; 2 ccm $\frac{M}{15}$ sec. Phosph.; 25 ccm Stärkelösung; 5 ccm Pankreasextr.	6,11	13,57	13,39	18,47	8,09
C	14 bzw. 6 ccm Phosphat; usw.	6,63	13,36	13,60	18,79	7,77
D	8 bzw. 12 ccm Phosphat; usw.	7,11	13,55	13,54	18,97	7,59
E	4 bzw. 16 ccm Phosphat; usw.	7,49	14,23	12,86	20,02	6,54
F	1 bzw. 19 ccm Phosphat; usw.	8,01	15,18	11,91	20,75	5,81
AA	Wie A; Extrakt vorher 10 Min. auf $100^\circ$	—	26,82	—	—	—
DD	Wie D; Extrakt vorher 10 Min. auf $100^\circ$	—	27,09	—	26,56	—



ner Versuchsdauer und Temperatur benutzt. Der Extrakt war im Sommer gewonnen worden von vier Karpfen, die 1,99 g Pankreas lieferten.

Bei diesen Versuchsergebnissen ist folgendes zu bemerken: Da die Titration eine Resttitration ist, müssen die Zahlen für die Kolben A bis F von denen der Kontrollkolben abgezogen werden um die Anzahl Kubikzentimeter Thiosulfat zu erhalten, welchen die Enzymkraft entspricht. So wurde beim ersten Versuch A von AA subtrahiert, B und C vom Mittelwert zwischen AA und DD, die übrigen von DD. Wie man sieht, ist bei diesen pH-Werten die Spaltung durch das saure Gemisch nicht viel größer als bei Neutralität; der Unterschied liegt fast innerhalb der Grenzen der Versuchsfehler. Auch andere Versuche lehrten mich, daß zwischen pH 5,5 und 8 die Hydrolyse durch die Puffergemische an sich keine bedeutenden Unterschiede aufweist und man also nicht für jeden Kolben eine Kontrolle anzustellen braucht. Daher habe ich auch beim zweiten Versuch nur eine Kontrolle bei pH 7,1 angestellt.

Da die Gemische genau in gleicher Weise zusammengesetzt waren, habe ich nur für eine Serie die pH-Werte ermittelt. Auch zwischen den Mischungen mit frischem und gekochtem Saft ist der pH-Unterschied sehr gering, wie diesbezügliche Messungen ergaben.

Aus der Tabelle AI ersieht man, daß in einer Zone zwischen pH 6,1 und 7,1 die beste Wirkung stattfindet (Kurve I Abb. 1). Doch sind die Unterschiede bei der 24stündigen Dauer nicht sehr erheblich, das Substrat war dafür in Kolonne I etwas zu weit umgesetzt. Die Kolben mit den äußersten pH-Werten gaben noch schwache Jodreaktion. Auch die Anwesenheit einer kräftigen Maltase würde zur Folge haben, daß die Unterschiede verwischt werden.

In der zweiten Tabelle sind die Unterschiede besser akzentuiert (Kurve II, Abb. 1). Der Verlauf der Kurven dürfte darauf hindeuten, daß bei längerer Zeitdauer das pH-Optimum sich etwas nach dem neutralen Punkt verschiebt. Das würde übereinstimmen mit den Beobachtungen von SJÖBERG (115) über Phaseolusamylase. Er findet ein Optimum bei pH 5,2. Bei längerer Dauer verschiebt sich das Wirkungsoptimum nach dem Resistenzoptimum, das bei pH 6,7 liegt. Nach RINGER und VAN TRIGT (105) ist das pH-Optimum für Speicheldiastase etwa 6. Für Pankreasdiastase von Säugetieren ist es 6,8 [WILLSTÄTTER c. s. (143), SHERMAN, THOMAS und BALDWIN (113a)].

Nach Abschluß der Titrationsen in Kolonne I wurde der Inhalt der Kolben B, C und D, worin am meisten verdaut war, zusammengefügt; 10 ccm der Mischung mit 0,4 g Natriumazetat und 0,2 g flüssigem Phenylhydrazin eine Stunde auf einem kochenden Wasserbade erhitzt. Eine genügende Menge Osazon bildete sich; bei mikroskopischer Untersuchung ergab sich, daß weitaus der größte Teil (nach Schätzung etwa  $\frac{9}{10}$ ) aus Kristallen von Glukosazon bestand, obwohl auch eine gewisse Menge



Maltosazonkristalle anwesend war. Die Verdauung war also in diesem Versuch weiter gegangen als Maltose und fast alle entstandene Maltose in Glukose verwandelt. Dieses Resultat beweist, daß auch eine kräftige Maltase anwesend ist, die wir später näher studieren wollen. Es wird sich dann ergeben, daß das pH-Optimum dieser Maltase denselben Wert hat, wie das der Diastase, aber daß die ganze Optimalzone wahrscheinlich etwas breiter ist. Das kann die etwas abgeflachte Form der Kurven von Abb. 1 erklären. Die Maltase ist in viel geringerer Menge anwesend

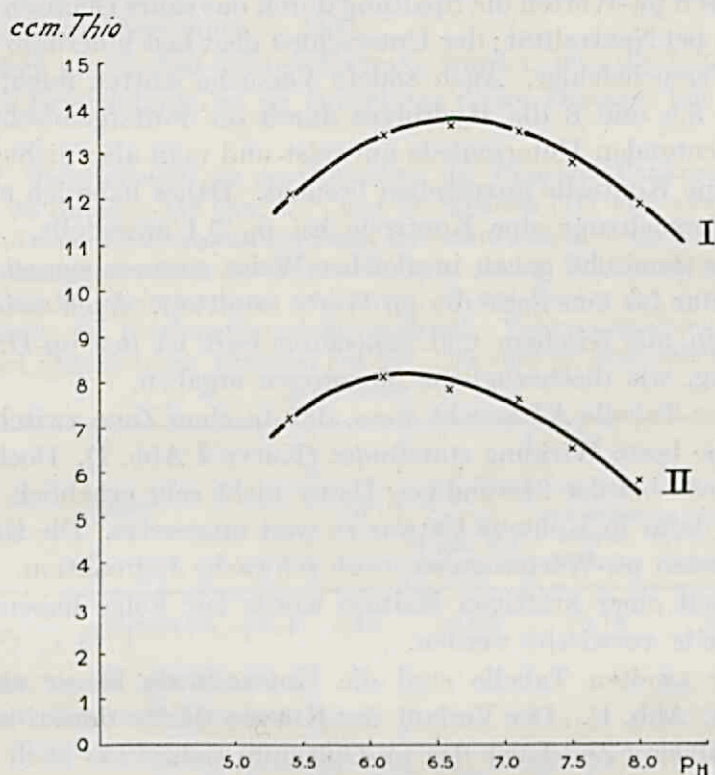


Abb. 1. Abhängigkeit der Wirkung von *Cyprinus*-Pankreasamylase von der Wasserstoffzahl (pH). I bei 38° und 24 Stunden Versuchsdauer; II bei 27° und 24 Stunden Dauer. Wegen der gleichzeitigen Wirkung der Maltase stellen diese Kurven die Summen der Amylase- und Maltasewirkungen vor. Durch die Wirkung des letzteren Enzyms erscheinen die Kurven verflacht. Siehe später.

wie die Amylase, so daß sie nur beim Gebrauch von ziemlich großen Mengen Extrakt, wie sie hier benutzt wurden, sich in meßbarem Maße geltend machen kann. Weil es nicht zu bestimmen ist<sup>1)</sup>, wieviel Maltose und Glukose nebeneinander anwesend sind, habe ich den Spaltungsgrad in Zentimeter Thio angegeben. Der Reduktionswert geht der Zucker-

<sup>1)</sup> Wenigstens nicht ohne umständliche Manipulationen, die auch größere Mengen Material erfordern würden. Bei einer Rohrzuckerinversion ist der Grad der Hydrolyse dadurch einfach titrimetrisch und polarimetrisch bestimmbar, weil für jedes verschwundene Mol Rohrzucker 1 Mol Glukose und 1 Mol Fruktose entstanden ist. Das ist hier nicht der Fall.

menge nicht ganz parallel, doch sind auf dieser kleinen Strecke die Unterschiede nicht so erheblich, daß es die Form der Kurven stark beeinflussen kann.

Ich bestimmte nun weiter die  $p_H$ -Optima dieses Enzyms für eine Versuchsdauer von  $4\frac{1}{4}$  Stunden bei  $27^\circ$  und  $16,5^\circ$  um zu sehen, ob eine Verschiebung des Optimums eintrete. Dies wäre auch von Interesse für spätere Vergleichung des Temperatureinflusses auf die Amylasen der Fische und Säugetiere. Ich wählte eine noch geringere Enzymmenge um deutlichere Unterschiede zu erhalten, auch schien es mir besser, um (anschließend an die Versuche von RINGER für Speicheldiastase) die Salzmenge bis auf die Hälfte zu verringern. Unter diesen neuen Umständen mußte ich also die Bestimmung des Optimums bei  $38^\circ$  und  $4\frac{1}{4}$  Stunden wiederholen, um das Ergebnis mit den neuen Resultaten vergleichen zu können. Außerdem führte ich bei einem  $p_H$  von 6,4 eine Bestimmung bei  $0^\circ$  aus. Für  $38^\circ$  und  $27^\circ$  benutzte ich die erwähnten Thermostaten; für  $16,5^\circ$  ein Aquarium mit Wasser auf Zimmertemperatur, worin die Temperatur zwischen  $16$  und  $17^\circ$  wechselte, für  $0^\circ$  stellte ich den Erlenmeyer-Kolben gut umschlossen in Eis. Die Resultate sind in der folgenden Tabelle B zusammengefaßt.

Bei diesen Versuchen muß ich darauf hinweisen, daß die Versuchsfehler hier etwas höher taxiert werden müssen, wie bei den vorigen Tabellen, da die Erhitzung auf freier Flamme oder in einem Wasserbade nacheinander zu etwas größeren Fehlern führt, als die gleichzeitige Erhitzung im Wasserbade von  $90$  oder  $100^\circ$ . Der Titrationsfehler zusammen mit den Fehlern, die sich unvermeidlich beim Ansetzen des Versuches durch Verteilung von Enzym, Puffer und Stärkelösung ergeben, schätze ich auf höchstens  $0,3$  ccm; diese Abweichung kann unter Umständen viel geringer sein, wie aus der Tabelle auf S. 482 ersichtlich ist. Wenn ich sie hier auf höchstens  $0,5$  ccm schätze beeinträchtigt dies die Resultate nur sehr unwesentlich<sup>1)</sup>.

Die so für  $38^\circ$  gefundene Kurve (I, Abb. 2) stimmt sehr gut überein mit denjenigen des vorigen Versuches, nur sind die Unterschiede, wie zu erwarten, schärfer akzentuiert. Es findet sich eine Optimalzone zwischen  $p_H$  6 und 6,5, bei  $p_H$  7 ist die Wirkung schon bedeutend geringer. Die Lage der Kurven, die bei den niederen Temperaturen erhalten sind (Abb. 2, II und III), zeigen innerhalb der Fehlergrenzen keine großen Unterschiede hinsichtlich der Optimalzone. Allein an der sauren Seite der Optimalzone fällt die Kurve von  $38^\circ$  steiler ab als die bei  $27^\circ$  und  $16,5^\circ$ . Noch größeren Unterschied in dieser Richtung zeigen die Kurven auf der alkalischen Seite. Dies stimmt zu unserem gegenwärtigen

<sup>1)</sup> Daß dieser Fehler im Parallelversuche nicht überschritten wird, zeigt die Betrachtung der Zahlen für AA in Kolonne I, II und III und von DD Kolonne I und II der Tabelle B.



**Tabelle B.** Bestimmung des  $p_H$ -Optimums der Pankreasdiastase von *Cyprinus carpio* bei  $38^\circ$ ,  $27^\circ$  und  $16,5^\circ$  und  $4\frac{1}{4}$  Stunden Versuchsdauer. 1,75 cem Extrakt, verdünnt mit dest. Wasser bis 35 cem und davon 5 cem pro Kolben. Jeder Kolben enthält eine Menge Enzym, herstammend von etwa 25 mg Pankreas. Zuckertitration: jodometrisch.  $p_H$ -Bestimmung: elektrometrisch. Versuche nacheinander eingesetzt und jeder einzeln abgebrochen durch Erhitzen auf freier Flamme während genau 2 Minuten oder auf einem Wasserbade während genau 10 Minuten.

Versuch	Inhalt	I. 7. X. 1925: $38^\circ$			II. 12. X. 1925: $27^\circ$			III. 14. X. 1925: $16,5^\circ$			IV. 15. X. 1925: $0^\circ$		
		$p_H$	cem Thio. pro 20 cem unt. Flüssigkeit	cem Thio. auf Rechnung Enzymwirkung	$p_H$	cem Thio. pro 20 cem unt. Flüssigkeit	cem Thio. Enzymwirkung	$p_H$	cem Thio. pro 20 cem unt. Flüssigkeit	cem Thio. Enzymwirkung	$p_H$	cem Thio. pro 20 cem unt. Flüssigkeit	cem Thio. Enzymwirkung
A <sup>1)</sup>	10 cem prim. Phosphat; 35 cem 1 proz. Stärkel., 5 cem verd. Extrakt (= ungef. 25 mg Pankreas)	4,685	25,65	0,67	4,96	20,90	5,16	5,14	22,10	4,16			
B	9 cem prim., 1 cem sec. Phosph.; 35 cem 1 proz. Stärkel.; 5 cem Extrakt	6,00	11,10	15,29	6,00	11,78	14,25	6	14,53	11,73			
C	7 cem prim., 3 cem sec. Phosph.; 35 cem 1 proz. Stärkel.; 5 cem Extrakt	6,57	10,35	16,04	6,6	12,39	13,64	6,6	14,29	11,97	6,6	22,32	3,94
D	4 cem prim., 6 cem sec. Phosph.; 35 cem Stärkel.; 5 cem Extrakt	7,09	12,64	13,81	7,1	13,77	12,22	7,1	15,22	11,04			
E	2 cem prim.; 8 cem sec. Phosph.; 35 cem Stärkel.; 5 cem Extrakt	7,48	15,59	10,57									
F	0,5 cem prim.; 9,5 cem sec. Phosph.; 35 cem Stärkel.; 5 cem Extrakt	8,00	19,25	6,62									
AA	wie A, Extr. vor Vers. 10 Min. bei $100^\circ$		26,32			26,06			26,26				
DD	wie D, Extr. vorher 10 Min. bei $100^\circ$		26,45			25,99							
FF	wie F, Extr. vorher 10 Min. bei $100^\circ$		25,87										

1) In Tabelle II und III war in A 9,9 prim. und 0,10 sec. Phosphat, daher der höhere  $p_H$ -Wert.

Wissen von dem schädigenden Einfluß der Temperatur auf die Enzyme: Je höher die Temperatur, je stärker wird bei gleicher Zeitdauer, bei einem  $p_H$ , welcher entfernt vom Optimum der Resistenz liegt (das für tierische Amylasen nicht weit vom Wirkungsoptimum liegt), die Vernichtung des Enzymes sein und je steiler werden die Kurven beiderseits des Optimums abfallen. Von einer Verschiebung vom Optimum bei niedriger Temperatur ist aber nichts zu sehen. Für Amylasen liegen wohl die

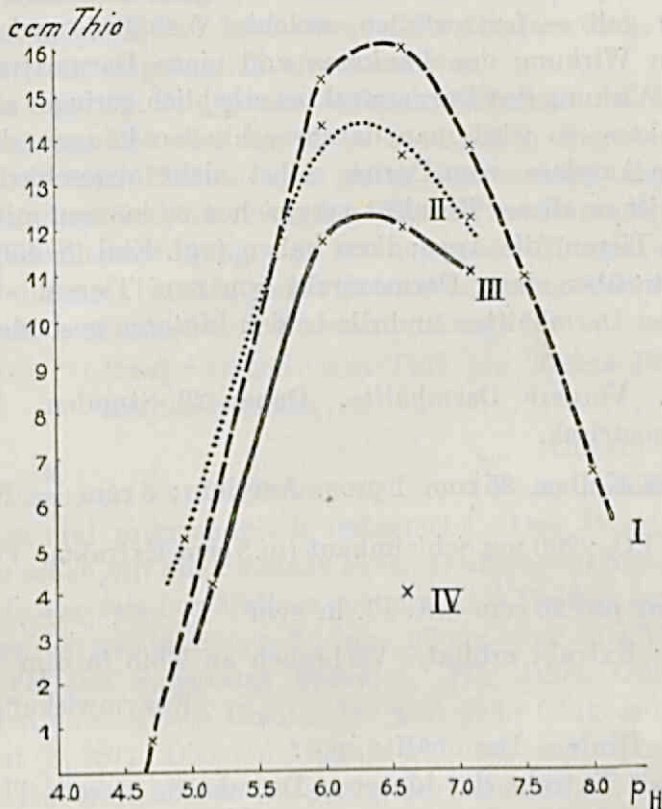


Abb. 2. Abhängigkeit der Wirkung von *Cyprinus*-Pankreasamylase von der Wasserstoffzahl bei  $4\frac{1}{4}$  Stunden Wirkungsdauer und bei 38° (I), 27° (II) und 16,5° (III). Der Punkt IV stellt die Wirkung des Enzyms unter diesen Umständen bei 0° vor. Der Unterschied zwischen der Form der Kurven und derjenigen von Abb. 1 wird dadurch bedingt, daß in dieser Zeit die Maltasewirkung noch nicht zur Geltung kommt.

Optima von Wirkung und Resistenz zu dicht nebeneinander um eine solche Verschiebung erwarten zu lassen. Vgl. Einleitung S. 457, 458.

Mit diesen und später zu erwähnenden Versuchen war nun die Menge des bisher gebrauchten Extraktes fast erschöpft und ich konnte bei 0° nur eine Bestimmung ausführen, bei einem  $p_H$ , bei dem auch bei dieser Temperatur das Optimum erwartet werden konnte. Findet doch auch von 38° bis 16,5° keine Verschiebung des Optimums statt. Die Wirkung des Enzymes bei 0° bei einem  $p_H$  von 6,6 und den oben erwähnten Umständen ist durch den Punkt IV in Abb. 2 vorgestellt. Wie man sieht,



ist bei 0° die Wirkung des Enzymes verhältnismäßig noch recht erheblich. Die Betrachtung dieser Versuchsergebnisse vom Standpunkte der VAN 'T HOFF'schen Temperaturregel aus wird vielleicht in einer späteren Veröffentlichung folgen können.

*Darm von Cyprinus.* Nachdem ich nun das pH-Optimum dieses Enzymes in dieser Weise unter verschiedenen Umständen studiert hatte, versuchte ich einige Tatsachen von mehr biologischem Interesse zu ermitteln. Hier galt es festzustellen, welches Verhältnis zwischen der amylytischen Wirkung des Pankreas und eines Darmextraktes besteht. Ist die Wirkung des Darmextraktes erheblich geringer als die des Pankreasextraktes, so wird man daraus schließen können, daß wahrscheinlich eine Amylase vom Darne selbst nicht abgeschieden wird. Von Interesse ist es, dieses Resultat vergleichen zu können mit den Ergebnissen von Tieren, die Appendices haben (vgl. Einl. S. 450 u. 455).

Ich verfügte über einen Darmextrakt von zwei Tieren, wovon die beiden vorderen Darmhälften und die beiden hinteren gesondert extrahiert waren.

Versuch 1. Vordere Darmhälfte. Dauer 22 Stunden.  $T = 27^\circ$ . Titration jodometrisch.

1. In einem Kolben 35 ccm 1 proz. Amylum; 8 ccm $\frac{M}{15}$ $KH_2PO_4$ ;	
2 ccm $\frac{M}{15}$ $Na_2HPO_4$ ; 200 mg Schleimhaut (in 5 ccm Extrakt). Verbrauch	
an $\frac{N}{10}$ Thiosulfat pro 20 ccm unt. Fl. in ccm . . . . .	9,60
1a. Wie 1; Extrakt erhitzt. Verbrauch an Thio in ccm . . . . .	1,13
Enzymwirkung	8,47

Versuch 2. Hintere Darmhälfte usw.

2. Wie 1 mit Extrakt der hinteren Darmhälfte	ccm Thio	8,90
2a. Wie 2, Extrakt erhitzt . . . . .		1,14
		7,76

Die beiden Darmhälften haben also eine viel geringere Konzentration an Amylase, wie das Pankreas, wo beinahe das Doppelte dieser Werte schon in 4 Stunden erreicht wurde mit 25 mg festem Pankreas pro Kolben. Roh gerechnet kann man von einer 80—90fach stärkeren Wirkung des Pankreasextraktes sprechen, wobei ich diese Zahl unter allem Vorbehalt nenne. Jedenfalls ist die Wirkung im Darne aber deutlich vorhanden und noch etwa 16mal stärker als die eines entsprechend angefertigten Pankreasextraktes eines Hechtes. Die Wirkung der zweiten Hälfte ist etwas geringer als die der ersteren. Der Unterschied ist aber zu gering, um daraus Schlußfolgerungen zu ziehen. Während die viel geringere Wirkung der Darmextrakte dafür spricht, daß es sich



wohl um adsorbierte Pankreasamylase handele, würde der Umstand, daß die zweite Hälfte der ersteren nur wenig an Wirksamkeit nachsteht, dagegen sprechen. Allerdings hat der Darm von *Cyprinus*, obwohl er ziemlich stark gewunden ist, nicht mehr als zweimal die Länge des Körpers, so daß von einer Verbreitung des Pankreasenzymes über eine sehr lange Strecke keine Rede ist. Die Därme waren aber vor ihrer Extraktion mit Wasser ausgepült worden (wahrscheinlich wohl in toto und von vorn nach hinten, ich notierte dies nicht ausdrücklich) und es ist sehr gut möglich, daß dabei etwas mehr Amylase in die hinteren Teile geraten ist, als ursprünglich anwesend war.

Darum habe ich den ganzen Versuch wiederholt mit Pankreas- und Darmextrakten, alle von denselben zwei neuen Tieren herstammend, wobei die beiden Hälften nun gleich voneinander abgebunden und streng gesondert verarbeitet wurden. Diese Tiere waren Sommerkarpfen.

Die Versuchsanordnung war auch, was die Mengen des Extraktes und des Substrates betrifft, genau gleich den vorigen Versuchen.  $T=27^{\circ}$ .

Versuch 1. Pankreas: 4 Stunden (25 mg)

Hauptversuch: cem Thio pro 20 cem Fl. . . . .	9,71
Kontrollversuch . . . . .	26,20
Enzymwirkung	16,49

Die Flüssigkeit wurde filtriert und von 10 cem derselben ein Osazon angefertigt und mikroskopisch untersucht. Das Präparat gab Maltosazon zu sehen mit einer kleinen Menge Glukosazonkristallen. In dieser Zeit wurde also fast nur Maltose gebildet. Als Maltose berechnet betrug die Menge des entstandenen Zuckers 92 mg, was eine Umsetzung von etwa 65 vH des Substrates bedeutet. Wir sahen früher, daß nach 24 Stunden unter diesen Umständen weit mehr Glukose als Maltose anwesend ist (S. 467). Dies weist darauf hin, daß im Karpfenpankreas eine Maltase vorkommt, aber in viel geringerer Konzentration als die Amylase. Im folgenden Kapitel werden wir durch direkte Einwirkung des Pankreasextraktes auf Maltose diese Ansicht befestigt finden.

Versuch 2. Erste Darmhälften. Mengen usw. wie oben. Titration pro 10 cem Flüssigkeit. Zeit 24 Stunden.

Hauptversuch . . . . .	16,06
Kontrollversuch . . . . .	26,45
Enzymwirkung	10,39

Versuch 3. Zweite Darmhälfte.

Hauptversuch . . . . .	15,20
Kontrollversuch . . . . .	26,43
Enzymwirkung	11,23

Hier hat also die hintere Hälfte eine etwas größere Wirkung; die Verteilung der Amylase durch die Darmwand vorn und hinten weist keinen



erheblichen Unterschied auf. Die Zweifel an dem vorigen Versuch waren also unberechtigt. Von 2 und 3 (Hauptversuche) wurde ein Osazon angefertigt. Es war alles Maltosazon. Im Versuch 3 beträgt die entstandene Zuckermenge rund 60 mg und es wurde somit etwa 43 vH des Substrates umgesetzt. In 2 etwas weniger.

Eine achtmal größere Menge Darmextrakt setzt in sechsmal soviel Zeit eine ungefähr gleichgroße Substratmenge um, die vom Pankreasextrakte in 4 Stunden bis Maltose abgebaut wird<sup>1)</sup>. Die Menge (Konzentration) der Amylase berechnet sich hieraus für das Pankreas auf rund 40–50mal derjenigen des Darmextraktes. Diese Zahl ist noch für den Darmextrakt zu günstig, da ein Umsatz von 65 vH Substrat beim Pankreas schon etwas zu weit geht, um noch den vollen Umfang der Wirksamkeit zu messen. Bei der geringen Menge Extrakt, die zur Verfügung steht und der Kostbarkeit desselben, habe ich die Bestimmung nicht wiederholt.

Es muß zu diesen Versuchen noch bemerkt werden, daß der Darmkanal von jedem der Karpfen 80 cm lang war, und daß 35 cm für die vordere Hälfte und 35 cm für die hintere Hälfte benutzt wurde. 10 cm dazwischen wurden abgebunden, um den Unterschied der Hälften, wenn vorhanden, desto deutlicher zu machen.

*Aktivierung durch Natriumchlorid.* Über die Aktivierung der *Cyprinus*-Diastase durch Salze stellte ich nur einen einzigen Versuch an. In zwei Kolben wurden 25 ccm 1 proz. Stärkelösung und je 6 Tropfen Pankreasextrakt von *Cyprinus* gebracht, zu dem einen noch 25 ccm einer 8 vT NaCl-Lösung, zu dem anderen 25 ccm destilliertes Wasser zugesetzt. Beide wurden 22½ Stunden bei 27° gehalten, der erste zeigte pro 20 ccm eine Enzymwirkung von 2,87 ccm 10 Thiosulfat, der zweite von 2,47 ccm, so daß ein Unterschied zugunsten des salzhaltigen Kolbens nicht zu verkennen, wenn auch nicht sehr deutlich war. Vielleicht war die Enzymmenge zu gering, oder aber verfügte der Pankreasextrakt selbst außerdem über eine genügende Salzmenge, wodurch der Unterschied gering wurde. Da ich nicht über eine Vorrichtung verfügte, das Enzym schnell genug absolut salzfrei zu machen, habe ich diese Untersuchung nicht weiter fortgesetzt.

*Wirkung der Galle von Cyprinus.* Von den zwei Karpfen des vorletzten Paragraphen wurde den Gallenblasen nach Ligatur des Ausführganges die Galle entnommen. Der pH dieser Flüssigkeit wurde auf 5,541 bestimmt<sup>2)</sup>. Mit der Flüssigkeit, die nach der Bestimmung übrig war, wurde folgender Versuch angestellt:

<sup>1)</sup> Man beachte, daß für das Pankreas 20 ccm, für den Darm pro 10 ccm titriert wurde!

<sup>2)</sup> Herr Prof. RINGER war so freundlich diese Messung mit seiner Elektrode auszuführen.



35 ccm 1 proz. Amylum, 9 ccm Puffer (2 T. prim., 1 T. sec. Phosphat, um den pH etwas zu erhöhen), 5 ccm Wasser und 1,2 ccm Galle. Nach Zusatz von Toluol wurde 20 ccm des Gemisches titriert, sie verbrauchten 25,69 ccm Thio. Kontrolle der Reagentia 27,62; für reduzierende Substanz wurde also fast 2 ccm verbraucht. Nach 24 Stunden war nur 3,43 ccm Thio nötig und also die 22,26 ccm Zunahme auf Rechnung der Enzymwirkung zu stellen. Fast die ganze Menge des Substrates war umgesetzt.

Dieser Versuch wurde nun zur genaueren Feststellung der Enzymmenge wiederholt mit einer Menge von 0,2 ccm Galle eines anderen Tieres unter übrigens gleichen Umständen. Pro 10 ccm untersuchter Flüssigkeit wurde hier in 24 Stunden eine Enzymwirkung übereinstimmend mit 6,43 ccm 0,1 N Thiosulfat gefunden. Es ist also unzweifelhaft eine Diastase in der Galle vorhanden, aber ihre Wirkung ist gering im Verhältnis zu derjenigen der Pankreasdiastase und etwa von der Größenordnung der Darmdiastase.

*Petromyzon: Darm.* Zufälligerweise verfügte ich über einen Darmextrakt zweier Petromyzonten. Die verwendete Schleimhautmenge war nicht genau bestimmt, der Extrakt war aber gewiß nicht schwächer als der oben verwendete vom *Cyprinus*-Darm.

Das Substrat war wieder 35 ccm Am. 10 Puffer (pH etwa 6,6); dazu 1 ccm Extrakt; 22 Stunden, 27°. Pro 20 ccm untersuchter Flüssigkeit ergab sich ein Unterschied von 1,25 ccm  $\frac{N}{10}$  Thio mit der Kontrolllösung, die gekochten Extrakt enthielt. Die Amylasewirkung war daher sehr gering und es ist wohl zweifelhaft, ob man diese nicht als eine Wirkung von Gewebsamylase betrachten muß. Das Pankreas von *Petromyzon* wurde erst vor kurzem mikroskopisch nachgewiesen. Es war daher unmöglich daraus einen Extrakt herzustellen. Ob man nun die gefundene Amylase für ein Gewebsenzym oder für ein Verdauungsenzym halten will, steht dahin; vom „teleologischen“ Standpunkte kann es jedenfalls nicht wundernehmen, daß bei einem blutsaugenden Parasiten, wie *Petromyzon*, eine Verdauungsamylase fehlt, bzw. nur in sehr geringer Menge vorhanden ist.

*Esox lucius: Pankreas und Darm.* Der Darmkanal des Hechtes ist sehr einfach gebaut: der Magen ist gerade, nicht V-förmig und ohne Blindsack; der Dünndarm weist nur eine einzige Biegung auf und ist zu beiden Seiten derselben gerade; das Pankreas verläuft den Darmkanal entlang in ziemlich dicken nicht sehr verzweigten Strängen, die sich leicht isolieren lassen, da sie auch mit der Leber nicht stark verwachsen sind. Bei gezüchteten Hechten fand ich das Pankreas oft von



einem großen Fettstrange umgeben, wodurch es für meinen Zweck unbrauchbar war. Für die Verdauungsuntersuchungen sind daher freilebende Tiere zu benützen.

Zur Verfügung stand ein Extrakt von 7,5 g Pankreas auf 75 ccm Glyzerin. Nachdem ich mich vergeblich bemüht hatte mit diesem Extrakte, zehnmal mit Salzlösung verdünnt und filtriert, eine Wohlgemuthzahl ( $D_{24h}^{38^\circ}$ ) zu erhalten (es war dies bei *Rana* wohl möglich) und auch der Versuch, die Jodreaktion durch größere Mengen Extrakt zum Verschwinden zu bringen, keine deutliche Resultate gehabt hatte, schritt ich zur Zuckertitration bei bestimmten  $p_H$ -Werten. (S. Tabelle C.)

In diesem Versuch ist für die Kolben A und AA  $p_H$  bestimmt worden und die Werte weisen nur einen Unterschied von 0,04 auf. Statt im

**Tabelle C.** Bestimmung des  $p_H$ -Optimums der Pankreasamylase *Esox* bei  $38^\circ$  und 24 Stunden Versuchsdauer. 1 Volumen Glyzerinextrakt mit 3 Vol. dest. Wasser verdünnt; von diesem Gemisch wurden 5 ccm zu jedem Kolben zugesetzt, so daß diese eine Menge Extrakt enthalten aus etwa 400 mg Pankreas. Zuckertitration oxydimetrisch (nach SCHOORL).  $p_H$ -Bestimmung elektrometrisch (in D- und E-kolorim. mittels Paranitrophenol). Verdauung abgebrochen durch gleichzeitiges Erhitzen auf  $100^\circ$  während 10 Minuten. 25. und 26. Mai 1925.

Marke	Inhalt	$p_H$	ccm 1,07 N K Permanganat pro 20 ccm unt. Flüssigkeit	Durch Enzym- wirkung verursa. Reduktion in mg Cu <sup>1)</sup>
O	20 ccm prim. Phosph.; 25 ccm 1 proz. Stärkelösung; 5 ccm Extrakt (entspr. $\pm 400$ mg)	4,80	1,87	6
OO	wie O; Enzym vor Versuch auf $100^\circ$	—	0,98	5
A	18 ccm prim., 2 ccm sec. Phosph.; 25 ccm Stärke, 5 ccm Extrakt	6,02	1,69	—
AA	wie A; Extrakt erhitzt	5,98	0,93	—
B	14 ccm prim., 6 sec. Phosph.; Am. sol. und Enzym wie oben.	6,50	2,03	7
BB	wie B usw.	—	0,96	—
C	8 ccm prim., 12 sec. Phosph.; Am. sol. und Enzym wie oben.	7,01	2,07	8
CC	wie C usw.	—	0,92	—
D	4 ccm prim., 16 sec. Phosph. usw.	7,2	1,89	6
DD	Mittel aus übrigen Kontrollen	—	0,95	—
E	1 ccm prim., 19 sec. Phosph. usw.	7,6	1,24	2
EE	Mittel aus übrigen Kontrollen	—	0,95	—

<sup>1)</sup> Ich gebe hier die Reduktion in mg Cu an, weil ich beim Anstellen dieses Versuches noch nicht wußte, welcher Zucker entsteht. Über diese kleine Strecke ist die Reduktionszunahme proportional der Zuckermenge.



Hauptversuch kann man also im Kontrollversuch den  $pH$  bestimmen und umgekehrt. Die Titrationsen der Kontrollversuche stimmen sehr gut überein. Für DD und EE habe ich daher das Mittel aus den anderen Bestimmungen verwendet. Die beobachtete Amylasewirkung ist sehr gering. Da die Titrationsen oxydimetrisch vorgenommen sind, ist die Genauigkeit groß genug die Werte in einer Kurve darzustellen (Abb. 3). Diese Kurve<sup>1)</sup> verläuft regelmäßig und gibt eine Optimalzone zwischen  $pH$  6,5 und 7,0. Nur der Punkt für O paßt nicht in dieser Kurve. Ich glaubte zuerst, daß dies seine Erklärung finden könnte in der Wirkung einer Maltase, die dann ihr Optimum bei niedrigerem  $pH$  haben würde; aber im folgenden Kapitel wird sich ergeben, daß eine Maltase in demselben Hechtpankreas-extrakt nicht anwesend ist. Dann bleibt wohl nichts anderes übrig als an einen Versuchsfehler zu denken, zumal da die Mengen gering sind. Da im übrigen die Resultate in gutem Einklang stehen mit den am Karpfen gewonnenen, so behält der übrige Teil der Kurve seinen Wert. Da der Amylase bei der Verdauung keine wichtige Rolle zukommen kann, habe ich davon abgesehen, den Versuch zu wiederholen. Unter gleichen Umständen liefert eine 16mal geringere Menge Karpfenextrakt in vier Stunden (sechsmal weniger Zeit) 16,04 ccm Thio als Resultat, hat also eine ungefähr 1500mal stärkere Wirkung. (Tabelle B I, S. 470.)

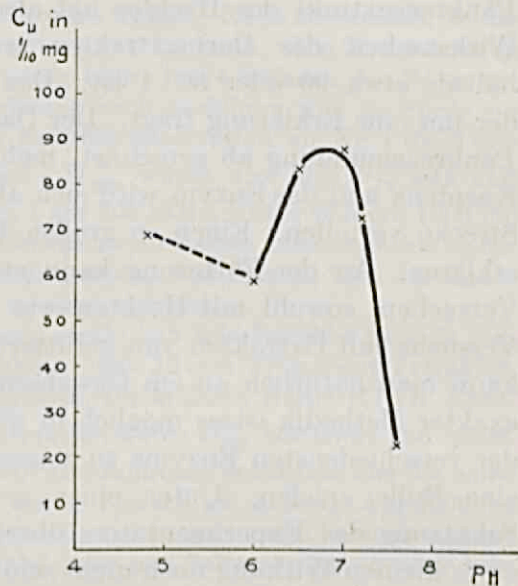


Abb. 3.  $pH$ -Aktivitätskurve der Pankreasamylase von *Esox* bei 38° und 24 Stunden Versuchsdauer. Die Reduktion ist hier in Zehntel mg Cu angegeben.

Es wurde gelegentlich behauptet, daß bei Hungertieren ein Verlust an Enzym stattfindet und da die verwendeten Hechte tatsächlich einige Zeit gehungert hatten, so stellte ich noch einen Versuch an mit einem Extrakt von Tieren, die in voller Verdauung getötet wurden.

35 ccm 1 vH Stärke, 10 ccm Phosphatpuffer (8 p. 2 s.), 5 ccm Extrakt Hecht, übereinstimmend mit 200 mg festem Pankreas, 10 Tropfen Toluol, 22 Stunden bei 27°. Thio: 3,33 ccm

Gekochte Kontr.: 1,21 „

Enzymwirkung pro 20 ccm unt. Fl. 2,12 ccm.

<sup>1)</sup> Diese Kurve sollte um einen vertikalen Teilstrich (1 mg Cu) dichter bei der Abszisse liegend gedacht werden. Durch ein Versehen (ohne Einfluß auf ihre Form) entspricht sie den Zahlen nicht ganz genau.



Da früher 400 mg verwendet wurden, ist die Wirkung hier viermal stärker, bleibt aber doch von derselben Größenordnung (375 mal stärker als Karpfenextrakt).

Es wurden nunmehr einige Versuche mit dem Darmextrakt desselben Hechtes angestellt. Die Versuchsanordnung ist wie die vorige, nur daß hier eine Menge Extrakt mit 250 mg verwendet wurde. Der Unterschied zwischen der Kontrolle und dem Hauptversuch betrug 0,96 ccm Thio. Umgerechnet auf 200 mg würde das etwa 0,80 ccm sein, während der Pankreasextrakt 2,12 ccm Thio verbrauchte. Der Pankreasextrakt des Hechtes hat also etwas weniger als die dreifache Wirksamkeit des Darmextraktes, während beim Karpfen das Verhältnis etwa 90 oder 50:1 ist. Das ist ein auffallender Unterschied, der um eine Erklärung fragt. Der Darmkanal des Hechtes ist, von der Pankreasmündung ab gerechnet, mehr als zweimal kürzer als der des Karpfens und das Enzym wird sich also beim Hecht über eine kleinere Strecke verteilen. Einen so großen Unterschied kann dies aber nicht erklären. An der Fütterung kann es auch nicht liegen, denn bei den Versuchen, sowohl mit Hechten wie mit Karpfen, wurde ein Teil der Versuche mit Extrakten von gefütterten Tieren ausgeführt. Schließlich kann man natürlich an ein Gewebsenzym denken, denn mit genügend exakter Methodik ist es möglich in sehr vielen Geweben kleine Mengen der verschiedensten Enzyme zu zeigen, die dann im Haushalt der Zelle eine Rolle spielen. Unter einer gewissen Grenze (die übrigens der Schätzung des Experimentators überlassen bleibt) kann man also aus einer kleinen Wirkung noch nicht schließen, daß das Enzym nach außen abgeschieden wird.

Die wahrscheinlichste Erklärung der Tatsache ist die folgende: Wo reichlich Amylase in den Darm abgeschieden wird, wie beim Karpfen, wird eine gewisse Menge an die Darmwand adsorbiert werden, bis diese mit dem Enzym gesättigt ist. Da so reichlich Amylase im Karpfenpankreas vorhanden ist, ist es auch sehr wahrscheinlich, daß diese Sättigung (flacher Teil der Adsorptionskurve) tatsächlich erreicht wird. Wo nun wenig Amylase abgeschieden wird, wie beim Hecht, wird auch in Prozenten ein viel größerer Teil des Enzymes adsorbiert werden können, ehe die Darmwand damit gesättigt ist und wird hier wahrscheinlich die Sättigung nicht einmal erreicht werden, so daß beim Karpfen der Unterschied zwischen der Menge an Pankreas- und Darmamylase viel größer ist wie beim Hecht.

*Rana, Pankreas und Darm.* Zur Orientierung stellte ich im Anfang meiner Untersuchung einige Versuche mit dem Pankreas von *Rana* an, die ich hier einschalten möchte. Ich benutzte dazu ausschließlich die Methode WOHLGEMUTH. Ich gebe hier die Protokolle nebst einigen Bemerkungen.



3. Nov. 1924. Pankreas *Rana* isoliert. Gewicht (oberflächlich zwischen Filtrierpapier getrocknet) 53 mg. Feingeschnitten und mit Seesand und 5 ccm physiol. Kochsalzlösung *Rana* (0,7 vH) angerieben und 24 Stunden extrahiert. Nach Filtrierung ein leicht trübes Filtrat. Hiervon wurde nach WOHLGEMUTH die Diastasezahl bestimmt bei 39° und 24<sup>h</sup>. Durch ein Versehen wurden 10 ccm Amylum 1 vH statt 5 verwendet, daher die gefundene Zahl mit 2 multipliziert werden muß. Es wurde dafür gesorgt, daß in jedem Röhrchen die gleiche Konzentration an NaCl anwesend war. Limes war das Röhrchen Nr. 4. Daraus ergibt sich  $D_{24}^{39} = 2 \times 4 \times 5 = 40$ . Da der Extrakt 1 Teil Gewicht auf 100 Teilen Flüssigkeit enthielt, war pro 1 g Drüsensubstanz berechnet die Zahl = 4000.

12. Nov. 1924. Pankreas *Rana*, Gewicht = 33 mg, zerschnitten und feingerieben mit 6 ccm dest. Wasser und 5 Tropfen Toluol. Nach 20 Stunden wurde der Extrakt filtriert. Er reagierte neutral auf Lackmus. Die Untersuchung nach WOHLGEMUTH ergab als zweifelhaften Limes in 24 Stunden das Röhrchen Nr. 1. Wenn man hier also die Berechnung noch ausführen will, so würde ein extrapoliertes Röhrchen mit doppelter Enzymkonzentration wie Nr. 1 die 5 ccm Amylum wahrscheinlich verdaut haben.  $D_{24}^{39}$  würde also hier 2 $\frac{1}{2}$  sein und da der Extrakt eine Konzentration von 1 auf 200 hatte, würde sich pro 1000 mg D = 500 ergeben, was in Betracht der etwas zweifelhaften Limesreaktion sicher etwas zu hoch gerechnet ist. Ohne Hinzusetzung von Salz ist also die *Rana*-Pankreasdiastase wenigstens achtmal weniger wirksam.

In gleicher Weise untersuchter Darmextrakt gab kein Resultat nach 24 Std.

17. Nov. 1924. 127 mg *Rana*-Pankreas mit 13 ccm Flüssigkeit extrahiert (die Flüssigkeit enthielt zur Hälfte Glyzerin, zur anderen Hälfte 0,7 vH *Rana*-Kochsalzlösung). Nach 24 Stunden Extraktion wurde  $D_{24}^{38}$  bestimmt und gleich 40 gefunden (Limes im Röhrchen Nr. 5). Alle Röhrchen enthielten hier die halbe Konzentration an Kochsalz wie beim ersten Versuch am 3. Nov. Auf 1000 mg umgerechnet war die Diastasezahl also 4000, was zu dem ersten Versuch stimmt.

Darmextrakt lieferte auf diese Weise (also mit Salzzusatz gewonnen) kein Resultat nach 36 Stunden.

Aus diesen Versuchen ergibt sich jedenfalls, daß im *Rana*-Pankreas eine kräftige Diastase sich vorfindet, die durch Salz aktiviert werden kann. Kleine Mengen Diastase werden sich auch im Darne wohl vorfinden, sie konnten aber mit dieser Methode nicht nachgewiesen werden.

Allen Röhrchen wurden 5 oder 7 Tropfen Toluol zugesetzt und für jede Serie war ihnen ein Kontrollröhrchen (gleich Nr. 1) mit 1 ccm gekochtem Extrakt gegenübergestellt worden, das immer Blaufärbung mit Jod zeigte.

Später machte ich einen Versuch zur Orientierung über die Amylase-mengen in Pankreas und Darm mittels Zuckertitration. Die Anordnung war die gleiche wie bei der Vergleichung vom *Cyprinus*-Pankreas und Darm. Gleiche Volumteile Extrakt aus Pankreas und Darm (bzw. 45 und 90 mg entsprechend) wirkten bei bestimmtem pH auf 1proz. Stärke. Nach 5 Stunden gab das Pankreas eine Zunahme von 4,30 ccm 0,1 N Thio pro 10 ccm unt. Flüssigkeit; nach 22 Stunden eine solche von 7,16 ccm. Der Darm nach 23 Stunden eine solche von 0,31 ccm. Der Unterschied in der amylytischen Wirkung zwischen Pankreas und



Darm war hier also auch ungefähr 50fach, während er beim Karpfen rund 50—100fach gefunden wurde.

Nach diesen Versuchen ist die Amylasemenge im *Rana*-Pankreas etwa drei- bis viermal geringer, wie die bei *Cyprinus*. Die WOHLGEMUTH-Zahlen geben für das *Rana*-Pankreas ein noch günstigeres Verhältnis, aber es liegt dies wahrscheinlich an der für *Rana* verwendeten größeren NaCl-Menge, die hier viel Einfluß hat.

Es kann vom biologischen Standpunkte wundernehmen, daß ein Insektenfresser wie *Rana* über eine so wirksame Amylase verfügt, während ein Raubfisch wie der Hecht fast keine Diastase im Pankreas aufweist. Eine Erklärung hierfür ist vielleicht, daß die *Rana*-Larven echte Pflanzenfresser sind.

*Acanthias vulgaris*: Pankreas. Von RICHET (98, 100) wurde die diastatische Wirkung des Pankreas von *Acanthias* und auch von *Cyprinus* und der Schleie erwähnt. SULLIVAN (125) erwähnte eine Diastase im Darne von Haifischen. Es war darum von Interesse die Größe dieser Wirkung kennen zu lernen.

Zehn Pankreas von einem Gewichte von 55 g wurden mir von Helgoland gesandt; sie waren unzerkleinert konserviert in der doppelten Gewichtsmenge unverdünnten Glycerins. Nach Ankunft wurden die Pankreas fein gehackt, mit Quarzsand in einem Mörser zerrieben mit dem Glycerin, worin sie gesandt, und noch 4 Tage der Extraktion überlassen, wonach das Gemisch durch Müllergaze kolliert wurde. Man erhielt etwa 90 ccm Flüssigkeit, so daß 1 ccm von der Extraktion von etwa 600 mg herrührte. 1 ccm dieses Extraktes wurde auf 12 ccm verdünnt mit destilliertem Wasser und von diesem Gemisch 5 ccm einer vorher bereiteten Mischung von 35 ccm 1 vH Stärke und 10 ccm Phosphatpuffer (7 p. 3 s.) zugesetzt bei 27°. Nach Zusatz von 10 Tropfen Toluol wurden 20 ccm jodometrisch titriert und verbrauchten 26,24 ccm  $\frac{N}{10}$  Thiosulfat. Nach 24 Stunden titrierte man abermals 20 ccm, die nun 24,38 ccm Thio verbrauchten. Die Zunahme war 1,86 ccm und die enzymatische Wirkung also von der Größenordnung derjenigen des Hechtexttraktes. In einer gleichartig zusammengesetzten Mischung ohne Toluolzusatz wurde  $p_H$  elektrometrisch bestimmt auf 6,62. Ich habe es für unnötig gehalten bei anderen  $p_H$ -Werten Versuche anzustellen. Da wir das Optimum für die Pankreasamylase von *Cyprinus* und *Esox* fanden bei  $p_H$  6,5, ungefähr demselben Werte, der für Säugetiere gefunden wurde, ist die Annahme, daß diese Amylase nun erheblich davon abweichen würde, gar zu unwahrscheinlich.

Eine andere wichtigere Frage ergibt sich aber. Erhebliche Mengen an Stärke werden die Raubfische nicht zu sich nehmen, daher eine



geringe Amylasemenge in ihrem Darmtraktus sehr gut verständlich ist. Aber in den Muskeln von Fischen, in den Mitteldarmdrüsen von Arthropoden werden ihnen nicht unerhebliche Mengen von Glykogen zugeführt. Daher fragt es sich, ob vielleicht dieses Substrat vom Pankreasextrakt besser abgebaut wird als Stärke. Es würde sich dann ein besonderes Enzym, Glykogenase vorfinden. In der Enzymliteratur wird für die Glykogenspaltung durch Speichel und Pankreassaft ein solches Enzym nicht angenommen, die Wirkung auf Glykogen wird der Amylase zugeschrieben. Bei niederen Tieren aber meinte man einige Male Glykogenspaltung als besondere Enzymwirkung nachweisen zu können, auch da, wo Stärkespaltung fehlte. Ausgemacht ist die Sache keineswegs. Unter den vorerwähnten Umständen wurde die gleiche Menge des Extraktes mit einer etwa 1 proz. Glykogenlösung zusammengebracht. Das Glykogen (ein Präparat von KAHLBAUM) war nicht ganz in Lösung gegangen. Durch Filtrieren erhielt man eine stark opaleszierende Flüssigkeit, deren Opaleszenz sich nach Zusatz des Puffers verstärkte. Anfangstiteration: 27,03; Endtitration: 24,93 nach 24 Stunden. Reduktionszunahme 2,10 ccm. Diese Zunahme ist innerhalb der Fehlergrenzen der von 1,86 bei der Stärke gleich. Zur Annahme einer besonderen Glykogenase bei den Raubfischen, die wenig Amylase in ihrem Pankreas führen, besteht also kein Grund. Die Kohlehydratverdauung spielt hier eine sehr unbedeutende Rolle.

Eine Zusammenfassung über dieses und das folgende Kapitel wird am Schluß des letzteren gegeben.

### Kapitel III.

#### Die Maltasen.

*Esox*: Pankreas und Darm — *Cyprinus*: Darm — *Cyprinus*: Pankreas — *Cyprinus*: Galle — *Cyprinus*: Saccharase — *Rana*: Pankreas und Darm — Zusammenfassung über Amylasen und Maltasen.

Bei der nun folgenden Besprechung meiner Resultate mit Maltase erwähne ich die Tiere und Organe nicht in derselben Ordnung wie bei den Amylasen, sondern in der Reihenfolge wie sie zur Untersuchung kamen. Das hat seinen Grund erstens darin, daß ich im Darne größere Maltasemengen erwartete als im Pankreas (und zwar nach Analogie mit den uns bekannten Verhältnissen bei den Säugetieren) und zweitens in zufälligen Umständen, welche die Beschaffung der nötigen Tiere betreffen.

Wenigstens beim omnivoren Karpfen erwartete ich Maltase im Darmextrakte zu finden. Ich muß im übrigen bemerken, daß auch unsere Kenntnisse von den Verhältnissen bei den Säugetieren und Vögeln, selbst bei den Haustieren, auf der Untersuchung von nur wenigen Arten



beruhen und daß man auch hier noch wohl zu viel die an wenigen Arten gewonnenen Resultate generalisiert hat.

Am Schlusse dieses Kapitels werde ich eine Zusammenfassung geben über die Resultate für Amylasen und Maltasen, samt einer kurzen Diskussion über die einschlägige Literatur über diese Enzyme bei den Säugetieren. Die etwas veränderte Reihenfolge kann also dem Leser keine Schwierigkeiten bei der Vergleichung bieten.

*Esox: Pankreas und Darm.* Zuerst untersuchte ich das Pankreas von *Esox* auf Anwesenheit einer Maltase. Das Resultat war negativ. Ich arbeitete bei  $p_H$ -Werten zwischen 4,7 und 6,6 und fand dabei keinerlei Wirkung, wie die folgende Tabelle (D) zeigen wird.

**Tabelle D.** Abwesenheit der Maltasewirkung im Pankreas von *Esox lucius* bei verschiedenen  $p_H$ -Werten. Glycerinextrakt von *Esox*-Pankreas. Liefert nach Kollieren 3 ccm; verdünnt bis 60 ccm mit dest. Wasser und von diesem Gemisch 5 ccm pro Kolben, also eine Menge, herrührend von etwa 200 mg Pankreasfrischgewicht. Temperatur 38°, Zeit 25 Stunden.  $p_H$  in V und W elektrometrisch, in den übrigen Kolben kolorimetrisch. Bei allen Kolben 10 Tropfen Toluol. Zuckertitration oxydimetrisch. 30. Juni bis 1. Juli 1925.

Marke	Inhalt	$p_H$	ccm 1,07 N K Permanganat pro 10 ccm unt. Flüssigkeit
V	20 ccm $\frac{M}{15}$ prim. Phosphat; 25 ccm 2 prom. Maltoselösung; 5 ccm verd. glyc. Pankreasextrakt (= 200 mg Frischgewicht)	4,7	1,97
W	19,7 ccm prim., 0,3 ccm sec. Phosph.; Mal- tose und Extrakt wie oben	5,3	1,92
X	19 ccm bzw. 1 ccm Phosph.; übrige wie o.	5,75	1,96
Y	18 ccm bzw. 2 ccm Phosph.; übrige wie o.	6,1	1,92
Z	14 ccm bzw. 6 ccm Phosph.; übrige wie o.	6,6	1,90
Kontrollen:			
VV	wie V mit Extrakt vorher 10' auf 100°	—	1,94
ZZ	wie Z mit Extrakt vorher 10' auf 100°	—	1,97

Keinerlei Wirkung hat bei diesen  $p_H$ -Werten stattgefunden. Mit Rücksicht auf die geringe Menge Diastase, die gefunden wurde, kann dies nicht wundernehmen. Offenbar spielt die Verdauung der Kohlehydrate im Darmkanal des Hechtes keine erhebliche Rolle.

Hiernach untersuchte ich den Darmextrakt von *Esox* auf Anwesenheit einer Maltase. Um nicht alle diese Tabellen mit negativen Resultaten

abzudrucken, erwähne ich nur, daß hier bei Verwendung von Puffergemischen aus Essigsäure und Natriumazetat bei pH 3,5 bis 6,0 Versuche angestellt wurden mit negativem Resultat. Die Unterschiede zwischen Hauptversuch und Kontrolle waren in 24 Stunden nicht größer als  $0,3 \text{ ccm } \frac{N}{10}$  Thio pro 3 ccm unt. Flüssigkeit. Diese zu titrierende Menge ist aber etwas zu gering, um bei einer stark reduzierenden Lösung von Maltose eine geringe Zunahme der Reduktion nachweisen zu können. Darum habe ich später die Maltoselösung so schwach gewählt (1 vH), daß 10 ccm Flüssigkeit zur Untersuchung kommen konnten.

Nach diesen negativen Ergebnissen bei *Esox* wandte ich mich der Untersuchung des Darmes von *Cyprinus* zu, wo ich Maltase zu finden erwartete.

*Cyprinus: Darm.* Ein Extrakt von den vorderen Hälften zweier Karpfendärme stand zur Verfügung. Hiervon wurde ein Kubikcentimeter einem Gemisch von 35 ccm  $2\frac{1}{2}$  vH Maltoselösung, 10 ccm Phosphatpuffer (von pH ung. = 6,8) und 5 ccm dest. Wasser zugesetzt. Titration bei Anfang des Versuches pro 3 ccm ergab: 19,38 ccm Thio. Nach 29 Stunden 18,57 ccm. Zunahme 0,81 ccm. Dieser Umsatz war so gering, daß man hier wieder zweifeln muß, ob man es nicht mit einem Gewebsenzym oder einem adsorbierten Enzym zu tun hat.

Weiter suchte ich zu erfahren, ob vielleicht bei einem andern pH eine bessere Wirkung stattfindet. (S. Tabelle E.)

**Tabelle E.** 20 ccm  $2\frac{1}{2}$  proz. Maltoselösung, 10 ccm Phosphatpuffer, 10 ccm dest. Wasser und 10 ccm verd. Extrakt pro Kolben (10 ccm ursprünglicher Extrakt, mit Wasser verdünnt bis 100, so daß jeder Kolben eine Menge herkommend von 200 mg Frischgewicht erhielt). Zeit der Verdauung 24 Stunden. Titration: jodometrisch. pH-Bestimmung: elektrometrisch. Verdauung abgebrochen durch 10' gleichzeitiges Erhitzen auf dem kochenden Wasserbade.

Versuch	Inhalt	pH	ccm 0,1 N Thio. pro 10 ccm unt. Flüssigkeit	ccm auf Rechnung Enzym- wirkung <sup>1)</sup>
I	10 ccm prim. Phosphat usw.	5,1	8,31	1,08
II	9,5 ccm prim., 0,5 sec. Phosphat	—	8,37	1,02
III	9 ccm prim., 1 sec. Phosphat	—	8,36	1,03
IV	7 ccm prim., 3 sec. Phosphat	—	8,41	0,98
V	4 ccm prim., 6 sec. Phosphat	—	8,43	0,96
VI	1 ccm prim., 9 sec. Phosphat	7,9	8,20	1,19
	Kontrolle wie IV mit gekocht. Extr.	—	9,39	—
	Kontrolle wie I (später angestellt)	—	9,49	—

<sup>1)</sup> Da die Kontrolle zu I später angestellt wurde, sind alle Zahlen in dieser Kolonne durch Abzug der Hauptversuche von 9,39 erhalten.



Diese Tabelle zeigt überall in den Hauptversuchen eine kleine Zunahme der Reduktion und merkwürdigerweise über das ganze pH Bereich. Da ich bei früheren Versuchen niemals eine Hydrolyse bei pH 4,5 bis 5 oder 8 gefunden hatte, machte ich ursprünglich nur einen Kontrollversuch (zu IV). Einen Tag später machte ich mit denselben Lösungen und demselben Extrakte noch einen Kontrollversuch zu I, da, wenn hier oder bei pH 8 durch Hydrolyse seitens der Puffergemische eine geringe Zunahme der Reduktion von z. B. 0,50 oder 0,60 ccm Thio stattgefunden hätte, das Resultat noch eine Kurve mit einer Optimumzone im neutralen Gebiet sein könnte. Wie man sieht, hatte die Kontrolle zu I aber denselben Wert wie diese bei IV. Übrigens war diese Vorsichtsmaßregel wohl überflüssig: BOURQUELOT fand (13 a) schon, daß sogar 0,2 vH HCl keine Spaltung von Maltose bewirkt in 24 Stunden bei 38°.

Wir dürften es hier also zu tun haben mit einem Enzym, das in seiner Wirkung ziemlich unabhängig von der Wasserstoffionenkonzentration ist. Wir werden später sehen, daß die Pankreasmaltase von *Cyprinus* wahrscheinlich etwas unabhängiger vom pH ist, als die Amylase. Jedenfalls ist die Wirkung der Darmmaltase hier sehr gering, wie wir es auch im eben erwähnten Vorversuch fanden, so daß man fast von Abwesenheit sprechen kann. Man würde noch einwenden können, daß die Enzyme im Darmsich auf eine so viel größere Strecke verteilen, daß die Längeneinheit relativ enzymschwach sein muß: man müsse daher größere Mengen Darmextrakt verwenden. Darauf kann man antworten erstens, daß dieselbe Menge eines Karpfendarmextraktes in derselben Zeit eine deutliche Wirkung auf Stärkelösung hat, zweitens, daß die pro Versuch verwendete Menge von 200 mg Schleimhautfrischgewicht herkommt von einer Darmstrecke von ungefähr 2,5 ccm (die zwei vordere Darmhälften von  $2 \times 40$  ccm lieferten 6,76 g). Da der ganze Darm 80 ccm lang ist vom Ösophagus bis zum Anus, ist  $\frac{1}{30}$  der ganzen Länge ein Abschnitt, worauf doch wohl eine Enzymwirkung sich geltend machen muß, soll sie eine Bedeutung für die Biologie des Tieres haben.

Um zu kontrollieren, ob diese Versuchsanordnung zum Nachweise einer Maltasewirkung wirklich geeignet war, verglich ich die Wirkung eines Karpfendarmextraktes unter den Bedingungen der obigen Tabelle und bei einem pH von etwa 6,6 mit der Wirkung eines Schweinedarmextraktes. Der Versuch mit Karpfenextrakt lieferte eine Zunahme von 0,90 ccm  $\frac{N}{10}$  Thio pro 10 ccm untersuchter Flüssigkeit in 22 Stunden (Umsatz des Substrats 7,5 vH); der mit dem Schweinedarmextrakt eine Zunahme von 5.65 ccm (Umsatz 48 vH). Die Maltoselösungen waren hier  $2\frac{1}{2}$ proz. Der Schweinedarmextrakt war schon ziemlich alt; die Maltasewirkung war also nicht verloren gegangen. Seine Stärke war nicht bekannt, darum wiederholte ich später den Versuch mit



frischem Extrakt vom Dünndarm eines Schweines und ließ dabei eine Menge von 200 mg Frischgewicht einwirken auf 1 vH Maltoselösung bei  $p_H = \text{etwa } 6,6$ . In 24 Stunden lieferte diese Menge eine Zunahme von  $2,65 \text{ ccm } \frac{N}{10}$  Thio gegen die Kontrolle mit gekochtem Extrakt in gleicher Menge. Schweinedarm wirkte also dreimalstärker als Karpfendarmextrakt.

*Cyprinus: Pankreas.* Das Pankreas von *Cyprinus* wurde nun auf seine Maltasewirkung untersucht.

Bei den Versuchen über die Pankreasamylase hatte ich schon durch Anfertigung von Osazonen gewisse Anhaltspunkte gewonnen. Beim Versuch auf S. 466/7 (Tabelle A I) wirkte eine Menge von 25 mg Pankreas während 24 Stunden auf Stärke und lieferte zu  $\frac{9}{10}$  Glukosazon; bei dem Versuch I auf S. 473 wirkte die gleiche Menge während 4 Stunden und lieferte sehr viel mehr Maltosazon als Glukosazon. Es lag also auf der Hand anzunehmen, daß eine Maltase im Pankreasextrakte anwesend war, aber in sehr viel kleinerer Konzentration als die Amylase. Diese Vermutung hat sich bestätigt. Das Verhältnis der Konzentrationen der Amylase und Maltase, soweit man davon reden kann, mußte also annähernd ermittelt werden und die Menge des letzteren Enzymes verglichen werden mit der des Darmes.

Zuerst aber suchte ich etwas zu erfahren über das  $p_H$ -Optimum der Pankreasmaltase bei diesem Tiere (Tabelle F).

Wie man sieht, weichen die Werte der Kontrollversuche, welche aus Vorsicht nicht nur beim Neutralitätspunkt, sondern auch bei den extremen  $p_H$ -Werten angestellt wurden, weniger voneinander ab als die angenommenen Fehlergrenzen von 0,2 bis 0,3 ccm. Ich habe daher die ursprünglich anwesende Menge Maltose gefunden aus dem arithmetischen Mittel dieser drei Kontrollen. Ferner sind A von AA, B und C vom Mittel zwischen AA und DD, D von DD abgezogen usw.

Weiter sieht man, daß ich hier die Resultate des Versuches auch ausgedrückt habe in Prozenten des Substrates, das umgesetzt wurde. Aus dem Kontrollversuch ist direkt nach Abzug von der Blankobestimmung der Reagenzien in der Tabelle ersichtlich, wie viel Maltose anwesend war. Da für jede 34 mg Maltose die verschwindet, 36 mg Glukose entsteht (genau 34,2 und 36,0) und der Titer also um eine entsprechende Anzahl Kubikzentimeter Thiosulfat abnimmt und zugleich um eine größere Menge zunimmt, da Glukose stärker reduziert als Maltose, kann man mit Hilfe der Tabelle in einfacher Weise berechnen, wieviel Milligramm Maltoseumsatz mit einer bestimmten Titerzunahme übereinstimmt. Nur muß man für die Berechnung der Differenz der Reduktionswerte (hier in der Tabelle von SCHOORL<sup>1)</sup>) oder auch von BER-

<sup>1)</sup> l. c. (III a).



**Tabelle F.** Bestimmung des  $p_H$ -Optimums der Pankreasmaltase von *Cyprinus* bei 27°, 24 Stunden und etwa 2 vT Salzgehalt. 5 ccm des Extraktes (gewonnen aus 375 mg) mit dest. Wasser verdünnt auf 55 ccm und von diesem Gemisch 5 ccm pro Kolben. Jeder Kolben enthält also eine Menge Extrakt, herstammend von ungef. 33,5 mg Pankreas. Zuckertitration: jodometrisch.  $p_H$ -Bestimmung: elektrometrisch. Verdauung abgebrochen durch 10 Minuten gleichzeitiges Erhitzen im kochenden Wasserbade.

Versuch	Inhalt	$p_H$	ccm $\frac{N}{10}$ Thio pro 10 ccm titr. Fl.	ccm Thio auf Rechn. Enzym- wirkung	mg Maltose umgesetzt	vH des Substrats umgesetzt
A	Wie in den übereinstimmenden Versuchen der Tabelle B I auf Seite 470 zur Bestimmung d. $p_H$ -Optimums d. Pankreasamylase von <i>Cyprinus</i> (Versuch vom 7. Oktober 1925) mit Maltose 1 vH statt Stärke	5,24	12,42	3,34	26,4	40,3
B		6,07	10,46	5,22	41,2	62,9
C		6,61	10,25	5,43	42,8	65,3
D		7,14	10,27	5,33	42,1	64,3
E		7,45	10,55	5,14	40,6	62,0
F		7,98	11,25	4,54	35,9	54,8
AA	Kontrollen		15,76	Mittel: 15,72	Blanko kontr. Reagentia	
DD			15,60		27,62 ccm $\frac{N}{10}$ Thio	
					ab 15,72 „	
					11,90 ccm Thio	
FF			15,79		Anwesend urspr.	
					65,5 mg Maltose	

TRAND (6), die Werte verwenden in der Nähe des am Kontrollversuch (mit gekochtem Enzym) gefundenen Titters, da die Reduktion, wie schon bei Besprechung der Methodik bemerkt wurde, nicht direkt proportional ist mit der Zunahme der Zuckermenge<sup>1)</sup>.

Der Versuch liefert als Resultat eine ziemlich breite Optimalzone zwischen  $p_H$  6 und 7,5. Die Übereinstimmung der bei  $p_H$  6,61 und 7,14 gefundenen Werte läßt schließen, daß bei etwas geringerem Substratumsatz der Gipfel der Kurve vielleicht zwischen 6,6 und 7,1 liegen wird. Die Resultate sind graphisch dargestellt in Abb. 4. Es hat den Anschein

<sup>1)</sup> Hier möchte ich noch hinzufügen, daß man bei den Versuchen im vorigen Kapitel (meistens Umsatz von 1 vH Amylumlösung durch Karpfenpankreas) zwar durch Aufkochen der Kontrollversuchslösung mit 4 N Schwefelsäure am Steigekühler und Titration, den Gehalt an Stärke ermitteln kann, daß man aber wegen dem gleichzeitigen Entstehen von Maltose und Glukose durch nicht genau bekannten Mengen von Amylase und Maltase, den prozentischen Umsatz des Substrates nicht ohne sehr umständliche Manipulationen ermitteln kann.

als ob die Optimalzone hier etwas breiter ist, als bei der Amylase. Übrigens zeigen die Optima der Pankreasamylase und Maltase keinen erheblichen Unterschied.

Nachdem nun die Lage des Optimum ungefähr bekannt war, verglich ich die Mengen der Amylase und Maltase im Pankreasextrakt folgendermaßen:

a) 35 ccm Amylumlösung 1 vH; 10 ccm Phosphatpuffer (3 ccm sec. 7 prim.); 5 ccm verdünntes Pankreasextrakt (etwa 50 mg) verbrauchen pro 20 ccm nach 4 Stunden Wirkung bei 27°: 9,25 ccm  $\frac{N}{10}$  Thio. Dieselben Mengen mit vorher gekochtem Extrakt: 26,48 ccm Thio. Enzymwirkung: 17,23 ccm (= 96 mg Maltose).

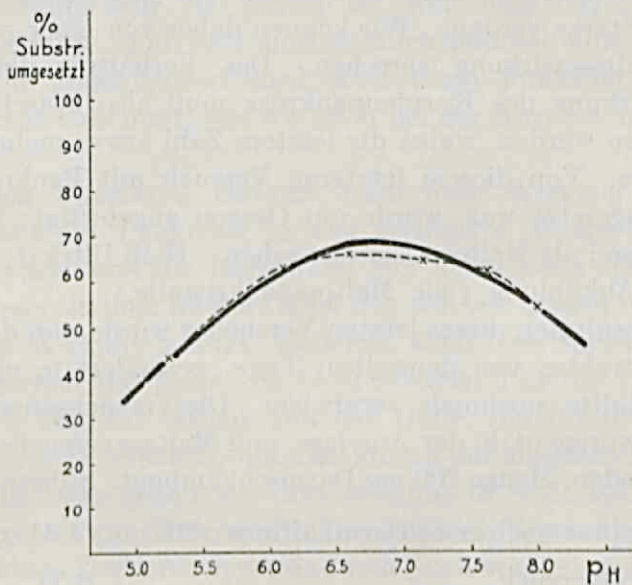


Abb. 4. Abhängigkeit der Wirkung von *Cyprinus*-Pankreasamylase bei 27° und 24 Stunden Versuchsdauer. Die gestrichelte Linie läuft genau den gefundenen Punkten entlang. Die ausgezogene Linie gibt den wahrscheinlichen Verlauf an, den man finden würde bei etwas geringerer Wirkungsdauer.

b) 35 ccm 1 vH Maltoselösung, 10 ccm Puffer, wie oben; 5 ccm Extr. wie oben verbrauchen c. p. pro 10 ccm: 15,81 ccm Thio. Kontrolle: 16,45. Enzymwirkung: 0,64 ccm Thio. Zeit 4 Stunden.

Während also der Extrakt kräftig diastatisch wirkte, war die Wirkung auf Maltose ziemlich gering, wenn auch deutlich. Von a) Hauptversuch wurde ein Osazon angefertigt: es war Maltosazon. Von b) Kontrollversuch ebenso, mit gleichem Resultat (zur Kontrolle, daß der richtige Zucker benutzt war). Von a) dürfen wir also den Zucker als Maltose berechnen und es ergibt sich dann, daß etwa 66 vH des Substrats umgesetzt worden ist, von der Maltose nur 6,5 vH, also zehnmal weniger. Diese Verhältniszahl ist nur annähernd richtig und sicher etwas zu ungünstig für die Amylasewirkung, da diese schon etwas weit vor-



geschritten ist, und die Zahl der Maltasewirkung in der Nähe der Fehlergrenze von 0,2 bis 0,3 ccm liegt.

Die Wirkung der Pankreasmaltase wurde noch an einem andern Präparate bestimmt, das auch schon gedient hatte für die Vergleichung von der amylolytischen Wirkung von Pankreas und Darm bei ein und demselben Karpfen (Kapitel II, S. 473, Versuch 1). 100 mg Pankreas in 5 ccm verd. Extrakt bewirkte unter den gleichen Umständen wie dort, auf Maltose in 27 Stunden eine Titerzunahme von 16,51—11,00 = 5,51 ccm Thio. Hieraus berechnet sich ein Umsatz des Substrates von etwa 65 vH. Im entsprechenden Amylaseversuch ist von 25 mg 65 vH des Substrates in 4 Stunden umgesetzt worden. Viermal so viel Pankreasextrakt setzt in fast siebenmal so viel Zeit die gleiche Menge Maltose um, die er an Stärke verdaut. Wir können daher von einer rund 25 mal geringeren Maltasewirkung sprechen. Das Verhältnis der Amylase- zur Maltasewirkung des Karpfenpankreas muß also zwischen 10 und 25 angenommen werden, wobei die letztere Zahl etwas mehr Wert hat, wie die erstere. Von diesem letzteren Versuch mit Pankreasmaltase, wo 65 vH umgesetzt war, wurde ein Osazon angefertigt: es gab viel mehr Glukosazon als Maltosazon zu sehen. Heiß filtriert, zeigte das Filtrat nach Abkühlung viele Maltosazonkristalle.

Mit den Resultaten dieses letzten Versuches wurde nun die Wirkung eines Darmextraktes von demselben Tiere, gesondert in eine vordere und hintere Hälfte, nochmals verglichen. Die Versuchsanordnung war genau wie die vorige (d. h. der Amylase- und Maltaseversuche auf S. 487) Dauer: 27 Stunden, Menge 200 mg Darmschleimhaut. Substrat: Maltose.

Resultat: Hauptversuch erste Darmhälfte pro 20 ccm: 5,64 ccm  $\frac{N}{10}$  Thio.

Kontrollversuch	„	„	„	„	6,55	„	„
					0,91	„	„
Hauptversuch zweite	„	„	pro 10 ccm	16,78	„	„	
Kontrollversuch	„	„	„	17,44	„	„	
				0,66	„	„	

Im Vergleich mit dem Pankreasextrakte kann man hier von einer etwa 20fach geringeren Maltasewirkung sprechen, da hier durch die doppelte Menge in beiden Fällen etwa 6 bis 10 vH des Substrates umgesetzt worden ist. Daß die Wirkung des Darmes auf Maltose in der Tat gering ist, wird in diesem 27 stündigen Versuch nochmals befestigt.

Im Versuch auf S. 483, Tab. E, wo der Karpfenextrakt auf 2 1/2 proz. Maltose gewirkt hat, findet man für 200 mg in 24 Stunden eine Zunahme derselben Größenordnung wie im obenstehenden Versuch b) auf S. 487 mit 50 mg Pankreasextrakt in 4 Stunden. Diese Extrakte waren vom selben Tier und es läßt sich hieraus auch wieder auf ein Verhältnis von



20 bis 25 : 1 des Pankreas- zum Darmextrakte schließen. Bei diesen Versuchen waren die Umsatzprozente ungefähr gleich und niedrig, wodurch sie sich besonders gut für die Vergleichung eignen.

Aus den Zunahmen beim Optimumversuch der Pankreasmaltase, verglichen mit dem letztbeschriebenen Versuche auf S. 488 läßt sich eine noch höhere Verhältniszahl von etwa 60 oder 70 berechnen. Sechsmal weniger Pankreas bewirkt da in  $\frac{6}{7}$  der Zeit zehnmal größere Zunahme.

Es hat keinen Sinn diesen Zahlen einen hohen Wert beizumessen. Individuelle Unterschiede werden sicherlich vorkommen. Die genannten Zahlen demonstrieren nur zur Genüge, daß die Menge der Maltase im Pankreasextrakte sehr viel größer ist (weit über das Zehnfache), als im Darmextrakte und daß höchstwahrscheinlich eine Maltase vom Darne nicht abgeschieden wird, aber diese Funktion ausschließlich dem Pankreas zukommt, wie wir auch bei der Amylase fanden.

*Galle von Cyprinus.* Obwohl, nach ihrer Wirkung gemessen, die Maltase, auch im Pankreas, in viel geringerer Menge vorhanden ist, als die Amylase, und die Darmwand hier keine Rolle spielt, kann man doch die Frage stellen, ob die Galle, die, wie wir fanden in der Tat auch diastatische Wirkung besitzt, vielleicht auch eine Maltase liefert. Die Galle würde hier die Rolle, die beim höheren Tier die Darmwand hat, übernehmen können. Einen Teil der Galle, die für die Prüfung auf Amylase diente (Versuch 2), untersuchte ich auf Maltase. Die Anordnung des Versuches war genau wie dort erwähnt (S. 475: 0,2 ccm Galle und Puffer  $\frac{2}{3}$  p.  $\frac{1}{3}$  s.). Hier wurde überdies eine Kontrolle mit gekochter Galle angesetzt. Der Versuch wurde durch Kochen abgebrochen. Verbrauch an Thio pro 10 ccm unt. Flüssigkeit: 15,44 für die Kontrolle, 15,63 für den Hauptversuch. Letzterer reduzierte sogar weniger stark wie die Kontrolle, aber der Unterschied von 0,19 ccm fällt innerhalb der Fehlergrenze von 0,3 ccm. Der Galle kommt also eine Maltasewirkung nicht zu.

*Cyprinus: Saccharase.* Einer Saccharase würde bei den Fischen wohl keine hohe biologische Bedeutung zukommen (daher es sehr unbegreiflich ist, daß viele Autoren immer zuerst nach dieser sogenannten Invertase suchen, statt nach der biologisch viel wichtigeren Maltase!). Doch könnte eine Untersuchung nach Unterschieden in den eventuellen Saccharasemengen in Pankreas und Darm großen Wert haben, zur Vergleichung mit den Resultaten über die Verteilung der Maltase. Darum wurde die Wirkung (A) von einer Menge Pankreasextrakt (aus 100 mg Gewebe), (B) Darmextrakt (aus 150 mg) unter den für Maltase angegebenen Umständen auf 1proz. Saccharoselösung verglichen. Zugleich wurde an einem Versuch mit Wasser statt Enzym (C) der Einfluß des



Puffers auf das Substrat untersucht (dies statt einer gekochten Kontrolle, zur Ersparung von Extrakt). Titriert wurden 20 ccm am Anfang und 20 ccm am Ende des Versuches (Dauer:  $24\frac{1}{2}$  Stunden). Es verbrauchten: AI: 27,56; AII: 27,44; BI: 27,49; BII: 27,41; CI: 27,67; CII: 27,64 ccm 0,1 N Thio. Die Blankokontrolle der Reagentia war 27,79 ccm. In der Saccharoselösung war also nur eine ganz kleine Menge reduzierende Substanz ( $= 0,12$  ccm); etwas mehr in den Extrakten; die Reduktion nahm in  $24\frac{1}{2}$  Stunden nur ganz unerheblich (und innerhalb der Fehlergrenze) zu. Von einer Saccharasemenge, die nur einigermaßen mit den gefundenen Maltasemengen zu vergleichen wäre, ist also nichts zu finden. Höchstens ist im Pankreas eine Spur Saccharase.

*Rana: Pankreas und Darm.* Einen einzigen Versuch stellte ich an über den Maltasegehalt von Pankreas und Darm bei *Rana*. Die Anordnung war wie bei der an *Cyprinus* beschriebenen Versuchen, was Puffer, Substrat usw. betrifft. Verwendet wurde 1 ccm Substrat (für das Pankreas aus 90, für den Darm aus 180 mg Gewebe. Das Pankreas gab in 24 Stunden eine Titerzunahme  $\left(\text{Thio } \frac{N}{10}\right)$  von 0,25 ccm. Der Darm ergab keinerlei Zunahme (1. Tit.: 17,28, 2. 17,30)<sup>1)</sup>.

Selbstverständlich ist dieser Versuch nur eine sehr vorläufige Stichprobe und werden die Verhältnisse an *Rana* genauer untersucht werden müssen. Es hat aber den Anschein, daß nicht nur was die Amylase, sondern auch was die Maltase betrifft, Pankreas und Darm bei *Rana* sich verhalten, wie bei den Fischen.

*Zusammenfassung über Amylasen und Maltasen.* In erster Linie charakterisierten wir die Karbohydrasen einiger Fische nach ihren Spaltungsprodukten und dem Optimum ihrer Wirkung bei verschiedener H-Ionenkonzentration. Hierbei ergab sich, daß die Karbohydrasen von den untersuchten Fischen im wesentlichen dieselben sind, wie diejenigen der Säugetiere und mit diesen auch in ihrer Abhängigkeit vom pH übereinstimmen. Ausführlicher wurde die Amylase aus dem Pankreas von *Cyprinus* auf dieses Optimum untersucht bei längerer (24 Stunden) und kürzerer ( $4\frac{1}{4}$  Stunden) Zeitdauer und bei  $0^\circ$ ,  $16,5^\circ$ ,  $27^\circ$  und  $38^\circ$ . Es zeigte sich, daß Verschiebungen im Optimum sich unter diesen Umständen fast nicht bemerkbar machten und deshalb diese Amylase ein sehr geeignetes Objekt ist, um die alte Streitfrage über den verschiedenen Einfluß erhöhter Temperaturen auf die Enzyme der Säugetiere und Fische daran zu prüfen. Dieses Enzym würde sicher viel

<sup>1)</sup> Da hier der Versuch nicht durch Kochen abgebrochen wird ist hier die Fehlergrenze nicht höher, als die einer gewöhnlichen Zuckertitration (0,05 ccm ungefähr).



geeigneter dazu sein, als z. B. das Pepsin, das RAKOCZY (95) untersuchte und wobei, wie wir später sehen werden, die Wasserstoffionenkonzentration sehr schwierig festzulegen ist, da sie sich im Laufe des Versuches erheblich ändern kann, wodurch auch die Reaktionsgeschwindigkeit sich ändert. Leider konnte diese Untersuchung jetzt noch nicht zur Ausführung kommen; es schien uns wichtiger zuerst einen Überblick über die gesamten Verhältnisse der enzymatischen Verdauung bei dieser Klasse zu gewinnen, als ein spezielles Enzym sehr eingehend zu studieren.

Zweitens konnten wir biologische Beziehungen feststellen zwischen den Mengen der vorhandenen Enzyme und der Art der Nahrung, die von den verschiedenen Spezies aufgenommen wird. Bei dem omnivoren Karpfen kommt im Pankreas mehr als die tausendfache Menge an Amylase vor, wie beim karnivoren Hecht und Haifisch; auch im Darne des Karpfens findet sich bedeutend viel mehr Amylase als beim Hecht; im Darne des parasitisch lebenden *Petromyzon* ist die Amylasemenge sehr gering. Maltase konnte im Pankreas und Darm des Hechtes bei verschiedenster Reaktion gar nicht nachgewiesen werden, während sich beim Karpfen eine ziemlich große Menge im Pankreas und eine kleinere im Darm findet. Saccharase fehlt im Pankreas und Darne von *Cyprinus*. Ein spezielles glykogenspaltendes Ferment konnte im Pankreas von *Acanthias* nicht nachgewiesen werden. Die großen Amylasemengen im Pankreas des Frosches sind wahrscheinlich auf die Verarbeitung pflanzlicher Nahrung während der Larvenzeit zurückzuführen. Maltase findet sich in kleinen Mengen im *Rana*-Pankreas und nicht im Darne<sup>1</sup>).

Auch bei den Säugetieren sind derartige biologische Beziehungen bekannt, so weit ich ersehen konnte, vorwiegend für Amylasen. So fanden ROBERTS (107), FLORESCO (26a), NELSON and LONG (57) das Pankreas des Schweines viel wirksamer als das von Rind, Schaf und Hund, C. HAMBURGER (34) das vom Hunde wirksamer als das des Rindes. Auch neuerdings fand SHUNGO OSATO (75), bei Kaninchen und Schwein mehr als bei Hund und Rind. Nur VERNON (128b) kommt zu einem abweichenden Resultate und findet die Amylase bei Rind und Schaf am kräftigsten. Im allgemeinen kann man schließen, daß von den Säugetieren die Omnivoren und Herbivoren mehr Amylase in ihren Verdauungsorganen führen als die reinen Karnivoren; die abweichenden Verhältnisse bei dem Rinde und dem Schaf stehen wohl im Zusammenhang mit den vielen Gärungsprozessen und dem abweichenden Darmbau, wodurch die Verdauung sich gänzlich vom normalen Typus unterscheidet. Die Mengen an Maltasen im Darne gehen denen an Amylasen im Pankreas parallel, wie besonders bei SHUNGO OSATO (75) zu ersehen ist.

Drittens stellten wir einige merkwürdige Beziehungen fest zwischen

<sup>1</sup>) Dies ist alles zu verstehen unter den frühererwähnten Versuchsbedingungen, besonders was die Konzentration an zugesetzten Extrakten betrifft.



den Karbohydrasemengen von Pankreas und Darm, Beziehungen die abweichen von denen bei den höheren Vertebraten. Beim Karpfen fanden wir ungefähr 50 bis 100mal mehr Amylase im Pankreas wie im Darm; beim Hecht ist der Unterschied viel geringer. Bei *Rana* findet man im Pankreas ein großes Quantum (ungefähr  $\frac{1}{3}$  von dem Wert des Karpfens); fast nichts im Darm. Dies alles entspricht noch den Verhältnissen bei den Säugetieren. Während aber dort die Enzyme, welche die Disaccharide spalten und also die Kohlehydratverdauung beenden, hauptsächlich in der Darmwand sich finden oder abgeschieden werden, ist das bei den Fischen, soweit wir untersuchten, und bei *Rana* nicht der Fall. Beim Karpfen findet man im Pankreas rund 25 mal mehr Maltase als im Darne. Bei *Rana* findet sich die geringe Menge Maltase im Pankreas, nicht im Darne. Bei *Esox* konnte Maltase weder im Pankreas noch im Darne nachgewiesen werden. Es scheint also ein gewisses Verhältnis zwischen den Mengen Amylase und Maltase zu bestehen; wo reichlich Amylase im Pankreas wie beim Karpfen, ist die Maltase dort mit Leichtigkeit nachzuweisen, und nur schwer im Darne, wo eine dreimal geringere Amylasemenge vorkommt, ist die Maltase noch gerade gut nachweisbar im Pankreas und nicht im Darm (*Rana*); wo 1000 mal weniger Amylase vorhanden ist, ist die Maltase unter diesen Versuchsbedingungen nicht nachzuweisen, weder im Pankreas noch im Darm (Hecht). Ausgeschlossen ist natürlich nicht, daß man auch dort noch Maltase finden würde, unter Anwendung von viel stärkeren Extrakten. Wo reichliche Mengen Maltose entstehen, findet bei den untersuchten niederen Vertebraten die weitere Verdauung durch den Pankreassaft statt, nicht durch den Darmsaft oder die Darmwand. Die Quanta der Karbohydrasen in der Darmwand sind unter allen Umständen so viel geringer als im Pankreas, daß es mir vorkommt, als haben wir es im Darne nur mit adsorbierten Pankreasenzymen zu tun; zur Annahme einer selbständigen Absonderung dieser Enzyme durch die Darmwand zwingt kein einziger Grund.

Bei der vielen Arbeit, die auf die Untersuchung von den Säugetierenzymen verwendet wurde, hat man der quantitativen Verteilung dieser Stoffe im Verlauf des Darmrohres verhältnismäßig wenig Aufmerksamkeit gewidmet. Zwar kann man den einzelnen Untersuchungen entnehmen, daß das Pankreas die Hauptquelle der Amylase ist, der Dünndarm die der Maltase und Saccharase; Untersuchungen, die absichtlich an *ein und demselben* Tier die Verteilung dieser Enzyme zu erforschen suchen, gibt es nur wenige. Alle Abhandlungen, denen man Tatsachen für die Begründung dieser Ansichten über die Verteilung im Darmkanal entnehmen kann, lassen sich hier nicht anführen, nur einzelne möchte ich nennen, um zu zeigen, daß trotz der verhältnismäßig geringeren Arbeit auf diesem Felde, die Kenntnis von der Verteilung dieser Enzyme



beim Säugetier gut begründet ist. Die Verteilung der Maltase wurde häufiger untersucht als die der Amylase.

Schon 1880 erwähnen BROWN und HERON (14), daß Darmextrakt viel kräftiger auf Maltose als auf Stärke einwirkt; sie schlagen vor, für die Spaltung dieser beiden Substrate zwei verschiedene Enzyme anzunehmen. Ihre Konklusion lautet wörtlich: „Thus we see, that in the transition from colloidal starch to highly diffusable dextrose, the hydrolytic actions of the pancreas and small intestine are mutually dependent and complementary to each other, neither one set of actions alone being sufficient.“ Sie finden mehr Maltase als Invertase im Darm und weisen darauf hin, daß die Maltosespaltung für den Organismus ungleich viel wichtiger sein muß als die der Saccharose. SHORE und TEBB (1892) und besonders die letztgenannte Autorin (1894) (126) machten die Experimente von BROWN und HERON zum Ausgangspunkte erneuter Untersuchungen. Auf diese Arbeiten, besonders die umfangreichere von L. C. TEBB allein, mit vorzüglicher chemischer Methodik ausgeführt, möchte ich besonders hinweisen. Die Versuche wurden ausgeführt an getrockneten und frischen Geweben, die quantitativ auf ihren Gehalt an Maltase untersucht wurden. Das Verhältnis der entstandenen Glukosemenge zum unangegriffenen Maltoserest, nach bestimmten Zeiten verglichen, ist Maß für die Enzymwirkung. Mittels Reduktion von FEHLING, polarimetrisch und durch Anfertigung von Osazonen, wurde die Spaltung verfolgt. Das Resultat ist eine Tabelle, die uns über die maltatische Wirksamkeit der verschiedenen Gewebe unterrichtet und die ich hier übernehmen möchte. Die Verhältniszahlen geben die Mengen Maltose (immer = 1 gestellt) und Glukose, die nach gleichen Zeiten gefunden werden, in Versuchen, bei denen die Gewebe auf eine Ausgangslösung von Maltose wirkten. Die Zahlen sind Mittel aus vielen Versuchen.

mucous membrane	} malt.	1	kidney . . . . .	1
of small intestine		3,21		0,66
spleen . . . . .		1	stomach . . . . .	1
		1,35		0,45
lymphatic gland . . . . .		1	pancreas . . . . .	1
		0,93		0,31
liver . . . . .		1	salivary gland . . . . .	1
		0,80		0,21
Peyer's patch . . . . .		1	muscle . . . . .	1
		0,64		0,20

Auch den Arbeiten von RÖHMANN<sup>1)</sup> und von BOURQUELOT (13a) kann man Tatsachen in dieser Beziehung entnehmen<sup>2)</sup>. In letzter Zeit erschien

<sup>1)</sup> PFLÜGERS Arch. 41, 424. 1887.

<sup>2)</sup> Siehe für vollständige Literaturzitate über diese Enzyme: C. OPPENHEIMER: Die Fermente und ihre Wirkungen, 5. Aufl. Leipzig 1925/26.



eine Abhandlung von SH. OSATA (75), in welcher sowohl die biologischen Beziehungen der Karbohydramengen zur Nahrung als der Unterschied in Amylasemengen (Panc > Darm) und Maltasegehalt (Darm > Pankreas) bestätigt werden. Daß hier ein auffallender Unterschied mit der Lokalisation der Maltase bei den Fischen vorliegt, ist also außer Zweifel.

Zwei Schlußfolgerungen aus diesem Verhalten müssen wir in diesem Zusammenhang nun noch erwähnen. Erstens liegt es auf der Hand, einen Zusammenhang anzunehmen zwischen dem Fehlen von Maltasewirkung im Darne (die geringe Wirkung bei Karpfen und Frosch beruht meiner Meinung nach auf adsorbierten Pankreasenzymen) und dessen Mangel an echten mehrzelligen Drüsen (besonders LIEBERKÜHNSchen Drüsen). Um diesen Punkt gründlich abzuhandeln, müssen wir zuerst sehen, wie sich der Darm in bezug auf Verdauung der Eiweißspaltprodukte verhält. Im folgenden Kapitel werden wir erfahren, daß Darmextrakt die Peptone weniger gut spaltet als der aktivierte und nichtaktivierte Pankreasextrakt, die Peptide aber besser, und werden nach Begründung dieser Tatsachen erörtern, welche Schlüsse das gesamte Material in dieser Beziehung zuläßt, auch in Verband mit einigen Anhaltspunkten, die uns die Literatur über die Rolle der LIEBERKÜHNSchen Drüsen gibt.

Zweitens müssen wir bemerken, daß zwar die Maltasekonzentration im Pankreas viel größer ist als im Darne, daß aber die Maltasemenge im Pankreas hinter dem Amylasegehalt in demselben Organ weit zurücksteht<sup>1)</sup>. Wird dann das abgeschiedene Quantum Maltase genügen, um die aus der Spaltung reichlicher Stärkemengen entstandene Biose zu Glukose zu verdauen? Diese Frage ist schwer zu beantworten. Sie ist auch meines Wissens für Säugetiere noch unbeantwortet. Es wurde nie untersucht, ob die Gesamtmenge der Darmmaltase die Biosemenge, die aus dem normaliter von einem Tiere aufgenommenen Quantum Stärke entsteht, zu spalten imstande ist, oder ob die nach bestimmter Fütterung abgeschiedene Pankreasamylase in einer quantitativen Beziehung steht zur gleichzeitig oder gleich nachher abgeschiedenen Maltase. Weiß man doch nicht einmal, ob die Wirkung der eigentlichen Darmfermente vorwiegend im Darmsafte oder in der Darmwand sich geltend macht. Man würde genötigt sein, einen Begriff der Verdauungskapazität eines Organes aufzustellen, der die Enzymkonzentration pro Kilogramm Organ oder Oberflächeneinheit (z. B. des Darmes), multipliziert mit dem Gesamtgewicht des Organes (oder der gesamten Oberfläche des Darmes) in Beziehung bringen würde zur gewöhnlich aufgenommenen Stärkemenge (oder anderem Substrat). Die verschiedenen hier in Betracht

<sup>1)</sup> Gemessen durch die relativen Verdauungsgeschwindigkeiten einer gleichen Konzentration an Substraten. Siehe R. WILSTÄTTER und R. KUHN: Zur Theorie der Zeitwertquotiente (144).



kommenden Größen würden sich nur äußerst schwierig und ungenau bestimmen lassen. Nur der Zusammenhang zwischen momentan veränderter Nahrungsmenge und Magen- und Pankreasenzymmenge wurde ermittelt (PAWLOVSCHE SCHULE [78]).

Weiter würden noch unbekannte Aktivierungserscheinungen im Darne, die die Aktion des einen Enzymes mehr als die des anderen begünstigten, eine Rolle spielen können.

JORDAN (44) hat an verschiedenen Stellen auf den großen Unterschied hingewiesen, der bezüglich der topographischen Enzymverteilung bei Wirbellosen und Wirbeltieren besteht. Bei den Wirbellosen finden wir überall einheitliche Säfte, die alle Enzyme enthalten. Bei den Säugetieren sind die Enzyme für Kohlehydrate, sowie für Eiweiße in Form von Enzymketten auf die verschiedenen Teile des verdauenden Traktes verteilt. Die Teilenzyme, die die Verdauung vollenden, befinden sich auf alle Fälle stets getrennt von den Enzymen, die die Verdauung anfangen, und zwar findet man erstere wohl stets im eigentlichen Mitteldarm, woselbst sie überall in kleinen Mengen, aber eben auf die volle Länge (oder beinahe die volle Länge) des langen Darmes verteilt, an den Darminhalt abgegeben werden. Durch diese Tatsache wird erreicht, daß die Nahrungsstoffe während ihres ganzen Transportes durch den Darm in kleinen Mengen in resorbierbaren Zustand übergeführt werden. Eine Überschwemmung mit Verdauungsprodukten an den Orten der Sekretion jener Säfte, die in großen Mengen sich in den Darm ergießen, findet nicht statt. Bei den Wirbellosen ist von solch einer Überschwemmung keine Rede, da bei ihnen der Gesamtprozeß der Verdauung äußerst langsam vor sich geht, die Nahrung durch den Verschuß des Kropfes nur in äußerst kleinen Mengen in den resorbierenden Mitteldarm tritt (der Kropf resorbiert bei den Tieren, wo dies bislang untersucht wurde, nicht). Bezüglich der Karbohydrasen sind die Fische offenbar eine Art von Übergang zwischen Wirbeltieren und Wirbellosen. Topographisch finden wir beide Teilenzyme, Amylase und Maltase, nicht getrennt. Eine Überschwemmung mit Glykose dürfte allerdings auch hier ausgeschlossen sein, da die Maltase nur in geringer Menge neben der Amylase im Pankreas des Karpfens vorkommt (1 : 25). Vermutlich wird hierdurch auch bedingt, daß die Zuckerresorption auf die gesamte Darmlänge verteilt wird. Die längere Zeitdauer<sup>1)</sup> dieser Art der Verteilung entspricht der allgemeinen Erscheinung, daß die Verdauung und Resorption bei Kaltblütern langsam vor sich geht und auch langsam vor sich gehen darf, bei dem relativ geringen Stoffwechsel.

Schließlich würde der Fischdarm für Maltose eine Resorptionsfähigkeit besitzen können, während eine solche beim Säugetierdarm fehlt

<sup>1)</sup> Der langsamen Wirkung der Amylase steht bei Wirbeltieren die Länge des Darmes, also einer zeitlichen eine räumliche Regulierung gegenüber.



(u. a. nach REID [97], WEINLAND [132], COHNHEIM [16]<sup>1</sup>). Auch diese Frage scheint mir bei den Teleostiern einer Lösung nicht zugänglich. Bei ihnen erstreckt sich, wie mehrfach erwähnt, das Pankreas in sehr feinen Verästelungen den Darm entlang und ist besonders beim Karpfen unmöglich ganz und gar davon zu entfernen. Immer werden also kleine Mengen Maltose, wenn sie wirklich resorbiert werden sollten, an der Außenseite des Darmes in Glukose verwandelt werden. Deswegen können solche Experimente niemals zu einer definitiven Entscheidung dieses Problems beitragen und ich habe daher auf ihre Ausführung verzichtet. Bei Haifischen hat man diese Nachteile nicht; vielleicht ließe sich auch bei *Esox* das ganze Pankreas ziemlich gut entfernen, aber man hat dann wieder den Nachteil, daß man mit Tieren arbeitet, die normaliter nur eine sehr geringe Kohlehydratverdauung zeigen. Mehr Erfolg ist von Versuchen mit *Rana*, besonders auch mit den pflanzenfressenden *Rana*-Larven und mit herbivoren Schildkröten zu erwarten, wenn ihre Verdauung einmal eingehend studiert würde und dieselben Verhältnisse wie beim Karpfen zeigen würde. Hierfür sprechen schon unsere wenigen Versuche mit *Rana*, und mit Hinsicht auf das Fehlen der Darmdrüsen ist diese Erwartung ähnlicher Verhältnisse gar nicht unbegründet. Diese Versuche würden mich aber vorläufig zu weit von meinem Thema abführen.

Recht interessant wäre auch die Untersuchung des Amylase- und Maltasegehaltes in Pankreas, Darm und *Appendices* von einem herbivoren oder omnivoren Fisch, der *Appendices* führt. Omnivoren und Herbivoren sind aber unter den Fischen selten; die meisten gehören zu den Cyprinoiden, die keine *Appendices* besitzen. Zu dieser Vergleichung kommt fast nur *Box boops*, eine Art, bei der man sich im allgemeinen darüber einig ist, daß sie rein pflanzenfressend ist, in Betracht. Dieses Tier konnte ich hier nicht leicht bekommen und es würde an einer zoologischen Station untersucht werden müssen.

#### Kapitel IV.

#### Trypsin und Erepsin.

Einleitung — Trypsin und Erepsin bei den Säugetieren — Methodik — Vorläufige Versuche am Karpfen —  $pH$ -Optimum der Wirkung des Karpfendarmextraktes auf Glycylglyzin und definitive Versuche an *Cyprinus*, *Esox*, *Acanthias* und *Rana*. — Zusammenfassung über Trypsin und Erepsin. Vergleichung mit den Resultaten, bei Amylasen und Maltasen erhalten.

*Einleitung.* In der Zusammenfassung über die beiden vorigen Kapitel erfuhren wir in bezug auf die Kohlehydratverdauung bei den Fischen

<sup>1</sup>) JORDAN und BEGEMANN (44a) fanden den *Rana*-Darm impermeabel für Saccharose (wenigstens weniger permeabel für Saccharose als für Maltose). Wahrscheinlich ist also eine Permeabilität des Fischdarmes für Maltose nach meiner Meinung nicht.



(soweit untersucht) dreierlei: Erstens sind die Enzyme, welche diese Verdauung anfangen und beenden, nicht gesondert lokalisiert im Pankreas und in der Darmwand wie bei den Säugetieren, sondern kommen beide im Pankreas vor, während höchstwahrscheinlich die geringe Menge Maltase im Darne nur Adsorptionsprodukt ist oder Gewebsenzym. Zweitens erlaubt uns dieses Verhalten den Schluß zu ziehen, daß die Differenzierung in der Lokalisation dieser Enzyme, welche bei den Invertebraten sich nirgends vorfindet, auch bei den niederen Vertebraten noch fehlt und von phylogenetisch sehr jungem Ursprung ist, weil sie außer bei den Säugetieren nur bei den Vögeln vielleicht vorkommen wird (letztere sind nur noch mangelhaft untersucht). Drittens wiesen wir schon auf den Zusammenhang hin, welcher zwischen dem Mangel an Karbohydrasen in der Darmwand und dem Fehlen von mehrzelligen Drüsen, besonders LIEBERKÜHNSchen Drüsen im Fischdarm mutmaßlich bestehen wird.

Bei der nun folgenden Untersuchung über die Proteasen der Fische drängte sich in erster Linie das Problem auf, wie es mit der Verteilung der Enzyme steht, welche die Eiweißverdauung im Mitteldarm anfangen und beenden. Sollte sich hier auch das Erepsin in größter Menge mit dem Trypsin im Pankreas vorfinden und auch sein Fehlen mit dem Mangel an Darmdrüsen in Verbindung bringen lassen, oder sollte die Sachlage in dieser Beziehung die gleiche sein wie bei den Säugetieren? Und wo wird sich im ersten Falle die Enterokinase vorfinden?

*Trypsin und Erepsin bei den Säugetieren.* Während die Eigenschaften und das Vorkommen von Amylase, Maltase und Invertase bei den Säugetieren hinlänglich ausführlich bekannt sind und die Beschreibung dieser Verhältnisse (deren Kenntnis sich auf die Literatur der letzten dreißig Jahre stützt) in keinem Hand- oder Lehrbuche fehlt, hat sich in den allerletzten Jahren, dank den Arbeiten der WILLSTÄTTERSchen Schule, unsere Kenntnis der proteolytischen Enzyme, die bei der Darmverdauung der Säugetiere eine Rolle spielen, so weitgehend verändert, daß es zum besseren Verständnis nötig scheint, schon hier die Resultate dieser bedeutsamen Untersuchungen kurz zusammenzufassen. Vor den Arbeiten aus WILLSTÄTTERS Schule nahm man an, daß das (aktivierte) Trypsin genuine Eiweißstoffe und auch die Peptone der Pepsinverdauung zu spalten imstande sei und daß es diese zu Aminosäuren abbauen könne. Allerdings wußte man seit den Untersuchungen von FISCHER und BERGELL (24, 25) und von FISCHER und ABDERHALDEN (26), daß es einige Dipeptide gibt, die der Einwirkung des Trypsins Widerstand leisten. Die Aufspaltung dieser Bindungen war dem von COHNHEIM (17) entdeckten Erepsin der Darmwand vorbehalten. Dieses Erepsin sollte auch Albumosen und Peptone angreifen, aber nicht natives



Eiweiß, letzteres allerdings mit einigen Ausnahmen, z. B. das Casein. Nebenbei wußte man, oder vermutete es wenigstens, daß auch im Pankreassaft Erepsin in kleinen Quanten vorhanden sein mußte (VERNON, BAYLISS und STARLING).

Diese Ansichten haben sich nun nach den Arbeiten von WALDSCHMIDT-LEITZ und Mitarbeitern im Münchener Laboratorium grundsätzlich geändert. Es gelang WALDSCHMIDT-LEITZ nach den WILLSTÄTTERSchen Methoden die Trennung von Trypsin und Erepsin in Pankreas- und Darmextrakten und die von Trypsin und Enterokinase nebst einer Isolierung des letzteren Stoffes aus der Darmwand. Die nachfolgende Untersuchung über die Spezifität dieser Enzyme ergab, daß reines Erepsin nur imstande war Di- und Tripeptide zu zerlegen und daß es auf Albumosen und Peptone gar keine Wirkung ausübte. Trypsin bedarf zur Spaltung von nativem Eiweiß der Aktivierung durch Enterokinase; es werden bei dieser Spaltung Aminosäuren frei, so daß es sich nicht um eine rein desaggregierende Wirkung handeln kann, wie sie ABDERHALDEN und OPPENHEIMER (73) annehmen. Unaktiviertes Trypsin spaltet WITTE-Pepton, seine Leistung in dieser Beziehung wird aber durch den Aktivator erhöht. Es spaltet aber kein einziges Dipeptid; bei den Peptiden, welche nach FISCHER und ABDERHALDEN von Trypsin hydrolysiert werden, handelt es sich um die Wirkung des Pankreaserepsins. Hingegen sind alle untersuchte Dipeptide durch Erepsin zerlegbar, auch die, welche von FISCHER und ABDERHALDEN als vom Pankreas unspaltbar angegeben waren. ABDERHALDEN selbst hat das in einer kurzen Veröffentlichung zugegeben (1) und erörtert, wie seine früheren Resultate zu erklären sind. Diese Resultate von WALDSCHMIDT-LEITZ nebst anderen über die Art der Kinasewirkung (die Kinase wirkt nicht als Enzym sondern bloß als Aktivator, und zwar in einem stöchiometrischen Verhältnis zu einer bestimmten Trypsinmenge) wurden in der Zeitschr. f. physiol. Chem. veröffentlicht (134, 135, 136, 137, 138, 139). Sie wurden auch von ihm zusammengefaßt in „Naturwissenschaften“ 1926. Diese neueren Ansichten werden wir bei unseren Versuchen im Auge behalten und diese Verhältnisse bei den Fischen, soweit die dort zu erhaltenden kleinen Quanta dies erlauben, nachprüfen müssen.

Um einen Vergleich zu ermöglichen, müssen selbstverständlich wieder die  $pH$ -Optima der betreffenden Enzyme untersucht werden um dieselben nach Möglichkeit zu charakterisieren und um die Vergleichen beim optimalen  $pH$  vornehmen zu können. In der Erwartung, daß die Optima dieser Enzyme (nach Analogie der Carbohydrasen) sich nicht allzuviel von denen der Säugetiere unterscheiden würden, orientierte ich mich zuerst vorläufig über die Verteilungsverhältnisse der Proteasen im Darne. Überdies werden die Experimente über das  $pH$ -Optimum des Trypsins im folgenden Kapitel gegeben werden, da sie an einem weitgehend ge-



reinigten *Acanthias*-Trypsin vorgenommen wurden, dessen Darstellung erst da beschrieben werden kann. Nach der Feststellung dieser Optima wurden dann die vorläufigen Versuche bei den gefundenen Optima nochmals durchgeführt.

*Methodik.* Die Extraktion wurde vorgenommen wie in den vorigen Kapiteln für Karbohydrasen angegeben, meistens mit Glyzerin. Für das Pankreas hat dies den großen Vorzug, daß darin die spontane Aktivierung des sogenannten Trypsinogens (dieser Name soll nach WALDSCHMIDT-LEITZ fortfallen) nicht auftritt.

Für die Verfolgung der Spaltung von nativem Eiweiß diente die Einwirkung auf gequollenes Fibrin, das mit Spritblau (Diphenylrosanilin) gefärbt war. Diese Methodik ist eine Abänderung des GRÜTZNERSchen Verfahrens der Pepsinbestimmung mit Karminfibrin. Sie wird im nächsten Kapitel, wo sie am meisten Verwendung findet, etwas eingehender besprochen werden (s. auch WOHLGEMUTH [145], RONA [108], S. 215, GEZELSCHAP [27] und RINGERS Arbeiten [101—106]).

Für die Verfolgung der niederen proteolytischen Spaltung (die von Pepton und von dem verwendeten Dipeptid Glycylglyzin) können vier Verfahren hauptsächlich Verwendung finden: die polarimetrische Untersuchung nach ABDERHALDEN, die Formoltitration von SÖRENSEN (121), die gasometrische Bestimmung der Aminosäuren nach VAN SLYKE und die Titration im alkoholischen Milieu nach WILLSTÄTTER und WALDSCHMIDT-LEITZ (142). Ich benutzte hauptsächlich letztere Titration, die den Vorzug größerer Einfachheit besitzt vor der Formoltitration, wobei eine Vergleichslösung notwendig ist und auch das Endresultat nur aus dem Unterschied einiger Titerziffern gefunden werden kann. Die „Alkoholtitration“ wurde bis jetzt in drei Modifikationen angewandt. Alle beruhen auf der Eigenschaft der Aminosäuren, daß in Alkohol einer bestimmten Konzentration eine intramolekuläre Atomverschiebung stattfindet, wobei das  $\text{NH}_2$  und das  $=\text{O}$  des Karboxyls sich aneinander binden, wodurch die Säuren sich wie Fettsäuren titrieren lassen mittels 0,2 N alkoholischer Lauge. Die drei Modifikationen sind folgende: man macht die zu untersuchende Flüssigkeit zu einer 96 proz. alkoholischen Lösung und benutzt Phenolphthalein als Indikator; zu einer 90 proz. Lösung, mit Thymolphthalein als Indikator (134); endlich zu einer 80—85 proz. Methylalkohollösung ebenfalls unter Anwendung von Thymolphthalein (139). Letzteres Verfahren bietet Vorteile wenn man große Mengen Puffer (u. a. Phosphat) braucht, welche in konzentriertem Äthylalkohol unlöslich sind. Die Methoden wurden von den Autoren durch Titration abgewogener Mengen von reinen Aminosäuren kontrolliert.

Die Feststellung des Umschlagpunktes dieser Titration verlangt auch für Lösungen von reinen Aminosäuren einige Übung. Beim Erscheinen des ersten schwachblauen Farbentons ist der Umschlagpunkt erreicht. Es schien mir zweckmäßig dann abzulesen und durch Zusatz von weiteren zwei oder drei Tropfen Lauge zu kontrollieren, ob die Flüssigkeit deutlich blau wird und man sich beim Beurteilen der Farbe nicht geirrt hat. Bei Anwesenheit von viel Eiweiß oder Pepton kann die Wahrnehmung des Umschlagpunktes etwas erschwert werden. Für die Titration in klaren Flüssigkeiten wird beim Gebrauch von Thymolphthalein der Fehler sich auf 0,04 cem 0,2 N alkohol. Lauge belaufen (nach WALDSCHMIDT-LEITZ' Angabe).

Zur Kontrollierung benutzte ich 0,1 N Glykokollösung, die 0,1 N NaCl enthält. 5 cem dieser Lösung mit 5 cem 0,1 N HCl gemischt soll nach SÖRENSEN ein pH von 1,932 aufweisen. Bestimmung mit meiner Wasserstoffelektrode ergab:



1,919, so daß die Glykokollösung richtig hergestellt war. Bei der Titration von 10 ccm dieser Lösung, zu 90 proz. Alkohol gemacht, und mit Thymolphthalein als Indikator wurde zuerst gefunden 5,93 ccm 0,1727 N Lauge, statt berechnet 5,79 und nach einiger Übung 5,80 und 5,84, womit die erwünschte Genauigkeit erreicht war.

Beim Ansetzen und Abbrechen der Versuche verfuhr ich hier in etwas anderer Weise als bei den Karbohydrasen. Dort wurde das Enzym zwecks genauerer Verteilung mit dest. Wasser verdünnt. Dies war hier nicht angebracht, weil dadurch das Volum der Lösung zu groß geworden wäre im Verhältnis zum Puffergemisch. Der Puffer muß ziemlich stark sein wegen der entstehenden Aminosäuremenge. Die Verteilung des Enzyms geschah hier mittels einer fein kalibrierten Auslaufpipette von 2 ccm Inhalt. Weil das Enzym als Glycerinlösung verteilt wurde, konnte ich nun auch ruhig die Versuche einige Zeit nacheinander ansetzen, weil doch das Enzym in Glycerin unbeschränkt haltbar ist<sup>1)</sup>. Das Abbrechen der Versuche geschah hier genügend durch die Übertragung der Flüssigkeit in Alkohol, zumal da die Titration unmittelbar hinterher ausgeführt wurde. Wurden elektrometrische pH-Bestimmungen ausgeführt, so geschah dies wieder an einigen Kubikzentimetern, die dem Gemisch vor dem Hinzusetzen des Toluols entnommen waren.

*Vorläufige Versuche.* Bei den vorläufigen Versuchen waren die pH-Optima der Enzyme von *Cyprinus* noch nicht ermittelt worden und die Alkalinität wurde hergestellt durch Natriumbikarbonat 2 vH und am Ende des Versuches durch Zusatz von Kresolrot (Umschlag zwischen pH 7,2 und 8,8) zu der kleinen Menge, die nach den Titrationen noch verblieb, einigermaßen geschätzt. Zweck war also die Vergleichung der Trypsin- und Erepsinmengen in Pankreas und Darm. Von diesen Versuchen folgen hier die Protokolle:

- A. 1. Röhrechen 100 mg Spritblau, 5 ccm 2 vH  $\text{NaHCO}_3$ , 5 ccm  $\text{H}_2\text{O}$ , 1 ccm Pankreasextrakt (75 mg) und etwa 0,4 ccm Darmextr. zur Aktivierung.  
 2. Röhrechen 100 mg Spritblau usw.; 1 ccm nicht aktiviertes Pankreasextrakt. Aktivierung von Nr. 1 in  $1\frac{1}{2}$  ccm  $\text{H}_2\text{O}$  während 30' bei 27°. Dann mit 3,5 ccm  $\text{H}_2\text{O}$  das Gemisch übergespült ins Röhrechen mit Spritblau. Quellungen 1 und 2 während 30 Minuten.

Nach  $1\frac{3}{4}$  Stunden ist noch kein deutlicher Unterschied sichtbar (Flüssigkeit stark opaleszierend). Nach  $3\frac{1}{2}$  Stunden aber war der Unterschied sehr deutlich und nahm fortwährend zu; nach 20 Stunden war die aktive Flüssigkeit (Nr. 1) intensiv blau; die nichtaktivierte (Nr. 2) nicht sichtbar verändert.

3. 100 mg Spritblau usw. 1 ccm Darmsaft (200 mg); nach 20 Stunden keine nachweisbare Änderung. Allen Röhrechen waren 5 Tropfen Toluol zugesetzt.  
 B. 1. 9 ccm WITTE-Pepton 3 vH (filtriert, klar); 6 ccm 2 vH Natriumbikarbonat; 1 ccm Pankreasextrakt (75 mg).

Titrationen nach:	0 Std.: 1,35	4 Std.: 1,49	24 Std.: 1,76
Zunahmen:	0,14	0,27	Total: 0,41.

2. 1 ccm Darmextrakt der ersten Hälfte, 9 ccm P.W. 3 vH; 6 ccm  $\text{NaHCO}_3$ .

Titrationen nach:	0 Std.: 1,32	4 Std.: 1,34	24 Std.: 1,59
Zunahmen:	0,02	0,25	

<sup>1)</sup> Wenigstens während so kurzer Zeit. VERNON (128a) findet, daß die Erepsinmenge in Glycerinextrakten abnimmt nach der dritten Woche.



3. 1 ccm Pankreasextrakt +  $\frac{1}{2}$  ccm Darmextrakt 1. Hälfte  $\frac{1}{2}$  Std. aktiviert bei 26,5°. Dann 9 ccm P.W. 6 ccm 2 vH NaHCO<sub>3</sub> zugesetzt.  
 Titrationen nach: 0 Std.: 1,35      4 Std.: 1,61      24 Std.: 3,12  
 Zunahmen:                      0,26                      1,51      Total: 1,77

Zunahme für 1 ccm Pankreas 0,41; für  $\frac{1}{2}$  ccm Darm 0,14. Mehr für das akt. Pankreasextrakt 1,22 ccm.

Der Rest nach der Titration gibt eine Zwischenfarbe mit Kresolrot, also  $p_H$  etwa 8,0.

- C. 1. 61 mg Glycylglyzin, 3 ccm NaHCO<sub>3</sub> 2 vH, 2 ccm Darmextrakt (Reste von vorderer und hinterer Hälfte gemischt), ungef. 400 mg; 11 ccm H<sub>2</sub>O. Total 16 ccm. 5 Tropfen Toluol.  
 Titrationen nach: 0 Std.: 1,34      5 Std.: 1,62      24 Std.: 2,14  
 Zunahmen:                      0,28                      0,52      Total: 0,80
2. 61 mg Glycylglyzin übergespült bei 1 ccm Pankreasextrakt (75 mg) mit 12 ccm H<sub>2</sub>O und 3 ccm NaHCO<sub>3</sub> 2 vH; 5 Tropfen Toluol.  
 Titrationen nach: 0 Std.: 1,38      17 Std.: 1,37      43 Std.: 1,34  
 Zunahmen:                      — 0,01                      — 0,04

Keinerlei Wirkung war hier wahrzunehmen. Mit Kresolrot gab der Rest eine Zwischenfarbe.

Aus diesen vorläufigen Versuchen ergibt sich folgendes Schema für die Wirkung von Pankreas- und Darmextrakt in bezug auf die Eiweißspaltung:

	Eiweiß	Pepton	Dipeptid
Nichtaktivierter Glyzerin-Pankreasextrakt . .	—	+	—
Aktivierter Glyzerin-Pankreasextrakt . . . . .	+	++	
Darmextrakt . . . . .	—	+	+
		(nur wenig)	

Hierin bedeutet + Spaltung, — Nichtspaltung, ++ erhöhte Spaltung.

Das alles ist in vollkommener Übereinstimmung mit den Resultaten von WALDSCHMIDT-LEITZ und Mitarbeitern für die Darmproteasen der Säugetiere.

*$p_H$ -Optimum der Wirkung des Karpfendarmextraktes auf Glycylglyzin und definitive Versuche an Cyprinus, Esox, Acanthias und Rana.*

Es war nun nach diesen vorläufigen Ergebnissen notwendig, die Versuche zu wiederholen bei den  $p_H$ -Optima der Trypsin- und Erepsinwirkung. Diese Optima mußten also zuerst ermittelt werden. Für das Trypsin geschah dies an einem nach MICHAELIS und DAVIDSOHN gereinigten Präparat aus *Acanthias*-Pankreas; die Beschreibung dieser Versuche bringt das folgende Kapitel. Für das Erepsin geschah die Bestimmung in Rohauszügen der Darmwand von *Cyprinus*. Letztere Versuche mögen hier gleich folgen (siehe Tab. G).

Die Nr. 2 wurde nicht angesetzt, da durch die starke Pufferung des Glycylglyzins die  $p_H$ -Werte niedriger ausfielen, wie erwartet wurde und



**Tabelle G.** Bestimmung des  $p_H$ -Optimums für das Darmerepsin von *Cyprinus carpio*. 10 ccm Puffermischung, 6 ccm 0,1 N Glycylglyzin und 1,8 ccm Darmextrakt (= 180 mg) in jedem Röhrchen. Titration von 5 ccm Flüssigkeit in 90 proz. alkoholischer Lösung (hergestellt durch Zusatz von absolutem Alkohol), beim Anfang und nach 23 Stunden.  $p_H$ -Bestimmung am Anfang und elektrometrisch, dann der Flüssigkeit 6 Tropfen Toluol zugesetzt.  $T = 27^\circ$ .

Nr.	0,1 N Borax in ccm	0,127 N HCl in ccm	0,9 N NaOH	$p_H$	in ccm 0,173 N KOH		
					Tit. Anf.	Tit. n. 23 St.	Zunahme
1	5,5	4,5	—	5,13	2,82	2,84	0,02
2	6	4	—	—	—	—	—
3	6,5	3,5	—	6,71	2,79	3,09	0,30
4	9	1	—	7,35	2,64	3,15	0,51
5	7,6	—	2,4	7,65	1,94	2,45	0,51
6	5,3	—	4,7	7,86	1,27	1,83	0,56

die Enzymmenge sehr beschränkt war. Das Glycylglyzin pufferte viel stärker als das Eiweiß (Fibrin) in den später zu erwähnenden Versuchen mit Trypsin, wo dieselben Mischungen von Borax, HCl und NaOH angewandt wurden. Versuche über die Hydrolyse des Substrates selbst konnten wegen des hohen Wertes des Glycylglyzins, sowie des Enzympräparates nur in einem gleich zu erwähnenden Fall angestellt werden.

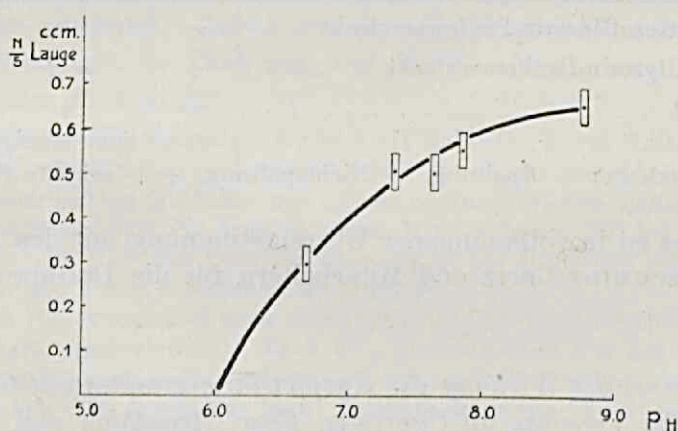


Abb. 5. Versuch zur Bestimmung des  $p_H$ -Optimums von *Cyprinus*-Darmerepsin bei der Wirkung auf Glycylglycine. Wegen Mangel an Peptid konnte die Kurve nicht weiter nach rechts verfolgt werden. ( $27^\circ$ ; 23 St.)

Diese Hydrolyse mag den Verlauf der Kurve, die man von den Resultaten der Messungen entwerfen kann, etwas beeinflussen, an den Ergebnissen wird sie nichts ändern (Abb. 5).

Der Extrakt war mit diesen Versuchen erschöpft. Da das Optimum offenbar noch nicht erreicht war, stellte ich mit einem anderen *Cyprinus*-Darmextrakte noch zwei Versuche an: einen bei einem  $p_H$  in der Nähe von Nr. 6 zur Bestimmung der Kraft des neuen Extraktes, einen bei



höherem pH. Verwendete Menge Extrakt: 2 ccm entsprechend 300 mg Frischgewicht.

6a: 5 ccm Borax; 5 ccm NaOH pH: 7,73; Titr. I: 1,19, Titr. II: 1,82, Zunahme 0,63.

7: 2,5 ccm Borax; 7,5 ccm NaOH pH: 8,76; Titr. I: 0,37, Titr. II: 1,30. Zunahme 0,93.

Einen Versuch stellte ich an in der Nähe des letzten pH-Wertes, um einen Eindruck zu bekommen über die Hydrolyse des Substrates. Dieser Versuch bei pH 9 (Umschlagpunkt des Phenolphthaleins) lieferte in 23 Stunden eine Zunahme von 0,18 ccm KOH. Tatsächlich ist also mit dem Versuch 7 bei pH 8,76 das Optimum noch nicht überschritten. Denn nach Abzug dieser Hydrolyse von 0,18 liefert Nr. 7 unter Benutzung des Wertes von 6a auf Nr. 7 der vorigen Tabelle umgerechnet  $\frac{56}{63} \times (0,93 - 0,18) = 0,67$ . Ich verfügte nicht über eine genügende Peptidmenge um die Versuche weiter fortzusetzen. Das Resultat stimmt mehr mit den Versuchen EULERS (22), der das pH-Optimum von tierischem Erepsin auf Glycylglyzin bei 37° gleich 8,7 fand, als mit demjenigen von WALDSCHMIDT-LEITZ, der es sowohl in Rohauszügen als in gereinigten Präparaten auf 7,8 bestimmte. Es kann dies an der geringeren Menge Puffer bei meinen Versuchen liegen, wodurch während der Reaktion sich das pH verschoben haben kann.

Jedenfalls kann man bei einem pH von 8 arbeitend gut vergleichbare Resultate erhalten. Auch entfernt vom Optimum, wenn nicht zu weit, verläuft nach WALDSCHMIDT-LEITZ die Reaktion des Erepsins auf Glycylglyzin monomolekular. Bei diesem pH von 8 habe ich dann die Vergleichung zwischen Erepsingehalt von *Cyprinus*-Pankreas und -Darm und von diesen Organen einiger anderen Tiere vorgenommen. Diese Versuche folgen hier, ihre Anordnung ist die gleiche wie bei den erwähnten Optimumversuchen:

Tabelle II.

Tier	Organ	Menge in mg	Titr. I	Titr. II	Zunahme	Verhältniszahl pro Gewichtseinheit <sup>1)</sup>
<i>Cyprinus</i> . .	Pankreas	200	1,13	1,17	0,04	0
„ . .	Darm	180	1,27	1,83	0,56	1
<i>Rana</i> . . . .	„	360	1,28	2,13	0,85	0,75
<i>Acanthias</i> . .	Pankreas	250	1,26	1,38	0,12	0,15
<i>Cyprinus</i> . .	Darm	400	1,31	1,47	0,16	0,1
	(alt. Extrakt)					
<i>Esox</i> . . . .	Darm	250	1,16	1,53	0,37	0,65
	(alt. Extrakt)					

<sup>1)</sup> Diesen Zahlen ist (mit Hinsicht auf die kleinen Zunahmen) nur sehr approximativer Wert beizumessen.



Diese Versuche bestätigen vollkommen die vorläufigen Resultate der Seiten 500 u. 501. Das Pankreas ein und desselben Karpfens wirkt nicht auf Glycylglyzin, während sein Darm das Peptid spaltet. Das Pankreas von *Acanthias* gibt eine sehr geringe aber unverkennbare Zunahme des Titers. Wir werden sogleich sehen, daß das *Acanthias*-Pankreas eine 8—10mal stärkere eiweißspaltende Wirkung hat wie das des Karpfens. Dort wo eine recht kräftige Verdauung von genuinem Eiweiß stattfindet, hat also das Pankreas eine noch gerade nachweisbare Erepsinwirkung.

Der Darm von *Rana* hat eine etwas kleinere Wirkung wie der von *Cyprinus*. Vom Hecht verfügte ich nicht über frischen Extrakt. Das Erepsin scheint (u. a. nach VERNON) auch in Glyzerin nicht unbeschränkt haltbar zu sein. Ich verglich gleich (über 1 Jahr) alte Extrakte von *Esox* und *Cyprinus*-Darm. Der *Esox*-Extrakt wirkte ungefähr sechsmal stärker wie der von *Cyprinus*. Da bei frischen Extrakten von *Rana* und *Cyprinus* gleiche Wirkungen gefunden wurden, scheinen hier gar nicht so große Unterschiede vorzukommen wie bei den Karbohydrasen. Da die Unterschiede nicht mehr als höchstens das 3—5fache betragen, wird man mit Hinsicht auf die vielen unbekannten Faktoren sogar von einer ungefähr gleichen Wirkung sprechen können.

Nachdem ich die im folgenden Kapitel zu beschreibenden Versuche mit *Acanthias*-Trypsin zur Bestimmung des Optimums durchgeführt hatte, verglich ich die proteolytische Wirkung vom Karpfenpankreas und Darm eines und desselben Tieres (das nämliche Tier das zu den Versuchen über die Glycylglyzinspaltungen gedient hatte) bei diesem Optimum (pH 8,2) miteinander. Für diese Vergleichung benutzte ich die Verdauung von mittels Spritblau gefärbten, trockenen, abgewogenen Quanta Fibrin, die zuerst im Puffergemisch eine halbe Stunde der Quellung überlassen und dann mit Enzym versehen wurden. Die Methodik wird im folgenden Kapitel eingehender beschrieben werden. Genaue kolorimetrische Vergleichung mit einer Standardlösung konnte ich hier nicht vornehmen, wegen der ziemlich starken und ungleichen Trübung der verschiedenen Extrakte. Doch sind die Resultate, auf die es ankommt, Vergleichung von Pankreas und Darm, so überzeugend, daß kein Zweifel möglich ist. Die Methode der Vergleichung von Pankreasextrakten untereinander beruht auf der Zeitdauer, die nötig war, um den Flüssigkeiten ungefähr gleiche Farbenstärke zu verleihen. Die Aktivierung des Glyzerinpankreasextraktes fand bei 27° statt, bei neutraler Reaktion und unter Zusatz eines kleinen abgemessenen Quantums Wasser. Denn nach WALDSCHMIDT-LEITZ (134) findet die Aktivierung am besten in neutralem Medium statt, während konzentriertes Glyzerin hemmt. Nach demselben Forscher sind nur minimale Mengen Darmextrakt im Vergleich zur Pankreasmenge notwendig zur Aktivierung (mehr als 100mal weniger in Trockensubstanz). Die hier angewandte Menge Enterokinase war immer



so groß, daß sie im Überschuß anwesend war. Nach J. M. HAMILL (35a) sind die Kinasen aller untersuchten Wirbeltiere identisch. Daher habe ich gelegentlich bei Vergleichung der Pankreastrypsinmengen verschiedener Tiere gleiche Mengen Darmextrakt eines und desselben Tieres zur Aktivierung benutzt.

Zuerst folgen hier die Versuche über die Vergleichung von Pankreas und Darm desselben Karpfens und mit dem Pankreas eines Hechtes:

4 Röhrchen, jedes mit 50 mg Spritblauf., 6,5 ccm 0,1 N Borax, 3,5 ccm 0,1 N HCl (entsprechend einem pH von ungefähr 8,2) und 200 mg Enzym in 2 ccm, Nr. 1 unaktiviertes Pankreas *Cyprinus*, Nr. 2 aktiviertes Pankreas *Cyprinus*, Nr. 3 Darmextrakt *Cyprinus*, Nr. 4 unaktiviertes Pankreasextr. *Esox*. Nach 3 Stunden ist in Nr. 1—3 noch keine Farbe zu sehen; in Nr. 4 hat sich eine starke Farbe entwickelt (gleich stark wie die in Nr. 2 nach 19 Stunden). Nach 19 Stunden: Nr. 1 ungefärbt, Nr. 2 ziemlich stark gefärbt, Nr. 3 zweifelhaft, ob eine Spur von Färbung zu entdecken ist, Nr. 4 sehr stark gefärbt, viel Fibrin gelöst. Nach 48 Stunden: Nr. 1 hat dieselbe Farbe erreicht wie Nr. 2; das kann nicht wundernehmen: auf die Dauer tritt Autoaktivierung ein. Nr. 3 aber bleibt gänzlich ungefärbt während wenigstens 5 Tagen. Es ist dann noch keinerlei Fäulnisgeruch wahrzunehmen. (Die Röhrchen wurden jedes mit einigen Tropfen Toluol versehen.) Die Resultate der vorläufigen Versuche werden hiermit bestätigt: Innerhalb 24 Stunden wirkt unaktivierter Pankreasextrakt von *Cyprinus* nicht auf Fibrin; aktivierter deutlich. Über das Resultat mit *Esox* sprechen wir unten.

In einem zweiten Versuch wurden das aktivierte (1) und nichtaktivierte (2) Pankreas von *Acanthias*, das aktivierte Pankreas von *Rana* (3) und das aktivierte Pankreas von *Cyprinus* (4) miteinander verglichen. Alles unter den vorerwähnten Bedingungen und mit einer gleichen Menge *Cyprinus*-Darmextrakt aktiviert. Nach 3 Stunden hatten beide, Nr. 1 und 2, die Farbe erreicht, die *Cyprinus* im vorigen Versuche in 19 Stunden lieferte; Nr. 3 und 4 erreichten diese Farbe nach 20—24 Stunden. *Cyprinus* und *Rana* wirken also ungefähr gleich stark. Ebenso wirken *Esox* und *Acanthias* gleich stark und ungefähr 6—8mal stärker als *Rana* und *Cyprinus*. Überdies wirkte von *Esox* und *Acanthias* auch der nichtaktivierte Pankreasextrakt. Der Pankreasextrakt von *Esox* war schon alt und hergestellt worden aus Tieren von einem anatomischen Praktikum, wobei mehrere (6—8) Stunden nach der Tötung verliefen, ehe der Extrakt angefertigt wurde<sup>1)</sup>. Das kann auch der Fall gewesen sein mit den Tieren aus Helgoland. Für letztere war auch wohl kein doppeltdestilliertes Glycerin,

<sup>1)</sup> Es war gelegentlich wegen der Teuerkeit der Fische notwendig, von diesem Praktikummateriel Gebrauch zu machen. Für die Amylasebestimmung ist dasselbe auch sehr gut brauchbar. Nur mit Trypsin erheben sich hier einige Schwierigkeiten.



Sp. D. = 1,26, sondern das gewöhnliche Präparat mit etwa 15 vH Wassergehalt verwendet worden, so daß bei beiden Extrakten vor bzw. während der Extraktion die Enterokinasebildung stattgefunden haben kann. Ich glaube also absolut berechtigt zu sein, in diesen Ergebnissen keinen Widerspruch zu sehen. Denn gerade bei den Karpfen wurde große Sorgfalt darauf verwendet, die Organe gleich nach dem Tode zu sammeln und in Glyzerin einzutragen. Für *Cyprinus* stimmen die hier und in den Vorversuchen erhaltenen Resultate völlig überein. Die Resultate der Vor- und definitiven Versuche wurden mit anderen Extrakten erhalten. Als die Vorversuche angestellt wurden, war das pH-Optimum für Fischtrypsin noch nicht bestimmt. Erwartet wurde pH etwa 8, gefunden 8,2, so daß die Vorversuche mit Trypsin die gleiche Beweiskraft haben, wie die definitiven; außerdem ist es noch ein Vorteil, daß sie damals mit einem anderen Mittel ( $\text{NaHCO}_3$ ) alkalisch gemacht wurden, was das Resultat verallgemeinert.

Die Trypsinwirkung ist bei Hecht und Haifisch ungefähr 6—8mal stärker als bei *Rana* und *Cyprinus*, für Erepsin ist der Unterschied allerdings etwas geringer.

*Zusammenfassung über Trypsin und Erepsin. Vergleichung mit den Resultaten, welche bei Amylasen und Maltasen erhalten wurden.*

Wir wiesen die Erepsinwirkungen nach durch Wirkung der Extrakte auf Glycylglyzin und versuchten das Optimum des Karpfenerepsins zu ermitteln. Es war wahrscheinlich erreicht bei pH 8,75, doch konnten wir den absteigenden Ast der Kurve nicht weiter verfolgen. Daß das Optimum höher liegt als das von WALDSCHMIDT-LEITZ für Säugererepsin gefundene und mehr mit der Wahrnehmung von EULER übereinstimmt, liegt wahrscheinlich an der kleinen Puffermenge, die ich benutzte. Die Charakterisierung des Trypsins durch Optimum und Spaltungsprodukte folgt im nächsten Kapitel<sup>1)</sup>.

Was die biologische Vergleichung betrifft, fanden wir die Trypsinwirkung bei Hecht und Haifisch ungefähr 8mal stärker als bei *Rana* und *Cyprinus*; für Erepsin wurde ein etwas kleinerer Unterschied gefunden. So große Unterschiede wie bei den Amylasemengen, die bei Hecht und Karpfen das 375—1500fache betragen, bestehen hier also nicht. Will man diese Tatsachen mit den Verhältnissen bei den Säugetieren vergleichen, so stößt man auf die Schwierigkeit, daß darüber nur wenige zahlenmäßige Angaben in der Literatur vorkommen. Auch hier scheinen die Unterschiede nicht erheblich zu sein. FLORESCO (26a) fand für das Pankreas die tryptische Wirkung bei Hund und Schwein zweimal so groß

<sup>1)</sup> Herr Prof. P. VAN ROMBURGH war so freundlich das Glycylglyzin für die in diesem Kapitel beschriebenen Versuche in seinem Laboratorium anfertigen zu lassen, wofür ich meinen verbindlichen Dank ausspreche.



wie bei Rind und Schaf (Wirkung auf Fibrin). Für Gelatineverdauung ist die Reihenfolge: Hund, Schwein, Rind, Schaf. Auch dabei betragen die Unterschiede nicht viel mehr als das zweifache. VERNON (128) findet Schwein, Schaf, Rind. ROBERTS (107) fand die gleiche tryptische Wirkung für Schwein, Rind und Schaf. Erheblich sind die Unterschiede also nicht.

Für Erepsin findet u. a. BERGMAN (5) bei Wiederkäuern weniger als bei anderen Pflanzenfressern.

WEINLAND (129) fand etwas weniger Erepsin beim Schweine, als COHNHEIM bei Hund und Katze gefunden hatte. Der Autor gibt aber selbst zu, daß seine Versuchsbedingungen nicht ganz denen von COHNHEIM entsprechen.

Einige zahlenmäßige Angaben entnehmen wir VERNON (128a). Er benutzte die kolorimetrische Methode und verglich die Extrakte nach etwas weniger als 3 Wochen. Sein Befund, daß bei Warmblütern Nierengewebe fast immer einen noch höheren Erepsingehalt aufwies als Dünndarmextrakt wurde von BERGMAN (5) nicht bestätigt. Einige von VERNONS Zahlen, ausschließlich über Pankreas- und Darmextrakt folgen hier. Die Einheiten sind willkürlich gewählt.

	Katze	Kaninchen	Meerschweinchen	Taube	Frosch	Aal	Krebs <sup>1)</sup>
Pankreas:	—	4,4	13,3	6,5	54,8	1,8	0,87
2)	2,0	1,3	7,4	2,7	12,1	2,8	1,0
3)	4,4	—	—	—	—	—	—
4)	2,2	—	—	—	—	—	—
Darm:	—	9,5	8,8	7,0	4,9	2,9	(0,36
2)	2,5	2,7	4,9	2,9	2,2	4,5	—
3)	11,4	9,5	—	7,0	4,9	2,9	—
4)	3,9	4,3	—	4,3	2,1	0,74	—

Es muß hierbei bemerkt werden, daß diese Zahlen keine Vergleichung der Erepsinwerte nach der modernen Definition dieses Begriffs darstellen. Sie stellen vielmehr vor das Resultat von der Einwirkung eines Gemisches aus Trypsin (Trypsinogen) und Erepsin auf das Peptonsubstrat, wobei im Pankreas natürlich mehr die Trypsinwirkung, im Darne die Erepsinwirkung das Resultat beeinflußt. Jedenfalls geben sie einen Eindruck von der Kraft der Proteolyse. Neuere Untersuchungen unter Benutzung von Dipeptiden zur Vergleichung fehlen noch.

Drittens verglichen wir die Mengen Trypsin und Erepsin in Pankreas und Darm. Hierbei stellte es sich heraus, daß für diese Enzyme die Verteilung genau so ist wie bei den Säugetieren: im Pankreas inaktives

<sup>1)</sup> Mitteldarmdrüse.

<sup>2)</sup> der Leberwert = 1 gestellt.

<sup>3)</sup> mit 0,1 vH Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

<sup>4)</sup> in H<sub>2</sub>O.



Trypsin, das durch Enterokinase aktiviert wird. Im Darme praktisch kein Trypsin; wenn adsorbiertes Trypsin vorhanden sein sollte, dann ist dies nur in geringem Maße der Fall, so daß es nicht nachweisbar war. Im Darme findet sich Erepsin, im Pankreas nicht oder wenigstens in viel geringerer Menge. Die neuere Literatur über die Verhältnisse bei den Säugetieren erwähnten wir schon im Anfang dieses Kapitels.

Hier lassen sich nun noch einige Bemerkungen anschließen an die Ausführungen, die schon im vorigen Kapitel angefangen wurden. Die kohlehydratspaltenden Fermente mangeln im Fischdarm; die Enterokinase und das Erepsin sind dort ebensogut anwesend wie bei den Säugetieren. Wenn man also einen Zusammenhang annehmen will zwischen dem Fehlen von echten Darmdrüsen bei den Fischen und der Absonderung der Enzyme, so würde man zu der Schlußfolgerung kommen, daß Erepsin und Enterokinase von den indifferenten Darmzellen produziert werden<sup>1)</sup>, aber die Absonderung von Maltase (gegebenenfalls vielleicht auch von Invertase) an das Vorkommen von LIEBERKÜHNSchen Drüsen gebunden ist. Denn weder den BRUNNERSchen Drüsen, noch den Agmina PEYERi der Säugetiere kommt eine Enzymsezernierung zu; das ist von verschiedenen Autoren überzeugend gezeigt worden. Somit würde auch die Funktion, oder wenigstens eine Funktion der LIEBERKÜHNSchen Drüsen bei den Säugetieren die Absonderung der Disaccharasen sein.

Es wurde nun auch am Säugetier selbst versucht, die Rolle der LIEBERKÜHNSchen Drüsen festzustellen, und zwar beschäftigt sich eine Untersuchung von FALLOISE eingehend mit diesem Gegenstand und mit demselben Resultat wie das obige. FALLOISE (23) schnitt den Darm (vom Hunde) auf, breitete ihn flach aus und kühlte ihn ab bis zum Erfrieren. Dann wurde bis auf  $\frac{1}{3}$ — $\frac{1}{2}$  mm tief geschabt, so daß nur die Zellen der Oberfläche (Zotten) mitgenommen wurden. Sodann wird eine zweite Portion gewonnen durch Schaben bis zur Muskularis und der Gehalt an Enzymen in den beiden Schichten verglichen. Beide enthalten gleiche Mengen Erepsin. Die obere Schicht enthält viel mehr Enterokinase als die untere, aber für Maltase und Invertase ist das Verhalten gerade umgekehrt. Enterokinase, so lautet die Schlußfolgerung, soll von den Zotten, Erepsin sowohl von den Zotten als von den LIEBERKÜHNSchen Krypten, Maltase und Invertase nur von den LIEBERKÜHNSchen Drüsen geliefert werden. Auch eine kleine Menge Amylase würden die Drüsen abscheiden.

Diese Resultate, welche an einem Objekt durch möglichste Isolierung der in Frage stehenden Organe und die meinigen, welche an einem Objekt, dem diese Organe fehlen, gewonnen wurden, stimmen also recht gut miteinander überein.

<sup>1)</sup> Es kann auch sein, daß die Becherzellen hierbei eine Rolle spielen.



Es wird nun von verschiedenen Histologen unter den Autoren die Meinung vertreten, daß die LIEBERKÜHNSchen Drüsen oder Krypten keine echten Drüsen seien, sondern bloß Regenerationsherde für das Oberflächen-gewebe. Das ist die Auffassung u. a. von BIZZOZERO (8) die auch STÖHR übernommen hat. Ich will hier diese histologische Streitfrage nur streifen. Die Drüsennatur der Organe wurde verteidigt von OPPEL in seinem Handbuche (72) und von MAURER in O. HERTWIGS Handbuch der vergleichenden Entwicklungsgeschichte der Wirbeltiere (35b), schließlich von BIEDERMANN in WINTERSTEINS Handbuch der vergleichenden Physiologie. Man hat auch die Anwesenheit der PANETHschen Zellen (Körnerzellen) zugunsten der Drüsennatur der Krypten geltend gemacht. Sie wurden vielfach als die eigentlich sezernierenden Elemente der L. K. angesehen. Sollte das richtig sein und die Funktion der L. K. wirklich u. a. in der Absonderung der Biasen bestehen, so würde man erwarten können, daß da, wo keine oder weniger Kohlehydratverdauung stattfindet, keine oder weniger PANETHsche Zellen anwesend sein sollten. Ich glaubte anfänglich in der Literatur eine Stütze für das Bestehen eines derartigen Zusammenhanges zu finden: PANETH selbst fand die Zellen nicht bei ausgesprochenen Karnivoren: Katze und Hund; jedoch wurden sie später bei einigen insektenfressenden Tieren aufgefunden und nach MARTIN (65) u. a. scheinen sie beim Schweine zu fehlen; auch bei den Eidechsen kommen sie vereinzelt vor. Ein deutlicher Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von PANETHschen Zellen und Lebensweise besteht also nicht. Sicher ist aber, daß bei echten Karnivoren diese Zellen nicht gefunden werden. In letzterer Zeit wurde von R. CORDIER (17a) eingehend die chromo-argentaaffinen Zellen in den LIEBERKÜHNSchen Krypten beschrieben; sie werden von diesem Autor als sezernierende Elemente aufgefaßt. Diese Zellen kommen in größerer Zahl bei den Karnivoren und Omnivoren wie bei den Herbivoren vor. Ihr Vorkommen aber bei den Kaltblütern ist zweifelhaft. Auch über die Mengen von Maltase und Invertase bei den verschiedenen Säugern fehlen exakte Angaben fast ganz, so daß die Frage nach einem näheren Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von verschiedenen Darmenzymen und den histologischen Elementen der LIEBERKÜHNSchen Drüsen, die sie liefern sollen, dahingestellt bleiben muß.

Als Stütze für die Annahme einer Beteiligung der LIEBERKÜHNSchen Drüsen an der Sekretion findet man vielfach (so bei BIEDERMANN) erwähnt, daß man auch nach Ausschluß vom Zufluß des Pankreassaftes einen echten Darmsaft erhalten kann, der u. a. von PAWLOV und seinen Schülern untersucht wurde und worin die Fermente, die für den Darm charakteristisch sind, keineswegs fehlen. WALDSCHMIDT-LEITZ (137, S. 224, 225) verteidigte neulich wenigstens für Erepsin und Enterokinase die Auffassung, daß diese Stoffe, etwa in Form einer Vorstufe, vom



Pankreas abgeschieden werden sollten und dann in den Zellen des Darmes aufgenommen, weiter zu den definitiven Stoffen aufgebaut und schließlich wieder in den Darm abgeschieden werden sollten. Eine phylogenetische Betrachtung liegt diesen Anschauungen zugrunde: es soll das Pankreas sich vom Darms sozusagen emanzipieren, der Darm seine Fähigkeit der Enzymproduktion dem Pankreas übertragen. Nur auf Grund einer phylogenetischen Spekulation bietet es nach meiner Meinung keine Vorteile, einen so verwickelten Vorgang, wie er eben beschrieben wurde, anzunehmen für die Prozesse, die bei der Enzymabsonderung stattfinden sollen. Es würde auch mit dieser Vorstellung schwer in Einklang zu bringen sein, daß beim phylogenetisch weniger emanzipierten Fischdarm das Pankreas die Produktion der Maltase besorgt (wie wir fanden), und daß bei den Säugetieren der Darm diese Funktion wieder übernommen haben sollte. Die Erscheinungen weisen weniger in der Richtung einer Emanzipierung vom Pankreas und Übertragung aller Enzymsekretion auf dieses Organ, als in der einer weiter fortschreitenden Arbeitsteilung zwischen Pankreas und Darm. Bei den Fischen ist eine solche zwar für die Proteasen (Trypsin und Erepsin), noch nicht aber für die Karbohydrasen zustande gekommen. Die Erreichung einer gesonderten Lokalisierung der Karbohydrasen bleibt dann den Säugetieren vorbehalten. Überdies deutet auch das Auftreten des Magens in der Vertebratenreihe mit der Sekretion eines eigenen Fermentes (Pepsin), dessen Vorkommen bei Invertebraten höchst zweifelhaft ist, auf die Existenz dieser immer weiter gehenden Spezialisierung der Enzyme und Differenzierung in ihrer Lokalisation. Bei den Fischen steht auch die Entwicklung des Magens auf einer niederen Stufe, da hier noch keine Haupt- und Deckzellen in den Drüsen zu unterscheiden sind und der Magen überhaupt fehlen kann.

Zusammenfassend können wir also feststellen, daß die Endverdauung der Eiweißstoffe bei den Fischen durch Erepsin aus dem Darmsaft oder der Darmwand bewirkt wird, wie bei den Säugetieren. Die Endverdauung der Kohlehydrate aber geschieht, im Gegensatz zu den Säugern, durch den Pankreassaft. Die letzte Tatsache bietet eine Stütze für die Meinung von FALLOISE, daß den LIEBERKÜHNschen Drüsen eine besondere Rolle zukommt bei der Sezernierung der Disaccharasen, da diese dem Fischdarm fehlen.

Daß inzwischen die Konzentration an Maltase im Pankreas viel geringer ist als die an Amylase, hat, teleologisch betrachtet, vielleicht die Bedeutung einer Überschwemmung des Körpers mit den Verdauungsprodukten vorzubeugen.



## Kapitel V.

**Reinigung und Wirkung des Pepsins und Trypsins von  
*Acanthias vulgaris*.**

Einleitung — Bereitung des Pepsins — Eigenschaften des Pepsins — Zusammenfassung über Pepsin — Bereitung des Trypsins — Eigenschaften des Trypsins — Zusammenfassung über Trypsin.

*Einleitung.* Bei der Untersuchung niederer Tiere stoßen wir immer auf die Schwierigkeit, daß die Methoden, welche die physiologische Chemie für die Säugetiere ausarbeitete, nicht zu verwenden sind für die kleinen Organ- oder Extraktmengen, die uns zur Verfügung stehen, wegen der Seltenheit oder Kostspieligkeit des Materials. So war an einen Versuch zur Reinigung einiger Enzyme vom Karpfen oder Hecht, die in dieser Arbeit studiert wurden, gar nicht zu denken. Die einzigen Fische, die für eine Anwendung einiger dieser Methoden in Betracht kamen, waren Haifischarten, die in größerer Anzahl von einigen zoologischen Stationen erbeutet werden zur Bedienung der anatomischen Praktika. Die biologische Anstalt auf Helgoland war bereit von 50 oder 100 Tieren Magen und Pankreas nach später zu erwähnenden Vorschriften zu konservieren und dann unserem Laboratorium in der kürzest möglichen Zeit zuzusenden. Da der Haifisch einen ziemlich geringen Konsumptionswert besitzt und überdies die Köpfe wie gesagt für anatomische Praktika verwendet werden konnten, war es in dieser Weise möglich, ein genügend großes Organmaterial ohne allzu hohe Kosten zu bekommen.

Da die Anwesenheit von Pepsin und Salzsäure, sowie von Trypsin nach den zitierten Untersuchungen von YUNG, WEINLAND, VAN HERWERDEN u. a. wahrscheinlich war, versuchte ich die Methoden von PEKELHARING (79, 80) bzw. MICHAELIS und DAVIDSOHN (67) für die Reinigung der Extrakte von Magen und Pankreas zu verwenden.

*Bereitung des Pepsins.* Ich befolgte hierbei genau das von PEKELHARING angegebene Verfahren, nur wurde die Reinigung nicht so weit fortgesetzt wie bei seinen Präparaten, wegen der Gefahr großen Verlustes bei weitgehender Säuberung. Das Prinzip dieser Methode ist, durch eine Selbstverdauung möglichst viel des Eiweißes und des entstehenden Azidalbumins zum Verschwinden zu bringen, so daß von den restierenden Produkten bei Wegdialysieren der Salzsäure nur das Pepsin ausfällt.

Bei der Konservierung, welche nach gesandten Vorschriften in Helgoland vorgenommen wurde<sup>1)</sup>, wurden nur die Schleimhäute verwendet, da es gelang

<sup>1)</sup> Für die große Sorgfalt, womit diese Vorschriften und auch die für die Konservierung von Pankreas und Mageninhalt befolgt wurden, bin ich der Direktion der biologischen Anstalt auf Helgoland und dem Herrn Oberpräparator HINRICHS zu bestem Danke verpflichtet.



diese in leichter Weise von der Muscularis loszupräparieren. Die Schleimhäute wurden in reines Meerwasser getaucht um anhaftende Stoffe zu entfernen und je nach der Größe in zwei bis vier Stücke geschnitten. Die vorhandenen Schleimhäute wurden nun roh gewogen und in die fünffache Gewichtsmenge 0,35proz. Salzsäure eingetragen. Auf jede 500 ccm Flüssigkeit wurde 2 ccm Toluol zugegeben und geschüttelt. (Diese Vorsichtsmaßregel wurde mit Rücksicht auf die lange Transportzeit getroffen; bei PEKELHARINGS Versuchen war sie selbstverständlich überflüssig.) Bis zur Konservierung verliefen nicht mehr als 2 Stunden.

Der Transport dauerte wenigstens 10 Tage; nach Ankunft wurden die Magen feingehackt und in der für die Konservierung benutzten Säure, nötigenfalls mit frischer 0,35 vH HCl versetzt, 2—4 Tage bei 30° im Thermostaten belassen. Die Zeiten sind, verglichen mit PEKELHARINGS Versuchen ziemlich lange, so daß darin unvermeidlicherweise größere Mengen Pepsin verloren gehen mußten. Die Flüssigkeit wurde nun weiter durch das von PEKELHARING angegebene Filter (aufgeweichte und zerzupfte Stücke Filtrierpapier auf einer in den Trichter gelegte perforierte Ebonitplatte) durchgesaugt. Die ursprüngliche trübe Flüssigkeit und das Filtrat lösten beide Fibrin; doch war diese Wirkung nach Schätzung lange nicht so kräftig wie bei einem früher in der Weise angefertigtem Extrakt aus Schweinemagen. Diese geringe Enzymkraft ist entweder durch eine andere Konzentration an Pepsin oder (wahrscheinlicher) durch viel Verlust an Enzym zu erklären. Das völlig klare Filtrat gab eine starke Biuretreaktion (durch die bei der Autolyse entstandenen Peptone), aber keine Tryptophanreaktion. Das Filtrat wurde nun gegen Leitungswasser dialysiert bis die Salzsäure fast verschwunden war; es trat sodann eine weiße Trübung auf; dieser Niederschlag wurde abzentrifugiert und haftete nun so fest am Boden, daß die obenstehende Flüssigkeit abgegossen werden konnte, gerade so wie dies in PEKELHARINGS Versuchen der Fall war. Für das Schweinepepsin lag das Minimum der Löslichkeit nicht bei der Neutralität, sondern bei 0,02 vH HCl. Es schien mir, als ob in meinen Versuchen die geringste Löslichkeit bei Neutralität oder wenigstens dichter bei der Neutralität lag, aber da die Flüssigkeitsmengen möglichst schnell verarbeitet werden mußten, habe ich hierfür keine genaue vergleichende Bestimmungen angestellt.

Der erhaltene Niederschlag wurde mit wenig destilliertem Wasser gewaschen und dann von neuem in einer kleineren Zentrifuge abgeschleudert oder filtriert, nachher in Vacuo über Schwefelsäure getrocknet.

Ein kleiner Teil des noch nicht trockenen Niederschlags löste sich leicht in schwacher Salzsäure und wirkte dann in kurzer Zeit energisch auf Karminfibrin, das vorher 20 Minuten in HCl derselben Konzentration zur Quellung gebracht worden war.

Den nach Zentrifugieren erhaltenen Niederschlag kann man wieder lösen in 0,2 vH HCl und durch Dialyse, nun gegen destilliertes Wasser, wieder in unlösliche Form bringen und abschleudern. Diese Behandlung kann zwecks Reinigung des Präparates einige Male wiederholt werden und schließlich durch wiederholtes Lösen in Oxalsäure und Dialysieren das Präparat vom anhaftenden Chlor befreit werden (RINGER [101]), aber die Mengen, die ich erhielt, waren dazu viel zu gering. Ich verarbeitete ungefähr 2 kg Frischgewicht an Schleimhäuten, entsprechend ungefähr 10—15 l Flüssigkeit und erhielt daraus 100 mg Trockensubstanz, die nun weiter in einem Mörser feingepulvert und im Exsikkator aufbewahrt wurden.

Aus der Flüssigkeit, woraus nach der Dialyse das Pepsin abgeschleudert wird, konnte PEKELHARING noch Pepsin erhalten, indem er sie zuerst konzentrierte durch Behandlung mit basischem Bleiazetat und Ammoniak, wobei das Pepsin



von dem entstehenden flockigen Niederschlag mitgerissen wird und nach Filtrieren aus dem Bleihydroxyd von Oxalsäure wieder zu einem kleineren Volumen gelöst werden kann. Nach abermaligem Filtrieren wird durch Dialysieren das Pepsin gefällt. Ein Teil der nach Zentrifugieren erhaltenen Restlösung behandelte ich in gleicher Weise. Nach dieser Verarbeitung entstand bei der Dialyse ein Niederschlag; aber die in dieser Weise erhaltene Enzymmenge war sehr gering. Die ungünstigen Verhältnisse, die durch den langen Transport und durch den Umstand bedingt sind, daß die Zerkleinerung der Mägen erst hier geschehen konnte, nachdem sie schon 10 Tage in HCl verblieben waren, sind sehr wahrscheinlich wohl Schuld an der kleinen Pepsinkonzentration in der Flüssigkeit.

Jedenfalls zeigen Extrakte der Schleimhaut vom *Acanthias*-Magen, wenn man sie einer Behandlung unterwirft, wie PEKELHARING für den Schleimhautextrakt vom Schweine angab, dieselben Eigenschaften wie letzterer Extrakt. Man erhält eine kleine Menge eines festen Stoffes, die, in HCl gelöst, kräftig Fibrin angreift und eine hohe Pepsinkonzentration hat, im Vergleich mit der Flüssigkeit, woraus sie stammt.

*Eigenschaften des Pepsins.* Mit der erhaltenen Stoffmenge versuchte ich nun etwas über die Wirkungsweise dieses Enzyms zu erfahren. Außer dem Präparat aus *Acanthias*-Magen verfügte ich noch über 90 mg eines früher zwecks Übung in der Methodik angefertigten Pepsinpräparates aus Schweinemagen, das ebensoweit gereinigt war, wie das aus *Acanthias* und über 100 mg eines weiter gesäuberten Präparates aus Schweinemagen, das mir freundlichst von Herrn Prof. RINGER zur Verfügung gestellt wurde. Beide Präparate konnten zur besseren Vergleichung der mit *Acanthias* erhaltenen Resultate mit den aus der Literatur für Säugetierpepsin bekannten Werte dienen.

Als Methode um die Pepsinwirkung zu bestimmen, benutzte ich diejenige von GRÜTZNER, in der Weise wie sie auch von RINGER benutzt wurde zur Bestimmung des pH-Optimums von Pepsin. Hierbei wird trockenes feingepulvertes mit Karmin gefärbtes Fibrin angewendet, das in einer bestimmten Gewichtsmenge (hier von meistens 50 mg) in jedes Reagenzglas gebracht wird. In jedes Glas wird die gleiche Menge verdünnter Salzsäure gebracht und vor der Hinzufügung der Pepsinlösung das Fibrin gleiche Zeiten der Quellung überlassen. Die Einwirkung des zuvor in schwacher Säure gelösten Pepsins soll nicht zu lange dauern (5 bis 15 Minuten für das sehr wirksame PEKELHARINGsche Pepsin) so daß nicht mehr als etwa  $\frac{1}{10}$  des Substrates umgesetzt wird. Die Verdauung wird dadurch beendet, daß man zur bestimmten Zeit die Flüssigkeit vom ungelösten Karminfibrin durch Glaswolle abfiltriert. In dem von GRÜTZNER beschriebenen Kolorimeter werden dann die Farben der Lösungen mit einer beliebigen Verdauungsflüssigkeit verglichen. In den stärkstgefärbten Lösungen ist am meisten verdaut worden. Weiteres über die Methode siehe bei GRÜTZNER (28, 29), RINGER (101, 102) und GESELSCHAP (27).

Für eine kurze Einwirkungsdauer von 10 Minuten bei 15° wurde von



RINGER (101) das Optimum der Wirkung bei  $p_H$  2,05 (Anfang) bzw. 2,42 (Ende des Versuches) gefunden. Durch Bestimmung des mittels Tannin nach der Verdauung nicht mehr zu fällenden Stickstoffes wurde es von SÖRENSEN (123) auf 1,8, für längere Zeit auf 1,4 bestimmt, von RINGER bei Wiederholung dieser Versuche auf 1,74 (Anfang) und 2,2 (Ende). Während der Versuchszeit (im letzteren Falle 4 Stunden) werden also beträchtliche Säuremengen gebunden. Auch verschiebt sich bei längerer Dauer das Optimum nach der sauren Seite, was sich nach SÖRENSEN dadurch erklärt, daß das Pepsin nach der neutralen Seite unbeständiger sein soll. So schnelle und starke Vernichtung wie beim Trypsin findet man hier aber nicht (103).

Ich fing damit an die Methode auf das reinste Schweinepepsin anzuwenden, zur Vergleichung und Kontrolle.

Versuch 1. 5 mg Schweinepepsin (reinstes Präparat) mit 25 ccm 0,005 N Salzsäure digeriert bei Zimmertemperatur und nach 30 Minuten filtriert. Hiervon 2 ccm pro Reagenzglas. 50 mg Karminfibrin, 20 Minuten gequollen. Verdauungszeit 12 Minuten.

Nr.	Wasser ccm	Salzsäure 0,127 N ccm	Kolorimeter zahl	$p_H$ Ende des V.
1.	7,8	0,2	0	—
2.	7,4	0,6	0,64	ungef. 7
3.	7,0	1,0	5,75	2,93
4.	6,4	1,6	6,12	2,50
5.	5,6	2,4	5,3	2,13

Das Optimum liegt hier bei einem End- $p_H$  von 2,5, während es bei RINGERS Versuchen wo mehrere Säuregrade zwischengeschaltet waren, bei 2,42 gefunden wurde.

Ein folgender Versuch diente dazu, das *Acanthias*-Pepsin zu untersuchen.

Versuch 2. 8 mg *Acanthias*-Pepsin mit 20 ccm 0,006 N HCl (zweimal stärkere Lösung des Pepsinpräparates wie im vorigen Versuch), digeriert bei Zimmertemperatur und nach 30 Minuten filtriert. Hiervon 2 ccm pro Reagenzglas, 50 mg K.-Fibr. 30 Minuten gequollen. Verdauungszeit 3 Stunden.

Nr.	Wasser ccm	Salzsäure 0,127 N in ccm	Kolorimeterzahl	$p_H$ -Ende
1.	7,2	0,8	schwach gefärbt	
2.	7,0	1,0	2,59	2,83
3.	6,90	1,10	3,56	2,83
4.	6,80	1,20	4,75	2,44
5.	6,40	1,60	3,75	2,01
6.	6,80	1,20		

Nach  $3\frac{3}{4}$  Stunden nur noch so schwach gefärbt, daß keine Ablesung möglich (oder 0,25). Ohne Enzym.



Dieselben Farbenintensitäten wie in Versuch 1 wurden hier von der doppelten Enzymmenge erst in der 15 mal längeren Zeit erreicht. Weil die Wirkungszeit so viel länger war, konnte hier der Anfangs-pH (s. Versuch 4) gleich nach dem Ansetzen des Versuches bestimmt werden und brauchte man kein unwirksam gemachtes Pepsin dazu zu verwenden, was zur Ersparnis an Enzym ein Vorteil war. Das gefundene Optimum von 2,44 (Ende) stimmt ungefähr überein mit dem für Säugetierpepsin bekannten Werte. Der Kontrollversuch Nr. 6 demonstriert, daß auch bei so viel längerer Zeit die Methode noch durchaus brauchbar ist. Es mutet etwas sonderbar an, daß trotz verschiedener Säuremengen pH in Nr. 2 und 3 denselben Wert hat. Das läßt sich vielleicht daraus erklären, daß in Nr. 3 durch die entstandene größere Menge an Spaltungsprodukten mehr Säure gebunden wurde, wodurch die Wasserstoffionenkonzentration dieselbe wurde. Wie man aus einem folgenden Optimumversuch (Nr. 4) sehen wird, verschiebt sich pH im Laufe des Versuches erheblich. In den Röhrchen mit höheren pH-Werten entstand eine Trübung, wenn die Azidität nicht groß genug war, um das entstandene Azidalbumin in Lösung zu halten. Da das *Acanthias*-Pepsin so viel weniger stark wirkt, als das Säugetierpepsin, hatte es einiges Interesse die Wirkungszeit mit der des erwähnten Schweinepepsins desselben Reinigungsgrades zu vergleichen. Dazu diente folgender Versuch.

Versuch 3. 2 mg Pepsin (Schwein) auf 5 ccm 0,006 N HCl 30 Minuten digeriert und dann filtriert. 2 ccm des Filtrats bei 50 mg Karminfibrin, 6,8 ccm H<sub>2</sub>O und 1,2 ccm 0,127 N HCl (entsprechend den optimalen Bedingungen). Quellung 30 Minuten. Verdauungszeit 25 Minuten.

Derselbe Versuch mit *Acanthias*-Pepsin, Dauer 125 Minuten. In diesen Zeiten wird eine ungefähr gleiche Intensität erreicht ( $A : S = 5 : 6$ ). Roh gerechnet wirkt das *Acanthias*-Pepsin wenigstens fünfmal schwächer als das in derselben Weise dargestellte Schweinepepsin. Dieses würde dann wieder fünf- bis sechsmal langsamer als das weiter gereinigte Schweinepepsin wirken, da letzteres zum *Acanthias*-Enzym in einem Verhältnis von 30 : 1 steht. Großer Wert ist diesen Zahlen nicht beizumessen. Besonders darf man daraus nicht auf eine grundsätzliche Verschiedenheit beider Enzyme schließen. Es kann nicht wundernehmen, daß bei Tieren mit so verschiedenem Bau der Magenschleimhaut wie *Acanthias* und einem höheren Säugetiere die erhaltenen Präparate in ungleichem Maße verunreinigt sein können. Auch zwischen Präparaten von Schweine- und Hundepepsin kommen Unterschiede in Wirksamkeit vor, wie GESELSCHAP (27) ausgeführt hat. Wichtiger scheint es mir, daß man wenigstens beim Haifisch in derselben Weise zu wirksamen Präparaten kommen kann und daß diese unter fast genau denselben Umständen ihre optimale Wirkung zeigen.



Folgender Versuch ist eine Wiederholung des Versuchs 2 zur nochmaligen Festlegung des Optimums.

Versuch 4. 10 mg *Acanthias*-Pepsin in 25 ccm 0,006 N HCl 30 Minuten digeriert, dann filtriert; davon 2 ccm pro Röhrchen. 50 mg Karminfibrin. Quellung 26 Minuten. Verdauungszeit: 4 Stunden 10 Minuten.

Nr.	Wasser ccm	HCl 0,127 N in ccm	Kol.-Zahl	p <sub>H</sub> -Anfang	p <sub>H</sub> -Ende
1.	7,0	1,0	trübe	2,70	6,22
2.	6,90	1,10	1,57	—	2,23
3.	6,80	1,20	2,80	2,29	2,44
4.	6,40	1,60	2,20	—	1,89
5.	6,00	2,00	1,96	—	1,905
6.	wie 3 für direkte p <sub>H</sub> -Bestimmung				
7.	wie 3 für längere Wirkung				
			ungef. 7,25 (nach 9 St.)		2,41

Beim optimalen Versuche hat sich der p<sub>H</sub> um 0,15 verändert, nach weiteren 4½ Stunden hat aber keine Änderung mehr stattgefunden, obgleich die Verdauung mit ungefähr derselben Geschwindigkeit fortgeschritten ist. In Nr. 1 änderte sich der p<sub>H</sub> so sehr, daß schließlich die Azidität nicht mehr genügend war um das geformte Azidalbumin in Lösung zu halten und eine Trübung entstand. Etwas sonderbar ist es, daß in Nr. 2 p<sub>H</sub> am Ende niedriger ist als in Nr. 3. Beim Versuch 2 war dies nicht der Fall (bzw. Nr. 3 und 4). Tatsächlich ist hier (Versuch 4) aber in 2 weniger verdaut worden, verglichen mit 3, als in den entsprechenden Röhrchen (3 und 4) von Versuch 2, wodurch in 2 hier nicht so viel Säure gebunden werden konnte. Diese Unterschiede mögen mit der Quellungs- und Verdauungszeit zusammenhängen. Sonderbar ist es auch, daß in 5 der p<sub>H</sub> wieder etwas zunimmt, oder wenigstens daß er nicht ziemlich viel niedriger als in 4 gefunden wird. Ein derartiges Resultat kommt auch in RINGERS Versuchen vor. Eine Erklärung dafür weiß ich nicht zu geben.

In Anbetracht dieser Verschiebungen und Unregelmäßigkeiten wird man mehr Wert zu legen haben auf den p<sub>H</sub> am Anfang, als auf denjenigen am Ende des Versuches, und vielleicht sogar noch mehr auf die Säuremenge als auf p<sub>H</sub>.

*Zusammenfassung über Pepsin.* Wir erfuhren, daß Schleimhaut-extrakte aus *Acanthias*-Magen, in der Weise behandelt, wie PEKELHARING mit Magenextrakt des Schweines und Fistelsaft des Hundes verfuhr, ein Produkt liefern, das sich wie Pepsin benimmt hinsichtlich der Verdauung von Fibrin. Wir fanden das Präparat weit weniger wirksam als in der gleichen Weise hergestelltes Schweinepepsin. Es mag dies an den ungünstigen Transportverhältnissen für die Haifischmägen liegen. Das Optimum der Wirkung, bestimmt bei 3- und 4stündiger Versuchsdauer und bei 18°, lag bei einem Anfangs-p<sub>H</sub> von 2,29 und einem



Endwert nach 4 Stunden von 2,44. Das entspricht ungefähr, wie wir später sehen werden, den tatsächlichen Säureverhältnissen im Haifischmagen.

Vergleichen wir dieses Optimum mit den in der Literatur für Pepsin der Säugetiere angegebenen, so bestimmten verschiedene Autoren diese wie folgt:

Acidalbumin bei	37°	1,6—1,8	SÖRENSEN (123)
Edestin	„ 37°	1,4	MICHAELIS u. MENDELSSOHN
Eieralbumin		2,2—2,5	NORTHROP
Gelatin		2—2,8	} GYEMANT (30)
Serumalbumin		2,0	
Fibrin	± 18°	2,05 Anf. 2,41 Ende.	RINGER (101, 102)

Diese Optima liegen nicht so weit auseinander als die für Trypsin, die von verschiedenen Autoren bestimmt wurden.

BODANSKY und ROSE (12) fanden mit Haifisch- und Teleostierpepsin bei der Wirkung auf Gelatin pH 3,0 als Optimum. Es ist möglich, daß dieser abweichende Wert Beimischungen zuzuschreiben ist, da sie mit ungereinigten Extrakten arbeiteten.

*Bereitung des Trypsins.* MICHAELIS und DAVIDSOHN bestimmten 1911 (67) den isoelektrischen Punkt und das Flockungsoptimum des Trypsins bzw. des Nukleoproteids an welches es adsorbiert vorkommt und mit welchem es beim Flockungsoptimum ausfällt. Die genannten Autoren glaubten nämlich zuerst, daß die wahrgenommenen Reaktionen von reinem Trypsin gegeben wurden, während HAMMARSTEN nachwies, daß hier ein Nukleoproteid ausfällt, an welches das Trypsin wahrscheinlich adsorbiert ist.

Die minimale Löslichkeit dieses Produkts liegt bei pH 3,5—4; man erreicht diese Reaktion zweckmäßig mit Essigsäure oder Essigsäure-Puffergemischen. Wenn auch dieses Trypsin noch mancherlei Beimischungen festhalten wird, so ist es doch ein recht wirksames Präparat, mit dem sich bequem experimentieren läßt und das sich ohne erhebliche Trübung und gänzlich ohne Färbung im schwach alkalischen Medium wieder löst, während die rohen Pankreasextrakte stark braun gefärbt sind.

Ich versuchte nun, ob dieselben Reaktionen und dieselbe Bereitungsweise für das Pankreastrypsin gelten würden, und dies war in der Tat der Fall.

Hundert Pankreasdrüsen von *Acanthias vulgaris* wurden mir gesandt von Helgoland. Der Transport dauerte glücklicherweise nur wenige Tage. Auf einen Gewichtsteil Pankreas waren zwei Gewichtsteile mit Chloroform geschüttelten destillierten Wassers zugegeben. Die Organe kamen etwas mazeriert an, doch konnten wir uns an Schnitten noch überzeugen, daß alles gesandte Gewebe wirklich Pankreas war. Am nächsten Tage waren die Organe fast ganz zerfallen,



wurden aber, soweit notwendig, noch besser zerkleinert, mit Quarzsand zerrieben und 4 Tage bei niedriger Temperatur sich selbst überlassen. Darauf kollierte man durch ein lockeres Tuch. Die Reaktion des Extraktes war sauer auf Lackmus und wurde nun mittels Soda schwach alkalisch gemacht zur Lösung des Enzyms bzw. des Nukleoproteids. Die darauf folgende Filtration darf nicht zu lange dauern, weil die alkalische Reaktion dem Enzym schadet. Da das Filtrieren durch Filtrierpapier im Eiweißtrichter zu langsam vor sich ging, benutzte ich für die größte Menge des Extraktes ein kleines PEKELHARING-Filter. Angeblich soll hierbei ein gewisser Verlust an Enzym stattfinden durch Adsorption am Filtrierpapier, aber man hat den Vorteil, daß das Enzym viel kürzere Zeit der alkalischen Reaktion ausgesetzt ist. Das Filtrat war stark braun gefärbt und gab eine schöne Tryptophanreaktion. Autolyse hatte also in beträchtlichem Maße stattgefunden. Einige Kubikzentimeter wirkten in 1 proz. Sodalösung kräftig auf Spritblaufibrin, während bei gekochtem Extrakt die Wirkung gänzlich unterblieb. Tatsächlich aktivieren denn auch derartige wässrige Extrakte sich selbst, wie man schon lange wußte. Nur mit reinem Glyzerin angefertigte Extrakte bleiben immer inaktiv. Diese Selbstaktivierung wurde neulich eingehend untersucht von WALDSCHMIDT-LEITZ und ANNA HARTENECK (138). Es zeigte sich dabei, daß der Aktivator (Enterokinase) in wässrigen Pankreasextrakten aus den Begleitstoffen des Enzyms entsteht. Nachträgliches Zusetzen von gereinigter Enterokinase aus Darmextrakt zu diesen selbstaktivierten Extrakten ist nicht mehr imstande ihre tryptische Aktivität weiter zu steigern. Andererseits erreicht diese Aktivität niemals den Höchstwert, den frischdargestelltes Pankreastrockenpulver, mit einem getrockneten Kinasepräparat in neutraler Lösung zusammengebracht, geben kann. Für meinen Zweck war die Selbstaktivierung ein großer Vorteil: ich brauchte nun das Präparat nicht in Kontakt zu bringen mit Darmextrakten, die ohne weiteres Verfahren natürlich reichliche Erepsinmengen enthalten. Mein Präparat stammte also vom Pankreas allein.

An einer kleinen Menge des gewonnenen Extraktes überzeugte ich mich nun, daß in der Tat bei einem pH von ungefähr 4 eine maximale Trübung auftrat. Selbstverständlich war das Material zu kostbar um damit vergleichende Ausflockungsbestimmungen vorzunehmen. Der erwünschte pH wurde durch Hinzufügung von 2 proz. Essigsäure erreicht. Zur Kontrolle brachte ich jedesmal einige Tropfen Extrakt auf eine weiße Porzellanplatte unter Hinzufügung von Tropfen eines passenden Indikators. Hierfür verwendete ich Di-Ethylrot (4,5 bis 6,5) und Bromphenolblau (3,0—4,6). Di-Ethylrot war ganz nach der sauren Seite umgeschlagen; Bromphenolblau zeigte eine Zwischenfarbe. Die Tropfen Indikator und Extrakt wurden mittels eines Rührstabes vermischt und mit sehr kleinen Portionen weiter angesäuerten Extraktes der Farbe nach verglichen. So ließ sich der pH bis auf 0,2 oder 0,3 genau einstellen.

Die Hauptmenge des Extraktes wurde nun auf diesen pH von 4 gebracht und nach kurzem Stehen zentrifugiert. Die obenstehende klare Flüssigkeit wurde vorsichtig abgehebert und man kontrollierte, ob dieselbe nach geringem Zusatz von Alkali oder Säure noch weitere beträchtliche Trübung zeigte, um das Material so gut wie möglich auszubeuten. Das war aber nicht der Fall, ein Beweis, daß die Bedingungen des Flockungsoptimums annähernd richtig erfüllt waren. Der Niederschlag wurde mit sehr wenig destilliertem Wasser angerührt und daraus von neuem abgeschleudert. Eine sehr kleine Menge des Niederschlags löste sich leicht in schwachem Alkali und wirkte kräftig auf Spritblaufibrin. Die Hauptmenge wurde in Vacuo getrocknet und es resultierte 98 mg fester Stoff, der in einem kleinen Mörser feingepulvert ein braungelbes Pulver von einem eigentümlichen starken Geruch (wie es auch die käuflichen Pankreatinpräparate zeigen) lieferte.



*Eigenschaften des Trypsins.* Mit diesem Pulver wurden nun Versuche angestellt, um das pH-Optimum zu bestimmen.

Die dazu angewandte Methodik war die Einwirkung auf gefärbtes Fibrin. Da sich Karmin in Alkali leicht löst, benutzt man hierzu Fibrin, das mit sogenanntem Spritblau (Diphenylrosanilin) gefärbt, tüchtig ausgewaschen, getrocknet und feingepulvert ist. Diese Methode wurde u. a. von W. E. RINGER bei seinen Versuchen über Pankreastrypsin verwendet (103, 104). Über die Anwendung des Diphenylrosanilins siehe auch SMORODINZEW und ADOWA (119, 120). Bei dieser Methode treten im Vergleich zum Gebrauch von Karminfibrin in saurem Medium, nur schwache Farben auf. Dieselben können aber durch Hinzusetzung einer gleichen Tropfenzahl starker Salzsäure (25 vH) erheblich verstärkt werden. Bei den Versuchen von RINGER wurde 15 mg Enzym in 6 ccm alkalischer Flüssigkeit gelöst, und jedem von fünf Röhrchen 1 ccm zugesetzt. Die Reaktion wurde an einigen Zehntel ccm Flüssigkeit gemessen, am Ende der Hauptmenge HCl-Tropfen zugesetzt und kolorimetrisch verglichen. Zur Ersparung von kostbarem Enzympräparat verwendete ich erstens nur 8 mg Enzym pro 6 ccm; zweitens verfügte ich nicht über so kleine Elektroden, so daß der pH nach Ablauf des kolorimetrischen Verfahrens in derselben Menge Flüssigkeit bestimmt wurde. Daher konnte man die Farbe nicht verstärken mit Säure und mußte die Versuche auch wegen der geringen Enzymmenge länger dauern lassen. Ich wählte eine Zeitdauer von 4 Stunden. Diese bot auch den Vorteil, daß das Optimum unter mehr physiologischen Umständen bestimmt wurde. Denn eine Versuchsdauer von 10 oder 15 Minuten mag für den kolloidchemischen Aspekt der Trypsinwirkung in Verbindung mit der Quellung des Eiweißes und andern Faktoren am geeignetsten sein, vom physiologischen Standpunkte ist es wichtiger, das Optimum des Enzyms in Zusammenhang mit den Reaktionsverhältnissen des Darmes bringen zu können.

Die Bestimmung dieses Optimums war notwendig wie bei den Karbohydrasen, in erster Linie um das Enzym mit dem Trypsin der höheren Vertebraten zu vergleichen, und weiter um darüber Auskunft zu erlangen, bei welchem pH die schon im vorigen Kapitel erwähnten Vergleichen der Proteasen von Pankreas und Darm auszuführen seien.

Als Puffergemische wurden verwendet N/20 Boraxlösung und 0,127 N HCl oder 0,09 N Lauge in passenden Mengen. Die meisten Versuche wurden bei 37° ausgeführt, da bei dieser Temperatur das Fibrin im alkalischen Medium besser zur Quellung gebracht wird und die meisten Optima des Säugertypsins bei dieser oder naheliegender Temperatur bestimmt wurden.

Die Beschreibung der Versuche folgt hier; eine kurze Besprechung der Resultate, verglichen mit den bekannten Tatsachen der physiologisch-chemischen Literatur, wird danach folgen.



Versuch 1. 8 mg *Acanthias*-Trypsin gelöst in 2,25 ccm 0,127 N HCl und 3,75 ccm 0,05 N Borax; davon 1 ccm pro Röhrchen. 50 mg Spritblau-fibrin, 30 Minuten gequollen. Verdauungszeit 4 Stunden.  $T = 37^{\circ} \pm 0,05^{\circ}$ . 11. Oktober 1926.

Nr.	ccm Borax	ccm HCl	ccm NaOH	pH vor Verd. <sup>1)</sup>	pH nach Verd.	Kolorimeterzahl
1.	5,5	4,5	—	7,43	7,44	0,12
2.	6,5	3,5	—	8,20	8,15	7,0
3.	9	1	—	verloren gegangen	8,925	4,58
4.	7,6	—	2,4	9,385	9,345	2,7 2,05 <sup>2)</sup>
5.	4,5	—	5,5	10,06	10,02	2,0 0,7 <sup>2)</sup>

Das Optimum liegt hier bei einem Anfangs-pH von 8,2. Da bei 7,4 fast keine Wirkung sich zeigt, war es interessant zwischen Nr. 1 und 2 noch einen Versuch einzuschalten. Bei diesem Versuch, der genau wie der vorige angestellt wurde, war für Nr. 4 und 5 die Trypsinlösung durch 5 Minuten langes Erhitzen bei Kochtemperatur inaktiviert worden, um einen Eindruck zu bekommen von der hydrolytischen Wirkung der alkalischen Mischung bei diesen pH-Werten. 14. Oktober 1926.

#### Versuch 2.

Nr.	ccm Borax	ccm HCl	ccm NaOH	pH nach V.	Kolorimeterzahl
1a	6	4	—	7,76	{2,75? zu Nr. 2
2.	6,5	3,5	—	—	{7
3.	9	1	—	8,921	{7
4.	7,6	—	2,4	—	{1
5.	4,5	—	5,5	—	{2 } zu Nr. 3 <sup>3)</sup>

Bei diesem Versuch ergab sich, daß gleich nach der Verdauung Nr. 1a fast dieselbe Farbenintensität zeigte wie Nr. 2 (Optimum des vorigen Versuches); es war aber in Nr. 1a eine Trübung entstanden, die allmählich zu Boden sank. Diese Trübung rührte wohl (wie bei den Pepsinversuchen) davon her, daß zwar bei diesem pH = 7,76 ein Angriff des Eiweißes gut möglich ist, die Menge Alkali schließlich aber nicht genügt, um das entstehende Alkalialbumin in Lösung zu halten. Nach Absetzen des Niederschlags wurde in Nr. 1a ein Wert von 2,75 verglichen mit Nr. 2 gefunden. Mit der trüben Flüssigkeit war keine Ablesung möglich; der Wert von 2,75 ist für die tatsächliche Wirkung daher viel zu niedrig. Daß wirklich Alkali gebunden wird, kann man aus der Vergleichung der pH-Werte vor und nach dem Versuch 1 ersehen. Wo fast keine Wirkung ist, ist der Unterschied 0,01; wo die höchste Wirkung ist, 0,05, in den anderen Röhrchen 0,04. Diese Werte sind aber der Fehlergrenze

<sup>1)</sup> Dieser wurde später an gleichartig zusammengesetzten Proben gemessen.

<sup>2)</sup> Nach Abzug der Alkaliwirkung. S. später.

<sup>3)</sup> Nr. 2 und 3 wurden also hier nicht direkt miteinander verglichen. Für diese Vergleichung wurden Nr. 2 und 3 von Versuch 1 benutzt.



sehr nahe; um diesen Schluß ziehen zu können, muß ich erstens darauf hinweisen, daß die Reproduzierbarkeit der Versuche in bezug auf die pH-Messung gut ist, da Nr. 3 von Versuch 2: 8,921 ergibt und von Versuch 1: 8,925. Zweitens muß ich verweisen auf die Prüfungstabelle im Kapitel VII über die Messung der Wasserstoffionenkonzentration, wo man ersehen kann, daß die mittlere Abweichung der dort gemessenen Puffergemische meistens um nicht mehr als 0,02 von den Standardwerten SÖRENSENS liegt.

Die Alkalihydrolyse in Nr. 4 und 5 wurde mit Nr. 3 verglichen. Da bei der Zahl 7 des Kolorimeters die Intensität der Lösungen gleich ist, infolge der Anordnung des Kolorimeters, stellt sich die Alkaliwirkung in Nr. 5 auf  $\frac{2}{7}$ , in Nr. 4 auf  $\frac{1}{7}$  von Nr. 3. Eine entsprechende Korrektur ist in den Werten von Nr. 4 und 5 in Versuch 1 anzubringen, wodurch diese sich auf  $2,7 - \frac{1}{7} \times 4,58 = 2,05$  und  $2,0 - \frac{2}{7} \times 4,58 = 0,7$  stellen. Unter Benutzung dieser korrigierten Werte ist diese Abhängigkeit der Trypsinwirkung von der Wasserstoffionenkonzentration in Abb. 6 in einer Kurve dargestellt.

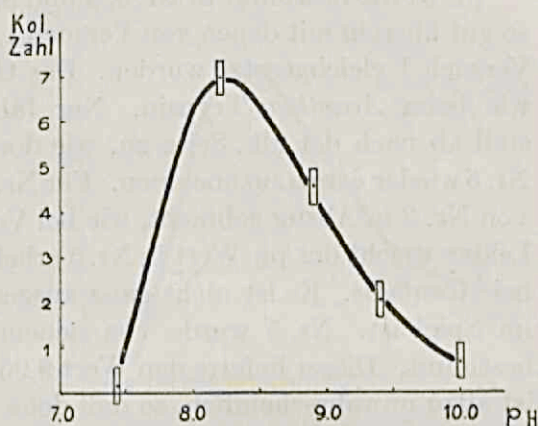


Abb. 6. Abhängigkeit der Wirkung von einem Präparat von *Acanthias*-Pankreastrypsin (gereinigt nach MICHAELIS und DAVIDSOHN) von der Wasserstoffzahl bei 4 Stunden Dauer und 37°. Kol.-Zahl = Ablesungszahl des Kolorimeters. Substrat Fibrin.

Da diese Versuche bei vierstündiger Dauer ausgeführt wurden und die Anordnung übrigens ungefähr derjenigen in den Versuchen RINGERS gleich war, schien es mir angebracht, das Trypsin, nach MICHAELIS und DAVIDSOHN aus Schweinepankreas bereitet, bei obiger Versuchsdauer wirken zu lassen. Herr Prof. RINGER war so freundlich, mir ein wenig des von ihm benutzten Trypsins zu überlassen. Nach der Erfahrung mit dem Pepsin erwartete ich, daß dieses weit stärker wirken würde, als das *Acanthias*-Präparat und verwendete anfänglich 2 mg des Säugetiertrypsins zu 6 ccm gelöst, also eine etwa achtmal schwächere Lösung als in den Versuchen RINGERS. Diese war aber nicht imstande, nach 4 Stunden ohne Hinzusetzen von HCl-Tropfen genügende Farbe zu entwickeln. Das war erst nach 18½ Stunden der Fall, woraus sich ergibt, daß die Stärken der beiden Präparate ungefähr gleich sind. Aber ein erheblicher Abzug für Alkaliwirkung bei dieser langen Dauer wird diesen Wert verringern. Es zeigte sich, daß bei Nr. 2 wahrscheinlich ein Optimum lag, aber Nr. 4 und 5 hatten stärkere Farben, wohl durch die Alkaliwirkung. Jedenfalls war dieses Resultat höchst unzuverlässig,



auch wegen der Abwesenheit von Antiseptikum bei so langer Dauer. Es wurde also mit einer größeren Menge Trypsin wiederholt.

Versuch 3. 5 mg Säugetiertrypsin in 2,25 ccm HCl und 3,75 ccm Borax gelöst; davon zu jedem Röhrchen 1 ccm; 50 mg Spritblaufibrin, 30 Minuten gequollen. Verdauungszeit 4 Stunden.  $T = 37^{\circ}$ . 18. Oktober 1926.

Nr.	ccm Borax	ccm HCl	ccm NaOH	pH-Ende	Kolorimeterzahl	
1.	5,5	4,5	—	7,43	0,40	
2.	6,5	3,5	—	8,20	7,00	
3.	9	1	—	8,94	5,33	
4.	7,6	—	2,4	9,38	3,92	3,16 <sup>1)</sup>
5.	4,5	—	5,5	9,955 und 9,585	6,00	4,48 <sup>1)</sup>

pH wurde bestimmt in Nr. 3, 4 und 5. Die Werte von 3 und 4 stimmen so gut überein mit denen von Versuch 1, daß sie in Nr. 1 und 2 denen von Versuch 1 gleichgesetzt wurden. Das Optimum zeigt hier dieselbe Lage wie beim *Acanthias*-Trypsin. Nur fällt die Kurve (Abb. 7) weniger steil ab nach der alk. Seite zu, wie dort. Sogar scheint die Wirkung in Nr. 5 wieder etwas zuzunehmen. Für Nr. 4 ist  $\frac{1}{7}$ , für Nr. 5  $\frac{2}{7}$  des Wertes von Nr. 3 in Abzug gebracht, wie bei Versuch 1 und 4 ausgeführt wurde. Leider weicht der pH-Wert in Nr. 5 erheblich ab von dem entsprechenden bei *Acanthias*. Es ist nicht ganz ausgeschlossen, daß hier ein Versehen im Spiel ist. Nr. 5 wurde von neuem angesetzt und der Anfangs-pH bestimmt. Dieser lieferte den Wert 9,955. Eine Verschiebung von 0,375 ist allzu unwahrscheinlich, so daß denn die Zunahme in Nr. 5 auf einem Versehen beim Einsetzen beruhen mag<sup>2)</sup>. Die Farbenstärke des später angesetzten Versuches konnte nicht mehr mit den anderen Experimenten verglichen werden.

Die 5 mg Trypsin lieferten ohne Zusatz von HCl in derselben Zeit genügende Farbenintensitäten wie das *Acanthias*-Trypsin. Letzteres wird etwas mehr als die halbe Wirksamkeit des Schweinetrypsins haben. Dabei muß man bedenken, daß letzteres erheblich weiter gesäubert war.

Schließlich war es nun noch interessant das Optimum des *Acanthias*-Trypsins bei  $27^{\circ}$  zu bestimmen.

Versuch 4. 8 mg *Acanthias*-Trypsin gelöst in 3,75 ccm Borax und 2,25 ccm HCl. 50 mg Spritblau 30 Minuten gequollen bei  $37^{\circ}$ . Verdauung 4 Stunden bei  $27^{\circ}$ .

Nr.	ccm Borax	ccm HCl und NaOH	pH	Kolorimeterzahl	
1.				1,5	
2.	Wie in Versuch 1			7	
3.				4,58	
4.				3	2,4
5.				3,8	2,5

<sup>1)</sup> Nach Abzug der Alkaliwirkung.

<sup>2)</sup> Daher wurde Nr. 5 aus der Abbildung fortgelassen.



Die Kurve (Abb. 8), die die Werte des Versuchs veranschaulicht, zeigt im wesentlichen die Form der Abb. 6. Zu beiden Seiten aber (sauer und alkalisch) fällt sie weniger steil ab als die bei  $37^{\circ}$ . Die Unterschiede sind nur gering, aber unverkennbar. Es kann nicht wundernehmen, daß die vernichtende Wirkung der Alkalinität bei niedriger Temperatur geringer wird.

Es war meine Absicht auch die spaltende Wirkung dieses Trypsinpräparates auf WITTE-Pepton mittels der Alkoholtitration zu verfolgen. Um die enzymatische Wirksamkeit des Präparates in dieser Hinsicht vorläufig zu ermitteln, stellte ich folgenden Versuch an bei einer Alkalinität, die nahezu dem in den vorigen Versuchen gefundenen Optimum entsprach.

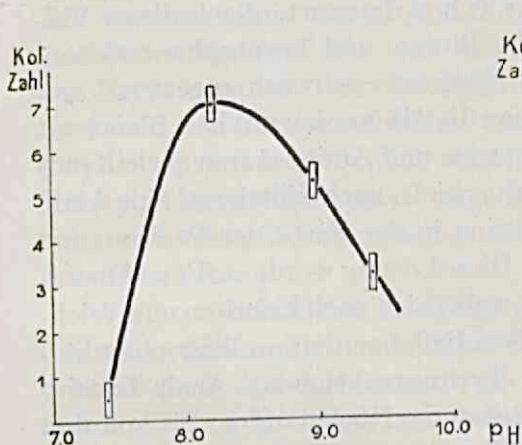


Abb. 7.

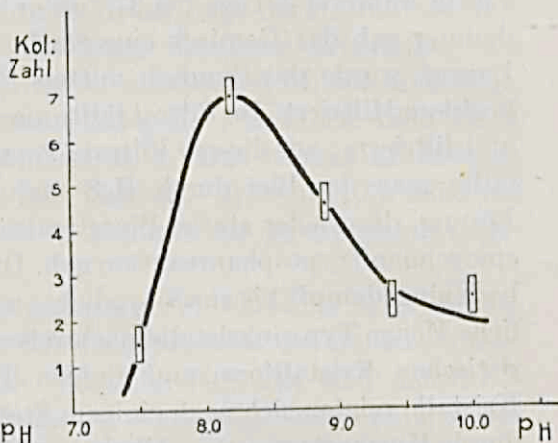


Abb. 8.

Abb. 7. Abhängigkeit der Wirkung von einem Präparat von Säugertrypsin (gereinigt nach MICHAELIS und DAVIDSOHN) von der Wasserstoffzahl bei 4 Stunden Dauer und  $37^{\circ}$ . Die Kurve fällt an der alkalischen Seite weniger steil ab als die vom *Acanthias*-Trypsin.

Abb. 8. Abhängigkeit der Wirkung vom Präparat von *Acanthias*-Pankreastrypsin von der Wasserstoffzahl (pH) bei 4 Stunden und  $27^{\circ}$ . Der Unterschied zwischen den pH Aktivitätskurven von *Acanthias*-Trypsin und Säugertrypsin bei  $37^{\circ}$  ist größer, wie derjenige, welcher zwischen beiden Kurven des *Acanthias*-Trypsins bei  $37^{\circ}$  und  $27^{\circ}$  erhalten wurde.

Es wurden (bei  $27^{\circ}$ ) zusammengebracht: 6,5 ccm 0,1 N Borax,  $3\frac{1}{2}$  ccm 0,127 N HCl, 3 ccm 3proz. WITTE-Peptonlösung (= 90 mg), 1 ccm Wasser und 4 mg des Trypsinpräparates (durch Anreiben in einen kleinen Mörser gelöst in einer Mischung von 1 ccm der Salzsäure und 2 ccm der Boraxlösung). Titriert wurden jedesmal 5 ccm. Titration I: 0,58 ccm 0,173 N alk. Kalilauge. — Titration II: (nach 4 Stunden) 0,90 ccm Lauge. Es waren noch 6 ccm übrig, wovon der größte Teil in die Wasserstoffelektrode aufgesaugt wurde zur pH-Messung. Die pH-Messung ergab einen Wert von 8,02. Nach Beendigung der Messung wurde der Inhalt der Elektrode in das ursprüngliche Reagenzrohr des Versuches zurückgebracht, Toluol zugesetzt und noch weitere 20 Stunden bei  $27^{\circ}$  gelassen. Die letzte (sehr ungenaue) Titration des Restes von etwas mehr als 5 ccm Flüssigkeit ergab 1,05 ccm Lauge. So ungenau diese



letzte Bestimmung durch Verlust und Verdünnung bei der pH-Bestimmung auch sein mag, zeigt sie doch, daß die Zunahme in den ersten 4 Stunden größer ist, als die in den letzten 20 Stunden (bzw. 0,32 und 0,15 ccm Lauge). Die geringe Totalzunahme von 0,47 ccm ermutigte mich nicht dazu, das kostbare Enzympräparat an einen Optimumversuch mit WITTE-Pepton zu wagen. Ich habe es daher für einige später anzustellende Versuche mit Spiritblaufibrin aufbewahrt.

Mit einem Teil eines Extraktes aus *Acanthias*-Pankreas versuchte ich zur besseren Charakterisierung des Enzymes noch etwas über die Spaltungsprodukte zu erfahren. 10 ccm Extrakt (entsprechend 5 g Frischgewicht) wurden mit 100 ccm 2 proz.  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung und etwa 10 g Fibrin während 4 Tage bei  $37^\circ$  unter Toluol digeriert. Nach dieser Verdauung gab das Gemisch eine starke Biuret- und Tryptophanreaktion. Darauf wurde das Gemisch mittels Essigsäure schwach angesäuert, gekocht und filtriert. Im Filtrat fällte man die Albumosen mit bas. Bleiazetat und filtrierte; aus diesem Filtrat (Peptone und Aminosäuren enthaltend) fällte man das Blei durch  $\text{H}_2\text{S}$  und erhielt nach Filtrieren eine klare Lösung, die wieder starke Biuretreaktion in der Farbe der Peptone und eine schöne Tryptophanreaktion gab. Diese Lösung wurde auf dem Wasserbade eingedampft bis zur Sirupdicke, wobei sich nach Erkalten eine reichliche Menge Tyrosinkristalle nachweisen ließ, kennbar an ihrer charakteristischen Kristallform und einigen Tyrosinreaktionen. Auch Leucin-Kristalle zeigten sich nach einigem Stehen des Rückstandes. Sie konnten durch Hinzusetzung von Alkohol und erneutem Eindampfen, von den Tyrosinkristallen und dem unangegriffenen Peptonrest getrennt werden. Diese Experimente wurden ausgeführt nach KRÜGERS Vorschrift (50 a).

*Zusammenfassung über Trypsin.* Wir erfuhren in der zweiten Hälfte dieses Kapitels, daß das Reinigungsverfahren, das MICHAELIS und DAVIDSOHN für das Säugertrypsin angaben, auch auf das Trypsin von *Acanthias vulgaris* anwendbar ist. Ein derartiges Präparat, nach der Fällung mit Essigsäure bloß weiter gereinigt durch Waschen mit wenig Wasser, wirkt fast ebenso stark wie ein weiter gereinigtes Präparat von Säugertrypsin. Es hat ein gut definiertes pH-Optimum, wenn man es 4 Stunden auf Fibrin wirken läßt, unter Benutzung von Borax, HCl und NaOH als Puffergemischen. Dieses Optimum liegt bei  $37^\circ$  und  $27^\circ$  bei pH 8,2 ungefähr. Nur fällt die pH-Aktivitätskurve bei  $27^\circ$  etwas weniger steil ab, als bei  $37^\circ$ . Säugertrypsin gibt bei 4 Stunden Wirkungsdauer ebenfalls ein Optimum bei etwas höher als pH 8, bloß fällt die Kurve bei  $37^\circ$  etwas weniger steil nach der alkalischen Seite als die des *Acanthias*-Trypsins<sup>1)</sup>. Diese letztere Vergleichung wurde ausgeführt, weil die An-

<sup>1)</sup> Es ist nicht ausgeschlossen (nach einigen seit der Abfertigung des Manuskriptes angestellten Versuchen), daß das Optimum für Säugertrypsin



gaben der betreffenden Literatur sehr weit auseinandergehen. Es werden Optima erwähnt zwischen 7,4 und 11. Diese große Verschiedenheit der Befunde erklärt sich erstens daraus, daß die Versuche bei sehr verschiedenen Substraten angestellt wurden, und daß bei vielen Proteasen insbesondere beim Trypsin, der Zustand des Substrates eine sehr große Rolle spielt. NORTHROP nahm an, daß das Optimum mit dem Dissoziationsmaximum des Substrates zusammenfällt, wenn es löslich ist und RINGER führte aus, daß es bei unlöslichem Eiweiß mit dem Maximum der Quellung annähernd übereinstimmt. Früher hatte MICHAELIS behauptet, daß  $pH$  den Dissoziationszustand des *Enzyms* weitgehend beeinflussen sollte. Auch für Pepsin gelten dieselben Betrachtungen<sup>1)</sup>. Ein zweiter Grund des großen Unterschiedes liegt darin, daß die verschiedenen Autoren bei sehr verschiedener Zeitdauer arbeiteten. Da das Trypsin so sehr der Vernichtung im alkalischen Milieu unterliegt, darf man den Zeitfaktor nicht vernachlässigen. Für Fibrin fand LONG (58) das Optimum bei  $pH$  8,0—8,6 (3 St. 40°). Das stimmt mit meinem Versuche für Säugertrypsin ungefähr überein. RINGER (103) fand bei einer so kurzen Wirkungsdauer wie 11 Minuten das  $pH$ -Optimum ungefähr bei 11,3.

WALDSCHMIDT-LEITZ (134) hat gegen letztere Versuche eingewendet, daß keine Kontrollbestimmungen für die Hydrolyse des Substrats ausgeführt sind, und daß deshalb die Versuche RINGERS kein deutliches Optimum zeigen. Diese Bemerkung ist unrichtig, denn einmal hat RINGER das Anstellen dieser Kontrollbestimmungen nicht versäumt und hat WALDSCHMIDT-LEITZ sie bloß übersehen und weiterhin zeigen die Kurven RINGERS ein deutliches Optimum und fallen oberhalb  $pH$  11,5 steil ab. Leider hat OPPENHEIMER in seinem „Fermente“ (5. Aufl.) S. 909 diese Kritik von WALDSCHMIDT-LEITZ übernommen, wahrscheinlich ohne die Originalarbeiten nachzuschlagen. Obwohl RINGER selbst (106) die Einwände von WALDSCHMIDT-LEITZ schon zurückgewiesen hat, schien es mir angebracht, auf diese Tatsachen nochmals hinzuweisen.

Auf Grund dieser Ergebnisse über Optima, Spaltprodukte und Bereitungsweise (Ausflockungsoptimum) ist das Trypsin von *Acanthias* mit dem der Säugetiere als nahezu identisch zu betrachten. Der geringe Unterschied in der Aktivitätskurve, die beim Schwein etwas weniger

unter diesen Umständen doch noch etwas höher liegt und also der Unterschied mit *Acanthias*-Trypsin noch etwas größer ist, wie hier angegeben.

<sup>1)</sup> In neuerer Zeit wurden von WILLSTÄTTER (140) u. a. pflanzliche Proteasen beschrieben, die ihr Optimum beim isoelektrischen Punkte des Substrates haben, also gerade bei der minimalen Quellung, Dissoziation, Viskosität usw. Nach meiner Meinung wird hierher vielleicht auch die Protease aus *Astacus*- und *Homarus*-Magensaft gehören, welcher Magensaft durchschnittlich ein  $pH$  von etwa 5,5 aufweist. Siehe aber auch die neuesten Untersuchungen von RINGER und GRUTTERINK (106).



steil verläuft wie bei *Acanthias*, kann auch kleinen Unterschieden in der Beimischungen zuzuschreiben sein. Ich sehe darin wenigstens keinen Grund, eine grundsätzliche Verschiedenheit anzunehmen. Biologisch betrachtet ist es sehr gut verständlich, daß das Trypsin der Säuger besser gegen höhere Temperaturen geschützt ist. Ohne Produktion eines neuen Enzyms kann das sehr gut erreicht werden durch Auftreten von Beimischungen, oder fortfallen von andern, wodurch das Enzymsystem erhebliche Veränderungen in seinen Eigenschaften erleiden kann. (Eine derartige Anpassung an verschiedene Umstände, die durch Beimischungen erreicht wird, bietet uns auch z. B. das Hämoglobin der Fische, verglichen mit dem der Säugetiere. Die Änderung der Dissoziationskurve des Hämoglobins findet hier seine Ursache in seiner Beeinflussung durch Stoffe aus den Blutkörperchen (vermutlich Elektrolyte.)

## Kapitel VI.

### Die Lipasen.

Wirkung in Rohextrakten — Verfahren von ROSENHEIM — Zusammenfassung.

In seinem „Grundriß der Fermentmethoden“ bemerkt WOHLGEMUTH folgendes über die Pankreaslipase: „Trotzdem die Pankreasdrüse sehr reich an Steapsin ist, macht es doch große Schwierigkeiten aus der Drüsensubstanz eine gut wirksame Fermentlösung zu bekommen. Am besten scheint noch das Verfahren von ROSENHEIM zu sein . . .“ usw. Bedenkt man nun noch, daß die verschiedensten Ionen und andere Substanzen einen erheblichen aktivierenden oder hemmenden Einfluß ausüben können, der sich zuweilen wieder anders im sauren als im alkalischen Mittel gestaltet, und weiter, daß auch das pH-Optimum im hohen Maße abhängig ist von dem Reinheitsgrade des Enzyms<sup>1)</sup>, so wird es einleuchten, daß die Lipase wegen diesen verwickelten Verhältnissen keineswegs ein so günstiges Objekt ist, um daran biologische Anpassungen zu studieren, wie wir das an Amylase, Maltase, Trypsin und Erepsin versuchten.

*Wirkung in Rohextrakten.* Nur die Lipase aus dem Pankreas von *Acanthias vulgaris* habe ich untersucht. In den ersten Versuchen verfügte ich über einen schon ziemlich alten Extrakt (einige Monate) von zehn Pankreas in etwa 85proz. Glycerin. Auf die Dauer scheint in diesen Extrakten eine lipatische Autolyse einzutreten: der Extrakt reagierte ziemlich stark sauer.

<sup>1)</sup> WILLSTÄTTER und MEMMEN (141) fanden z. B. das pH-Optimum der Magenlipase und der Pankreaslipase in Rohauszügen verschieden. Die beiden Enzyme ergeben sich nach Reinigung als identisch; der Unterschied der Optima ist bloß durch den Unterschied der Beimischungen bedingt.



Die Versuche wurden so ausgeführt, daß in 100 ccm-Flaschen 2 ccm Olivenöl, 20 ccm dest. Wasser und 1 oder 2 ccm der Enzymlösung gebracht wurden; ich neutralisierte das Gemisch auf Phenolphthalein, setzte 10 Tropfen Toluol zu und verschloß die Flaschen mittels Gummistopfen. Sie wurden dann einige Stunden im Thermostaten um eine Achse gedreht, mittels einer Einrichtung, wie man sie bei chemischen Löslichkeitsbestimmungen verwendet (OSTWALD-LUTHER [76], Kap. XI, S. 261). Nach Ablauf der Versuchszeit wurde der Inhalt mit 100 ccm 96 vH Alkohol in einen Erlenmeyerkolben übergespült und mittels 0,1 N alkoholischer Lauge titriert. Eine Blankobestimmung mit gekochtem Enzym ist notwendig, da man im alkoholischen Milieu Eiweiß und seine Abbauprodukte mitbestimmt (WILLSTÄTTER und WALDSCHMIDT-LEITZ [142]). Nach PEKELHARING ist die Reproduzierbarkeit der Versuche bei dieser Anordnung gut und er stellt den Versuchsfehler auf 0,1—0,2 ccm  $\frac{N}{4}$  Kalilauge.

Versuch 1. Anordnung wie erwähnt. Nr. 1 mit 35 mg  $MgCl_2$ , Nr. 2 ohne Zusatz, Nr. 3 mit gekochtem Extrakt (1 ccm). Zur Neutralisation der Kontrolle waren 0,98 ccm 0,1 N Lauge nötig; die gleiche Menge wurde auch den andern Flaschen zugesetzt. Diese ziemlich große Menge wurde von der schon erwähnten Autolyse des Extraktes, die stattgefunden hatte, bedingt. Nach 8 Stunden verbrauchten: Nr. 1: 5,88, Nr. 2: 3,27, Nr. 3: 3,02 ccm 0,1 N alk. Lauge. Zunahme ohne Zusatz: 0,25; mit  $MgCl_2$ : 2,86. Bekanntlich ist nach PEKELHARING (93)  $MgCl_2$  eines der am stärksten aktivierenden Salze.

*Verfahren von ROSENHEIM.* Es wurde nun versucht, nach der Methode von ROSENHEIM (109) ein reineres Lipasepräparat anzufertigen. Dazu wurde zuerst der Extrakt durch Kollieren von einer darin (durch die Autolyse) entstandenen, überstehenden Trübung größtenteils getrennt und dann mit einem zehnfachen Volum destillierten Wassers verdünnt. Dabei entstand (wie es ROSENHEIM für Schweinepankreas beobachtete) ein Niederschlag. Nach Zusatz von einigen Tropfen verdünnter Essigsäure setzte dieser Niederschlag sich besser ab und am nächsten Tage wurde die obenstehende Flüssigkeit abgehebert. Nochmals wurde Wasser zugesetzt und nachdem das Präzipitat sich wieder gesetzt hatte, die Flüssigkeit abgehebert und das Präzipitat auf gehärtetem Filter trockengesaugt, mit etwas Wasser ausgewaschen, vom Filter genommen und (nach PEKELHARING) in einigen (4) ccm Glycerin gelöst. Die Ausbeute war nicht groß: durch die Autolyseprodukte dürfte im Extrakt ziemlich viel Enzym gebunden oder vernichtet worden sein. Mit dem so gereinigten Enzym wurde folgender Versuch angestellt.



Versuch 2. Die 4 ccm des Lipasepräparates verdünnt zu etwas mehr als 60 ccm mit dest. Wasser, und davon in jede Flasche 20 ccm gebracht. Zu allen Flaschen 3 Tropfen Phenolphthalein. Nr. 1 war mit 35 mg  $MgCl_2$  versehen, Nr. 2 ohne Zusatz, Nr. 3 mit gekochtem Extrakt. Alle brauchten 0,13 ccm 0,1 N Lauge zur Neutralisation. Nach 6 Stunden Drehen gab Nr. 1 eine Zunahme von 4,35, Nr. 2 von 0,74, Nr. 3 von 0,63 ccm 0,1 N Lauge zu sehen. Diese letzte rührt also hauptsächlich von Eiweiß und Peptiden her und die Zunahme für die Versuche mit  $MgCl_2$  und ohne Zusatz stellen sich auf 3,72 und 0,11.

Mit einem frischen Extrakt von *Acanthias*-Pankreas wurde der Versuch noch einmal wiederholt. Jedoch gelang hier die Fällung des Präzipitats nicht so gut wie im vorigen Versuche, vielleicht weil etwas zu viel angesäuert wurde. Es waren ziemlich große Mengen Eiweiß mitgefällt und das Präparat war auch nicht frei von Trypsinwirkung. Die Unterschiede zwischen den Versuchen und der Kontrolle waren ungefähr den zuvor erwähnten gleich.

*Zusammenfassung.* Aus diesen wenigen Versuchen über Fettspaltung geht hervor, daß eine Lipase im Pankreas von *Acanthias* enthalten ist, daß sie von  $MgCl_2$  aktiviert wird, wie die Pankreaslipase der Säugetiere, und daß sie nach dem Verfahren von ROSENHEIM einigermaßen gesäubert werden kann.

Ich muß noch hinzufügen, daß ich mich vergeblich bemühte, mit einer Menge Karpfenextrakt (75 mg entsprechend), der eine lebhaft Amylasewirkung zeigte, Fettspaltung zu erhalten in  $8\frac{1}{2}$  Stunden. Die Mengen an Organ, die man braucht, um deutliche Spaltung nachzuweisen, sind bei dieser Anordnung viel größer (für Haifisch 500 mg).

## Kapitel VII.

### Die Wasserstoffionenkonzentration im Darmkanal der Fische.

Einleitung — Methodik — Resultat der Messungen.

*Einleitung.* Es ist ein Problem der allgemeinen Physiologie zu erforschen, inwiefern die Reaktion des Magen- und Darminhaltes übereinstimmt oder abweicht von den  $pH$ -Optima, die in Vitro für die verschiedenen Enzyme gefunden wurden.

Was die Magenverdauung betrifft, scheint die Reaktion des Inhaltes auf dem Höhepunkt der Verdauung nicht so weit vom Optimum der Pepsinwirkung entfernt zu sein. Wir konnten der Literatur entnehmen, daß dieses ungefähr bei  $pH = 2$  liegt, während nach MICHAELIS und DAVIDSOHN (68) die mittlere Azidität liegt zwischen  $C_H$ -Werten von 0,028 und 0,0015 (also  $pH = 1,55$  und 2,82) und MC CLENDON (61) fand, daß nach einer gewöhnlichen Mahlzeit (kein eiweißreiches Probefrühstück)



$C_H$  in der Mitte des Magens steigt bis etwa 0,01 (Werte zwischen 0,001 und 0,05) also  $p_H$  etwa 2. Diese Konzentration wird zwei bis drei Stunden nach der Mahlzeit erreicht und bleibt dann konstant bis die Nahrung aus dem Magen verschwindet.

Während im Magen die saure Reaktion und die Anwesenheit freier Salzsäure immer leicht nachzuweisen war, haben sich über die Reaktion des Darminhaltes, die gar nicht so weit vom neutralen Punkt entfernt liegt, die Ansichten im Laufe der letzten 30 bis 40 Jahre geändert: sowohl durch die Entwicklung der elektrometrischen Methode zur Bestimmung der Wasserstoffionenkonzentration, als durch den verbesserten Einblick in die Wirkungsart und Zuverlässigkeit der Indikatoren. Die frühere Vorstellung war die einer sauren Zone bis zum Ductus pancreaticus, dann einer alkalischen bis zum Dickdarm und dann wieder einer sauren durch die Gärungen im letzten Darmabschnitt.

Auch COHNHEIM (16) l. c. S. 78 und 110 vertrat die Auffassung, daß die Dünndarmverdauung (Duodenalverdauung?) bei einer dem Optimum der proteolytischen Trypsinwirkung entsprechenden Alkalinität ablaufe ( $p_H$  etwa 9). Neuere Messungen aber von LONG und FINGER (59) unter den nötigen Kautelen ausgeführt an Darminhalten von drei verschiedenen Darmstrecken bei Schweinen, Kälbern und Lämmern und für den ganzen Darm vom Hunde, ergaben, daß in allen Dünndarmabschnitten die Reaktion nicht weit von der Neutralität abweicht. Auch bei gesunden Menschen wurden Messungen ausgeführt an Darminhalt, der nach den Mahlzeiten gewonnen wurde mittels einer „Rehfußtube“, deren Stellung radiographisch kontrolliert wurde. Die Reaktionen wurden gefunden „from distinctly acid to slightly alkaline. Where the tube is far enough down to secure a uniform mixture of contents, the acid reaction is apparently as common as the alkaline, but the degree of acidity is not sufficient to check the normal tryptic reaction. . . . Any reaction near neutrality may occur.“ Derartige Resultate wurden auch von MC CLENDON und Mitarbeitern (61—63) erhalten bei Menschen, die während 5 Tage und 4 Nächte ein Rohr mit einem kleinen eisernen Senker in ihrem Darm trugen. Beim erwachsenen Hunde wird der Darminhalt über die ganze Länge sauer gefunden (im Anfang  $p_H = 6 - 6,3$ ; in der Mitte 5,6 und 5,7 und am Ende 6—6,3).

HAMMARSTEN erwähnt in seinem Lehrbuch der physiologischen Chemie (9. Aufl., S. 405) auf Grund der älteren Wahrnehmungen noch, daß der Darm in seiner ganzen Länge alkalisch sein kann. Im Lichte der neueren Messungen glaube ich, daß dies in Abrede gestellt werden muß: in normalen Umständen bewegt sich die Reaktion des Darminhaltes um den neutralen Punkt. Auf Grund der Alkalinität von Pankreas- und Darmfistelsaft findet sich die Vorstellung eines alkalischen Darminhaltes noch hier und da in der Literatur. So kommt in einer vor einigen Jahren



erschienenen Abhandlung von WILLSTÄTTER, WALDSCHMIDT-LEITZ und HESSE (143) über Pankreasamylase, die folgende Bemerkung vor: „Bei schwach alkalischer Reaktion, also unter den natürlichen Wirkungsverhältnissen des pankreatischen Enzyms im Darm, erfolgt bei gleichzeitiger Anwesenheit von Natriumchlorid ...“ usw. AUERBACH und PICK (2), die in einer ausführlichen Arbeit die  $C_H$  von Pankreas- und Darmfistelsaft ermittelten und diese bei  $18^\circ$  gleich  $0,2 \times 10^{-8}$  bis  $5 \times 10^{-8}$  fanden ( $p_H$  8,70 bis 7,30) zogen aus diesen Wahrnehmungen den Schluß, daß die Alkalinität des Dünndarminhaltes dem (von MICHAELIS und DAVIDSON gefundenen) Optimum der peptolytischen Wirkung des Trypsins entspricht. Mit Unrecht, denn man hätte im voraus erwarten können, daß der saure Chymus, vom Magen herkommend, ebenso die entstehenden Fettsäuren und Aminosäuren und auch die  $CO_2$  einen wichtigen Einfluß haben mußten beim Zustandekommen der Reaktion des eigentlichen Darminhaltes. Die neuere Literatur lehrte denn auch, wie wir ausführten, daß diese Reaktion annähernd neutral ist und die größten Abweichungen eher nach der sauren als nach der alkalischen Seite vorkommen. Übrigens müssen wir aus der wichtigen Arbeit von AUERBACH und PICK noch hervorheben, daß die anorganischen Bestandteile der Säfte im wesentlichen  $NaHCO_3$  und  $NaCl$  sind, wobei im Pankreas das Bikarbonat, im Darmsaft das Chlorid überwiegt. Beide haben die gleiche wahre Alkalinität, der Pankreassaft aber ein größeres Säurebindungsvermögen (höheren Gehalt an Bikarbonat).

Die Optima der Pankreasamylase und der Darminvertase (bei den Säugetieren) liegen bei annähernd neutraler (sehr schwach saurer) Reaktion, so daß diese Enzyme bei genügendem Salzgehalt, der wohl immer anwesend ist, unter optimalen Bedingungen arbeiten. Das Optimum der Erepsinwirkung liegt nach WALDSCHMIDT-LEITZ bei 7,8, nach EULER bei etwa 8,7; das von Trypsin auf Pepton bei ungef. 8, von Trypsin auf Eiweiß bei längerer Dauer bei 9 bis  $10^1$ ). Für Pepton- und Peptidsplaltung weicht es also um wenigstens 1,0, für natives Eiweiß noch mehr von der Reaktion des Milieus ab. Eine große Rolle wird der Spaltung von nativem Eiweiß im Darm nicht zukommen, aber immerhin gelangen doch nicht ganz unbeträchtliche Mengen hiervon in den Darm (siehe VAN SLYKE [116]). Für Lipase liegt das Optimum bei 8—9, also auch von der Reaktion des Darminhaltes entfernt. Es wurde bisher nicht untersucht, ob Abfuhr der Spaltungsprodukte vielleicht eine Änderung im Reaktionsverlauf oder in der optimalen Reaktion mit sich bringt. Dieses allgemein-physiologische Problem kann besser zuerst an größeren Tieren

<sup>1)</sup> In hohem Maße hängen die gefundenen Optima ab von der Zeitdauer, vom benutzten Substrat und auch davon, ob die angewandte Menge Puffergemisch im Stande ist,  $p_H$  während der Wirkungszeit konstant zu halten. Daher die sehr verschiedenen Angaben in der Literatur. Siehe auch S. 525.



studiert werden, wo unbeschränkte Mengen an Organen zur Verfügung stehen. Doch schien es nicht unwichtig, schon jetzt zur Vergleichung mit den angeführten Resultaten bei Säugetieren, einige Messungen am Magen- und Darminhalt der Fische auszuführen.

Was diese Verhältnisse bei den Fischen betrifft, so haben wir die Angaben über die Magensäure schon besprochen (Kap. I, S. 448). Über den Säuregrad des Darmes sind keine einigermaßen exakten Beobachtungen gemacht worden.

*Methodik.* Diese bestand in der elektrometrischen Bestimmung der Wasserstoffionenkonzentration. Das Prinzip und die Anwendung dieser Methodik findet man bei HAMBURGER (32) SÖRENSEN (122), HÖBER (38) und in den Monographien von MICHAELIS (66) und CLARK (15), so eingehend besprochen<sup>1)</sup>, daß ich auf diese grundlegenden Arbeiten verweisen kann und nur anzugeben habe, mit welchen der vielen gebrauchten Hilfsmitteln die Messung ausgeführt wurde. Das Potentiometersystem bestand aus zwei Widerstandskasten, jeder von 1110  $\Omega$ , geschaltet nach dem Schema, angegeben in RONA auf S. 68, MICHAELIS auf S. 128. Als Nullinstrument diente meistens ein Kapillarelektrometer, später auch das Pointer-Type-Galvanometer Nr. 2320 d der Leeds und Northrup Comp., mit einem Widerstand von 1000  $\Omega$  und einer Sensitivität von 0,5 Milliampère. Die Wasserstoffelektrode war meistens die Birnelektrode von MICHAELIS, sie wurde mittels gesättigter KCl-Lösung mit einer 1 N-Kalomelektrode verbunden. Der Wasserstoff wurde in einem KIPPSchen Apparat entwickelt und durch Silbernitrat oder Sublimat, Kaliumpermanganat, alkalische Pyrogallollösung und destilliertes Wasser geführt. Für die Messungen an Meeresfischen verfügte ich über einen Apparat, bestehend aus einem Potentiometer von Cambridge and Paul Cy., der direkte Ablesung von  $\pi$  in Millivolts erlaubte und über ein Spiegelgalvanometer. Elektrolytischer Wasserstoff aus einer Bombe wurde hierzu gebraucht. Die Messungen fanden bei Zimmertemperatur statt; wenn diese von 18° abwich, wurden die üblichen Korrekturen für die Werte des Normalelementes, der Kalomelektrode und der Faktor  $\frac{RT}{F}$  angebracht. Die Werte der für die Berechnung notwendigen Konstanten sind angegeben in CLARK l. c. Ausgabe 1923. Später verfügte ich über ein kleines Zimmer, wo im Winterhalbjahr immer vor den Messungen T auf 18° gebracht werden konnte. Die gleiche hier angeführte Apparatur diente zur Messung der Wasserstoffionenkonzentration in den Versuchen über die optimale Reaktion aus den vorigen Kapiteln.

Als Substanzen für die Puffergemische (besonders für die zur Kon-

<sup>1)</sup> Eine praktische Darstellung kommt auch in RONAS „Fermentmethoden“ vor.



trollierung der Aufstellung) dienten KAHLBAUM-Präparate mit der Bezeichnung „zu Enzymstudien nach SÖRENSEN.“ Verwendet wurden Lösungen von primären und sekundären Phosphaten, von Borsäure, Borax, Salzsäure und Natronlauge in den von SÖRENSEN (122, 123) und von PALITSCH angegebenen Konzentrationen<sup>1)</sup>.

Zuerst möchte ich einige Belege geben für die Richtigkeit der verwandten Apparatur:

Tabelle J. Kontrollmessungen mit der Wasserstoffelektrode.

Datum	Gemessene Puffermischung	Nr. der Elektrode	PH-Wert bei 18° nach den Tabellen von SÖRENSEN	Gefundener Wert	Temperatur der Messung	Bem.
15. VI. 1925	5 ccm $\frac{M}{15}$ prim. + 5 ccm $\frac{M}{15}$ sec. Phosphat	I	6,81	6,77	22,5°	N. Mess.v. Prof. RINGER 6,79 bei 18°
18. VIII. 1925	wie oben	I	6,81	6,82	17°	
26. IX. 1925	8 ccm prim. + 2 ccm sec. Phosphat	I	6,24	6,19	18°	
4. XII. 1925	5 ccm prim. + 5 ccm sec. Phosphat	I	6,81	6,80	16,5°	
4. XII. 1925	wie oben	II	6,81	6,81	16,5°	
VII. 1926	7,5 ccm prim. + 2,5 ccm sec. Phosphat	II	6,35	6,33	18°	
29. VII. 1926	8 ccm $\frac{M}{5}$ Bors. + 2 ccm $\frac{M}{20}$ Borax	II	7,78	7,77	18°	
29. VII. 1926	9 ccm $\frac{M}{5}$ Bors. + 1 ccm $\frac{M}{20}$ Borax	II	7,36	7,37	18°	
27. V. 1926	5 ccm prim. + 5 ccm sec. Phosphat	II	6,81	6,82	17°	
VIII. 1926	5 ccm $\frac{N}{10}$ HCl + 5 ccm $\frac{M}{10}$ Glykokoll (hierin $\frac{M}{10}$ NaCl)	II	1,93	1,92	22°	

<sup>1)</sup> Tabellen hiervon auch in KOLTHOFF (46).



Die Abweichungen von den Standardwerten sind nur in zwei dieser zehn Fälle höher als 0,02. Für die Messung der schon in den vorigen Kapiteln angeführten pH-Optima liefert der Apparat also sehr gute Resultate.

Auch für die Mageninhalte der Teleostei, die ein pH von ungefähr 5 haben und für die der Selachii, die 2 bis 3 aufweisen, ist der Apparat brauchbar, falls keine Säure ausgewaschen wird; zugunsten dieses Einwandes aber besteht kein Argument. Eventuelle Kohlensäure spielt in diesen Regionen keine Rolle mehr.

Einige Schwierigkeiten können sich ergeben bei der Messung von Darminhalten. Wenn größere Mengen Darmsaft zur Verfügung stehen, empfiehlt sich die Anwendung einer Elektrode mit „ruhender Wasserstoffatmosphäre“ z. B. nach HASSELBALCH, MICHAELIS oder RINGER. Bei diesen Elektroden wird das Gleichgewicht durch Schütteln (200mal) hergestellt. Es ist aber dann wohl notwendig vorher zu zentrifugieren, da der Darminhalt eine äußerst schleimige Konsistenz hat. Nur die Elektrode von MICHAELIS (V-Elektrode) würde für meinen Zweck dienen können. Die Mengen Darmsaft, die ich erhielt, waren aber sehr gering: 1 oder 2 ccm und überdies außerordentlich schleimig und viskös, bisweilen breiig, mit Nahrungsresten gemischt. Diese sehr visköse Masse durch Schaukeln in Gleichgewicht mit Wasserstoff zu bringen, versprach wenig Erfolg. Zum Zentrifugieren war die Menge zu gering. Kolorimetrisch war mit diesen Flüssigkeiten nichts anzufangen. Darum führte ich die Messung einfach in der Birnelektrode aus: sehr kleine Mengen können darin gemessen werden, nötigenfalls mit der gleichen Menge Wasser verdünnt. Die Gefahr des CO<sub>2</sub>-Auswaschens bleibt bestehen, aber erstens hat man eine gewisse Kontrolle in der Schnelligkeit, womit die Messung konstant wird; zweitens kann man nur zu alkalische Werte finden. Es galt auszumachen, ob der Darminhalt der Fische wie bei den Säugetieren annähernd neutral ist, oder alkalisch. Aus pH-Werten in der Nähe von 8 würde man daher keinen Schluß ziehen können, da der Wert richtig oder durch Kohlensäureverlust entstanden sein kann. Da ich sie aber in der Tat in der Nähe von 7 fand, habe ich kein Bedenken, einige dieser gut konstanten Messungen aufzunehmen. Mit empfindlichem Lackmuspapier wurde auch kontrolliert und nie eine deutliche Reaktionsabweichung gesehen.

Eine Methode zur Kontrollierung der Resultate (die ich freilich nur auf die Mageninhalte angewendet habe, da die Mengen Darmsaft für zwei Messungen zu gering waren) ist der Gebrauch der Chinhydron-elektrode. Für eine ausführliche Beschreibung auch der theoretischen Grundlagen kann ich auf die Originalarbeiten BILMANNs verweisen und auf CLARK (l. c.). Eine kurze Beschreibung findet sich auch in RONAS Fermentmethoden (l. c.). Die Methode ist nur brauchbar im



sauren Mittel und im alkalischen bis zu einem pH von 8. Die Störungen in eiweißhaltigen Lösungen sind von KOLTHOFF (47) untersucht worden. Dabei zeigte es sich, daß in Gegenwart von Eiweiß bei saurer Reaktion richtige Resultate gefunden werden, daß von pH 7 aber aufwärts sich Abweichungen zeigen. Allerdings sind bei pH 7,5 diese Abweichungen noch gering.

Bei der Messung von Mageninhalten mit einem pH von ungefähr 5 (wie wir sie bei den Teleostiern finden) besteht die Gefahr, daß bei der Durchführung von Wasserstoff eine flüchtige Säure ausgewaschen wird.

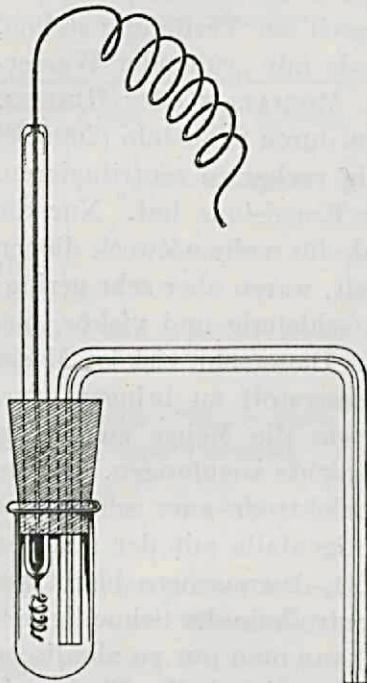


Abb. 9. Einfache Chinhydronelektrode, die benutzt wurde für die Messung kleiner Mengen Mageninhalt von Fischen. Erklärung siehe im Text.

(Nur für Haifische ist, wie in der Einleitung erwähnt wurde, die Anwesenheit von Salzsäure wahrscheinlich gemacht.) Die Chinhydronelektrode bietet hier ein sehr willkommenes Kontrollverfahren. Es stellte sich heraus, daß sowohl bei Teleostei als bei Selachii die Messungen ziemlich gut, in einigen Fällen sogar sehr gut übereinstimmen mit den Resultaten der Wasserstoffelektrode.

Wegen Kleinheit und Schleimigkeit der Flüssigkeitsmengen war ein Apparat mit Hähnen und Verbindungsröhrchen für meinen Zweck ungeeignet. Ich ließ darum einen kleinen, ganz einfachen Apparat anfertigen, der in Abb. 9 abgebildet ist<sup>1)</sup>. Er besteht aus einem Glasrohr von 1,5 cm Durchmesser und 2 cm Höhe, mit flachem Boden. Die Platinelektrode und das mit Agar (worin KCl bis zur Sättigung gelöst ist) gefüllte Verbindungsröhrchen treten durch einen doppelt durchbohrten Gummipfropfen ein

und können wegen des flachen Bodens bis ganz unten in das Glasröhrchen hineinreichen, so daß eine sehr niedrige Flüssigkeitsschicht zur Messung ausreicht. Die Platinelektrode bestand aus hartem iridiumhaltigen Platin<sup>2)</sup> und war in einer Spirale ausgezogen. Das Platin wird bekanntlich für diese Messungen nicht mit Platinschwarz bedeckt.

Das Chinhydron war nach BILLMANN'S Vorschrift bereitet. Durch einigemal wiederholtes Umkristallisieren und ebenfalls wiederholtes Auswaschen mit eiskaltem Wasser wurde es von Sulfat und besonders von Säure befreit.

<sup>1)</sup> Die von ETTISCH (21) beschriebene Mikroform der Chinhydronelektrode war mir damals noch nicht bekannt. <sup>2)</sup> Auf Anraten von Herrn Dr. KOLTHOFF.



Zur Messung wird ins Glasrohr eine kleine Menge (etwa 100 mg) Chinhydron gebracht, dann die zu untersuchende Flüssigkeit zugegeben und falls diese besonders konsistent ist, am besten mit einem Rührstabe gut mit dem Chinhydron gemischt. Dann wird der Gummipfropfen mit Elektrode und Verbindungsrohr aufgestellt, 100mal geschüttelt und der Potentialunterschied ( $\pi$ 1 N) zu einer (in diesem Falle 1 N) Kalomel-elektrode gemessen, wobei im Gegensatz zur Wasserstoffelektrode nun die Kalomelelektrode den negativen, die Chinhydron-elektrode den positiven Pol bildet.

Die Resultate wurden berechnet mittels der Formel

$$pH = \frac{0,4 - (t - 18^\circ) 0,0050 - \pi 1 N}{0,0570 (t - 18^\circ)} \quad (\text{KOLTHOFF [47]}).$$

Messung eines Puffergemisches aus 50 ccm 0,1 M Kaliumbiphtalat und 39,85 ccm 0,1 N NaOH, mit einem pH-Wert nach CLARK und LUBS 5,6, gab mit  $H_2$ : 5,59, mit Chinhydron 5,61. Ein Phosphatpuffergemisch, dessen pH mit der Wasserstoffelektrode auf 4,67 bestimmt wurde, ergab bei Messung mit Chinhydron pH 4,65.

*Resultat der Messungen.* Bevor ich die Messungen an Mageninhalt mitteile, muß ich noch bemerken, daß ich einmal bei einem im Aquarium lebenden Hechte, der zwischen zwei Brettern festgebunden war, eine Glassonde von etwa 8 mm äußerem Durchmesser einführte, was ohne Schwierigkeiten gelang<sup>1)</sup>. Ich versuchte darauf durch Ansaugen, schließlich mit der Wasserstrahlluftpumpe Inhalt zu gewinnen, aber vergebens. Da die Hechte in unserem Aquarium niemals Nahrung annahmen, wurde diesen Tieren ein in zwei Längsstücken zerschnittener Fisch mit der Sonde in den Magen eingeführt und das Tier wieder ins Aquarium gebracht. Das Tier überlebte diese Behandlung; von dem eingeführten Fisch wurde aber nach einigen Stunden die eine Hälfte, nach 18 Stunden die zweite Hälfte ausgebrochen. Nach 2 Tagen wurde das Tier getötet und zur Kontrollierung der Methode nochmals die Glassonde eingeführt. Es kamen jetzt etwa 2 ccm eines gelbbraunen dicken Schleimes zum Vorschein, der weder auf Kongorotpapier noch auf rotes und blaues Lackmuspapier reagierte. Das stimmt überein mit der Tatsache, daß die letzten Flüssigkeitsmengen nach der Verdauungsperiode ungefähr neutral reagieren, wie wir später sehen werden. Bei der Öffnung des abgebundenen Magens ergab sich, daß in der Tat aller Inhalt aus dem Magen ausgehebert worden war. Da die Tiere aber doch nicht zum Fressen zu bringen waren, habe ich dieses Verfahren nicht weiter benutzt, sonst wäre es meine Absicht gewesen, die Änderung des pH von Stunde zu Stunde zu bestimmen. Beim Karpfen ließ das Verfahren sich wegen des engen Ösophagus nicht verwenden; die Barsche, die wir bekommen konnten, waren zu klein, um viel Inhalt auszuhebern.

<sup>1)</sup> Auf diese Weise hatte WEINLAND Mageninhalt von Haifischen gewonnen.



Tabelle K.  $p_H$ -Messungen an Magen- und Darminhalten von verschiedenen Teleostirn.

Datum und Nummer	Art	Teil des Darmkanals	Inhalt	Zustand (Stadium der Verdauung)	$p_H$
15. VI. 1925 1.	Karpfen	Darm bis $\frac{1}{4}$ vom Ende	einige cm gut flüssiger Saft, dunkel braunrot mit körnigen Nahrungsresten	Hunger (wenigstens 4—5 Tage), Tier jetzt sterbend	6,73
27. VI. 1925 2.	"	Darm bis $\frac{1}{4}$ vom Ende	1,5—2 cm Saft, dunkelbraun, getrübt, mit Regenwürmern	$2\frac{1}{2}$ Stunde nach der Aufnahme von einigen Würmern	7,13
18. IX. 1925 3.	"	Darm bis $\frac{1}{3}$ vom Ende	1,5—2 cm braugelber gallenfarbiger Saft, klar, fast ohne Nahrungsreste	wenigstens 4 Tage Hunger	7,32
13. X. 1925 4.	" (kräftiges gut fressendes Tier)	Darm, vord. Hälfte	3—4 cm dunkelbrauner Saft mit einigen zum Teil intakten, zum Teil stark zerfallenen Würmern	$4\frac{1}{2}$ —5 Std. nach dem Fressen von einigen großen Würmern	7,71
10. IX. 1925 5.	2 Ex. <i>Trachinus</i> (Inhalte zusammengefügt)	Magen	einige kleine Seenadeln, dicker grauer Brei	zwischen Stadium 1 und 2; nachts gefangen, toteingeliefert	5,40
11. IX. 1925 6.	— 3 Ex. <i>Trachinus</i>	Darm Magen	dick, breiig, grau und grün erstes Exempl. mit vielen Garnelen, zweites mit wenigen Garnelen, drittes mit kleinem Fisch	wie oben erstes Stadium, oder zwischen 1 und 2	6,73 8,19
10. IX. 1925 7.	— <i>Pleuronectes</i>	Darm von zwei d. Tiere Darm vom dritten Tier	$\frac{2}{3}$ stammte vom Tier mit vielen Garnelen: gelb; $\frac{1}{3}$ vom zweit. T., braungelb ziemlich viel trüber Saft	— wahrsch. zweites Stadium	7,13 7,11
25. IX. 1925 8.	Hecht	Darm Magen "	3 cm klarer, leicht opaleszierender Saft zu wenig Inhalt zur Messung 1,5 cm klarer, gelbgrüner, sehr flüssiger Saft mit einigen Flocken	Hunger Ende der Verdauung oder Hunger	8,81 wird nicht konstant. Sauer auf Lackmus 6,77
—	—	Darm	1 cm dicker braungelber Saft	—	—



5. XI. 1925 9.	Hecht	Magen	mehr als 5 ccm weißlicher Saft mit kleinem halbverdauten Fisch; sauer auf Lackmus, nicht auf Kongorot; sehr wenig Inhalt	zweites Stadium	4,83
10.	— Hecht	Darm Magen	wenig Saft, ohne Fleisch mit stark verdauten Gräten; klar, stark sauer auf Lackmus, nicht auf Kongorot	Ende einer kräft. Verdauung	— 4,65
11.	"	"	ziemlich viel klarer Saft, ohne Fisch oder sonstige feste Teile. Reaktion auf Lackmus zweifelhaft	drittes Stadium, Rest einer Verdauungsperiode	7,704 (mit ruh. H <sub>2</sub> atm.) <sup>1)</sup>
6. XI. 1925 12.	"	"	großer Fisch, vordere Hälfte nach dem Pylorus hin, stark angegriffen; hintere noch intakt im Ösophagus, Schwanz im Pharynx, weiter fast kein Saft. Einige ccm H <sub>2</sub> O zugesetzt zum verdauten Teil des Fisches; eine halbe Stunde nach Schütteln extrahiert	Anfang einer Verdauungsperiode (erstes Stadium)	5,60
13. XI. 1925 13.	— Hecht	Darm "	einige ccm 3× mit H <sub>2</sub> O verdünnt. Reaktion auf Lackmus zweifelhaft Magen leer, Wand schwach sauer auf Lackmus. Darm zweifelhaft auf Lackmus. Darmsaft klar, mit einigen Bandwürmern	wie oben wahrscheinlich Hungerperiode, Fisch mittags gestorb., abends gemessen	6,85 6,4
13. XI. 1925 14.	"	"	Magen leer, Wandung schwach sauer. Darmsaft (stark getrübt) mit einigen ccm H <sub>2</sub> O verdünnt, gemessen	letztes Ende einer Verdauungsperiode	6,775
—	<i>Cyprinus</i>	Galle von zwei Ex.	—	—	5,54 <sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Messung mit ruh. H<sub>2</sub> atm. durch Prof. RINGER.



Zuerst gebe ich nun eine Tabelle (K) von Messungen mit der Wasserstoffelektrode an Mageninhalten von Teleostiern. Die Meeresfische wurden mir von der zoologischen Station in Helder überlassen; die Messung wurde daselbst ausgeführt im „Rijksinstituut voor Hydrografisch Visscherijonderzoek“, dessen Direktor, Herrn IR. F. LIEBERT, ich für die Erlaubnis zum Gebrauch seiner Apparatur und freundliche Unterstützung dabei vielen Dank schulde. Die Karpfen wurden in unseren Aquarien gehalten; es waren von der Nederl. Heidemaatschappij gezüchtete Fische; ihre gewöhnliche Nahrung war Gerstenmehl. Die Hechte waren frisch gefangene und für ein anatomisches Praktikum getötete Tiere, über deren Magen- und Darminhalt ich wenige Stunden nach ihrem Tode verfügen konnte. Er wurde immer durch Anlegen von Ligaturen am Ösophagus, Pylorus, Anus und zuweilen an einer Stelle des Darmes zwischen dem vordersten  $\frac{2}{3}$  und dem hintersten  $\frac{1}{3}$  verhindert, daß irgendeine Mischung von den Inhalten der verschiedenen Teile stattfinden konnte. Bei der Tötung wurde nur das Zentralnervensystem durchschnitten und vernichtet. Ösophagus und Herz blieben intakt, starke Blutung wurde vermieden. Karpfen konnten einigemal gefüttert werden. An den gefangenen Fischen war das Stadium der Verdauung im Magen meistens ohne große Schwierigkeiten festzustellen. Ich unterscheide dabei, etwas willkürlich, ein erstes Stadium, worin ganze Tiere wenig oder wenigstens nicht bis zum Verschwinden der Körperformen angegriffen sind; ein zweites, worin viel breiiger Inhalt ohne definierbare Tierreste anwesend ist. Am Ende (drittes Stadium) der Verdauung bleibt eine kleine, ziemlich klare Flüssigkeitsmenge zurück. Während des Hungers ist gar keine Flüssigkeit anwesend, wie ich mich öfters überzeugen konnte an Hechten, die einige Wochen bis einen Monat im Aquarium gehungert hatten.

Bei der Tabelle K sind folgende Bemerkungen zu machen. Die Reaktion des Darminhaltes ist in den meisten Fällen dem Neutralpunkt sehr nahe, nur bei Nr. 4, dem gefütterten Karpfen, weicht sie um 0,7 nach der alkalischen Seite ab. Alkalisch ist der Darminhalt also sicher nicht; die Messung von Nr. 7 sehe ich nicht als zuverlässig an, da es sich hier vielleicht um reines Meerwasser handelte, woraus  $\text{CO}_2$  ausgewaschen wurde. Auch beim Karpfen, wo kein saurer Chymus aus dem Magen in den Darm übertritt, ist die Reaktion nicht alkalisch. Die Mageninhalte von Hechten bewegen sich, was ihre Azidität betrifft, zwischen  $\text{pH}$  4,5 und 5,5. Eine Ausnahme bildet Nr. 11 mit Hungersaft. Von den Meeresfischen hat einer 5,4, ein anderer, wo der Inhalt aus Garnelen bestand, 8,2. Auch frühere Untersuchungen erwähnten alkalische Reaktion bei Anwesenheit vieler Crustaceen.

Die folgende Tabelle L gibt die Messung an einigen Hechtexemplaren, die gleichfalls für ein anatomisches Praktikum getötet worden waren.



Tabelle L.  $p_H$ -Messungen an Magen- und Darminhalten von *Esox*.

Datum und Nummer	Organ	Inhalt	Verdauungsstadium	$p_H$ mittels		
				H <sub>2</sub>	Chinhydron	
4. XI. 1926 1.	Magen	Etwa 15 ccm grauer ziemlich flüssiger Brei mit kleinem Fisch. Sauer auf Lackmus	Wahrscheinlich zweite Hälfte der Verdauungsperiode	5,76	5,79	Ein dritter Teil der Flüssigkeit zentrifug., Zentrifugat im Eisschrank aufbewahrt; am nächsten Tage mit ruh. H <sub>2</sub> atm. 5,86
4. XI.	Darm	grauer sehr konsistenter Brei	Zur Messung ungeeignet			
2.	Magen	kl. Hecht, Frosch, kl. Aal, kl. Fisch und wenig breiige Masse. Stark Sauer auf Lackmus	Erstes Stadium	5,22	5,48	
4. XI. 5. XI.	Darm	2 ccm grünlich-gelber Saft; ziemlich flüssig; Reakt. zweifelh. auf Lackmus		5,92	6,98	
4. XI. 5. XI. 1926 3.	Magen	5 ccm flüssig. eigentüml. grauschwarzer Saft m. Flocken u. einer Notonecta	Wahrscheinlich zweites Stadium	5,97	5,64	
5. XI. 1926	Magen	Einige größtenteils verdaute Fische	Zwischen erstem und zweitem Stadium	4,92	4,90	
5. XI. 1926 4.	Darm	Zu wenig Inhalt zur Messung				
5. XI. 1926 5.	Magen	Sehr wenig gelbbrauner Saft beinahe neutral auf Lackmus	Ende des zweit. oder dritten Stadiums		7,04	
	Darm	Fast kein Inhalt				

Ein Teil der Proben von einem einzigen Tiere wurde nun mit der Wasserstoffelektrode, ein anderer mit der Chinhydronelektrode gemessen. Alle Messungen bei 18°.

Aus dieser Tabelle samt der vorigen ergibt sich, daß die Azidität vom *Esox*-Magen während der Verdauung sich in verhältnismäßig engen Grenzen bewegt: zwischen  $p_H$  4,7 und 5,8. Es ist nicht möglich, einen deutlichen Zusammenhang anzugeben zwischen den Variationen der  $p_H$ -Werte und dem Ernährungszustand. Während des Hungers ist der Magen leer;



am Ende einer Verdauung bleibt eine kleine Saftmenge, die, soweit untersucht, ungefähr neutral reagiert, sogar einmal alkalisch (7,7) gefunden wurde. In der letzten Verdauungsphase scheint also der  $p_H$  anzusteigen.

Daß der mit beiden Methoden gemessene Darminhalt mit der Wasserstoffelektrode untersucht, saurer ist als mittels Chinhydron, mag daran liegen, daß die Messung mit Wasserstoff am folgenden Tage vorgenommen wurde und daß in einem neutralen Milieu leicht Gärung eintreten kann.

In Bezug auf die Tatsache, daß der  $p_H$  im Hechtmagen soviel höher ist als der des Säugetiermagens und daß VAN HERWERDEN die titrierbare Azidität des Selachiermageninhaltes soviel höher fand als diejenige der Teleostier, war es sehr interessant, den Säuregrad des Selachiermagens zu messen. Leider konnte ich in Helder in den vergangenen Jahren kein frisches Material bekommen. Von Helgoland bekam ich eine Sendung Mageninhalt von *Acanthias*, die dort frisch eingefangen waren und mir geschickt wurden in von mir dazu gesandten Flaschen mit Glasstöpsel; diese kamen in eine Blechbüchse, umgeben mit Eis und verpackt in eine Kiste mit isolierendem Material. Der Transport dauerte kaum 3 Tage und bei Ankunft war noch ein Drittel der Büchse mit Eis gefüllt. Obwohl kein Desinfektans zugesetzt war<sup>1)</sup>, wurde keinerlei Fäulnisgeruch wahrgenommen. Um eine leidliche Menge Mageninhalt zu erhalten, wurden in Helgoland die Produkte von verschiedenen Tieren, deren Inhalte im gleichen Zustande waren, zusammengefügt, so daß die meisten Messungen ein Mittel aus den Werten einiger Tiere vorstellen.

Die Messungen (Tabelle M) mit Chinhydron sind alle höher ausgefallen als die mit der Wasserstoffelektrode, welche an einem anderen Teil derselben Flüssigkeiten am gleichen Tage gemacht wurden. Diese Mageninhalt waren alle ziemlich bis sehr stark schleimig. Eine Vergleichung mit der vorigen Tabelle läßt sehen, daß die beste Übereinstimmung zwischen Wasserstoff- und Chinhydronelektrode da besteht, wo die Flüssigkeiten am wenigsten viskös sind. Da in solchen schleimigen Flüssigkeiten eher und besser Sättigung mit  $H_2$  erreicht werden wird bei Durchleiten als bei Schütteln (wie in der Chinhydronelektrode), so schreibe ich die höheren Werte der Chinhydronmessungen einer ungenügenden Einstellung des Gleichgewichtes zu und halte die Messungen mit der Wasserstoffelektrode für die richtigeren.

Man ersieht gleich aus der Tabelle wieviel höher die Azidität dieser *Acanthias*-Magen ist, als die der früher untersuchten Teleostier. Während  $p_H$  beim Hechtmagen schwankt zwischen 4,7 und 5,8 (Mittel etwa 5,2), liegt der Wert hier zwischen 2,3 und 3,2 oder 3,5, wenn man die Chinhydronmessung berücksichtigen will. Mittel also 2,8, das ist ein Unterschied von fast 2,5 der Wasserstoffzahl! Die Verhältnisse nähern

<sup>1)</sup> Mit Rücksicht auf die vorgenommene Messung mit der Wasserstoffelektrode.



Tabelle M.  $p_H$ -Messungen vom Mageninhalt von *Acanthias vulgaris*.  $T = 18^\circ$ .

Nr.		Stadium der Verdauung	$p_H$ mittels	
			H <sub>2</sub>	Chinhydron
1.	3 Mageninhalt nach Entfernung der groben Reste; Inhalt: Fische	erstes Stadium	2,32	2,87
2.	2 Mageninhalt nach Entfernung grober Reste; Inhalt: Fische, Krebse	„	3,17	—
3.	2 Mageninhalt, nur Flüssigkeit	zweites Stadium	3,22	3,44
4.	2 Mageninhalt, nur Flüssigkeit, aber wenig	„	2,36	—
5.	1 Mageninhalt nach Entfernung weniger grober Reste (Fische)	zwischen erstem u. zweitem Stadium	3,17	3,50
		mit anderem Chinhydronpräparat		3,42

sich hier denen der Säugetiere. Die Beobachtungen anderer Autoren über den höheren Gehalt an titrierbarer Säuremenge bei Selachii, vgl. mit Teleostei, stimmen hiermit überein. Auch RINGER (37) fand den  $p_H$  von einem in Neapel gefütterten *Scyllium* auf 1,69, also recht niedrig und weist darauf hin, daß diese Azidität nicht von organischer Säure herkommen kann, da diese dann in einer sehr hohen Konzentration anwesend sein müßte.

Wir fanden das Optimum des *Acanthias*-Pepsins bei  $p_H$  2,2—2,5, also nicht weit vom tatsächlichen Säuregrad des Magens. Es wäre nun interessant festzustellen, ob das  $p_H$ -Optimum des Hechtpepsins auch bei etwa 2,2 liegt oder mehr den Aziditätsverhältnissen des Hechtmagens entspricht, und welche Verhältnisse im ersteren Falle Ursache sind, daß die Verdauung beim Hecht doch nicht weniger kräftig vor sich geht. Hierzu hatte ich aber noch keine Gelegenheit.

Außer diesem bemerkenswerten Aziditätsunterschied ergaben die Messungen an Darminhalten, die in diesem Kapitel beschrieben wurden, daß auch der Fischdarm eine ungefähr neutrale Reaktion aufweist; ein möglicher Kohlensäureverlust bei der Messung würde ja nur einen zu hohen  $p_H$  als Resultat gegeben haben. Das Problem, wie es möglich ist, daß Trypsin- und Erepsinwirkung in dem Darm zur Entfaltung kommen, während ihr Wirkungsoptimum mehr oder weniger erheblich von der Azidität des Darmes entfernt liegt, gilt also auch für die Fische.



## Kapitel VIII.

## Zusammenfassung der Resultate.

1. Die kohlenhydratspaltenden Enzyme von Pankreas und Darm von Karpfen, Hecht, Frosch und einer Haifischart wurden charakterisiert nach ihren Spaltungsprodukten und ihren pH-Aktivitätskurven. Die Methodik bestand in Zuckertitrationen, Osazonreaktionen und elektrometrischer pH-Bestimmung. Es ergab sich, daß Amylase und Maltase bei den untersuchten Arten lokalisiert sind im Pankreas, und zwar die Amylase in einer 25mal größeren Konzentration als die Maltase. Die Mengen im Darne sind derart, daß hier nur an adsorbierte Enzyme gedacht werden kann. Invertase fehlt, soweit untersucht, sowohl im Pankreas als im Darm. Ebenso wenig ist bei den ausschließlichen Karnivoren eine spezielle Glykogenase vorhanden.

Diese Enzyme veranlassen die Entstehung der nämlichen Spaltprodukte bei der Wirkung auf Stärke und Maltose, wie die der Säugetiere. Das pH-Optimum der Pankreasamylase liegt, ziemlich unabhängig von der Zeitdauer des Versuches, bei 38°, 27° und 16,5° bei pH 6,0—6,5, das der Maltase bei 6,0—7,5, mit einer etwas breiteren Optimalzone. Von letzterem Enzym wurde bei den Säugetieren die pH-Aktivitätskurve, soweit mir bekannt, noch nicht bestimmt.

2. In gleicher Weise wurde mit den eiweißspaltenden Fermenten von Pankreas und Darm verfahren. Als Methodik diente hierzu die Titration von Aminosäuren in alkoholischer Lösung, Reaktionen auf bestimmte Aminosäuren, die Spaltung von Glycylglyzin und die Wirkung auf Spritblaufibrin. Diese Enzyme sind in gleicher Weise lokalisiert wie bei den Säugetieren: das Trypsinogen im Pankreas, die Enterokinase und das Erepsin in der Darmwand. Die Anwesenheit einer geringen Erepsinmenge im Pankreas ist wahrscheinlich. Die Spaltung verläuft, soweit untersucht, in genau der gleichen Weise wie bei den höheren Vertebraten.

Das pH-Optimum der Wirkung des Trypsins auf Fibrin liegt bei 4 Stunden Versuchsdauer bei 37° und 27° bei 8,2 wie das des Säugertrypsins. Für das Säugertrypsin scheint die Aktivitätskurve etwas weniger steil abzufallen (Einfluß von Beimischungen?).

Das Optimum für Erepsin auf Glycylglyzin wurde vorläufig auf 8,7 ermittelt.

3. Es wurden nach den Methoden von PEKELHARING, MICHAELIS und DAVIDSOHN und von ROSENHEIM mehr oder weniger weit gereinigte Präparate von Pepsin, Trypsin und Lipase angefertigt. Diese Präparate wurden weiter untersucht. Für das Pepsin wurde ein pH-Optimum von 2,2 (Anfang) bis 2,5 (Ende) gefunden bei 18° und 4 Stunden Dauer. Das für Trypsin wurde oben angedeutet. Die Lipase wird kräftig durch  $MgCl_2$  aktiviert.



4. Die Wasserstoffionenkonzentration im Magen von *Acanthias* und einigen Teleostierarten wurde mit Wasserstoff- und Chinhydronelektrode bestimmt. Sie ist für Selachier beträchtlich höher als für Teleostier ( $pH$  2,8 bzw. 5,2). Die Angaben VAN HERWERDENS über den Unterschied im Gehalt an titrierbaren Säuremengen bei diesen beiden Gruppen wurden hierdurch bestätigt. Es wurde gezeigt, daß der Darminhalt als nahezu neutral betrachtet werden kann, und daß, im Hinblick auf die Art der Fehlerquelle der Methode, der wahre Wert für den  $pH$  eher nach der sauren als nach der alkalischen Seite von den gefundenen Werten abweichen dürfte. Das Problem, wie es möglich ist, daß die Verdauung der Eiweißstoffe, die in Vitro immer eine mehr oder weniger alkalische Reaktion erfordert, im Darmrohr in einem annähernd neutralen Milieu stattfinden kann, gilt für die Fische, so gut wie für die Säuger.

5. Die Verdauung bei den Fischen gestaltet sich in ihren Hauptzügen ebenso wie bei den Säugetieren. Die wichtigsten Abweichungen sind in histologischer Hinsicht die geringere Spezialisierung der Magendrüsen und das Fehlen von echten Darmdrüsen. Es ergab sich ein wichtiger Unterschied in der Lokalisierung der Karbohydrasen und in der Existenz zweier biologischer Gruppen (wahrscheinlich zusammenfallend mit den systematischen Gruppen der Selachii und Teleostei), die, bei gleich intensiver Eiweißverdauung, einen erheblichen Unterschied in wirklicher Azidität und titrierbarer Säuremenge im Magen zeigen. Schließlich ist die Zeit, die zu der Verdauung gebraucht wird, bei den Fischen, in Übereinstimmung mit der niederen Temperatur, bei der die Reaktionen stattfinden, erheblich größer als bei den Säugetieren (VAN SLYKE und WEINLAND).

Es ist somit keine Rede davon, daß die Fische im Allgemeinen eine Art von Zwischenstellung einnehmen würden zwischen den Invertebraten und den höheren Vertebraten. Besonders ist das nicht der Fall für die Art ihrer Enzyme, wie SCHEUNERT noch anzunehmen scheint (OPPENHEIMERS Handbuch der Biochemie, 3. Teil, 2. Hälfte). Gerade für die eiweißspaltenden Fermente läßt sich vermuten, daß erhebliche Unterschiede vorhanden sein werden zwischen den Vertebraten einerseits und den Invertebraten andererseits. Die Reaktion im Magen und Darm, die bei einigen Invertebraten ermittelt wurde (für *Holothuria* in einigen vorläufigen Versuchen kolorimetrisch von OOMEN (71a), für *Astacus* elektrometrisch von mir [unveröffentlicht], für Lamellibranchiaten und Gastropoden von YONGE [146]), schwankt zwischen  $pH$  4 und 6<sup>1)</sup>, ein Gebiet, wo sowohl Trypsin und Erepsin als auch Pepsin erheblich von ihrem Optimum entfernt sind. Nur in Bezug auf die Azidität des Magens und auf die Lokalisierung der Karbohydrasen an

<sup>1)</sup> Allerdings fand VAN DER HEYDE (Diss. Amsterdam 1922) für andere Echinodermen höhere  $pH$ -Werte (etwa 7—7,5).



einer und derselben Stelle (Pankreas) können die Teleostei eine solche Mittelstellung einnehmen. Die Untersuchungen werden in dieser Richtung auch für die Invertebraten fortgesetzt werden müssen.

Vergleichen wir diese Resultate mit dem Programm der S. 458/59, so sehen wir, daß den dort genannten Punkten 4 (Rolle der Appendices) und 5 (Einfluß der Temperatur auf die Enzyme) am wenigsten Aufmerksamkeit zuteil wurde. Für die Appendices liegt das an Art und Eigenschaften des Materials, das hier zur Untersuchung kommen konnte. Für die Rolle der Temperatur findet sich eine Anweisung auf S. 471 u. 521/23; ich habe einige Versuche angestellt, die ich noch nicht mitteile, da die Unterschiede der Enzyme von Kalt- und Warmblütern jedenfalls so gering sind, daß eine Wiederholung unter weiteren Kautelen notwendig ist, bevor Schlüsse in dieser Hinsicht berechtigt sind.

Über den Wert von Resorptionsversuchen (Punkt 7) am Fischdarme in biologischer Hinsicht ist auf S. 495/96 das Nötige bemerkt worden.

### Literatur.

1. Abderhalden, E.: Zeitschr. f. physiol. Chem. 151, 151. 1926. — 2. Auerbach und Pick: Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte 43, 155. 1912. — 3. Bayliss, W. M.: The nature of enzyme action. 5th Ed. London 1925. — 4. Ders. und Starling, E. H.: Journ. of physiol. 28, 333. 1902. — 5. Bergman, P.: Skand. Arch. f. Physiol. 18, 119. 1906. — 6. Bertrand, G. und Thomas, P.: Guide pour les manipulations d. Chim. biologique. Paris 1910. — 7. Biedermann, W.: Aufn., Verarb.-Ass. d. Nahrung. Wintersteins Handb. d. vergl. Physiologie. Zweiter Bd., erste Hälfte. Jena 1911. — 8. Bizzozero, G.: Anat. Anz. Jg. 3, 781. 1888. Siehe auch die Arbeiten, zitiert in Oppels Handbuch.) — 9. Ders.: Arch. f. mikroskop. Anat. 33. 1889; 40. 1892; 42. 1893. — 10. Blackman, F. F.: Ann. of botany 19, 281. 1905. — 11. Blanchard, R.: Bull. de la soc. zool. de France 8. 1883. — 12. Bodansky, M. und Rose, W.: Americ. journ. of physiol. 62. 1922. — 13. Boudouy, Th.: Arch. de zool. exp. et gén. 3. série, 7, 419. 1899. — 13a. Bourquelot, E.: Cpt. rend. de l'acad. d. sc. Paris 97. 1883. — 14. Brown, H. J. und Heron, J.: Proc. of the roy. soc. of London, B, 30. 1880. — 15. Clark: The Determination of Hydrogenions. Baltimore 1923. — 16. Cohnheim, O.: Die Physiologie der Verdauung und Ernährung. Berlin 1908. In: Nagels Handbuch der Physiologie. — 17. Ders.: Zeitschr. f. physiol. Chem. 33, 451. 1901. — 17a. Cordier, R.: Arch. de biol. 36, fasc. 3. 1926. — 18. Decker, F.: Festschr. f. v. Kölliker. Leipzig 1887. — 19. Duclaux, E.: Traité de microbiologie. T. 2, 1899. — 20. Eggeling, H.: Jenaische Zeitschr. f. Naturwiss. 43, 417. 1907. — 21. Ettisch: Zeitschr. f. wiss. Mikroskop. u. mikroskop. Technik 42, 302. 1925. — 22. Euler, H.: Zeitschr. f. physiol. Chem. 51, 213. 1907. — 23. Falloise, A.: Arch. internat. de physiol. 2, 299. 1904/05. — 24. Fischer, E. und Bergell, P.: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. 36, 2592. 1903. — 25. Dies.: Ebenda 37, 3103. 1904. — 26. Fischer, E. und Abderhalden, E.: Zeitschr. f. physiol. Chem. 46, 52. 1905. — 26a. Floresco, N. M.: Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. II. série 3. 1896. — 27. Geselschap, L. J.: Zeitschr. f. physiol. Chem. 94, 205. 1915. Auch: Dissertatie Utrecht 1915 (Holländisch). — 28. Grützner: Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. 8, 452. 1874. — 29. Ders.: Ebenda 143, 189. 1911. — 30. Geyman: Biochem. Zeitschr. 105. — 31. Hamburger, H. J.: Arch. néerland. des



- sciences exactes et nat. série II, 13, 428. 1908. — 32. Ders.: Osmotischer Druck und Ionenlehre in den medizinischen Wissenschaften. Wiesbaden 1904. — 33. Ders. und Hekma, E.: Proc. koninkl. Akad. v. Wetensch. Amsterdam 1902. — 34. Hamburger, C.: Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. 60, 545. 1895. — 35a. Hamill, J. M.: Journ. of physiol. 30. — 35b. Hertwig, O.: Handb. d. vergl. u. exp. Entwicklungslehre der Wirbeltiere. Bd. 2, Tl. 1. — 36. Herwerden, M. A. van: Zeitschr. f. physiol. Chem. 56, 453. 1908. — 37. Ders. und Ringer, W. E.: Ebenda 75, 290. 1911. — 37a. Homburger, L.: Zentralbl. f. d. med. Wiss. 1877. Nr. 31, 561. — 38. Höber, R.: Physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe. 5. Aufl. Leipzig 1924. — 39. Jacobshagen, E.: Jenaische Zeitschr. f. Naturwiss. 47. 1911. — 40. Ders.: Ebenda 49. 1913. — 41. Ders.: Ebenda 53. 1915. — 42. Hammarsten, O.: Lehrb. d. physiol. Chemie, 9. Aufl. 1922. — 43. Ders.: Zeitschr. f. physiol. Chem. 56. 1908. — 44. Jordan, H. J.: In: Bethes Handbuch der norm. u. pathol. Physiologie (im Erscheinen). — 44a. Ders. und Begemann, H.: Zool. Jahrb., Abt. f. allg. Zool. u. Physiol. 38, 565. 1921. — 45. Knauthe: Zeitschr. f. Fischerei Jg. 5, 189. 1897. — 46. Kolthoff, I. M.: Der Gebrauch von Farbenindikatoren 2. Aufl. Berlin 1923. — 47. Ders.: Zeitschr. f. physiol. Chem. 144, 259. 1925. — 48. Ders.: Arch. v. d. Suikerindustrie Ned.-Indië 1926. — 49. Kranenburg, W. R. H.: Arch. du Musée Teyler (Haarlem) Sér. II, 7, 245. 1902. — 50. Krüger, A.: Untersuchungen über das Pankreas der Knochenfische. Inaugural-Dissert. Kiel 1904. — 50a. Krüger, P.: Tierphysiologische Übungen. Berlin 1926. — 51. Krukenberg, C. F. W.: Untersuch. d. physiol. Inst. Heidelberg 1, 327. 1878. — 52. Ders.: Ebenda 2, 385. 1878—82. — 53. Laguesse, E.: Cpt. rend. de l'acad. d. sc. Paris 112, 440. 1891. — 54. Ders.: Journ. de l'anat. et physiol. Année 30, 1894. — 55. Legouis, P.: Ann. de sc. nat., zool. 17 et 18. 1873. — 56. Liebert, F.: Rapp. en Verh. Rijksinst. v. Visscherijonderzoek, Dl. I, 124. 1913. — 57. Long, J. H. and Nelson, R. A.: Journ. of the Americ. chem. soc. 39, 1766. 1917. — 58. Ders. and Hull, M.: Ibid. 39, 1051. 1917. — 59. Ders. und Fenger, F.: Ibid. 39, 1278. 1917. — 60. Luchau, E.: Über die Magen- und Darmverd. b. einig. Fischen. Inaug.-Diss. Königsberg 1878. — 61. MacClendon, J. F.: Americ. journ. of physiol. 38. 1915. — 62. Ders., Shedlov und Karpman: Journ. of biol. Chem. 34. 1918. — 63. MacClendon, J. F.: Proc. of the nat. acad. of sciences U.S.A. 6, 690. 1920. — 64. Macfadyen, A., Neneke, M. und Sieber, N.: Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. 28. — 65. Martin, F. P.: Vergl. hist. Unters. d. Oberfl. u. Drüsenep. d. Darmschleimhaut d. Haussäugetiere. Inaug.-Diss. d. veter.-med. Fak. Leipzig 1910. — 66. Michaelis, L.: Die Wasserstoffionenkonzentration, Berlin 1914. — 67. Ders. und Davidsohn, H.: Biochem. Zeitschr. 30, 481. 1911. — 68. Ders.: Zeitschr. f. exp. Pathol. u. Therapie 1910. 398. — 69. Michaelis, L. und Pechstein, H.: Biochem. Zeitschr. 59, 77. 1913. — 70. Moore und Rockwood: Journ. of physiol. 21, 58 u. 373. 1897. — 70a. Nakayama, M.: Zeitschr. f. physiol. Chem. 41, 348. 1904. — 71. Northrop, J. H.: Journ. of gen. physiol. 5, 263. 1922. — 71a. Oomen, H. A. P. C.: Publ. d. staz. zool. di Napoli: Ricerche di fisiol. e di chim. biol. 7. 1926. Auch: Diss. Utrecht 1926. — 72. Oppel, A.: Lehrb. d. vergl. mikroskop. Anatomie d. Wirbelt. Tl. II: Schlund und Darm. Jena 1897. — 73. Oppenheimer, C.: Die Fermente und ihre Wirkungen. 5. Aufl. Leipzig 1925/26. — 74. Ders.: Handbuch der Biochemie 3, 2. Hälfte. Jena 1909. — 75. Osato, Shungo: Tohoku Journ. of exp. med. 1. — 76. Ostwald-Luther: Hand- und Hilfsbuch zur Ausführung physiko-chem. Messungen. 3. Aufl., 4. Neudruck. Leipzig 1910. — 77. Paneth, J.: Arch. f. mikroskop. Anat. 31. 1888. — 78. Pavlov, I. P.: The Work of the digestive glands. 2. Eng. Ed. London 1910. — 79. Pekelharing, C. A.: Zeitschr. f. physiol. Chem. 22, 233. 1896. — 80. Ders.: Ebenda 35, 8. 1902. — 90. Ders. und Ringer, W. E.: Ebenda 75.



1911. — 91. **Pekelharing, C. A.**: Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **167**, 254.  
 1917. — 92. **Ders.**: In: Abderhaldens Handb. biol. Arbeitsmeth. Abt. IV, Teil I, H. 3, Lief. 166. — 93. **Ders.**: Zeitschr. f. physiol. Chem. **81**, 355. 1912.  
 — 94. **Polimanti, O.**: Biochem. Zeitschr. **38**, 113. 1912. — 95. **Rakoczy, A.**: Zeitschr. f. physiol. Chem. **85**. 1913. — 96. **Redeke, C.**: Anat. Anz. **17**, 146. 1900. — 97. **Reid, W.**: Journ. of physiol. **26**, 427. 1901. — 98. **Richet, Ch.**: Arch. de physiol. norm. et pathol. (2) **10**, 536. 1882. — 99. **Ders. und Mourrut, A.**: Cpt. rend. de l' acad. des sc. Paris **90**, 879. 1880; **86**, 676. 1878. — 100. **Richet, Ch.**: Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. **36**, 74. 1884. — 101. **Ringer, W. E.**: Ztschr. f. physiol. Chem. **95**, 195. 1915. — 102. **Ders.**: Arch. néerland. de physiol. de l'homme et des anim. **2**, 571. 1918; **3**, 349. 1919. — 103. **Ders.**: Zeitschr. f. physiol. Chem. **116**. 1921. — 104. **Ders.**: Ebenda **124**, 171. 1923. — 105. **Ringer, W. E. und VanTrigt, H.**: Zeitschr. f. physiol. Chem. **82**, 484. 1912. — 106. **Ringer, W. E. und Grutterink, Frl. B. W.**: Ebenda **156**, 275. 1926. — 107. **Roberts, W.**: Proc. of the roy. soc. of London **32**, 145. 1881. — 108. **Rona, P.**: Praktikum der physiologischen Chemie. Teil I: Fermentmethoden. Berlin 1926. — 109. **Rosenheim, O.**: Journ. of physiol. **40**. 1910. — 110. **Schmidt, J. E.**: Arch. f. mikroskop. Anat. **66**, 12. 1905. — 111. **Schoorl, N.**: Zeitschr. f. angew. Chem. **12**. 1899. — 111a. **Ders.**: Chem. Weekbl. 1917, S. 221. — 112. **Sellier, M. J.**: Trav. des Labor. Stat. zool. d'Arcachon, 1899. 93. — 113. **Ders.**: Ebenda 1902. — 113a. **Sherman, H. C., Thomas, A. W. und Baldwin, M. W.**: Journ. of the Americ. chem. soc. **41**, 231. 1918/19. — 114. **Shore, L. E. und Tebb, M. C.**: Journ. of physiol. **13**, XIX. 1892. — 115. **Sjöberg, K.**: Biochem. Zeitschr. **133**, 294. 1923. — 116. **Slyke, Donald, D. van and White, G. F.**: Journ. of biol. chem. **9**, 209. 1911. — 117. **Smirnow, A. J.**: Physikal.-med. Ges. Jekaterinodor 1920 (Russ.). Zit. nach **Rona** Ber. Ges. Physiol. **13**. — 118. **Ders.**: Milit. med. Journ. d. IX. Armee 1920 (Russ.). Zit. nach **Rona** **8**. — 119. **Smorodinzew, J. A. und Adowa, A. N.**: Zeitschr. f. physiol. Chem. **149**, 173. 1925. — 120. **Dies.**: Biochem. Zeitschr. **153**, 14. 1924. — 121. **Sörensen, S. P. L.**: Ebenda **7**, 45. 1908. — 122. **Ders.**: Ergebnisse der Physiologie Jg. **12**, 393. 1912. — 123. **Ders.**: Biochem. Zeitschr. **21**, 131. 1909; **22**, 352. 1909. Auch in: Cpt. rend. Lab. de Carlsberg **8**. 1909. — 124. **Stirling, W.**: Journ. of Anat. and physiol. **18**, 426. 1884. — 125. **Sullivan, M. X.**: Bull. of the Bureau of Fisheries **27**. 1907. — 126. **Tebb, C. M.**: Journ. of physiol. **15**. 1894. — 127. **Trautmann, A.**: Arch. f. mikrosk. Anat. **76** (1910/11). — 128. **Vernon:** Journ. of physiol. **27**, 269. 1901. — 128a. **Ders.**: Ebenda **32**, 33. — 128b. **Ders.**: Ebenda **28**, 156. 1902. — 129. **Weinland, E.**: Zeitschr. f. Biol. **45**. — 130. **Ders.**: Ebenda **41**, 35 u. 275. 1901. — 131. **Ders.**: Ebenda **55**. 1911. — 132. **Ders.**: Ebenda **38**, 16. 1899. — 133. **Wiechowski, W.**: Hofm. Beitr. z. chem. Physiol. und Pathol. **9**, 232. 1907. — 134. **Waldschmidt-Leitz, E.**: Zeitschr. f. physiol. Chem. **132**, 237. 1924. — 135. **Ders.**: Ebenda **142**, 217. 1925. — 136. **Ders. und Harteneck, Anna:** Ebenda **147**, 286. 1925. — 137. **Dies.**: Ebenda **149**, 203. 1925. — 138. **Dies.**: Ebenda **149**, 221. 1925. — 139. **Waldschmidt-Leitz, E. und Schöffner, A.**: Ebenda **151**, 31. 1926. — 140. **Willstätter, R., Graßmann, W. und Ambros, O.**: Zeitschr. f. physiol. Chem. **151**. 1926. — 141. **Willstätter, R. und Memmen, F.**: Ebenda **133**, 247. 1924. — 142. **Willstätter, R. und Waldschmidt-Leitz, E.**: Ber. d. Dtsch. chem. Ges. **54**. 2988. 1921. — 143. **Willstätter, R., Waldschmidt-Leitz, E., und Hesse, A. R. F.**: Zeitschr. f. physiol. Chem. **126**, 143. 1923. — 144. **Willstätter, R. und Kuhn, R.**: Ebenda **125**, 1. 1925. — 145. **Wohlgemuth, J.**: Grundriß der Fermentmethoden. Berlin 1913. — 146. **Yonge, C. M.**: Journ. mar. Biol. Ass. Unit. Kingdom **13**. 1925. — 147. **Yung, E.**: Arch. d. zool. exp. et gén. 3. série, **7**. 1899.



## Stellingen.

### I.

De darmmaltase- en invertase der zoogdieren worden door de Lieberkühnsche klieren geproduceerd.

### II.

Het ontbreken van meercellige klieren in den darm der visschen gaat parallel met het ontbreken van de disaccharasen aldaar.

### III.

Er bestaat bij de lagere vertebraten een veel sterker uitgesproken biologisch verband tusschen de hoeveelheden der enzymen in het darmkanaal en het gebruikte voedsel, dan bij de hoogere.

### IV.

De resultaten, die Carlson heeft verkregen bij zijn proeven over de regeling van het hartrythme by *Limulus* mogen niet gegeneraliseerd worden ten gunste van de neurogene harttheorie.

### V.

Indien bij het onderzoek naar de functie van haemoglobine als transportmiddel van zuurstof bij de lagere dieren, de haemoglobinewerking wordt uitgeschakeld door CO, heeft men bij het trekken van conclusies rekening te houden met een eventueele werking van het CO op het oxydatieve vermogen der cellen.

### VI.

Broman heeft niet aannemelijk gemaakt, dat de asymmetrische ligging van het zoogdierhart een gevolg is van de minder sterke aanleg tot ontwikkeling der linker long.

Broman, I.: *Anat. Anzeiger* Bd. 57 (1923/24), p. 95.

### VII.

De opvatting van Boutan omtrent de oorzaak van de asymmetrie der Gastropoden is onjuist.

### VIII.

De selectietheorie van Darwin is niet in staat met behulp van de door Baur gevonden factormutaties als variatiemateriaal, het evolutieproces te verklaren.

Baur, E.: *Zeitschr. f. ind. Abst. und Vererbungslehre* Bd. XXXVII (1925), p. 107.

Tammes, T.: idem Bd. XXXVI (1925), p. 417.

### IX.

G. Schmid heeft voldoende aannemelijk gemaakt, dat de beteekenis der insectivorie bestaat in een compensatie voor het ontbreken van eenige elementen (N, P en K) in den bodem, waarop de de insectivore planten voorkomen.

Schmid, G.: *Flora* Bd. 104 (1912), p. 335.



## X.

Het verdient geen aanbeveling om in gevallen, als beschreven door Krogh in zijn »Anatomie und Physiologie der Capillaren« op blz. 171—179, zonder meer van een osmotischen druk van eiwithoudende vloeistoffen te spreken.

## XI.

Een statistisch-teleologische denkwijze is in de biologische wetenschappen onmisbaar. Zij alleen biedt tegenover die levensverschijnselen, welke door hun zeer groote gecompliceerdheid (deels vooralsnog) aan een physisch-chemische analyse weerstand bieden, het middel om te voldoen aan de voorwaarde, die Kirchhoff aan een natuurbeschrijving stelt, nl. dat zij zoo eenvoudig mogelijk zij.

Teleologie is, aldus gebruikt, geen metaphysische denkwijze, maar een opportunistisch middel ter beschrijving, dat in de wijze, waarop het gebruikt wordt, tot op zekere hoogte is te vergelijken met sommige begrippen die in de physica tot vereenvoudiging der beschrijving worden ingevoerd.

Kirchhoff: Vorlesungen über Mechanik. Vorrede en § 1.

Hertz, H.: Die Prinzipien der Mechanik. Ges. Werke Bd. III. Einleitung.

Poincaré, H.: Science et Hypothèse.

—: La valeur de la Science.

Mach, E.: Die Mechanik.

---















U  
1