



# Über die eiweisslösenden Enzyme im Magensaft von Astacus

<https://hdl.handle.net/1874/291781>

A. Qu. 192, 1928.

# ÜBER DIE EIWEISSLÖSENDEN ENZYME IM MAGENSAFTE VON ASTACUS

OSAMU SHINODA



BIBLIOTHEEK DER  
RIJKSUNIVERSITEIT  
UTRECHT.

Diss.  
Utrecht  
1928

ICHHANDLUNG JULIUS SPRINGER  
IN BERLIN · 1928







ÜBER DIE EIWEISSLÖSENDEN ENZYME  
IM MAGENSAFTE VON ASTACUS

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK UTRECHT



3969 4090

ÜBER DIE EIWEISSLÖSENDEN ENZYME  
IM MAGENSAFTE VON ASTACUS

*Diss. Utrecht 1928*

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN  
DOCTOR IN DE WIS- EN NATUURKUNDE  
AAN DE RIJKSUNIVERSITEIT TE UTRECHT,  
OP GEZAG VAN DEN RECTOR MANIFICUS  
DR. B. J. H. OVINK, HOOGLEERAAR IN DE  
FACULTEIT DER LETTEREN EN WIJSBE-  
GEERTE, VOLGENS BESLUIT VAN DEN  
SENAAT DER UNIVERSITEIT TEGEN DE BE-  
DENKINGEN VAN DE FACULTEIT DER WIS-  
EN NATUURKUNDE TE VERDEDIGEN OP  
MAANDAG 30 APRIL 1928, DES NAMIDDAGS  
DRIE UUR, DOOR

OSAMU SHINODA  
GEBOREN TE OSAKA

---

VERLAGSBUCHHANDLUNG JULIUS SPRINGER  
IN BERLIN · 1928



## AAN MIJNE MOEDER

## VOORWOORD

Bij het eindigen van mijn studietijd is het mij aangenaam mijn dank te kunnen betuigen aan allen, die mij in mijn studietijd geleid en voortgeholpen hebben.

Hooggeleerde JORDAN, hooggeachte Promotor. De tijd, dien ik op Uw laboratorium onder Uwe leiding mocht doorbrengen, zal mij altijd in gedachten blijven. Ik dank U voor het vele, dat ik van U geleerd heb en voor de hulp, die ik bij mijn promotie van U mocht ondervinden. De vriendelijkheid, waarmede zoowel Gij als ook Mevrouw JORDAN mij op allerlei wijze zijt tegemoet gekomen, vormt voor mij een der schoonste herinneringen aan mijn Europeesche reis.

Hooggeleerde NIERSTRASZ. Voor de gastvrijheid, waarmede Gij mij, niet alleen in Uw laboratorium, maar ook in Uw huiselijken kring hebt willen ontvangen, zeg ik U en Mevrouw NIERSTRASZ mijn hartelijken dank.

Zeergeleerde HIRSCH, ook U dank ik voor Uwe goede raadgevingen en voor de welwillendheid, waarmee Gij mij met de resultaten van Uwe nog niet gepubliceerde onderzoeken in kennis hebt gesteld. De dagen in Uw gastvrij huis doorgebracht, zal ik nimmer vergeten. Ontvang ook daarvoor, samen met Mevrouw HIRSCH bij dezen mijn bewijs van groote erkentelijkheid.

Zeergeleerde SCHUURMANS STEKHoven. Ik dank U, dat Gij mij bij het samenstellen van mijn proefschrift zeer behulpzaam zijt geweest.

Zeergeleerde VONK. Ik ben er U zeer dankbaar voor, dat Gij mij ten allen tijde met raad en daad hebt willen terzijde staan.

Tenslotte wil ik niet nalaten ook de ROCKEFELLER International Education Board dank te zeggen voor haar finanziële hulp, die het mij mogelijk maakte dit proefschrift te bewerken.

Die älteste Frage, welche die vergleichende Physiologie der Verdauung beherrscht hat, ist diejenige, nach der Analogie zwischen den Proteasen der Säugetiere und denjenigen der Wirbellosen. In der älteren Literatur stellte man sich die Frage, ob die eiweißverdauenden Enzyme, die man in den verschiedenen Säften der wirbellosen Tiere findet, mit dem Pepsin oder dem Trypsin der Wirbeltiere vergleichbar sei. Damals waren das die einzigen Proteasen, die man bei den Wirbeltieren kannte: das Erepsin war noch nicht entdeckt worden und der Unterschied zwischen aktiviertem und nichtaktiviertem Trypsin unbekannt. Die beiden Begriffe Pepsin und Trypsin waren für die vergleichende Physiologie beinahe ausschließlich durch die Reaktion definiert, bei welcher sie arbeiten: Pepsin bei saurer, Trypsin bei „alkalischer“ Reaktion. Beide Enzyme waren außerdem dadurch charakterisiert, daß sie einander zerstören. Bei einer bestimmten Reaktion in der Mischung beider Enzyme behauptet sich nur dasjenige, für welches die betreffende Reaktion günstig ist. Später wurde die Definition etwas genauer. Ohne besondere technische Hilfsmittel gelang es, bei der tryptischen Verdauung bestimmte kristallinische Produkte zu erhalten, die man als Leucin und Tyrosin erkannte; während durch eine einfache Reaktion mit Bromwasser ein Körper in den Verdauungsprodukten charakterisiert wurde, der später als die Aminosäure Tryptophan identifiziert werden konnte. Mit anderen Worten, es fanden sich bei der tryptischen Verdauung freie Aminosäuren, die bei der peptischen Verdauung nicht auftraten, wenn man wenigstens das Pepsin in reinem Zustande gebrauchte.

Die ersten Untersucher auf dem Gebiete der Enzyme wirbelloser Tiere beschränkten sich völlig auf den Nachweis der Reaktion. Von einzelnen Forschern wurde ausdrücklich die Behauptung aufgestellt, daß, wenn der Magensaft eines Tieres auf Lakmus sauer reagiere, man

von einem pepsinartigen Enzym reden müsse, während, sobald das Lakmuspapier blau wird, ein tryptisches Enzym gegeben sei. Gegen diese allzu oberflächliche Charakterisierung der Enzymarten hat JORDAN (8) Front gemacht.

Wenn man auch damals nicht über Mittel verfügte, um die Reaktion auf genauere Weise festzustellen, so wußte man doch schon, daß Lakmus keineswegs seinen Umschlag nach rot auf freie Säuren beschränkt, sondern schon etwa durch die Anwesenheit saurer Salze in geringen Mengen gerötet wird. So weit man damals wußte, kam Pepsin nur in Gegenwart größerer Menge freier Mineralsäure vor: Seine Wirkung, so sagte man, beschränkt sich vollkommen auf die Zusammenarbeit mit freier Säure, während von Trypsin bekannt war, daß es zwar schneller bei alkalischer Reaktion arbeite, daß es aber auch bei neutraler Reaktion (auf Lakmus) seine Wirkung nicht einstelle. Ja, eine schwachsaure Reaktion auf Lakmus schloß Trypsinwirkung nicht völlig aus. Daher erwies sich Lakmus als Indikator für die Wirkung der Proteasen in einer der beiden Formen als unbrauchbar. Andere Indikatoren, wie Kongorot, Lakmoid usw. wurden schon damals in die vergleichende Untersuchung eingeführt.

Von diesem Standpunkte aus hatte JORDAN (7) im Jahre 1904 die Protease aus dem „Magensaft“ des Flußkrebses untersucht. Er kam damals zu den folgenden Ergebnissen: Im Kaumagen von *Astacus* befindet sich ein Saft, auch während des Hungers, den man sich leicht dadurch verschaffen kann, daß man unter den Mandibeln eine dünn ausgezogene Glasröhre in den Magen einführt. Der Saft steigt dann sofort in das Rohr. Wir nennen ihn Magensaft, obwohl er nicht durch die chitinisierten Wände des Magens abgesondert wird, sondern aus den zahlreichen Blinddärmen stammt, zu denen der Mitteldarm dieser Tiere umgestaltet ist. Diese Blinddärme sind es, die man früher „Leber“ oder „Hepatopankreas“ nannte.

Der Magensaft hat die folgenden Eigenschaften: Er ist eiweißreich, gelb bis braun, Zusatz ganz geringer Menge Säure verursachen einen feinflockigen Niederschlag des Eiweißes, welches in dem Saft aufgelöst ist. Das Eiweiß dürfte ein Globulin sein.

Die Reaktion des Magensaftes ist schwach sauer auf Lakmus, so schwach, daß es sich nicht um freie Säure, wie sie im Magen der Säugetiere vorkommt, handeln kann. Kongorot wird nicht gebläut, GUENZBURGS Reagenz erwies sich dem Saft gegenüber als indifferent. Tinktura Cochinellae wird vom Saft blaurot, rotes Lakomoidpapier blau gefärbt.

Damals schloß JORDAN, daß der Magensaft vom Flußkrebs ein freies Alkali enthält, neben welchem sich ein saures Salz befindet, Auffassungen, denen heute keine Bedeutung mehr zukommt. Jedenfalls widerlegte die Feststellung die Meinung, als müsse die Protease des Saftes ein

pepsinartiges Enzym sein. Weiterhin wurde die Meinung, daß Pepsin nicht in Frage kommt, gestützt durch die Erscheinungen, welche man bei der Eiweißverdauung beobachten konnte. HOPPE-SEYLER (6) sagte auf Seite 397 seiner Arbeit: „Fibrinflocken werden in kurzer Zeit in der Flüssigkeit bei gewöhnlicher Temperatur, ohne Quellung bis auf geringen Rückstand gelöst, bei 40° geschieht dieses in wenigen Minuten. Salzsäure in geringen Spuren verlangsamt die Verdauung sofort. Ein Tropfen Salzsäure von 2% sistiert sie. Das Filtrat ist stets wirkungslos. Löst man den Niederschlag in Salzsäure von 0,1% wieder auf, so zeigt sich diese Lösung auch unwirksam. Dagegen gibt der Niederschlag eine vollkommen wirksame Lösung, wenn man ihn in verdünntem Alkali auflöst.“ Als Produkte der Eiweißverdauung durch den Saft vom Flußkrebs hatte man die folgenden gefunden: Mehr als 1 ccm Krebssaft wurde mit 50 ccm Chloroformwasser verdünnt und dieser Flüssigkeit eine gewisse Menge Fibrin bei 30—40° zugesetzt. Nach 12 Stunden war alles gelöst. Die klare, schwarzgelbe Flüssigkeit gab bei Zusatz verdünnter Essigsäure einen ziemlich feinflockigen Niederschlag. Das Filtrat trühte sich beim Kochen neuerdings, worauf abermals filtriert wurde. Das klare Filtrat ergab deutlich Biuretreaktion mit roter Färbung (Albumosen). Nach vollkommenem Aussalzen der Flüssigkeit fällt die Biuretreaktion wieder positiv aus, so daß Peptone vorhanden sein müssen. Läßt man den Saft längere Zeit einwirken, z. B. drei Tage, dann tritt bei Zusatz von Essigsäure keine merkliche Trübung mehr ein und auch beim Kochen war die Eiweißfällung sehr viel geringer, als nach kurzer Verdauungszeit. Nunmehr gab eine Probe des klaren Filtrats sehr deutliche Tryptophanreaktionen. Beim Eindampfen der neutralisierten Eiweißflüssigkeit scheiden sich aus dem braunen Sirup massenhafte Leucinkugeln und Tyrosindrusen aus. Aus allen diesen Ergebnissen hatte JORDAN geschlossen, daß der Magensaft des Flußkrebses eine tryptische Protease enthielt. Die ältere Behauptung KRUKENBERGS (10), daß der Saft von *Astacus* und *Homarus* gleichzeitig Pepsin und Trypsin enthält, meinte JORDAN widerlegen zu können. KRUKENBERG hatte mit Extrakten aus der Mitteldarmdrüse gearbeitet und hatte auch saure Extrakte der Drüse wirksam gefunden. JORDAN hatte dagegen gefunden, daß saure Extrakte aus der Drüse nicht wirksamer sind, als die gleiche Säure, ohne daß man damit zuerst eine Drüse extrahiert hat. Das galt für beide genannte Krustazeenarten.

Auch bei vielen anderen wirbellosen Tieren fördert die genannte Methodik analoge Erscheinungen zutage. Sehr überzeugend waren die Resultate verschiedener Untersucher, wir nennen hauptsächlich NIRENSTEIN (13), bei *Paramecium*. Wenn diese Tiere Nahrung in ihre Vakuolen aufgenommen haben, dann läßt sich durch Hinzufügung von Farbstoffindikatoren zur Nahrung ausgesprochen saure Reaktion in der Vakuole

nachweisen. Allein, solange diese saure Reaktion herrscht, findet keine Verdauung in der Vakuole statt. Erst, wenn sie verschwindet und alkalischer Reaktion Platz macht, setzt die Verdauung ein. Die saure Reaktion wird in Zusammenhang gebracht mit der Nahrung dieser Bakterienfresser und man meint, daß die Säure bei der Abtötung der Bakterien eine Rolle spielt; das Enzym aber, welches in der Vakuole wirkt, ist nicht imstande bei saurer Reaktion zu arbeiten. Da man bei den Wirbellosen nirgends mit den damals zur Verfügung stehenden Mitteln ein pepsinartiges Ferment fand, so schien es, als sei Pepsin ein besonderer Besitz der Wirbeltiere, als sei vielleicht das Pepsin ein „Anpassungsprodukt“ an die saure Reaktion im Magen der Wirbeltiere. Diese kann man vergleichen mit der sauren Reaktion in der Vakuole von *Paramecium*, allein mit dem Unterschiede, daß die saure „antiseptische“ Periode, durch den Besitz dieses eigentümlichen Vorenzyms, dem Verdauungsprozeß nicht verloren gehe. Denn Pepsin sei nur eine Art Vorenzym, welches das Eiweiß zwar angreift, aber seine Spaltung nicht vollendet.

Die Tatsache, daß Pepsin das Eiweißmolekül nicht bis zur vollständigen Befreiung der Aminosäuren spaltet, wurde erst einwandfrei anerkannt, als man mit hinlänglich gesäuberten Pepsinpräparaten arbeitete. Unsaubere Magenextrakte können Erepsin enthalten. Am zuverlässigsten erwies sich bekanntlich Magenfistelsaft. Es stand also bei den Säugetieren eine Vielheit von Enzymen gegenüber jener vermuteten Einheit bei den Wirbellosen.

Mittlerweile war das Erepsin entdeckt worden, und gleichzeitig ergab sich die merkwürdige Tatsache, daß bei den Säugetieren die letzte Hand an die Spaltung der Eiweißkörper sowohl als der Kohlenhydrate durch Sekrete des eigentlichen Mitteldarmes gelegt wird. Weder der Magen, noch das Pankreas bereiten praktisch diejenigen Enzyme, welche die genannten Nahrungsmittel in resorbierbaren Zustand spalten. Der Darm der Wirbeltiere läßt nur Monosaccharide hindurch. Und wenn auch die Resorption sich keineswegs auf Aminosäuren zu beschränken braucht, praktisch werden durch den Darm nur Aminosäuren in das Blut hindurchgelassen. Diese Umstände schienen ein Licht auf die Bedeutung der Enzymketten, wie sie bei den Wirbeltieren vorkommen, zu werfen, man mußte zwischen Vorverdauung und definitiver Verdauung unterscheiden. Erstere geschieht in großen Mengen zugleich, im Magen und im Darm (Pepsin, Trypsin, Amylase), während letztere durch den Umstand, daß die kleinen Darmdrüsen über die ganze Länge des Darmes verteilt sind, nur langsam und gleichmäßig über die Darmlänge verteilt, vor sich geht. Es ist leicht einzusehen, daß auf diese Weise der Organismus vor Überschwemmung mit den Verdauungsprodukten beider genannter Nahrungskörpergruppen beschützt ist.

Die Auffassung, die wir einleitend kurz skizziert haben, wurde durch die Untersuchungen der WILLSTÄTTERSchen Schule schwer erschüttert.

Während man bis dahin in dem Besitz einer Vielheit von Proteasen bei den Wirbeltieren lediglich den Ausdruck einer Art Arbeitsteilung gesehen hat, d. h. eine Arbeitsteilung unter den verschiedenen Teilstrecken des Magendarmkanals, so ergab sich neuerdings auch eine spezifisch chemische Bedeutung der Proteasen des Wirbeltieres.

Bekanntlich fußt die neue Enzymatologie zum großen Teil auf den Arbeiten von R. WILLSTÄTTER und seinen Schülern. Die Methode, die unsere Auffassung über die Enzyme umzugestalten berufen ist, strebt eine Trennung der einzelnen Enzyme voneinander an, durch fraktionierte und selektive Adsorption. Durch diese Methoden gelang es, wenn auch zunächst keine vollkommene Individualisierung der einzelnen Enzyme zu erlangen, so doch mit dermaßen gereinigten Enzymen zu arbeiten, daß man den Wirkungsbereich des einzelnen Enzyms viel strenger umschreiben kann, als das bis dahin möglich war. In Wirklichkeit liefert der Organismus z. B. im Pankreas keineswegs einheitliches Trypsin, sondern auch das Pankreas enthält Erepsin, daher die Notwendigkeit, das Trypsin durch die genannte Methode zu isolieren. Mit diesen gereinigten Enzymen gelang es E. WALDSCHMIDT-LEITZ, eine genaue Klassifikation der Wirbeltierproteasen aufzustellen. Er unterscheidet vier Proteasen, nämlich Erepsin, Trypsin-Enterokinase (aktiviertes Trypsin), nichtaktiviertes Trypsin, endlich Pepsin.

Erepsin wirkt in alkalischen Milieu vornehmlich auf niedere Polypeptide und spaltet sie zur Aminosäure. Allerdings vermag Erepsin auch wirkliches Pepton (d. h. durch langdauernde Einwirkung von Pepsin aus dem Eiweiß entstandes Pepton) zu spalten. Aber die eigentliche Wirkung des Erepsins dürfte doch die Lösung von Dipeptidbindungen sein.

Trypsin im Zusammenwirken mit bestimmten Mengen von Enterokinase greift natives Eiweiß an, und spaltet es so, daß einzelne Aminosäuren, wie Leucin, Tyrosin und Tryptophan frei werden. Viele Dipeptide vermag es aber nicht zu spalten.

Unaktiviertes Trypsin spaltet Pepton, aber kein natives Eiweiß, während Pepsin natives Eiweiß spaltet, aber in seiner Wirkung nicht weiter geht, als bis zur Bildung von Pepton.

WALDSCHMIDT-LEITZ ist der Meinung, daß diese vier Enzyme verschiedene Funktion haben. Wenn man mit modernen Titriermethoden, z. B. mit Alkoholtitration, die Menge der Aminosäuregruppen, die als Produkte der verschiedenen Enzyme auftreten, feststellt, so zeigt es sich, daß bei der Wirkung aller vier Enzyme Aminogruppen frei werden und daß der den einzelnen Enzymen entsprechende Zuwachs im Verhältnis ganzer Zahlen zueinander steht, gleichgültig in welcher Reihenfolge man die Enzyme einwirken läßt. Daher schließt WALDSCHMIDT-LEITZ,

daß keines der Enzyme durch eines der drei anderen ersetzt werden kann, jedes habe eine spezifische Aufgabe.

Endlich äußert WALDSCHMIDT-LEITZ die Meinung, daß die vier Enzyme je einer Art der chemischen Bindung, durch welche die verschiedenen Aminosäuren miteinander zum Eiweißmolekül verbunden sind, entsprechen. Gegenüber der Auffassung verschiedener Forscher, z. B. ABDERHALDEN, behauptet er, daß wir es in keinem Falle mit einer desaggregierenden Wirkung eines Enzyms zu tun haben; denn (abgesehen von den oben wiedergegebenen Argumenten) schon bei der Pepsinwirkung treten saure und basische Gruppen im Verhältnis von 1:1 auf. Dies hat zur Voraussetzung, daß einzelne Aminosäuren abgespalten werden, was bei einer Desaggregation nicht der Fall sein würde. Der weitere Schluß aus diesem Verhalten ist der, daß das Eiweißmolekül vier verschiedenartige Bindungen enthält, von denen jede so spezifisch ist, daß es eines besonderen Enzyms bedarf, um sie zu lösen. Dabei ist es natürlich gleichgültig, ob derartige Enzyme topographisch voneinander getrennt sind (Pepsin und die übrigen) oder miteinander gemischt wirken (Trypsin und Erepsin).

Aus diesen Tatsachen ergibt sich für die vergleichende Physiologie eine vollkommen neue Problemstellung. Solange man sich noch vollkommen auf die Feststellung des Substrates, der Reaktion auf einige wenige Indikatoren und das Auftreten einiger weniger Produkte beschränkte, konnte man noch von einer einheitlichen Protease im Saft etwa des Krebses reden. Wie ist das nun mit der heutigen Methodik? Wenn WALDSCHMIDT-LEITZ recht hat, so ist die spezifische Form der Enzymwirkung durch spezifische Eigenschaften des Eiweiß gegeben und nicht durch die Eigenart des Tieres. Daher muß auch der Magensaft eines Invertebraten nicht ein einheitliches „Urtrypsin“, sondern ein 3—4faches Enzymgemisch enthalten.

Ich habe mir nun zur Aufgabe gestellt, diese Dinge beim Flußkrebs zu untersuchen, mußte mir aber unmittelbar sagen, daß ich nur einen Teil der neueren Methoden auf diese Analyse anzuwenden imstande sei. Es hätte auf der Hand gelegen, mit fraktionierter oder selektiver Adsorption eine Trennung der verschiedenen Proteasen im Magensaft des Krebses zu versuchen. Allein es schien mir, daß ich auf diesen Weg verzichten müßte. Die Erfahrungen über die Adsorptionsmethode sind wohl noch nicht Allgemeingut; wenn man sie auf ein Objekt wie den Magensaft des Flußkrebses übertragen wollte, so würde man über ungezählte Exemplare dieser Tierart verfügen müssen. Ich hoffe später, wenn mir die Adsorptionsmethode genau bekannt ist, auf diese Technik auch beim Flußkrebs zurück zu kommen. Zunächst standen mir zur Verfügung zwei Mittel, um eine etwaige Vielheit von Enzymen zu charakterisieren. Gegenüber den alten primitiven Methoden der Reaktion

auf einige Farbenindikatoren steht heute die wohl ausgebildete Technik der  $p_H$ -Bestimmungen. Da man außerdem durch SÖRENSEN und WILLSTÄTTER und VAN SLYKE über vorzügliche Methoden verfügt, den Gang einer Enzymwirkung quantitativ zu verfolgen (z. B. Formol- und Alkoholtitrierung), so gelingt es heute leicht, das  $p_H$ -Optimum einer bestimmten Enzymwirkung festzustellen. Ob ein solches Optimum allerdings dazu dienen kann, ein bestimmtes Enzym, verglichen mit einem anderen zu charakterisieren, das steht noch nicht fest. In der Literatur über die vergleichende Physiologie der Enzyme, scheint man diese „Etikettierung“ der Enzyme als zuverlässig zu betrachten. Es sei hier schon bemerkt, daß ich mich diesem Optimismus nicht anschließen kann und daß Untersuchungen gezeigt haben, daß die Charakterisierung einzelner Enzyme durch  $p_H$ -Optima zunächst noch nicht möglich ist. Immerhin wollen wir doch unsere diesbezüglichen Erfahrungen mitteilen, da sie für künftige Untersuchungen wertvolles Material enthalten.

Eine zweite Methode ist diejenige, uns nach bestimmten Substraten umzusehen, die spezifisch nur durch ein bestimmtes Enzym gelöst werden können, wenigstens bei den Wirbeltieren. Solange wir das Eiweißmolekül noch nicht so kennen, daß die Bindungen, deren Lösung, nach WALDSCHMIDT-LEITZ, Aufgabe bestimmter Enzyme ist, für alle Enzyme direkt untersuchen können, müssen wir auf andere Weise versuchen, den Enzymen spezifische Aufgaben zu stellen. Was das Erepsin betrifft, so liegen die Dinge klar genug: Beim Wirbeltier vermag nur das Erepsin gewisse Dipeptide zu lösen. Es war also die Frage, ob derartige Dipeptide wie z. B. Glyzyl-glyzin, oder Leucyl-glyzin durch den Magensaft des Flußkrebses gelöst werden können. Wesentlich schwieriger gestaltete sich die Frage bezüglich einer etwaigen Pepsinfaktion im Saft des Flußkrebses. Die enzymatologische Literatur gab hier keinen Aufschluß. Dagegen schien es mir, als könne man vielleicht reines Bindegewebe von Wirbeltieren als ein Substrat verwenden, durch welches Pepsin- und Trypsinwirkung voneinander unterschieden werden können. Durch die klinischen Arbeiten von SAHLI wußten wir, daß das Trypsin und das Erepsin des Menschen Bindegewebe praktisch nicht angreifen, während das Pepsin des Magens dieses sehr leicht tut. Darauf begründet sich die Prüfung der Magenfunktion des Menschen durch SAHLI. Er verwendet Glasrörchen mit Methylenblau, die durch eine Gummimembran verschlossen werden. Diese Gummimembrane wird durch eine präparierte Darmsaite festgebunden. Im gesunden Magen löst sie sich auf und der Farbstoff erscheint im Harn. Fehlt die Magenverdauung, so bleibt die Saite auch im gesunden Darm ungelöst.<sup>1</sup> So verfügte

<sup>1</sup> Siehe neuerdings SAHLI, HERMANN: The fallacy of SAHLI „Desmoid Reaction“. Journ. Americ. Med. Assoc. 82, 51, 1924. Daselbst auch die Literatur über das Unvermögen des Trypsin-Erepsingemisches, rohes Bindegewebe zu verdauen.

ich wenigstens über zwei spezifische Substrate, von denen allerdings das Letztgenannte nicht so weitgehend untersucht war, daß man von einer allgemein gültigen Spezifität reden durfte. Für eine allgemeine Physiologie ist das Argument, daß der Saft eines Tieres Bindegewebe löst, natürlich nur ein Analogieschluß dafür, daß er eine Pepsinfaktion enthält. Dagegen sind die Untersuchungen mit den genannten verschiedenen Substraten biologisch hochinteressant; denn wenn es gelingt, zu zeigen, daß der Saft eines Invertebraten imstande ist, nicht nur, wie man das früher wußte, natives Eiweiß so zu verdauen, daß dabei einzelne Aminosäuren auftreten, sondern, daß dieser Saft Dipeptide und Bindegewebe zu lösen vermag, dann darf man hieraus das Folgende schließen: Mag er eine oder mehrere Enzyme enthalten, jedenfalls beschränkt sich seine Wirkung nicht auf Trypsinwirkung, sondern sie umfaßt alles, was die verschiedenen Säfte der Wirbeltiere zu lösen vermögen.

Ich versprach mir zu Anfang meiner Untersuchung sehr viel aus einer Kombination beider genannter Methoden, d. h. ich nahm mir vor, nicht lediglich die Tatsache zu prüfen, ob der *Astacus*-Saft die genannten Substrate zu lösen vermag, sondern auch die  $p_H$ -Optima dabei festzustellen. Es war möglich, daß z. B. die Verdauung von Darmsaiten ein ähnlich niederes  $p_H$ -Optimum zeigte, wie ein solches dem Pepsin zukommt. Eine derartige Koinzidenz würde die Meinung vom Vorhandensein einer Pepsinfaktion bei *Astacus* weitgehend gestützt haben. Es sei hier schon erwähnt, daß diese Hoffnung getäuscht wurde, wie wir aus den Versuchsergebnissen ersehen werden.

Bei Anwendung der Methoden der  $p_H$ -Optima sind wir gezwungen, den Enzymen ein Milieu zu verschaffen, welches nicht übereinstimmt mit ihrem natürlichen Milieu. Während das natürliche Milieu einen ganz bestimmten  $p_H$ -hat, müssen wir zur Feststellung der Optima bestimmte Puffergemische zusetzen, wodurch wir also zweierlei am natürlichen Magensaft verändern: 1. seine Wasserstoffionenkonzentration, 2. sein Gehalt an gelösten Stoffen.

Daß ein Enzym möglicherweise ein Optimum besitzt, welches anders ist, als dasjenige des Saftes oder des Milieus, indem es normalerweise wirkt, ist bekannt. Im Gegensatz zu den meisten anderen Enzymen des Wirbeltieres, gilt dieses für das Trypsin. Nach LONG und FENGER (12) ist der Inhalt des Darmes mancher Säugetiere neutral ( $p_H = 7,2$ ), ja, sogar schwach sauer. Dagegen liegt das  $p_H$ -Optimum des Trypsins wesentlich höher. Es kann nicht genau festgestellt werden, da ein großer Unterschied besteht zwischen dem Resistenzoptimum und Wirkungs-optimum dieses Enzyms. Das Resistenzoptimum liegt bei  $p_H = 3,15$ . Nun nimmt zwar die Wirkungsgeschwindigkeit des Trypsins mit zunehmendem  $p_H$  zu, allein, gleichzeitig wird das Enzym schneller und

schneller vernichtet. So bleibt die Bestimmung optimaler Wirkung immer ein Kompromiß, bei dem die willkürliche Feststellung der Wirkungszeit von großer Bedeutung ist (RINGER [15]). Bei einer Wirkungszeit von 11 Minuten liegt das  $p_H$ -Optimum des Enzyms bei 11,3, dagegen bei einer Wirkungszeit von 4—5 Stunden, die mehr den physiologischen Verhältnissen entspricht, bei  $p_H$  8—9. Diese Optima liegen also jedenfalls weit entfernt von den Bedingungen, wie sie im Darm der Säugetiere herrschen.

Für Erepsin wird das  $p_H$ -Optimum durch EULER als 8,7 angegeben, nach WALDSCHMIDT-LEITZ als 7,8. Für Pepsin fällt Optimum und Milieubedingungen wieder zusammen, wenigstens bei den Säugetieren (Reaktion und Optimum ungefähr gleich 2. Näheres siehe EULER (3). VONK (17) stellte im Mageninhalt von *Esox luceus*  $p_H$ -Werte von 4,7 bis 5,8 fest, während die Optima des Pepsins bei Fischen sich nicht wesentlich unterscheiden dürften von denjenigen der Säugetiere z. B. für *Acanthias* gleich 2,2 bis 2,5<sup>1</sup>.

#### Untersuchungen über verschiedene $p_H$ -Optima bei der proteolytischen Wirkung der Säfte wirbelloser Tiere.

Während man früher, wie oben gezeigt wurde, durch die zufällige Wahl der Objekte zu der Meinung gekommen war, daß die verdauenden Säfte der niederen Tiere eine einheitliche Protease enthalten, die nur bei einer einzigen Reaktion ( $p_H$ ) arbeitet, zeigte sich neuerdings, daß bei anderen Tieren die  $p_H$ -Empfindlichkeit mindestens viel weniger groß ist, als dieses nach jenen älteren Versuchen z. B. beim Flußkrebs der Fall zu sein schien. VAN DER HEYDE (17) fand bei *Asterias forbesii* und *Thyone briarius* einen Darmsaft, der sowohl bei saurer, als bei alkalischer Reaktion Eiweiß zu lösen vermag. Allerdings ist die Menge des Produktes bei alkalischer Reaktion größer, so daß der Verfasser schließt, es handele sich um eine tryptische Verdauung mit verhältnismäßig großer Unabhängigkeit vom  $p_H$ . Auch OOMEN (14) fand im Verdauungssafte von *Holothuria stellati* eine nach seiner Meinung einheitliche Protease, die bei  $p_H$ -Werten von 2,8 bis 9,2 wirken soll, mit zunehmender Stärke bei zunehmender Alkalinität. Maxima und Minima ergaben sich bei Alkoholtitrierung nicht. Leider hat OOMEN es versäumt, den  $p_H$  in der Mischung von Puffergemisch, Substrat und Saft potentiometrisch festzustellen. Er beschränkte sich auf Feststellungen des  $p_H$  in dem Puffergemisch mit dem Substrat, so daß vermutlich durch Zutat des Saftes eine Veränderung des  $p_H$  auftrat.

BODANSKY (1) untersuchte Extrakte von Coelenteraten, und zwar *Physalia arethusa* und *Stomolophus meleagris*. Er bestimmte die Menge

<sup>1</sup> Die Karbohydrasen besitzen ein Optimum (zwischen 6—7), welches der Reaktion innerhalb des Darms der verschiedenen Tiere sehr nahe liegt.

Gelatine, die durch diese Extrakte verflüssigt wurde, und zwar bei verschiedenen  $p_{\text{H}}$ -Werten. Es gelang ihm, distinkte Optima festzustellen. Das eine lag bei  $p_{\text{H}} 3,0-3,5$ , das zweite bei ungefähr 7,8.

YONGE (19) untersuchte auf die gleiche Weise Extrakte aus der Mitteldarmdrüse von *Ostrea edulis* und fand als Optima 3,5 und ungefähr 9.

P. KRÜGER (10) stellte ebenso zwei Optima fest für die Proteolyse durch den Magensaft von *Astacus*. Das eine soll bei 3,5, das andere bei 7—8 liegen. Es muß dabei aber unmittelbar erwähnt werden, daß KRÜGER versäumt hat, sich vor der Wirkung der Autolyse auf das eigene Eiweiß durch Kontrollversuche zu schützen. Wir werden auf diesen Umstand weiter unten zurückkommen.

Offenbar nehmen die genannten Forscher ohne weiteres an, daß die beiden Optima einer Pepsin- und einer Trypsinfraktion entsprechen. Wir werden weiter unten auf diese Frage zurückkommen, wenn wir unsere eigenen Resultate mitgeteilt haben.

### Die Wasserstoffionenkonzentration des Magensaftes von *Astacus fluviatilis* und *A. macrodactylus*.

Mir standen zur Verfügung zwei Arten von Flußkrebsen, nämlich *Astacus fluviatilis* und *Astacus macrodactylus*. Die erste Art erhielten wir durch eine holländische Züchterei. Sie sind von normaler Größe, dunkelbraun. Allein, sie sind schwach und man kann sie nur kurze Zeit im Aquarium lebend erhalten. Der Magensaft ist rotbraun und

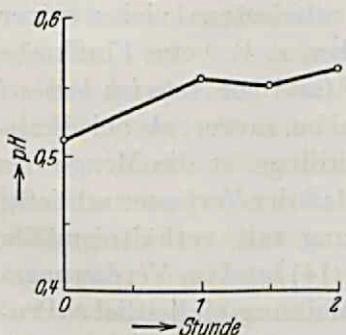


Abb. 1. Die Veränderung von  $p_{\text{H}}$  des Magensaftes nach der Fütterung (vgl. Tabelle 1).

in der Regel etwas weniger viskos, als der Saft der anderen Art. *Astacus macrodactylus* danken wir der freundlichen Hilfe von Herrn Dr. W. WUNDER, der sie uns aus Breslau schickte. Sie sind groß, mehr oder weniger grünlich braun, aber etwas heller von Farbe als *fluviatilis*. Sie sind wesentlich stärker als diese und lassen sich längere Zeit im Aquarium am Leben erhalten. Darauf habe ich die meisten meiner Versuche mit dieser Art ausgeführt. Der Magensaft ist gelblich bis grünlich-braun und oft sehr viskos. Ich werde meine Daten ohne Rücksichtnahme auf die Art angeben, da sich keine wesentlichen Unterschiede ergeben haben.

Der Magensaft wurde auf bekannte Weise mit einer Glasröhre dem lebenden Tiere entnommen. Der  $p_{\text{H}}$  wurde mit Hilfe der Wasserstoffelektroden gemessen. War die Menge die zur Verfügung stand zu klein, so benutzte ich die Quinhydronelektroden, die ich nach der Anleitung VONKS (18) benutzt habe. Die Resultate zahlreicher Messungen waren die folgenden:

Tiere, die 10 Tage lang gehungert hatten, hatten in ihrem Magensaft einen  $p_H$  von 5,01. Tiere, die mit 0,2 g Fleisch gefüttert worden waren, hatten einen  $p_H$  von ungefähr 5,6.

### Die Autolyse des Magensaftes.

Alle quantitativen Versuche über eine Verdauung in dem Magensaft eines Krebses haben zur Voraussetzung, daß man unter den gewählten Bedingungen die Autolyse des eigenen Eiweißes genau kennt. Es geht nicht an z. B. dem Magensaft ein Substrat hinzuzusetzen, etwa Dipeptide, und dann später festzustellen, daß bei einem bestimmten  $p_H$  die titrierbaren Aminosäuren zugenommen haben, da auch ohne Zusatz von Dipeptiden eine solche Zunahme stattfinden muß, wenn man in der Nähe des Optimums der Autolyse arbeitet. Außer dieser technischen, hat aber die Untersuchung der Autolyse eine biologische Bedeutung. Offenbar ist der Eiweißgehalt des Magensaftes ein integrierender Bestandteil dieses Sekrets, wenn wir auch zunächst nicht sagen können, welche Rolle er spielt. Man könnte in erster Linie an Pufferung denken, die ja sicherlich auch in dem Saft niederer Tiere vorhanden sein muß, wenn die Wirkung der Enzyme nicht durch alle möglichen Nahrungsmittel durch abweichenden  $p_H$  geschädigt werden soll.

Schon JORDAN (7) hatte gefunden, daß das Eiweiß des Saftes gegenüber der eigenen Protease außerordentlich widerstandsfähig ist. Allerdings hat er sich, wenn auch nur durch den Augenschein, von einer geringen Autolyse überzeugt. Meine Versuche wurden mit WILLSTÄTTERS Alkoholtitrierung ausgeführt, und zwar wurde die Methode RONAS „Fermentmethoden“ (16) entnommen.

### Allgemeines über die Methodik meiner Untersuchungen.

*Puffergemische.* Ich benutzte Glykokoll, Borat und Biphtalatgemische. Letztere eignen sich am besten für die Alkoholtitrierung.

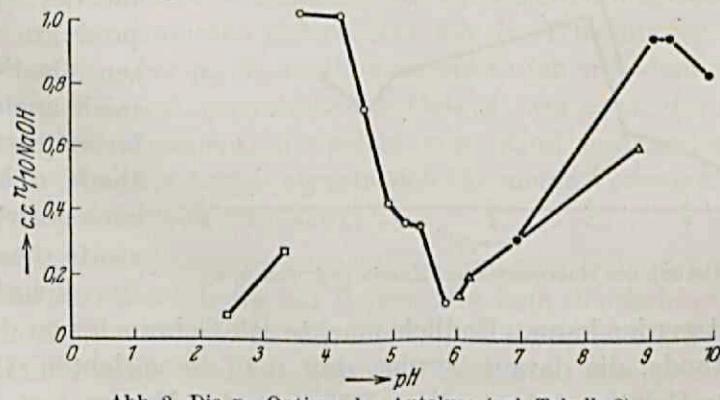


Abb. 2. Die  $p_H$ -Optima der Autolyse (vgl. Tabelle 2).

Boratgemische sind ungeeignet für diesen Zweck, da der Endpunkt der Titrierung sehr undeutlich wird. Das Glykokollgemisch wurde häufig

durch andere Forscher benutzt, aber seine Puffungskapazität ist nicht sehr groß bei Werten, die höher als  $p_H = 5$  liegen.

Ich stellte verschiedene Versuchsreihen unter Benutzung der Alkoholtitrierung an und fand ein Optimum der Autolyse bei ungefähr  $p_H 3,5$ , ein anderes bei ungefähr 9. Ein ausgesprochenes Minimum fand sich bei  $p_H 6$ . Hieraus ergab sich, daß der normale  $p_H$  des Saftes ganz in der Nähe dieses Minimums liegt, so daß also hierdurch die Autolyse des Saftes unter normalen Bedingungen eine sehr geringe Rolle spielt, wie, wenn auch ohne quantitative Methode, JORDAN festgestellt hat.

Die Ergebnisse über die Autolyse nötigen uns zu einer Kritik einer jüngst erschienenen Arbeit von P. KRÜGER (10). KRÜGER gebraucht jeweils 0,5 ccm Saft mit 10 ccm Puffergemisch. Obwohl er drei Arten von Kontrollversuchen macht, über Faktoren von untergeordneter Bedeutung (wenn wir nach den Resultaten urteilen dürfen), ließ er die wichtigste, die Kontrolle für Autolyse weg, was zumal bei der verhältnismäßig hohen Konzentration des Saftes, die er benutzte, von großer Bedeutung ist. Daher sind seine Kurven, wenigstens bei den genannten  $p_H$ -Werten, Resultanten der Autolyse und der Proteolyse.

### Die Wirkung des Magensaftes auf natives Eiweiß.

Ich habe gearbeitet mit Kasein, Gelatine, Fibrin und verschiedenen Arten von Bindegeweben aus den oben angegebenen Gründen. Als Methode diente in erster Linie die Alkoholtitration. Mit ihr wurden

die  $p_H$ -Optima bestimmt. Die Werte, die ich fand, sind recht verschieden.

Um die Zunahme der Spaltungsprodukte zu messen, bediente ich mich auch der kolorimetrischen Methode, d. h. der Lösung gefärbter Substrate, die quantitativ kolorimetrisch

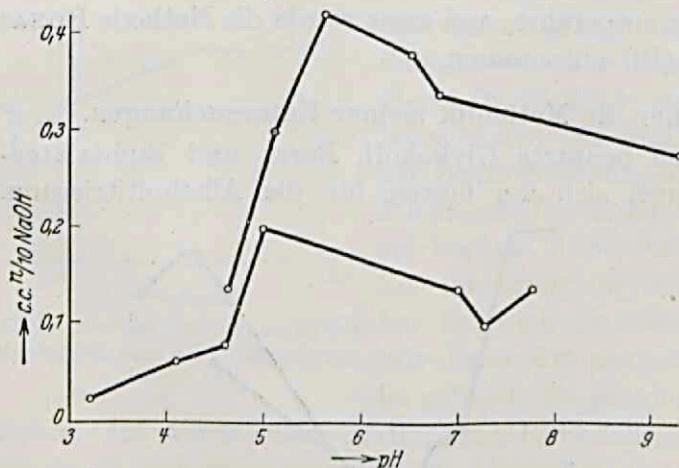
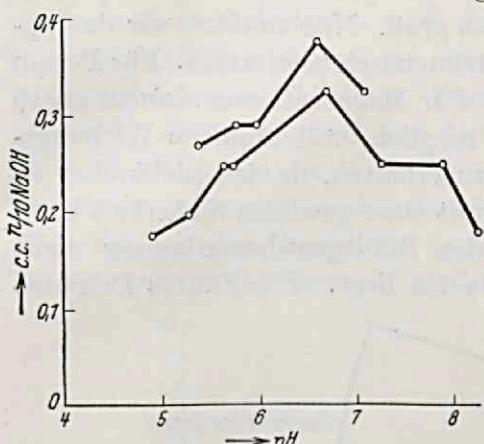


Abb. 3. Die Wirkung des Magensaftes auf Kasein (vgl. Tab. 3, A).

festgestellt werden kann. Endlich machte ich Gebrauch von der METT-schen Methode, die darauf beruht, daß man in geeichten Glasröhren gelatinisierte Gelatine bringt, diese Röhre in das Enzym legt und nach bestimmten Zeiten die Länge des gelösten Gelatinefadens mißt.

Mit Kasein ergab sich ein deutliches Optimum etwas unter einem

$p_H$ -Wert von 6. Die Kurve fällt steil auf der sauren Seite ab, während sie nach der alkalischen Seite langsam absinkt.



Bei Gelatine fand ich ein Optimum bei ungefähr 6,5 mit symmetrischem Abfall der Kurve nach beiden Seiten. Bei Fibrin ergaben sich zwei Optima, eins bei ungefähr 8 und ein zweites, wenn die Enzyme stark waren, bei ungefähr 5,5 (siehe Tabelle 4).

Abb. 4. Die Wirkung des Magensaftes (oben) sowie des Mitteldarmdrüsensextraktes auf Gelatine (vgl. Tabelle 3, B.).

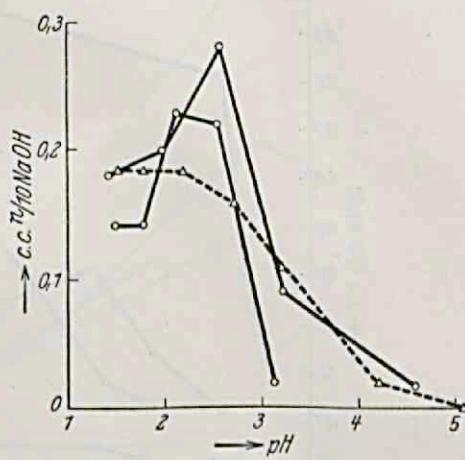


Abb. 5.

Abb. 5. Die Wirkung des Magensaftes auf Fibrin (vgl. Tabelle 3, C.). — Abb. 6. Die Wirkung des Pepsins auf Catgut von SAHLI (—) sowie auf Ligamentum nuchae (---) (vgl. Tabelle 4).

### Bindegewebe oder Kollagenverdauungen.

Mit Kollagen stellte ich die folgenden Versuche an. Erstens stellte ich das  $p_H$ -Optimum fest, welches sich bei einer Verdauung durch Säugertierpepsin ergibt. Zweitens untersuchte ich die Wirkung von Trypsin auf Bindegewebe (bei  $p_H$  8), endlich arbeitete ich mit dem Saft von *Astacus*. Als Substrat verwandte ich Catgut, wie es in der Chirurgie verwendet wird, Ligamentum nuchae vom Rind und andere Bindegewebspräparate. Am besten eignete sich für meine Versuche „Catgut“ für die Desmoidreaktion von SAHLI<sup>1</sup>.

Ungereinigte Bindegewebspräparate werden zum Teil gut von Trypsin verdaut und ihre Verdauung mit Pepsin gibt kein deutliches Optimum. Wenn man SAHLIS Catgut in ein, wie üblich hergestelltes Pepsin- und Trypsin-(Pankreatin-Rhenania-)Gemisch bringt, so löst es sich nur in

<sup>1</sup> Wir erhielten dieses Präparat von der Firma Hausmann, St. Gallen, durch freundliche Vermittlung von Herrn Professor Dr. H. SAHLI.

Pepsin auf. In Trypsin bleibt es äußerlich unverändert<sup>1</sup>. Der Magensaft des Flußkrebses beträgt sich diesbezüglich wie Säugetierpepsin! Allein das Lösungsvermögen ist nicht groß. Nun mußten wir das  $p_H$ -Optimum dieser Wirkung zunächst titrimetrisch bestimmen. Für Pepsin ergab sich ein Optimum von 2—2,0. Für Magensaft von *Astacus* ergab sich das Folgende: es war mir nicht möglich, vollkommene Wirkungskurven gegenüber diesem Substrat zu erhalten, da ich nicht über so große Saftmengen verfügte. Allein, mit einer gewissen Sicherheit kann ich schließen, daß das Optimum der Bindegewebeverdauung nicht niedriger als 4 und nicht höher als 7,5 liegt. Für SAHLIS Präparat

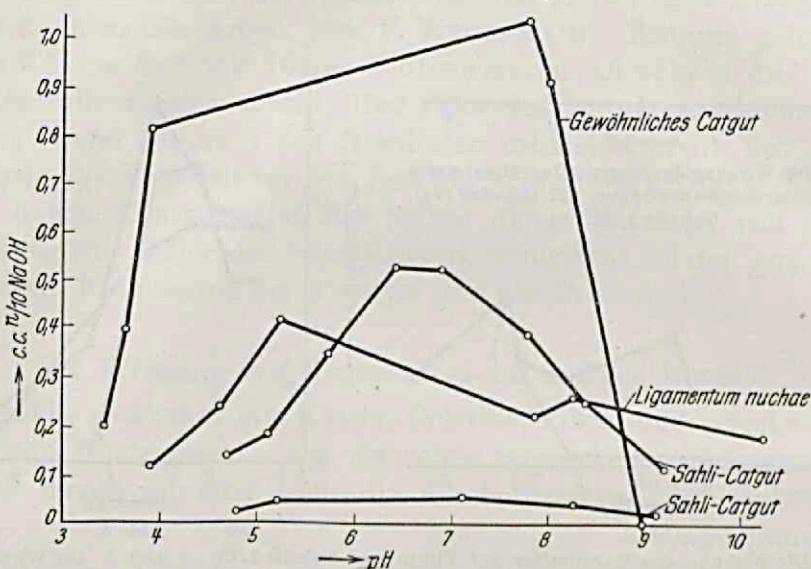


Abb. 7. Die Wirkung des Magensaftes auf Kollagenen (vgl. Tabelle 6).

liegt es ungefähr bei 6,7; da im Laufe des Versuches der  $p_H$  etwas abnimmt, so liegt es ein wenig mehr nach der alkalischen Seite, also etwa bei 6,8 (vgl. Tabelle 5—7).

#### Die Wirkung auf Dipeptide.

Die einfachste Methode, um die Spaltung von Dipeptiden zu zeigen, war die Benutzung von sogenanntem Fermentdiagnostikum<sup>2</sup>, das ist Glyzyl-tryptophan, bei dessen Spaltung Tryptophan frei wird und daher die Tryptophanreaktion auftritt, allein diese Methode war leider nicht brauchbar, da durch die Autolyse des Saftes auch schon Tryptophan-

<sup>1</sup> Es sei ausdrücklich bemerkt, daß, wenn man Trypsin auf Bindegewebe wirken läßt, und die Zunahme der freiwerdenden Aminosäuren titriert, eine solche sich in der Tat feststellen läßt, zumal bei ungereinigtem Bindegewebe (andere Eiweißkörper?). Auch in dieser Beziehung ist SAHLIS Catgut am besten, da es am wenigsten Titerzunahme bei Trypsineinwirkung ergibt.

<sup>2</sup> Firma Kalle u. Co., A.-G. Biebrich a. Rh.

reaktion auftritt, wobei also nicht festgestellt werden kann, aus welcher Bindung Tryptophan freigemacht wird. Ich arbeite daher mit Glyzyl-glyzin und Leucyl-glyzin. Die Lösung ist außerordentlich schwach, findet aber statt, und zwar bei einem  $p_H$ -Optimum von 9. Die Resultate findet der Leser in Tabelle 8. Eine genaue Kurve der Wirkung konnte ich nicht zeichnen, weil das Optimum mit dem Autolyseoptimum zusammenfällt und die Wirkung der „Erepsinfraktion“ überhaupt nur aus einer Subtraktion des Autolysetiters im Kontrollversuche, vom Titer des mit den Dipeptiden gemischten Saftes erhalten werden kann. Es sei ausdrücklich bemerkt, daß nur auf diesem Wege die Verdauung

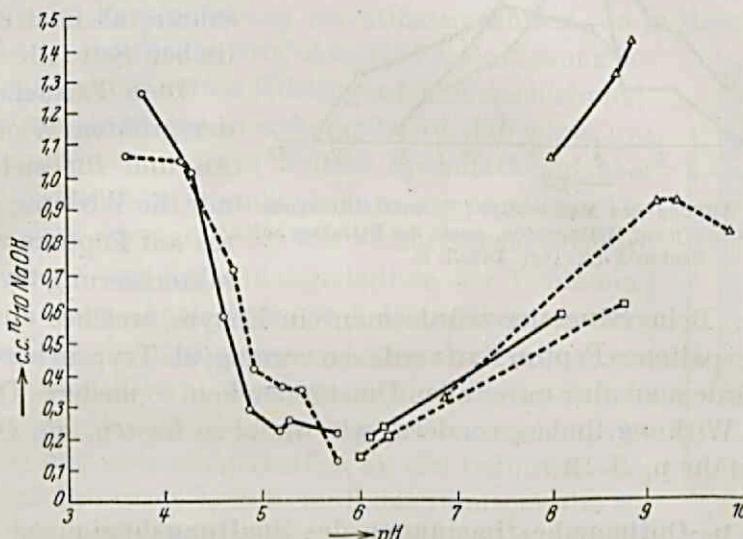


Abb. 8. Die Wirkung des Magensaftes auf Leucyl-glyzin (vgl. Tabelle 7, B, b) mit Autolysekontrolle (---).

der Dipeptide überhaupt bewiesen werden kann. KRÜGERS diesbezügliche Versuche müssen als nichtbeweisend angesehen werden und auch der von ihm gefundene niedere  $p_H$ -Optimumwert konnte durch meine Versuche nicht bestätigt werden. Er dürfte sich auf reine Autolyse beziehen.

Zunächst stellen wir also fest, daß der Saft des Flußkrebses alles leisten kann, was die Saftgemische der Wirbeltiere zu leisten imstande sind. Soweit wir dieses beurteilen können, sind also alle Wirkungsfractionen im Saft des Krebses vertreten. Es fragt sich nun, ob diesen Wirkungsfractionen auch bestimmte Enzymindividuen entsprechen. Um dieses festzustellen, wurden nun noch eine Reihe  $p_H$ -Optimumbestimmungen ausgeführt, in der Hoffnung, daß sich einzelne Fraktionen als Enzymindividuen charakterisieren lassen würden. Wir haben schon oben erwähnt, daß diese Untersuchungen nicht zu einem bestimmten Resultate geführt haben. Wir lassen unsere Versuche folgen.

### Die Wirkung des Magensaftes von *Astacus* auf Peptone.

Als Substrat diente Wittepepton und Pepton F der Firma Witte in Rostock. Dieses letztere verschaffte mir Herr Dr. G. Ch. HIRSCH. Ich sage ihm auch an dieser Stelle für seine freundliche Hilfe meinen besten Dank.

Für beide Stoffe fand ich nur ein einziges  $p_H$ -Optimum, nämlich

6,7 für Wittepepton und 6,2 für Pepton F. Beide Kurven fallen symmetrisch sowohl nach der sauren, als nach der alkalischen Seite ab.

Diese Tatsache ist von der größten Wichtigkeit. An und für sich diente mir die Wirkung des Säf-tes auf Peptone zur Charak-terisierung tryptischer

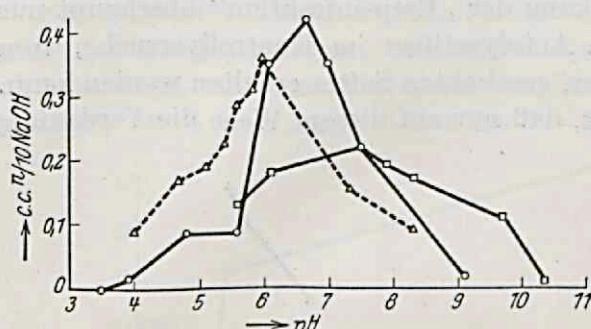


Abb. 9. Die Wirkung des Magensaftes (□) und Mitteldarmdrüsensextraktes (○) auf Wittepepton, sowie des Extraktes auf Pepton F (△) (vgl. Tabelle 8).

Wirkung. Beim Säugetier würde man ein Enzym, welches auch weitgehend gespaltenes Pepton F zu verdauen vermag, als Trypsin bezeichnen. Dabei würde man aber unter allen Umständen kein so niederes Optimum für seine Wirkung finden, sondern, wie wir oben hörten, ein Optimum von ungefähr  $p_H$  8—9.

### $p_H$ -Optimumbestimmungen des Spaltungsbeginnes.

DERNBY (2) untersuchte das Optimum der Autolyse von Hefezellen. Er stellte es fest bei  $p_H$  5,5, während nach seinen eigenen Untersuchungen das „Pepsin“ der Hefe ein solches bei  $p_H$  3—3,5 und das „Trypsin“ bei 7,5—8 hat. Er schloß daraus, daß das Optimum der Autolyse einer kombinierten Wirkung beider Enzyme zuzuschreiben sei. Wir wollen hier nicht die Frage diskutieren, inwiefern zwei derartige Enzyme zusammen arbeiten können, und zwar dergestalt, daß die optimale Menge des Produktes bei einem  $p_H$  entsteht, der zwischen den beiden individuellen Optima beider Enzyme liegt. Es will uns scheinen, als ob man in der allgemeinen Physiologie mit den aus der Wirbeltierphysiologie stammenden Begriffen wenig sorgfältig umgeht. Pepsin und Trypsin des Säugetieres arbeiten niemals zusammen, auch überlagern sich ihre Wirkungsbereiche nicht.

Wenn bei Pflanzen und niederen Tieren zwei Enzyme vorkommen und wenn diese bei ihrer Zusammenarbeit ein mittleres  $p_H$ -Optimum haben, so handelt es sich hierbei schon um Eigenschaften, wie sie bei Enzymen, denen man die Definition entnahm, nicht vorkommen.

Nun wäre es ja immerhin möglich, daß der Prozeß viel komplizierter

ist, daß z. B. in der ersten Phase ausschließlich Pepsin wirkt, sodann Trypsin. Wir messen die Produkte, deren Masse abhängig ist von der individuellen Wirkung beider Enzyme. Am besten wäre dieses bei Bindegewebe zu verstehen, wenn dieses auch beim Flußkrebs ausschließlich durch die „Pepsinfaktion“ angegriffen werden würde. Die Masse des titrierbaren Produktes würde dann in erster Linie abhängen von der Pepsinwirkung. Sie würde der Trypsinwirkung das Material zur Verfügung stellen; aber naturgemäß würde auch von der Geschwindigkeit der Trypsinwirkung die Menge der Endprodukte abhängen. Drittens würde auch die Geschwindigkeit der Trypsinwirkung diejenige der Pepsinwirkung beeinflussen müssen, da ja durch die Aufspaltung der peptischen Produkte die Pepsinwirkung beschleunigt werden müßte (Gleichgewichtsverschiebung). Diese Wechselwirkung ist so kompliziert, daß wir es uns versagen müssen, uns in weitere Spekulationen über ein mögliches Kompromißoptimum zu ergehen. Dagegen wollen wir eine Reihe von Versuchen besprechen, deren Ziel es war, das Anfangsstadium der Verdauung allein zu fassen. Auch dieses ist keine vollkommen eindeutige Methode, wenigstens nicht bei Anwendung von Gelatine oder Fibrin, da diese beiden Stoffe sowohl von Pepsin, als von Trypsin angegriffen werden. Solange wir uns aber einigermaßen an die Definition dieser beiden Proteasen halten, muß das Bindegewebe ein gutes Objekt für unsere Versuche sein; denn bei ihm muß der Spaltungsbeginn eine Funktion lediglich des Pepsins sein. Wenn auch diese Versuche keine Sicherheit geben können, da sie sich ja auf eine Analogie begründen, so schien uns doch ihre Methode die beste Aussicht zu geben, um zu zeigen, daß vermutlich auch das Einzelenzym, welches die Proteolyse einleitet, bei jenem *mittleren p<sub>H</sub>-Optimum* arbeitet.

In erster Linie bediente ich mich der METTSchen Röhren, die mit Gelatine im Gelzustande gefüllt, in das Verdauungsgemisch gelegt werden. Die Abnahme der Gelatinesäule innerhalb einer bestimmten Zeit wird gemessen (siehe Abb. 10).

Das Verdauungsgemisch wird in einer Zentrifugenröhre von ungefähr 6 cm Länge und 1 cm Durchmesser gebracht. Der innere Durchmesser der mit Gelatine gefüllten Kapillare betrug ungefähr 1,1 mm. Die Länge der Gelatinesäule wird vor und nach der Verdauung (bei Zimmertemperatur) gemessen. Die Methode ist nicht sehr fein, so daß eine genaue Eichung der Kapillare nicht vorgenommen wurde.

Übrigens steht das Prinzip der Methode demjenigen nahe, welches der durch BODANSKY (1, bei Zölenteraten) und YONGE (19, bei Mollus-

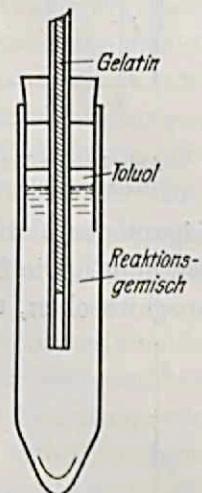


Abb. 10. Der Messungsapparat der Verdünnung der Gelatinesäule.

ken) angewandten Methode zugrunde liegt. Meine Resultate findet der Leser in Tabelle 10. Im Mittel erhielt ich ein Optimum von 5,5 und ein zweites von 8. Auch mit WILLSTÄTTERS Polypeptidtitration, die sich ja im wesentlichen auf frühe Spaltungsprodukte beschränkt, erhielt ich fast gleiche Optima.

Mit Fibrin, mit unserem wichtigsten Substrat, Bindegewebe, nämlich

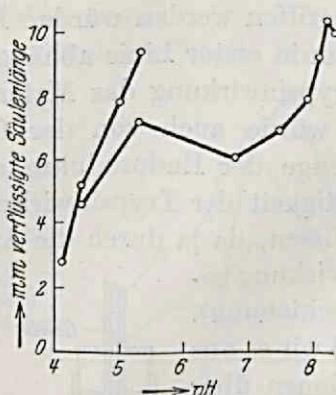


Abb. 11. Die Verflüssigung der Gelatinesäule (vgl. Tab. 10).

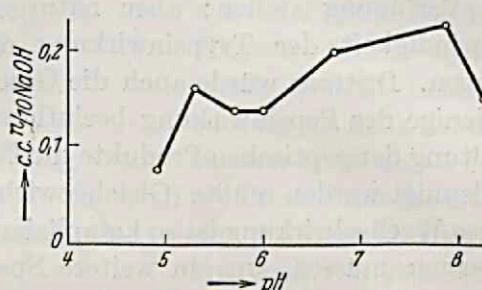


Abb. 12. Der Spaltbeginn bei Gelatine bestimmt mit Polypeptidtitration (vgl. Tab. 9).

Ligamentum nuchae des Rindes, benutzte ich die kolorimetrische Methode. Die Stoffe wurden mit Ammoniakkarmin gefärbt und so gut ausgewaschen, daß sie in schwacher Säure keine Farbe mehr abgeben.

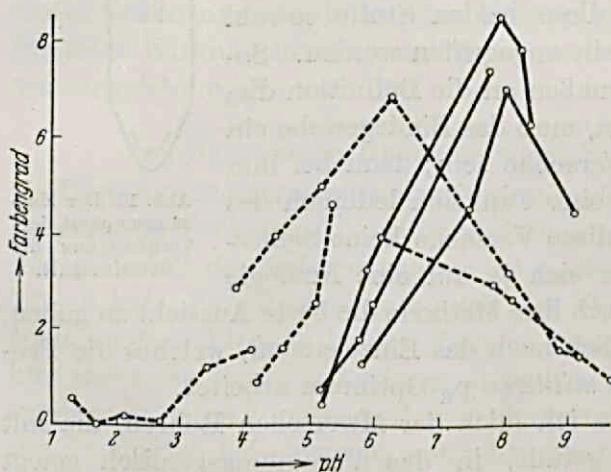


Abb. 13. Die Wirkung des Magensaftes auf gefärbtes Fibrin (—), sowie auf gefärbtes Ligament (---) (vgl. Tab. 11).

daß die Kurve etwas asymmetrisch wurde: nach der sauren Seite fällt die Kurve allmählicher ab, als nach der alkalischen. Aber die Optima bleiben fast unverändert ( $p_{II}$  6). Der Leser findet die Daten in Tabelle 12.

Eine weitere Erklärung der Methode erübrigt sich, da sie durch die Publikation der GRÜTZNERSchen Schule allgemein bekannt ist. Für Versuche bei alkalischer Reaktion kam an Stelle des alkalilöslichen Karmins, Spritblau.

Bei Fibrin erhielt ich nur die höhere Zahl, die ich bei Titration gefunden hatte ( $p_{II}$  8). Mit Bindegewebe fand ich,

### Diskussion meiner Resultate.

Wir wollen unsere Resultate zusammenfassend in zwei Gruppen zerlegen. 1. Ich ging aus von dem Gegensatze, der zwischen der alten und neuen Auffassung über die Enzyme wirbelloser Tiere bestand.

JORDAN hatte in seinem Buche und in seinen älteren Publikationen von „Urtrypsin“ gesprochen. Eine Auffassung, die naturgemäß im Widerspruch steht zu den Resultaten neuester Untersuchungen. Wir wissen heute, daß das Trypsin der Säugetiere nicht alles zu leisten vermag, was für die Verdauung der Eiweißkörper nötig ist, so daß es ausgeschlossen erscheinen muß, daß ein einziges Enzym, welches die gesamte Eiweißverdauung eines Tieres zu leisten hat, mit dem Trypsin der Säugetiere verglichen werden darf.

2. Wenn den Anschauungen von WALDSCHMIDT-LEITZ diejenige allgemeine Gültigkeit zukommt, die der genannte Verfasser zur Begründung seiner Schlußfolgerungen voraussetzen muß, so ist die ältere Meinung JORDANS, daß wir bei den wirbellosen Tieren eine einzige „Urprotease“ finden, nicht mehr haltbar, auch wenn man dieser Protease einen größeren Wirkungsbereich zuerkennt, als dem Trypsin. Denn nach WALDSCHMIDT-LEITZ könnten den verschiedenen Arten von Peptidbindungen im Eiweißmolekül jeweils besondere Enzyme auch bei Wirbellosen entsprechen. Viele neuere Untersucher haben, wie wir das in der Einleitung auseinandergesetzt haben, sich ohne weiteres der Meinung WALDSCHMIDT-LEITZ' angeschlossen: sie meinen, daß den beiden Optima, die sie finden, ein Pepsin und ein Trypsin entspricht.

1. Ich habe in dieser Arbeit zeigen können, daß der eiweißverdauende Saft des Flußkrebses sicherlich imstande ist, das Eeiweißmolekül *in seiner Gesamtheit* abzubrechen. Die letzte Phase der Spaltung, die beim Wirbeltier durch das Erepsin geleistet wird, erwies sich in meinen Versuchen als äußerst schwach: Glyzyl-glyzin, sowie Leucyl-glyzin, wurde bei einem pH-Optimum von 9 sehr schwach gespalten. Als Charakteristikum für die peptische Phase wählten wir die Spaltbarkeit des Bindegewebes, in erster Linie die nach SAHLI präparierte Darmsaite, die gelöst wurde.

2. Wenden wir uns jetzt der zweiten Frage zu, nämlich nach dem Vorkommen verschiedener Einzelenzyme im Saft des Flußkrebses. Es will uns scheinen, als dürfe man diese Frage noch nicht beantworten. Dagegen haben meine Untersuchungen viel neues Material, wenn auch nicht zur Beantwortung, dann doch zur Beurteilung dieser Frage geliefert. Ausgehend von der Definition der Einzelenzyme, wie wir sie in der Wirbeltierphysiologie finden, müssen wir zunächst feststellen, daß die  $p_H$ -Optima durchaus ungenügend sind, um in solchen Enzymgemischen die Anwesenheit von derartigen Einzelenzymen festzustellen. Es fehlt den Enzymen, zumal bei niederen Tieren, eine Konstanz der  $p_H$ -Optima. Verschiedene Substrate haben verschiedene Optima, die sich bislang noch nicht durch Eigenschaften der Substrate (z. B. durch den isoelektrischen Punkt) haben erklären lassen. Man vergesse auch nicht, daß man alle diese Bestimmungen nur mit Hilfe grober Eingriffe

ausführen kann, d. h. unter Hinzufügung von Puffergemischen, um die  $p_H$ -Werte zu erzielen. Es scheint aber (nach RINGER), daß bei manchen Enzymen die Zutat, zumal von Elektrolyten einen direkten Einfluß auf das  $p_H$ -Optimum hat. *Die Hauptsache aber ist, daß die Wirkung des Krebssafes auf einzelne spezifische Substrate, unter ganz anderen Bedingungen vor sich geht, als die entsprechende Wirkung durch die jeweiligen Enzyme des Säugetieres.*

Ich habe gezeigt, daß wenig verdautes Wittepepton (hauptsächlich Albumosen) durch *Astacus*-Saft bei  $p_H$  6,7 optimal verdaut wird. Weitgehend verdautes Pepton (Pepton F) bei  $p_H$  6,2: wäre der Saft eine Mischung von Trypsin und Pepsin im Sinne der Vertebratenphysiologie, so müßte der  $p_H$ -Wert beim Pepton F steigen, da eigentliches Pepton lediglich durch Trypsin angegriffen werden müßte, mit einem alkalischen Optimum.

Auch Bindegewebe, das mutmaßliche Substrat der Pepsinfaktion, wird mit einem  $p_H$ -Optimum von 6,7 verdaut. Daß dieses Optimum sich auf die erste Phase der Spaltung bezieht, ergab sich aus der Anwendung der kolorimetrischen Methode auf Bindegewebe. In allen diesen Fällen erhielten wir gleiche, nämlich für Pepsin viel zu hohe  $p_H$ -Optima. Damit konnten wir die Annahme ausschließen, daß jene  $p_H$ -Mittelwerte, die wir als unterstes Optimum fanden, Mittelwerte zwischen den Optima von Pepsin und Trypsin des Wirbeltieres, d. h. als Kompromißoptimum zwischen beiden Enzymen aufzufassen seien. Ein wesentlicher Punkt, der nicht übersehen werden darf und der gegen das Vorhandensein eines Pepsines im Sinne der Wirbeltierphysiologie spricht, ist das Fehlen jeglicher Labwirkung des Magensaftes von *Astacus fluviatilis*, eine Labwirkung, die für Pepsin charakteristisch sein soll.

Wir haben noch einem Einwande zu begegnen. Es kommt nämlich im Krebsmagensaft ein  $p_H$ -Optimum vor, welches dem des Pepsins näher liegt, als alle anderen. Es ist das niedere Optimum der Autolyse, welches bei 3,5 liegt. Autolyse spielt aus folgendem Grunde eine besondere Rolle. Bei  $p_H$  4 fängt das eigene Eiweiß des Saftes an sich zu trüben, bei  $p_H$  3 ist alles Eiweiß niedergeschlagen und alle Enzyme werden durch den Niederschlag adsorbiert. (Das Filtrat ist wirkungslos, während der in Alkali gelöste Niederschlag die volle Enzymwirkung hat.) Bei jenem  $p_H$ -Optimum von 3,5 messen wir die Wirkung des Enzyms auf das eigene Eiweiß, welches durch Adsorption mit dem Enzym verbunden ist. Man könnte nun daran denken, daß das eiweißfreigemachte Enzym eines Krebses ein niederes „Pepsin-Optimum“ haben würde, als der natürliche Saft. Man erinnere sich auch, daß ich mit der METTSchen Methode sowie mit der Polypeptidtitration bei Gelatine die Spaltungsbeginnoptima bei  $p_H$  6, d. h. bei demselben  $p_H$  wie das Autolyseminum fand. Bei der Fibrinolyse läßt sich titrimetrisch

eines der Optima bei  $p_H$  etwa 6 feststellen; dieses Optimum verschwindet bei der Spritblaufibrinmethode, und es bleibt nur das andere, das bei  $p_H$  8 liegt.

Wahrscheinlich jedoch ist das Verhalten bei der Autolyse spezifisch für diese Erscheinung; denn wäre Autolyse und z. B. Fibrinolyse das gleiche, und Autolyse bei niederm  $p_H$  durch die Adsorption nur bevorzugt, so müßte die Autolyse auch bei  $p_H$  6—7 vor sich gehen, wo die totale Proteolyse und Peptolyse maximal sind. Das ist nicht der Fall. Das Optimum 6,7 der ersten Bindegewebsverflüssigung spricht gegen die Möglichkeit eines Kompromisses zwischen niederm  $p_H$ -Optimum und Beschädigung des Enzyms durch solchen niederen  $p_H$ , denn ein solches Wirkungsoptimum müßte niederer liegen. Praktisch geht die Verdauung beim Flußkrebs optimal bei  $p_H$ -Werten von 5,5 bis 6,5 vor sich, ganz in der Nähe des  $p_H$  des Saftes. Ob innerhalb der Coeca die Bedingungen für die schwache „Erepsinwirkung“ ( $p_H$  9) und zugleich für das zweite Optimum anderer Substrate gegeben sind, wissen wir nicht.

Kurzum, beim Flußkrebs von „Pepsin“ und „Trypsin“ usw. zu reden, ist beim gegenwärtigen Stande unseres Wissens nicht erlaubt. Die  $p_H$ -Optima eignen sich, für sich genommen, nicht zur Charakterisierung von proteolytischen Enzymen, da sie offenbar durch alle möglichen Umstände verändert werden, und nicht ausschließlich als Funktion der Enzymart zu betrachten sind. Künftige Versuche werden das Enzymgemisch in seine Faktoren zerlegen und deren spezifische Eigenschaften feststellen müssen. Die einzelnen Teilenzyme, die den Bindungsarten des Eiweißmoleküles entsprechen, werden erst dann allgemein gültige Definitionen erhalten (falls man, wie wohl zu vermuten ist, das Vorhandensein solcher Teilenzyme überhaupt nachweisen kann). Die „allgemeine Physiologie“ hat auch hier eine ausgebaut vergleichende Physiologie zur Voraussetzung. Vorläufig fußt auch die WILLSTÄTTERSche Schule nur auf einigen Spezialfällen. Wir müssen uns in unserer Darstellung auf Enzymwirkung beschränken und dürfen bei den Wirbellosen noch nicht von „Enzymindividuen“ reden.

### Der Rhythmus der Sekretion der verdauenden Enzyme.

Daß bei den wirbellosen Tieren Sekretionsrhythmen nach Maßgabe der Nahrungsaufnahme entstehen, hat HIRSCH vor längerer Zeit gezeigt (4). Im vorigen Jahr hat er diese Rhythmen auch bei *Astacus* gefunden (5, siehe auch BETHES Handbuch für normale und pathologische Physiologie, 9). Bei diesen letztgenannten Untersuchungen, von denen er im zitierten Handbuch eine kurze Übersicht gibt, fand er die bemerkenswerte Tatsache, daß bei *Astacus* die Verdauung nativen Eiweißes und von Pepton F verschiedene Sekretionsrhythmen habe. Als natives Eiweiß diente Kasein. Wird nun die Enzymkraft in bestimmter Weise zu

verschiedenen Zeiten nach der Nahrungsaufnahme geprüft, so ergibt sich für die Menge der „Kaseinase“ und der „Peptonase“ je eine Kurve mit zwei Höhenpunkten binnen sechs Stunden, aber die Kurven sind nach HIRSCH nicht gleich. Sie folgten vielmehr in ihren Maxima und

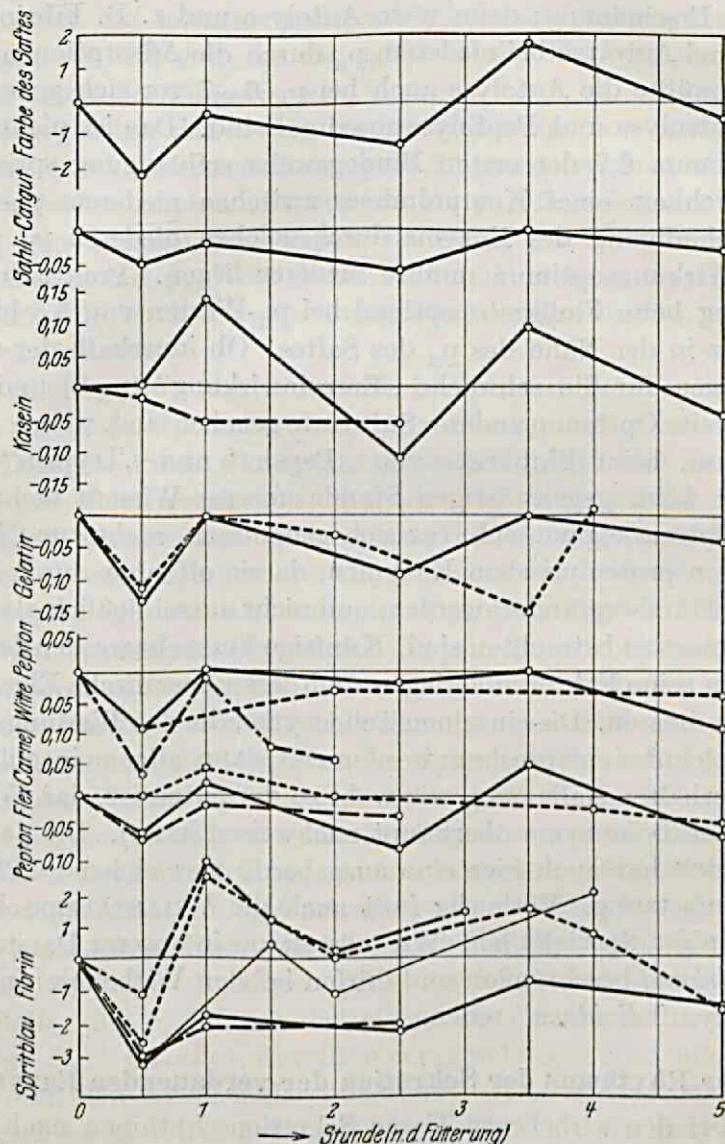


Abb. 14. Sekretionsrhythmus nach der Fütterung, d. h. die Zu- und Abnahme der enzymatischen Kräfte der Magensaft bei verschiedener Zeitdauer nach der Fütterung. Der Hungersaft ist als Standard genommen (vgl. Tab. 12). Die Kurven sind: A ...., B - - -, C - - - - , D - - - - - , und E - - - - - .

Minima aufeinander. Daraus ergibt sich, daß die Kraft der Protease für hoch zusammengesetzte und diejenige für tief abgebaute Eiweißkörper rhythmisch in reziprokem Verhältnis steht. Diese eigenartlichen Befunde werden vermutlich am besten durch die Annahme von zwei verschiedenen Proteasen im Magensaft von *Astacus* erklärt. Diese An-

gabe weckte in mir die Hoffnung, durch „systematische Stufenuntersuchungen“, in verschiedenen Zeitabständen nach der Fütterung meiner Krebse, doch noch imstande zu sein, verschiedene Enzymindividuen voneinander zu unterscheiden. Leider ergab sich, daß die genannten Unterschiede sich nicht feststellen lassen. Kasein wird durch den Magensaft des Flußkrebses nur schwer angegriffen. Hierdurch entstand vermutlich eine Unregelmäßigkeit der „Kaseinasekurve“, wie sie in dem

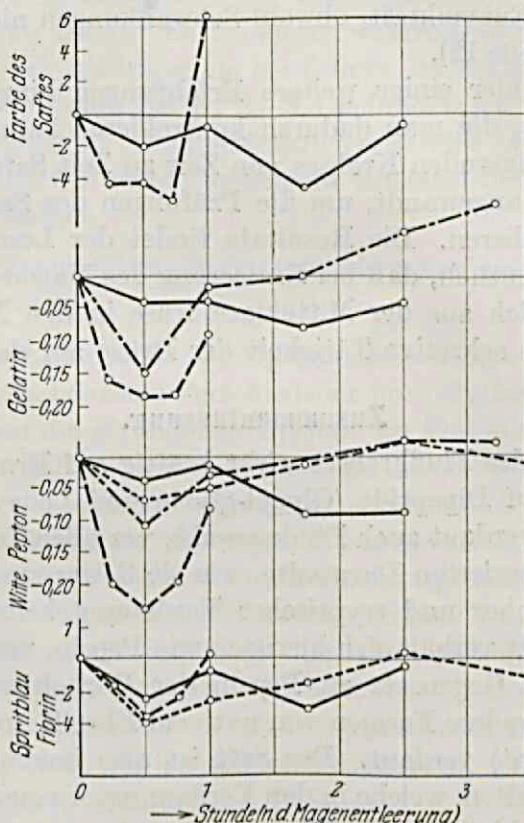


Abb. 15. Sekretion nach der künstlichen Entleerung des Magens, der Hungersaft als Standard genommen (vgl. Tab. 13). Die Kurven sind: A —, B - - -, C - · - , und D - · · - .

mir freundlich zur Verfügung gestellten Manuskript von HIRSCH vor kommt. Ich habe daher die Stufenuntersuchungen mit verschiedenen Substraten und mit Alkoholtitrierung wiederholt. Ich ließ die Tiere mindestens eine Woche lang hungrn, sodann wurden sie mit 0,2 g Fleisch gefüttert und ihr Magensaft wurde nach bestimmten Zeitintervallen entnommen und auf seine Wirkung untersucht. Als Substrat diente hierbei Gelatine, Wittepepton, Pepton F<sup>1</sup>, Kasein und SAHLIS Darmsaite; außerdem benutzte ich noch gefärbtes Fibrin für kolori-

<sup>1</sup> Ich hätte lieber an Stelle von dem immerhin undefinierten Gemisch, wie es im Pepton F vorliegt, Dipeptide verwandt, nämlich Glyzyl-glyzin, oder Leucyl-glyzin, allein diese werden zu schwach angegriffen.

metrische Messungen. Die Resultate sind, wie sich aus den folgenden Tabellen ergibt, immer gleich den Kurven von HIRSCH für Pepton F: *Die „Sekretion von Protease und Peptonase“ war synchron. Es ließen sich auf diese Weise nicht zweierlei Enzyme voneinander unterscheiden.* Die erste Sekretion tritt eine und die zweite Sekretion  $3\frac{1}{2}$  Stunden nach der Fütterung auf. Der frisch abgesonderte Saft ist dunkler gefärbt und die Farbe des Saftes ist bis zu einem gewissen Grade der Indikator für die Enzymkraft, obwohl Schwankungen nicht unbedeutend sind (siehe Tabelle 12).

Ich möchte hier einige weitere Erfahrungen hinzufügen über die Hungersekretion, die man dadurch kontrollieren kann, daß man dem Magen eines hungernden Krebses von Zeit zu Zeit Saft entnimmt. Die Methode wurde angewandt, um die Prüfungen des Saftes nach Fütterung zu kontrollieren. Die Resultate findet der Leser in Tabelle 13. Es zeigte sich deutlich, daß bei Entleerung des Magens der verdauende Saft kontinuierlich aus der Mitteldarmdrüse in den Magen fließt, ein Abfluß, dem die sekretive Tätigkeit der Drüse auf dem Fuße folgt.

### Zusammenfassung.

1. Der Saft des Flußkrebses wirkt kräftig auf Eiweiß und Pepton, sehr schwach auf Dipeptide (Glyzyl-glyzin und Leucyl-glyzin).
2. Der Saft verdaut auch Bindegewebe, vor allen Dingen das Bindegewebe der präparierten Darmsaite, wie sie SAHLI zur Unterscheidung zwischen peptischer und tryptischer Verdauung beim Menschen verwendet. Der Saft verhält sich hiernach wie Pepsin, verdaut das Bindegewebe aber im Gegensatz zu Pepsin der Wirbeltiere bei einem  $p_H$  von 6,8. Auch andere Formen von nativem Eiweiß, sowie Pepton werden (wie bekannt) verdaut. Der Saft ist also imstande, alle Eiweißfraktionen zu spalten, welche in den Verdauungsorganen der Wirbeltiere durch die verschiedenen daselbst anwesenden proteolytischen Teileenzyme gespalten werden können.
3. Es kommt im Saft des Flußkrebses eine Autolyse vor. Sie zeigt zwei  $p_H$ -Optima. Das eine liegt bei 3,5, das andere bei 9. Die niedere Lage des erstgenannten Optimums bedingt es, daß innerhalb des natürlichen Magensaftes Autolyse nur in sehr bescheidenem Ausmaße stattfindet. Das bedingt Schutz des eigenen Eiweißes, da der Saft im Hunger ein  $pH$  von 5, nach Fütterung ein solches von 5,5 hat.
4. Bei  $p_H$  4 beginnt eine Trübung des Saftes. Bei  $p_H$  3 ist alles Eiweiß niedergeschlagen und es hat die Enzyme, adsorptiv gebunden, mit sich zu Boden gerissen. Im Zustande adsorptiver Bindung findet die Autolyse optimal statt.
5. Bei der Verdauung verschiedener eiweißartiger Substrate haben sich verschiedene Optima ergeben; in der Regel (und bei der Anwendung

bestimmter Formen der Titrierung) handelt es sich um 3 Optima. Das eine für Pepto- und gesamte Proteolyse liegt bei  $p_H$  6,2—6,7. Für den Spaltungsbeginn der Eiweißkörper (mit Ausnahme der Bindegewebe) zeigt sich bei dem gleichen  $p_H$ -Wert ein Minimum, während Optima hierfür bei  $p_H$  8—9 (Fibrin, Gelatine) bzw. 5,3 (Gelatine) liegen.

6. Das Optimum bei  $p_H$  5 ist bisher nicht eindeutig festgestellt, da bei niedrigerem  $p_H$  als etwa 4 der Magensaft selbst fast unwirksam geworden ist (siehe oben). Es ist sogar wahrscheinlicher, daß dieses Optimum tatsächlich niedriger als bei 5 liegt, da bei anderen Invertebraten ein Säureoptimum bei  $p_H$  3—3,5 gefunden ist, wenn man verhältnismäßig eiweißarme Organextrakte verwandte (vgl. YONGE [19], BODANSKY [1]). Ich will mein Experiment zunächst für die Feststellung dieses Wertes fortsetzen.

7. Die gefundenen Optima liegen niemals genau beim isolektrischen Punkt des Substrates.

8. Aus den verschiedenen  $p_H$ -Optima lassen sich keine Schlüsse ziehen auf das Vorhandensein verschiedener protoelytischer Teilenzyme. Denn erstens liegen die gefundenen Optima des Flußkrebses (im Gegensatz zu manchen andern Invertebraten) zu nahe beieinander, um zu einem Schlusse zu berechtigen. Zweitens ergaben sich bei der Anwendung spezifischer Substrate, die beim Wirbeltier nur durch eines der Teilenzyme angegriffen werden, beim Flußkrebs Optima, die vollkommen anders sind, als diejenigen der Teilenzyme bei den Vertebraten, welche dieselben Substrate angreifen; z. B. hat Bindegewebe (auch bei Bestimmung des Spaltungsbeginnes) ein mittleres  $p_H$ -Optimum von ungefähr 6,7, Pepton F mit seinem größeren Gehalt an Pepton hat einen etwas niederen  $p_H$  (6,2), als das Albumosengemisch, welches unter dem Namen „Wittepepton“ käuflich ist (6,7).

9. Wenn man nach der Fütterung der Tiere die verschiedenen Sekretionsstufen (im Sinne HIRSCHS) auf ihre Wirkung auf verschiedene Substrate hin untersucht, die beim Wirbeltier durch verschiedene Teilenzyme angegriffen werden, so zeigt sich, daß der abgeschiedene Saft immer die gleichen Enzyme enthält, d. h. die Maxima und Minima aller untersuchten Wirkungen fallen zusammen. Es gelingt also auch nicht auf dem Wege der Stufenuntersuchung verschiedene Enzymindividuen voneinander zu unterscheiden.

10. Wir dürfen von einer alles umfassenden proteolytischen Wirkung reden, aber noch nicht von verschiedenen proteolytischen Individuen. Wenn es einmal gelingen sollte, diese letzteren durch moderne Isolierungsmethode einzeln darzustellen, dann ergibt sich heute schon aus unserem Resultate, daß diese Teilenzyme andere Eigenschaften haben

werden, als diejenigen des Wirbeltierkörpers, und daß man in der allgemeinen Physiologie daher diesen Teilenzymen neue Definitionen wird geben müssen.

Die Untersuchung wurde mit Unterstützung des Rockefellers International Education Board ausgeführt; ich danke dem Board bestens für seine Hilfe; ebenso danke ich Herrn Prof. H. JORDAN, der mir einen Platz in seinem Institut zur Verfügung stellte, mir das Thema für diese Arbeit gab und mich stets mit seinem Rat unterstützt hat. Dem Herrn Dr. H. J. VONK danke ich für seine freundliche Hilfeleistung.

### Bibliographie.

1. Bodansky, M. und Rose, W.: Americ. Journ. Physiol. **62**, 473. 1922. —
2. Dernby: Journ. of Biol. Chem. **35**, 179. 1918. — 3. Euler, H.: *Chemie der Enzyme II.* Teil, 2. Abs. 1927. — 4. Hirsch, G. C.: Biol. Zentralbl. **38**, 41. 1918. —
5. Ders. und Jacobs, W.: Zeitschr. f. Zellforsch. u. mikroskop. Anat. **3**, 198. 1926. —
6. Hoppe-Seyler: Arch. f. d. ges. Physiol. **14**, 395. 1877. — 7. Jordan, H. J.: Ebenda **101**, 263. 1904. — 8. Ders: *Vergleichende Physiologie wirbelloser Tiere. 1. Ernährung.* 1914. — 9. Ders. und Hirsch, G. C.: Handb. norm. pathol. Physiol. **3**, 24 (besonders S. 89). 1927. — 10. Krüger, P. und Graetz, E.: Zeitschr. f. physiol. Chem. **166**, 128. 1927. — 11. Krukenberg: Heidelberger Untersuch. **1**, 331; **2**, 1 u. 261. 1878. — 12. Long, J. H. und Fenger, F.: Journ. of the Americ. Chem. Soc. **39**, 1278. 1917. — 13. Nirenstein: Zeitschr. f. allg. Physiol. **6**. 1905. —
14. Oomen, H. A. P. C.: Public. Staz. Zool. Napoli **7**, 3. 1926. — 15. Ringer und Grutterink, B. W.: Zeitschr. f. physiol. Chem. **156**, 275. 1926. — 16. Rona, P.: *Praktikum der physiologischen Chemie. 1. Fermentmethoden.* 1926. — 17. van der Heyde, H. C.: *On the physiology of digestion, respiration and excretion in Echinoderms.* Diss. Amsterdam. 1922. — 18. Vonk, H. J.: Zeitschr. f. vergl. Physiol. **5**, 445. 1927. — 19. Yonge, C. M.: Journ. of Mar. Biol. Assoc. **14**, 295. 1926.

### Protokolle.

Tabelle 1. Die Wasserstoffionenkonzentration des Magensaftes von *A. macrodactylus*.

Dauer nach Fütterung	p <sub>H</sub> gemessen mit	
	Quinhydronelektrod	Wasserstoffelektrod
Vor der Fütterung	5,12	5,05
Nach 1 Stunde . .	5,56	—
„ 1½ Stunde .	5,50	—
„ 2 Stunden .	5,59	—

Tabelle 2. Die Autolyse des Magensaftes.

A: 10 ccm Pufferlösung und 2 ccm verdünnter Magensaft ( $1 \times 20$ ),  $37^\circ\text{C}$ , 19 Stunden; 3 ccm Reaktionsgemisch ist in 30 ccm absoluten Alkohol gebracht, mit n/10 NaOH titriert, Thymolphthalein als Indikator. Der  $\text{p}_\text{H}$  der Gemische wurde nicht gemessen, da in so verdünnten Lösungen die Unterschiede zwischen dem  $\text{p}_\text{H}$  der Lösungen und dem des Pufferungsgemisches unbedeutend sind.

Pufferlösung	$\text{p}_\text{H}$ des Puffers	1. Titration in ccm	2. Titration in ccm	Differenz in ccm
Glykokoll + NaOH . .	9,52	2,38	2,38	0,00
"      "	9,02	2,60	2,60	
"      "	8,02	2,33	2,33	
K-Biphthalat + NaOH.	5,93	2,09	2,09	0,00
"      "	4,98	2,67	2,67	
K-Biphthalat + HCl . .	3,58	1,55	1,55	

B: Die Autolyse bei konzentrierteren Lösungen von Magensaft. a) 10 ccm Puffer, 3 ccm Wasser, und 2 ccm Magensaft (zentrifugiert), 9 Stunden,  $37^\circ\text{C}$ . 5 ccm wurden in 50 ccm absolutem Alkohol mit 10/n NaOH titriert, Thymolphthalein als Indikator.  $\text{p}_\text{H}$  3,6—9,9 in 3 Reihen.

Pufferlösung	$\text{p}_\text{H}$ bei Beginn	1. Titration in ccm	2. Titration in ccm	Differenz in ccm
K-Biphthalat + HCl . .	3,6 <sup>1</sup>	3,24	4,31	1,07
"      "	4,2 <sup>1</sup>	2,66	3,66	1,00
"      "	4,6	2,20	2,91	0,71
K-Biphthalat + NaOH . .	4,9	1,82	2,24	0,42
"      "	5,2	1,28	1,64	0,36
"      "	5,4	1,20	1,55	0,35
Glykokoll + NaOH . .	5,8	3,44	3,55	0,11
"      "	6,0	3,66	3,80	0,14
"      "	6,3	3,80	4,00	0,20
"      "	8,8	2,44	3,04	0,60
"      "	6,9	3,66	3,97	0,31
"      "	9,1	2,21	3,14	0,93
"      "	9,3	1,14	2,07	0,93
"      "	9,9	0,64	1,45	0,81

b) 6 ccm Puffer, 2 ccm Wasser und 1 ccm Magensaft, 19 Stunden,  $37^\circ\text{C}$ . 3 ccm wurden in 30 ccm absolutem Alkohol mit n/10 NaOH titriert, Thymolphthalein als Indikator.

K-Biphthalat + HCl . .	2,4 <sup>1</sup>	1,52	1,60	0,08
"      "	3,3	1,60	1,88	0,28

<sup>1</sup> In saurem Milieu findet Präzipitation der Eiweißkörper des Magensaftes statt, aber dies stört die Autolyseversuche nicht (vgl. Kapitel über Autolyse).

**Tabelle 3. Die Verdauung der nativen Eiweißkörper mit Astacus-Magensaft.**

A: Kasein: a) 13 ccm Puffer, 0,1 g Kasein und 1,3 ccm Magensaft ( $1 \times 10$ ); 1 Stunde; 37° C. 5 ccm waren wie oben in Alkohol titriert.

b) 16 ccm Puffer, 0,1 g Kasein und 1,2 ccm Magensaft ( $1 \times 10$ ); 1 Stunde, 37° C. Titration wie oben.

Pufferlösung	p <sub>H</sub> bei Beginn	1. Titration in ccm	2. Titration in ccm	Zunahme in ccm
a) K-Biphtalat + HCl .	4,6	1,90	2,04	0,14
	5,1	1,24	1,54	0,30
	5,6	0,94	1,36	0,42
Glykokoll + NaOH .	6,5	4,60	4,98	0,38
	6,8	4,56	4,90	0,34
	9,3	1,80	2,08	0,28
b) K-Biphtalat + HCl .	3,2	1,72	1,74	0,02
	4,2	1,42	1,48	0,06
	4,6	1,10	1,18	0,08
Glykokoll .	5,0	1,80	1,00	0,20
	7,0	2,76	2,90	0,14
	7,3	2,60	2,70	0,10
" "	7,8	2,72	2,86	0,14

B: Gelatine: a) 6 ccm Puffer, 1 ccm 6%ige Gelatine und 1 ccm Magensaft ( $1 \times 30$ ); 45 Minuten, 37° C.

b) 1 ccm Wasserextrakt der Mitteldarmdrüse statt des Magensaftes;  $1\frac{1}{2}$  Stunden, 37° C. Die beiden Tritationen mit 3 ccm Gemisch in absolutem Alkohol.

Pufferlösung	p <sub>H</sub> bei Beginn	1. Titration in ccm	2. Titration in ccm	Zunahme in ccm
a) K-Biphtalat + NaOH	5,4	0,71	0,98	0,27
	5,8	0,49	0,78	0,29
	6,0	0,42	0,71	0,29
Glykokoll + NaOH .	6,6	2,44	2,82	0,38
	7,1	2,53	2,86	0,33
b) K-Biphtalat + NaOH	4,9	1,22	1,40	0,18
	5,3	1,47	1,69	0,20
	5,7	1,22	1,47	0,25
Glykokoll + NaOH .	5,6	1,28	1,53	0,25
	6,7	2,22	2,55	0,33
	7,3	2,33	2,58	0,25
"	7,9	2,46	2,71	0,25
	8,3	1,33	1,51	0,18

- C. Fibrin: a) 10 ccm Puffer, 0,1 g Fibrin und 1 ccm Magensaft ( $1 \times 10$ ); 3 Stunden,  $37^\circ$  C.  
 b) 16 ccm Puffer, 0,05 g Fibrin und 1,3 ccm Magensaft ( $1 \times 10$ );  $37^\circ$  C, 3 Stunden.  
 Titration in Alkohol mit 3 (a) bzw. 5 (b) ccm Reaktionsgemisch.

Pufferlösung	p <sub>H</sub> bei Beginn	1. Titration in cem	2. Titration in cem	Zunahme in cem
K-Biphtalat + HCl . . .	3,1	1,48	1,46	0,02
" " "	3,7	1,26	1,26	0,00
" " + NaOH . . .	5,1	0,70	0,72	0,02
Glykokoll + NaOH . . .	7,1	2,68	2,70	0,02
" " "	7,9	2,74	2,88	0,14
" " "	8,1	2,54	2,80	0,26
" " "	8,3	2,52	2,86	0,16
K-Biphtalat + NaOH . . .	5,2	0,58	0,69	0,11
" " "	5,5	0,36	0,56	0,20
Glykokoll + NaOH . . .	7,2	2,33	2,46	0,13
" " "	7,9	2,78	2,97	0,16
" " "	8,1	2,71	2,97	0,26
" " "	9,7	0,49	0,62	0,13

Tabelle 4. Die Wirkung von Pepsin auf Kollagen.

A. 10 ccm Puffer, 3 ccm 6%iges Pepsin und 0,05 g SAHLISCHES Catgut;  $38^\circ$  C, 18 Stunden. 5 ccm wurden in 50 ccm absolutem Alkohol mit n/10 NaOH titriert, Thymolphthalein als Indikator.

Pufferlösung	p <sub>H</sub> bei Ende	1. Titration in cem	2. Titration in cem	Zunahme in cem
Glykokoll + HCl . . .	1,4	4,22	4,40	0,18
" " "	2,0	4,13	4,33	0,20
" " "	2,6	4,00	4,28	0,28
K-Biphtalat + HCl . . .	3,2	2,60	2,69	0,09
" " + NaOH . . .	4,6	1,72	1,70	0,02

B: 10 ccm Puffer, 5 ccm 10%iges Pepsin und 0,05 g SAHLISCHES Catgut;  $39^\circ$  C, 18 Stunden. Titration wie oben.

Pufferlösung	p <sub>H</sub> bei Ende	1. Titration in cem	2. Titration in cem	Zunahme in cem
Glykokoll + HCl . . .	1,5	3,77	3,91	0,14
" " "	1,8	3,77	3,91	0,14
" " "	2,1	3,66	3,89	0,23
" " "	2,6	3,64	3,86	0,22
K-Biphtalat + HCl . . .	3,4	2,38	2,40	0,02

C: Puffer und Pepsin wie oben, 0,05 g getrocknetes Ligamentum nuchae vom Rind; 37° C, 18 Stunden. Titration wie oben.

Pufferlösung	p <sub>H</sub> bei Ende	1. Titration in cem	2. Titration in cem	Zunahme in cem
Glykokoll + HCl . . .	1,5	3,77	3,95	0,18
" " "	1,8	3,77	3,95	0,18
" " "	2,2	3,75	3,83	0,18
" " "	2,7	3,70	3,86	0,16
K-Biphthalat + HCl . .	3,2	2,33	2,44	0,11
" " "	4,2	1,91	1,93	0,02
K-Biphthalat + NaOH .	5,1	1,35	1,35	0,00

Tabelle 5. Die Wirkung von Trypsin auf Kollagen.

10 cem Puffer (Glykokoll + NaOH, p<sub>H</sub> 8,17), 2 cem 3%iges Pankreatin (Rhenania) und 0,05 g Kollagen; 38° C, 17 Stunden. 5 cem wurden in Alkohol mit n/10 NaOH titriert, Thymolphthalein als Indikator.

Kollagen	1. Titration in cem	2. Titration in cem	Zunahme in cem
SAHLISCHES Catgut . .	5,02	5,56	0,54
Gewöhnliches Catgut .	5,02	5,91	0,89
Ligamentum nuchae .	5,02	5,82	0,80
Wursthaut . . . . .	5,00	5,84	0,84

Tabelle 6. Die Wirkung des Magensaftes auf Kollagen.

A: a) 7 cem Pufferlösung wurden mit 2 cem Magensaft gemischt, hiervon wurden 3 cem zusammen mit 0,05 cem Catgut von SAHLI bei 37° C 4 Stunden lang gehalten. 2 cem Gemisch wurden in 20 cem absolutem Alkohol titriert, Thymolphthalein als Indikator. Die Autolyse wurde kontrolliert.

Pufferlösung	p <sub>H</sub> bei Beginn	1. Titration in cem	2. Titration in cem	Kontrolle in cem	Zunahme in cem
K-Biphthalat + NaOH .	4,7	4,94	{ K 1,24 E 1,38 }	0,30	0,14
" " "	5,1	4,96	{ K 1,10 E 1,29 }	0,14	0,19
" " "	5,7	4,48	{ K 0,48 E 0,83 }	0,00	0,35
Borat + NaOH . . . .	5,7	0,79	{ K 0,75 E 1,10 }	0,04	0,35
" " "	6,9	0,53	{ K 0,57 E 1,10 }	0,04	0,53
" " "	7,8	0,47	{ K 0,55 E 0,94 }	0,07	0,39
" " "	8,4	0,33	{ K 0,39 E 0,64 }	0,06	0,25
" " "	9,2	0,18	{ K 0,17 E 0,29 }	- 0,01	0,12

b) 10 ccm Puffer, 1 ccm Saft ( $1 \times 10$ ) und 0,05 g Catgut von SAHLI;  $37^\circ\text{C}$ , 6 Stunden. Vor dem Experiment wurden 3 ccm für die  $\text{p}_\text{H}$ -Bestimmung genommen. 3 ccm sind wie gewöhnlich in Alkohol titriert.

Pufferlösung	$\text{p}_\text{H}$ des Beginns	1. Titration in ccm	2. Titration in ccm	Zunahme in ccm
K-Biphtalat + NaOH .	4,8	0,88 <sup>1</sup>	0,90	0,02
" "	5,2	0,54	0,58	0,04
Borat + NaOH . . .	7,1	0,70	0,76	0,06
" "	8,3	0,36	0,40	0,04
" "	9,1	0,52	0,54	0,02

B: 10 ccm Puffer, 1 ccm Magensaft ( $1 \times 10$ ) und 0,1 g gewöhnliche Darmsaite, hiervon wurden 3 ccm vor dem Experiment für die  $\text{p}_\text{H}$ -Bestimmung genommen.  $37^\circ\text{C}$ , 4 Stunden. 3 ccm wurden in 30 ccm absolutem Alkohol mit n/10 NaOH titriert, Thymolphthalein als Indikator.

Pufferlösung	$\text{p}_\text{H}$ des Beginns	1. Titration in ccm	2. Titration in ccm	Zunahme in ccm
Glykokoll + HCl . . .	3,4	2,82	2,82	0,20
" "	3,6	2,60	3,00	0,40
" "	3,8	2,60	3,42	0,82
Glykokoll + NaOH . .	7,8	2,62	3,66	1,04
" "	8,0	2,58	3,50	0,92
" "	9,0	2,84	2,84	0,00

C: 10 ccm Puffer, 1 ccm Magensaft ( $1 \times 10$ ) und 0,1 g getrocknetes Ligamentum nuehae vom Rind, hiervon wurden 3 ccm vor dem Experiment für die  $\text{p}_\text{H}$ -Bestimmung genommen.  $37^\circ\text{C}$ , 6 Stunden. Titration wie oben.

Pufferlösung	$\text{p}_\text{H}$ des Beginns	1. Titration in ccm	2. Titration in ccm	Zunahme in ccm
Glykokoll + HCl . . .	3,9	1,40	1,52	0,12
" "	4,6	1,02	1,26	0,24
Glykokoll + NaOH . .	5,2	0,30	0,72	0,42
" "	7,9	2,68	2,90	0,22
" "	8,3	2,52	2,80	0,26
" "	10,2	0,34	0,52	0,18

<sup>1</sup> 3 ccm Gemisch wurden in 35 ccm Alkohol titriert, der jedoch 0,5 ccm n/10 HCl enthält.

Tabelle 7. Die Wirkung des Magensaftes auf Dipeptide.

A: 6 ccm Puffer, 1 ccm Magensaft und 3 ccm 1,25%iges Leucylglyzin; 37° C, 19 Stunden. 3 ccm wurden in 30 ccm absolutem Alkohol mit n/10 NaOH titriert. Die Autolyse wurde kontrolliert (statt Dipeptidlösung das gleiche Volumen destilliertes Wasser).

Pufferlösung	p <sub>H</sub> bei Beginn	1. Titration in ccm	2. Titration in ccm	Zunahme in ccm
Experiment				
K-Biphtalat + HCl . . .	2,9	2,00	2,16	0,16
Glykokoll + NaOH . . .	9,0	1,20	1,65	0,45
"      "	9,2	0,83	1,34	0,51
"      "	9,6	0,41	0,94	0,52
Kontrolle für Autolyse				
K-Biphtalat + HCl . . .	2,4	1,52	1,60	0,08
"      "	3,3	1,60	1,88	0,28
Glykokoll + NaOH . . .	9,0	1,40	1,74	0,34
"      "	9,5	0,72	1,07	0,35
"      "	9,8	0,35	0,68	0,33

B: a) Bedingungen wie oben; statt Leucylglyzin wurde 2%iges Glycylglyzin angewandt. Auch die Kontrolle mit gekochtem Magensaft wurde gemacht, um zu sehen, ob die Hydrolyse des Substrates schon durch Pufferlösung mit höherem p<sub>H</sub> ausgelöst wird.

Pufferlösung	p <sub>H</sub> bei Beginn	1. Titration in ccm	2. Titration in ccm	Zunahme in ccm
Experiment				
Glykokoll + NaOH . . .	6,4	2,39	2,62	0,25
"      "	8,6	1,84	2,80	0,96
Kontrolle mit gekochtem Enzyme				
Glykokoll + NaOH . . .	9,4	1,97	1,99	0,02
Kontrolle für Autolyse				
Glykokoll + NaOH . . .	6,8	2,38	2,56	0,18
"      "	8,1	2,40	2,60	0,20
"      "	9,7	0,72	1,22	0,50

b) 10 ccm Puffer, 2 ccm Magensaft und 3 ccm 2%ige Glyzylglyzin 37° C, 19 Stunden. 5 ccm wurden wie gewöhnlich in Alkohol titriert. Die Kontrolle mit gekochtem Magensaft und Dipeptidlösung wurde am sauren Ende gemacht. Die ganze pH-Reihe wurde in 3 Serien untersucht.

Pufferlösung	pH bei Beginn	1. Titration in ccm	2. Titration in ccm	Zunahme in ccm
Experiment				
K-Biphtalat + HCl . . .	3,8	4,69	5,95	1,26
"      "	4,3	4,23	5,24	1,01
"      "	4,6	3,77	4,35	0,58
"      "	4,9	3,35	3,64	0,29
"      "	5,2	2,84	3,06	0,22
"      "	5,3	2,69	2,95	0,26
Glykokoll + HCl . . .	5,8	4,93	5,15	0,22
Glykokoll + NaOH . . .	6,1	5,22	5,42	0,20
"      "	6,2	5,33	5,57	0,24
"      "	8,1	3,55	4,13	0,58
"      "	8,0	3,90	4,96	1,06
"      "	8,7	2,46	3,78	1,32
"      "	8,9	2,17	2,59	1,42
Kontrolle mit gekochtem Magensaft				
K-Biphtalat + HCl . . .	3,7	4,46	4,44	0,02
Kontrolle für Autolyse				
K-Biphtalat + HCl . . .	3,6	3,24	4,31	1,07
"      "	4,2	2,66	2,66	1,00
"      "	4,6	2,20	2,91	0,71
"      "	4,9	1,82	2,24	0,42
"      "	5,2	1,28	1,64	0,36
"      "	5,4	1,20	1,55	0,35
Glykokoll + HCl . . .	5,8	3,44	3,55	0,11
Glykokoll + NaOH . . .	6,0	3,66	3,80	0,14
"      "	6,3	3,80	4,00	0,20
"      "	8,8	2,44	3,04	0,60
"      "	6,9	3,66	3,97	0,31
"      "	9,1	2,21	3,14	0,93
"      "	9,3	1,14	2,07	0,93
"      "	9,9	0,64	1,45	0,81

Tabelle 8. Die Wirkung des Magensaftes auf Peptone.

A: a) 6 ccm Puffer, 1 ccm Magensaft ( $1 \times 30$  centrifugiert) und 1 ccm 6%iger Wittepepton;  $37^\circ\text{C}$ , 45 Minuten. 3 ccm wurden wie gewöhnlich in Alkohol titriert. Die Kontrolle mit gekochtem Magensaft wurde gemacht. Wenn die gleiche Pufferlösung gebraucht wird, so unterscheiden sich die  $\text{p}_\text{H}$  des Reaktionsgemisches und der Kontrolle nur wenig (siehe 1. und 8. Kolumne), so daß nicht alle  $\text{p}_\text{H}$  gemessen wurden.

Pufferlösung	$\text{p}_\text{H}$ bei Beginn	1. Titration in ccm	2. Titration in ccm	Zunahme in ccm
Experiment				
K-Biphthalat + NaOH . .	5,6	0,60	0,70	0,13
" " "	6,1	0,44	0,62	0,18
Glykokoll + NaOH . .	—	2,35	2,55	0,20
" "	—	2,49	2,71	0,22
" "	8,3	1,33	1,51	0,18
" "	9,7	1,29	0,40	0,11
" "	10,3	2,02	2,09	0,07
" "	12,4	0,96	0,44	0,08
Kontrolle mit gekochtem Magensaft				
K-Biphthalat + NaOH . .	5,6	0,60	0,60	0,00
" " "	—	0,44	0,44	0,00
Glykokoll + NaOH . .	7,5	2,46	2,44	0,02
" "	7,9	2,55	2,58	0,03
" "	—	1,42	1,44	0,02
" "	—	2,00	2,06	0,06
" "	12,5	0,33	0,40	0,07

b) 10 ccm Puffer, 2 ccm Wasserextrakt der getrockneten Mitteldarmdrüse und 2 ccm 5%iger Wittepepton;  $37^\circ\text{C}$ , 19 Stunden. 5 ccm wurden wie gewöhnlich in Alkohol titriert.

Pufferlösung	$\text{p}_\text{H}$ bei Beginn	1. Titration in ccm	2. Titration in ccm	Zunahme in ccm
K-Biphthalat + HCl . .	3,5	2,89	2,89	0,00
" " "	3,9	2,78	2,80	0,02
" " "	4,8	2,22	2,31	0,09
K-Biphthalat + NaOH . .	5,6	1,69	1,78	0,09
" " "	6,1	0,69	1,04	0,35
Borat + NaOH . . . .	6,7	1,49	1,91	0,42
" " "	7,0	1,29	1,64	0,35
" " "	7,5	1,00	1,22	0,22
" " "	9,1	4,35 <sup>1</sup>	4,37	0,02

<sup>1</sup> Vor der Titration wurden 5 ccm n/10 HCl hinzugefügt und die Titration wurde mit 100 ccm Alkohol ausgeführt.

B: 10 ccm Puffer, 2 ccm Wasserextrakt der getrockneten Mitteldarmdrüse und 3 ccm 5%iger Pepton F (ex carne, WITTE [Rostock]). Titration wie oben.

Pufferlösung	p <sub>H</sub> bei Beginn	1. Titration in ccm	2. Titration in ccm	Zunahme in ccm
K-Biphtalat + HCl . .	4,0	2,43	2,52	0,09
K-Biphtalat + NaOH . .	4,7	2,30	2,47	0,17
"      "	5,1	2,26	2,45	0,19
Borat . . . . .	5,4	1,61	1,84	0,23
"	5,6	1,55	1,84	0,29
K-Biphtalat + NaOH . .	5,8	1,16	1,47	0,31
"      "	6,0	1,10	1,56	0,46
Borat . . . . .	7,3	1,47	1,62	0,15
"	8,3	1,01	1,10	0,09

Tabelle 9. Die p<sub>H</sub>-Optima des Magensaftes für Eiweißspaltungsbeginn (bis zu den Polypeptiden).

6 ccm Puffer, 1 ccm Magensaft ( $1 \times 30$ ) und 1 ccm 6%ige Gelatine;  $37^{\circ}\text{C}$ , 45 Min., 3 ccm wurden wie gewöhnlich a) in absolutem bzw. b) in 55%iger Alkohol titriert.

a

Pufferlösung	p <sub>H</sub> bei Beginn	1. Titration in ccm	2. Titration in ccm	Zunahme in ccm
Biphtalat + NaOH . .	4,9	1,22	1,40	0,18
"      "	5,3	0,47	0,69	0,22
"      "	5,7	0,22	0,47	0,25
"      "	6,0	0,28	0,53	0,25
Glykokoll-NaOH . . .	6,9	2,22	2,55	0,33
"      "	7,3	2,33	2,58	0,25
"      "	7,9	2,46	2,71	0,25
"      "	8,3	1,33	1,51	0,18

b

Pufferlösung	p <sub>H</sub> bei Beginn	1. Titration in ccm	2. Titration in ccm	Zunahme in ccm	Aziditäts- zunahme durch Polypeptide
Biphtalat + NaOH . .	4,9	1,24	1,35	0,11	0,08
"      "	5,3	0,44	0,60	0,18	0,16
"      "	5,7	0,22	0,40	0,18	0,14
"      "	6,0	0,31	0,49	0,18	0,14
Glykokoll + NaOH . .	6,7	1,89	2,13	0,24	0,20
"      "	7,9	2,02	2,26	0,24	0,24
"      "	8,3	0,91	1,07	0,16	0,15

24\*

**Tabelle 10. Die Verflüssigung von Gelatine.**

a) 8 ccm Puffer und 6 ccm Magensaft; wovon 5 ccm für das Experiment und der Rest für  $p_{\text{H}}$ -Messung. 5%ige Gelatine, Zimmertemperatur ( $< 17^{\circ} \text{C}$ ), 24 Stunden.

Pufferlösung	$p_{\text{H}}$ bei Beginn	Höhe der verdauten Gelatinsäule in mm
K-Biphtalat + NaOH .	4,4	4,6
" " .	5,3	7,2
Glykokoll + NaOH .	6,8	6,1
" " .	7,5	7,0
" " .	7,9	8,0
" " .	8,1	9,3
" " .	8,2	10,4
" " .	8,3	10,0

b) 5 ccm Puffer und 1 ccm Magensaft ( $1 \times 15$ ). 5%ige Gelatine, Zimmertemperatur ( $< 17^{\circ} \text{C}$ ), 40 Stunden.

Pufferlösung	$p_{\text{H}}$ bei Ende	Höhe der verdauten Gelatinsäule in mm
K-Biphtalat + HCl .	4,1	2,8
K-Biphtalat + NaOH .	4,4	5,2
" " .	5,0	7,8
" " .	5,3	9,2

**Tabelle 11. Die Wirkung des Magensaftes auf aufgefärbte feste Eiweißkörper<sup>1</sup>.**

A: Mit Karmin gefärbtes Fibrin. 5 ccm Puffer, 0,5 ccm Magensaft ( $1 \times 7,5$ ) und 0,05 g Fibrin. Zimmertemperatur, 21 Stunden. Kolorimeterstandard willkürlich.

Pufferlösung	$p_{\text{H}}$ bei Ende	Kolorimeterzahl			Differenz
		Experiment	Kontrolle		
K-Biphtalat + HCl . .	3,7	0,1	0,1		0,0
" " + NaOH . .	4,8	6,2	0,2		0,0
" " "	5,2	0,9	0,2		0,7
" " "	5,8	2,0	0,2		1,8
Glykokoll + NaOH . .	6,0	2,6	0,2		2,4
" " "	7,8	8,1	0,1		7,5

<sup>1</sup> Ich danke hier bestens Herrn Prof. Dr. W. E. RINGER, der mir das gefärbte Fibrin zur Verfügung stellte.

- B: Mit Spritblau gefärbtes Fibrin. a) 5 ccm Puffer, 1 ccm Magensaft ( $1 \times 10$ ) und 0,05 g Fibrin. 37° C. 2 Stunden.  
 b) 5 ccm Puffer, 2 ccm Magensaft ( $1 \times 2$ ) und 0,05 g Fibrin. 37° C, 2 Stunden.

Pufferlösung	pH bei Ende	Kolorimeterzahl
<i>a</i>		
K-Biphthalat + NaOH .	5,8	1,3
Glykokoll + "	7,5	4,5
" "	8,1	7,3
" "	9,1	4,4
<i>b</i>		
K-Biphthalat + "	4,7	0,0
" "	5,2	0,3
Glykokoll + "	5,8	3,2
" "	8,0	8,4
" "	8,2	8,6
" "	8,3	7,7
" "	8,4	6,2

In beiden Fällen wurden Substrat und Puffer gemischt, bei 37° C 30 Minuten lang im Thermostaten gehalten, erst dann wurde die Fermentlösung zugegossen. Farbenstandard willkürlich.

C: Mit Karmin gefärbtes Ligamentum nuchae (vom Rind)<sup>1</sup>.

- a) 6 ccm Puffer, 1 ccm Magensaft ( $1 \times 10$ ) und 0,08 g Ligament. Zimmertemperatur, 19 Stunden. Kolorimeterstandard willkürlich.  
 b) 5 ccm Puffer, 1 ccm Magensaft ( $1 \times 10$ ) und 0,07 g Ligament. Zimmertemperatur, 19 Stunden. Kolorimeterstandard willkürlich.

Pufferlösung	pH bei Ende	Kolorimeterzahl		Differenz
		Experiment	Kontrolle	
<i>a</i>				
Glykokoll + HCl . . .	1,3	4,9	4,3	0,6
" "	1,7	2,8	2,8	0,0
" "	2,1	2,8	2,6	0,2
" "	2,7	2,7	2,6	0,1
K-Biphthalat + HCl . .	3,4	3,8	2,6	1,2
" "	4,1	4,2	2,6	1,6
<i>b</i>				
" "	4,2	0,9	—	0,9
" + NaOH .	4,6	1,6	—	1,6
" "	5,1	2,5	—	2,5
" "	5,3	4,6	—	4,6

<sup>1</sup> Das Ligament (in Alkohol aufbewahrt) wurde möglichst klein geschnitten und mindestens 3 Tage in einer gesättigten ammoniakalischen Lösung von Karmin gelassen.

D: Mit Spritblau gefärbtes Ligamentum nuchae (vom Rinde)<sup>1</sup>. 5 ccm Puffer, 1 ccm Magensaft ( $1 \times 10$ ) und 0,06 g Ligament. 37° C, 5 Stunden. Kolorimeterstandard willkürlich. Das Experiment ist einmal wiederholt worden.

Pufferlösung	$p_H$ bei Ende	Kolorimeterzahl in cem
Biphthalat + NaOH . . .	6,1	3,9
Glykokoll + „	7,9	2,8
“ “	8,2	2,6
“ “	9,7	0,9
Biphthalat + HCl . . .	3,8	2,8
“ + NaOH . . .	4,5	3,9
“ “	5,2	5,3
Borate. . . . .	6,3	6,8
“	8,1	3,1
“	8,9	1,5
“	9,3	1,4

Tabelle 12. Sekretionsrhythmus des Magensaftes nach der Fütterung.

A: 5 ccm Biphthalat Puffer ( $p_H$  6,59) und 0,08 g Spritblaufibrin, 37° C; nach 30 Minuten wurden 2 ccm Magensaft ( $1 \times 20$ ) zugefügt, 45 Minuten Verdauung. Farbenstandard willkürlich.

Dauer nach der Fütterung in Stunden . .	0,0	$\frac{1}{2}$	$1\frac{1}{2}$	2,0	4,6
Fibrin)					
Kolorimeterzahl . . . . .	5,0	1,7	5,5	3,9	7,1

B: Die Magensafte waren mit 20fachen Volumen Wasser verdünnt.

a) 5 ccm Biphthalat-Puffer ( $p_H$  6,5) und 0,05 g Spritblaufibrin, 37° C; nach 30 Minuten wurden 2 ccm Magensaft zugefügt, 45 Minuten Verdauung. Kolorimeterstandard willkürlich.

b) 10 ccm Biphthalat-Puffer ( $p_H$  6,5), 2 ccm Magensaft und 2 ccm 5%iges WITTE-pepton. 5 ccm wurden wie gewöhnlich in Alkohol titriert. 38° C, 17 Stunden.

Dauer nach der Fütterung in Std. .	0,0	$\frac{1}{2}$	1	$1\frac{1}{2}$	2,0	3,0
a (Fibrin)						
Kolorimeterzahl . . . . .	5,0	3,8	8,0	6,2	5,1	6,4
b (Wittepepton)						
1. Titration . . . . .	0,42	0,44	0,49	0,42	0,47	—
2. Titration . . . . .	1,67	1,53	1,03	1,55	1,58	—
Zunahme . . . . .	1,35	1,09	1,24	1,13	1,11	—

<sup>1</sup> Das Ligament war 2 Tage lang mit alkoholischer Lösung von Spritblau (0,05%) gefärbt.

C: Die Magensafte wurden mit 30fach Volumen Wasser verdünnt. Alle Experimente bei 37° C.

- 5 ccm Puffer (6,5), 2 ccm Saft und 0,05 g Spritblaufibrin; 35 Minuten vorläufige Quellung, 45 Minuten Verdauung.
- 10 ccm Puffer (6,5), 2 ccm Saft und 2 ccm 5%ige Gelatine 3,5 Stunden. 5 ccm wurden in Alkohol titriert.
- 10 ccm Puffer (6,5), 2 ccm Saft und 2 ccm 3%iges Pepton F; 4,5 Stunden. 5 ccm wurden in Alkohol titriert.
- 10 ccm Puffer (6,5), 2 ccm Saft und 2 ccm 5%iges Wittepepton; 3 Stunden 50 Minuten. 5 ccm wurden in Alkohol titriert.

Dauer nach der Fütterung in Stunden . . . . .	0,0	$\frac{1}{2}$	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0
a (Fibrin)							
Kolorimeterzahl . . . . .	5,0	2,3	7,5	5,0	6,5	5,6	3,3
b (Gelatine)							
1. Titration . . . . .	0,58	0,58	0,58	0,59	0,59	0,59	—
2. Titration . . . . .	1,18	1,07	1,18	1,16	1,04	1,20	—
Zunahme . . . . .	0,60	0,49	0,60	0,57	0,45	0,61	—
c (Pepton F)							
1. Titration . . . . .	0,51	0,51	0,51	0,51	—	0,53	0,53
2. Titration . . . . .	0,80	0,80	0,84	0,80	—	0,80	0,78
Zunahme . . . . .	0,29	0,29	0,33	0,29	—	0,27	0,25
d (Wittepepton)							
1. Titration . . . . .	0,44	0,44	—	0,44	—	—	0,44
2. Titration . . . . .	0,98	0,89	—	0,95	—	—	0,91
Zunahme . . . . .	0,54	0,45	—	0,51	—	—	0,47

D: Die Magensafte wurden mit 30fach Volumen Wasser verdünnt. Alle Experimente bei 37° C.

- 10 ccm Glykokoll-Puffer ( $p_{\text{H}}$  6,7), 2 ccm Saft und 0,05 g Spritblaufibrin; 30 Minuten vorläufige Quellung, 1 Stunde Experiment. Kolorimeterstandard willkürlich.
- 10 ccm Biphthalat-Puffer ( $p_{\text{H}}$  5,8), 2 ccm Saft und 0,1 g Kasein; 4 Stunden. 5 ccm wurden in Alkohol titriert.
- 10 ccm Biphthalat-Puffer ( $p_{\text{H}}$  6,1), 2 ccm Saft und 2 ccm 5%iges Pepton F; 3 Stunden 40 Minuten. 5 ccm wurden in Alkohol titriert.
- 10 ccm Puffer, 4 ccm Saft und 2 ccm 1%iges Glyzylglyzin; 19 Stunden. 5 ccm wurden in Alkohol titriert.
- 10 ccm Puffer, 2 ccm Saft und 0,05 g SAHLISCHES Catgut;  $19\frac{1}{2}$  Stunden. 5 ccm wurden in Alkohol titriert,

Dauer nach der Fütterung in Stunden . . . . .	0,0	$\frac{1}{2}$	1,0	$2\frac{1}{2}$
a (Fibrin)				
Kolorimeterzahl . . . . .	5,0	1,9	2,9	2,9
b (Kasein)				
1. Titration . . . . .	0,58	0,56	0,58	0,56
2. Titration . . . . .	1,15	1,11	1,09	1,07
Zunahme . . . . .	0,57	0,55	0,51	0,51

Tabelle 12. D. (Fortsetzung).

Dauer nach der Fütterung in Stunden . . . . .	0,0	$\frac{1}{2}$	1,0	$2\frac{1}{2}$
c (Pepton F)				
1. Titration . . . . .	0,82	0,82	0,80	0,78
2. Titration . . . . .	1,22	1,15	1,18	1,15
Zunahme . . . . .	0,40	0,33	0,38	0,37
d (Glyzylglyzin) . . . . .				
e (SAHLISCHES Catgut). . . . .				

Keine Verdauung

E): Die Magensaft wurden mit 20fachen Volumen Wasser verdünnt. Alle Experimente bei 37° C.

- a) 10 ccm Biphthalat-Puffer ( $p_{H_2} 5,6$ ), 2 ccm Saft und 3 ccm 5%ige Gelatine; 1 Stunde. 5 ccm wurden in Alkohol titriert.
- b) 10 ccm Glykokoll-Puffer ( $p_{H_2} 6,7$ ), 2 ccm Saft und 3 ccm 5%iges Wittepepton 2 Stunden. 5 ccm wurden in Alkohol titriert.
- c) 10 ccm Biphthalat-Puffer (6,1), 2 ccm Saft und 3 ccm 6%iges Pepton F; 2 Stunden 50 Minuten. 5 ccm wurden in Alkohol titriert.
- d) 10 ccm Puffer ( $p_{H_2} 5,8$ ), 2 ccm Saft und 0,1 g Kasein; 19 Stunden. 5 ccm wurden in Alkohol titriert.
- e) 10 ccm Puffer ( $p_{H_2} 6,7$ ), 2 ccm Saft und 0,05 g Catgut von SAHLI; 19 Stunden. 5 ccm wurden in Alkohol titriert.
- f) 5 ccm Puffer ( $p_{H_2} 6,7$ ), 1 ccm Saft und 0,05 g Spritblaufibrin. 30 Minuten vorläufige Quellung, 45 Minuten Verdauung.
- g) Farbe der verdünnten Säfte. In beiden Fällen waren der Kolorimeterstandard willkürlich.

Dauer nach der Fütterung in Std.	0,0	$\frac{1}{2}$	1,0	$2\frac{1}{2}$	$3\frac{1}{2}$	5,0
a (Gelatine)						
1. Titration . . . . .	0,71	0,71	0,73	0,73	0,73	0,71
2. Titration . . . . .	1,22	1,09	1,24	1,15	1,24	1,18
Zunahme . . . . .	0,51	0,38	0,51	0,42	0,51	0,47
b (Wittepepton)						
1. Titration . . . . .	0,64	0,64	0,64	0,64	0,64	0,64
2. Titration . . . . .	1,24	1,15	1,24	1,22	1,24	1,15
Zunahme . . . . .	0,60	0,51	0,60	0,58	0,60	0,51
c (Pepton F)						
1. Titration . . . . .	1,15	1,13	1,13	1,15	1,13	1,13
2. Titration . . . . .	1,75	1,67	1,75	1,67	1,78	1,67
Zunahme . . . . .	0,60	0,54	0,62	0,52	0,65	0,54
d (Kasein)						
1. Titration . . . . .	0,36	0,40	0,38	0,38	0,40	0,36
2. Titration . . . . .	2,29	2,33	2,44	2,20	2,42	2,24
Zunahme . . . . .	1,93	1,93	2,06	1,82	2,02	1,88
e (SAHLISCHES Catgut)						
1. Titration . . . . .	0,09	0,09	0,11	0,11	0,11	0,09
2. Titration . . . . .	0,27	0,22	0,27	0,22	0,29	0,24
Zunahme . . . . .	0,18	0,13	0,16	0,11	0,18	0,15
f (Fibrin)						
Kolorimeterzahl . . . . .	5,0	1,7	3,2	2,7	4,2	3,4
g (Verdünnter Saft)						
Kolorimeterzahl . . . . .	7,0	4,8	6,7	5,7	8,9	6,5

**Tabelle 13.** Die Sekretion des Verdauungssafes nach der künstlichen Entleerung des Magens.

A: Die Magensaft wurden mit 10fachem Volumen Wasser verdünnt; 37° C.  
a) Die Farbe der verdünnten Säfte.

- b) 5 ccm Biphthalat-Puffer ( $p_{\text{H}}$  6,2), 2 ccm Saft und 0,05 g Spritblaufibrin.  
30 Minuten vorläufige Quellung, 45 Minuten Verdauung. In a und b war der Kolorimeterstandard beide willkürlich.
- c) 10 ccm Biphthalat-Puffer ( $p_{\text{H}}$  5,9), 2 ccm Saft und 2 ccm 6%ige Gelatine;  
1 Stunde.
- d) 10 ccm Glykokoll-Puffer ( $p_{\text{H}}$  8,0), 2 ccm Saft und 3 ccm 6%iges Wittepepton  
45 Minuten. In c und d je 5 ccm wurden in Alkohol titriert.

Dauer nach der Entleerung in Stunden .	0,0	$\frac{1}{2}$	1,0	$\frac{3}{4}$	$2\frac{1}{2}$
a (Farbe der Säfte)					
Kolorimeterzahl . . . . .	10,0	8,0	9,3	5,7	9,6
b (Fibrin)					
Kolorimeterzahl . . . . .	10,0	7,6	9,2	6,8	9,7
c (Gelatine)					
1. Titration . . . . .	0,49	0,49	0,49	0,47	0,49
2. Titration . . . . .	1,02	0,98	0,98	0,89	0,98
Zunahme . . . . .	0,53	0,49	0,49	0,45	0,49
d (Wittepepton)					
1. Titration . . . . .	3,80	3,77	3,77	3,75	3,77
2. Titration . . . . .	4,40	4,33	4,35	4,26	4,28
Zunahme . . . . .	0,60	0,56	0,58	0,51	0,51

B: Die Magensaft wurden mit 10fachem Volumen Wasser verdünnt; 37° C.  
a) Die Farbe der verdünnten Säfte.

- b) 5 ccm Biphthalat-Puffer ( $p_{\text{H}}$  6,2), 2 ccm Saft und 0,05 g Spritblaufibrin.  
30 Minuten vorläufige Quellung,  $1\frac{1}{2}$  Stunden Experiment. In a und b war der Kolorimeterstandard willkürlich.
- c) 6 ccm Biphthalat-Puffer ( $p_{\text{H}}$  5,9), 1 ccm Saft und 2 ccm 6%ige Gelatine; 1 Stunde.
- d) 6 ccm Glykokoll-Puffer ( $p_{\text{H}}$  8,0), 1 ccm Saft und 2 ccm 6%iges Wittepepton;  
1 Stunde. In e und d wurden je 3 ccm in Alkohol titriert.

Dauer nach der Entleerung in Stunden .	0,0	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{2}$	$\frac{3}{4}$	1,0
a (Farbe der Säfte)					
Kolorimeterzahl . . . . .	8,5	4,3	4,2	3,2	15,0
b (Fibrin)					
Kolorimeterzahl . . . . .	5,7	3,9	1,9	3,6	5,9
c (Gelatine)					
1. Titration . . . . .	0,31	0,29	0,31	0,29	0,31
2. Titration . . . . .	1,00	0,82	0,82	0,80	0,91
Zunahme . . . . .	0,69	0,53	0,51	0,51	0,60
d (Wittepepton)					
1. Titration . . . . .	2,33	2,33	2,31	2,35	2,33
2. Titration . . . . .	2,78	2,58	2,62	2,60	2,71
Zunahme . . . . .	0,45	0,25	0,21	0,25	0,38

C: Die Magensafte wurden mit 10fachem Volumen Wasser verdünnt, 37° C.  
a) 5 ccm Biphthalat-Puffer ( $p_{H_2}$  6,2), 1 ccm Saft und 0,05 g Spritblaufibrin.

30 Minuten vorläufige Quellung; 1 Stunde Experiment. Kolorimeterstandard ist willkürlich.

b) 6 ccm Biphthalat-Puffer ( $p_{H_2}$  5,9), 1 ccm Saft und 1,3 ccm 6%iges Wittepepton; 30 Minuten. 3 ccm wurden in Alkohol titriert.

Dauer nach der Entleerung in Std.	0,0	$\frac{1}{2}$	1,0	$\frac{1\frac{3}{4}}{4}$	$\frac{2\frac{1}{2}}{2}$	$\frac{3\frac{1}{2}}{4}$
a (Fibrin)						
Kolorimeterzahl . . . . .	8,2	4,2	5,6	6,5	8,8	7,1
b (Wittepepton)						
1. Titration . . . . .	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44
2. Titration . . . . .	0,69	0,62	0,64	0,67	0,71	0,67
Zunahme . . . . .	0,25	0,18	0,20	0,23	0,27	0,23

D: Die Magensafte waren mit 10fachem Volumen Wasser verdünnt 36° C.

a) 5 ccm Biphthalat-Puffer ( $p_{H_2}$  5,6), 1 ccm Saft und 2 ccm 6%ige Gelatine; 1 Stunde.

b) 5 ccm Glykokoll-Puffer ( $p_{H_2}$  8,0), 1 ccm Saft und 2 ccm 6%iges Wittepepton; 1 Stunde. In beiden Fällen wurden je 3 ccm in Alkohol titriert.

Dauer nach der Entleerung in Std.	0,0	$\frac{1}{2}$	1,0	$\frac{1\frac{3}{4}}{4}$	$\frac{2\frac{1}{2}}{2}$	$\frac{3\frac{1}{4}}{4}$
a (Gelatine)						
1. Titration . . . . .	0,80	0,80	0,80	0,80	0,82	0,80
2. Titration . . . . .	1,22	1,07	1,20	1,22	1,31	1,33
Zunahme . . . . .	0,42	0,27	0,40	0,42	0,49	0,53
b (Wittepepton)						
1. Titration . . . . .	2,55	2,55	2,55	—	2,55	2,55
2. Titration . . . . .	2,89	2,78	2,86	—	2,91	2,91
Zunahme . . . . .	0,34	0,23	0,31	—	0,36	0,36

**Nachtrag bei der Korrektur.** Während des Druckes meiner Arbeit erschien eine zweite Mitteilung über den verdauenden Saft von *Astacus* von KRÜGER (Zool. Jahrb., Abt. f. allgem. Zool. u. Physiol. 45, 463. 1928). Auch in dieser Arbeit hat KRÜGER keine Kontrollversuche über Autolyse gemacht; er behauptet, daß er nur unbedeutende Zunahme der Azidität durch Autolyse gefunden habe (S. 492). Naturgemäß hängt der Fehler, den die Autolyse verursachen kann, von der relativen Menge des Magensaftes (d. h. des eigenen Eiweißes) und der Menge des Substrates ab; da KRÜGER fast keine Protokolle in seiner Mitteilung gibt, kann man seine Versuche nicht kritisieren; allein bei seinen zwei Versuchen mit Pepton, wo er ausnahmsweise die ganze Beschreibung der Versuche gab, kann man den Angaben entnehmen, daß hierbei die Autolyse eine bedeutende Rolle gespielt hat (vergleiche den Abschnitt über Autolyse). Ja, wenn man meine Kurve der Autolyse zu der Peptolyse fügt, so kann man die Kurve KRÜGERS erhalten, die er auf S. 498 seiner Mitteilung gegeben hat. Die gleiche Kritik gilt wahrscheinlich auch für die Versuche mit anderen Substraten zum B. Leucyl-glycin; aber da genauere Beschreibungen der Versuche fehlen, so ist ein definitives Urteil nicht möglich.

# STELLINGEN

## I.

Het werkzaam agens, dat prosecretine in den darmwand tot secretine maakt, is niet, zooals tot dusver werd aangenomen het zoutzuur van de maag, maar een bestanddeel van de gal.

## II.

De theorie van WINTERSTEIN omtrent de uitsluitende regeling van de ademhalingsfunctie van het zoogdier door  $\text{CO}_2$ -spanning (resp. pH.) in het bloed is sinds de onderzoeken van BUITENDIJK en medewerkers niet ongewijzigd houdbaar.

## III.

JAECKEL heeft overtuigend aangetoond, dat de lipkraakbeentjes tot het skelet van vroegere kieuwbogen hebben behoord.

## IV.

Er bestaan gegrondde bezwaren tegen de methodiek van NUERNBECK om een beeld van de lichtverdeling in Avenakoleoptielen te verkrijgen.

## V.

Vooralsnog mogen wij de enzymen der ongewervelde dieren niet met die der gewervelde dieren vergelijken.

## VI.

Bij de onderscheiding van diergroepen moeten wij ook de fysiologische kenmerken in acht nemen.

## VII.

SOERENSEN's onderzoeken hebben aangetoond, dat de proteinen, die door enzymen verteerd kunnen worden, een polypeptide structuur bezitten.

## VIII.

De onderzoeken van ROBINSON en zijn medewerkers over de osteogenese wijzen aan de histochemie nieuwe banen.









