

**Undersøgelser over  
Kymosinets (Løbefermentets) Forhold ved Filtrering  
gennem Chamberlands Filter.**

Af

A. Marschall.

Filtrering af Fermentopløsninger gennem porøse Stoffer har i lang Tid været benyttet og tildels undersøgt. Pachutin<sup>1)</sup> angiver at kunne skille de tre Pankreasfermenter ved Filtrering gennem en Lercylinder. Det lykkes dog ikke saa godt i vandig Opløsning, som naar der anvendes koncentrerede Saltopløsninger til Udtrækning af Pankreas. Det paa Æggehvide virkende Ferment faas saaledes næsten rent ved Seignettesalt og svovlundersyrligt Natron; det paa Stivelse virkende ved arsensurt Kali, det paa Fedt virkende ved antimonsurt Kali og tvekulsurt Natron. Om det er de forskellige Salte, der udtrække de enkelte Fermenter, eller det er Filtret, der ved Hjælp af Saltene skiller dem ad, er ikke nøje undersøgt. Af Artiklen, der er en foreløbig Meddelelse, har jeg ikke fundet nogen Fortsættelse, men det er altsaa lykkedes Pachutin at faa Fermenterne til at gaa gennem Filtret. Rent Løbeferment er fremstillet og undersøgt af Hammarsten<sup>2)</sup>, som finder, at det kun ved højt Tryk og

<sup>1)</sup> Centralblatt für medic. Wissenschaften 1872, Pag. 97.

<sup>2)</sup> Upsala läkareförenings förhandl. 1873, Pag. 70.

efter længere Tids Forløb gaar igennem en porøs Lercylinder, samt at det iøvrigt beror paa Trykket og den porøse Vægs Beskaffenhed. Gipsfiltre ere undersøgte af Cazeneuve<sup>1)</sup>, som derigennem filtrerede følgende Fermenter: Diastase, Myrosin, Amygdalin, Pepsin samt Fermentet af torula urinae. Gipsen, som baade virkede mekanisk og kemisk, absorberede fuldstændigt alle disse Fermenter.

Ved Filtrering af Bakteriekulturer er ogsaa bemærket, at Chamberlands Filter, foruden at tilbageholde Bakterierne, ogsaa absorberer en Del af de virksomme Stoffer i Opløsningen, saaledes at hvis Væsken er toxisk, svækkes Virulensen betydeligt. Det er saaledes f. Ex. konstateret af Rødet og Courmont med Hensyn til den toxiske Bouillonkultur af staphylococcus pyogenes aureus. For at undersøge dette Forhold har Arloing<sup>2)</sup> som Objekt benyttet den sure og toxiske Saft, som faas af Sukkerroen efter Gæring i Gruber. Arloing benyttede et Tryk af 3 Atmosf. og filtrerede stadig samme Mængde Væske, men hvormeget, staar desværre ikke angivet. Resultatet ved Filtrering gennem et nyt F-Filter gav, at Filtret tilbageholdt

af Inddampningsresten . . . . .	19,89 pCt.
- Stoffer, som fældes af Alkohol.	20,48 —
- frie Syrer . . . . .	33,80 —

Efter at Filtret har været brugt flere Gange og steriliseret i Autoklaven — det bliver ikke glødet — taber det en Del af sin Kraft til at holde Stoffer tilbage; saaledes absorberede et gammelt Lys kun

af Inddampningsresten . . . . .	2,05 pCt.
- Stoffer, som fældes af Alkohol.	4,41 —

<sup>1)</sup> Bull. soc. chimique 1884, Tome 42, Pag. 91.

<sup>2)</sup> Comptes rendus de l'académie des sciences, Paris d. 20/6 92.

Hvad angaar Giftigheden af Væsken, da taber den 80 pCt. ved at gaa gennem et nyt Filter, men kun 60 pCt. ved et noget ældre.

Da Fermenters Forhold ved Filtrering gennem Chamberlands Filter er af betydelig Interesse baade i fysiologisk og kemisk Henseende, og da Undersøgelserne herom ere temmelig sparsomme, og som det vil ses af det foregaaende, tildels modsigende, har jeg i det følgende forsøgt at yde et Bidrag hertil ved at undersøge Løbefermentets Forhold i saa Henseende.

Det Ferment, hvis Styrke er lettest at bestemme, er nemlig absolut Kymosinet, og det er derfor, jeg har benyttet det til mine Undersøgelser. For at faa rent Kymosin kunde man gaa frem efter følgende af Hammarsten benyttede Methode. En sur eller neutral Infusion paa Kalvemaver fældes ved lidt efter lidt dertil at sætte eddikesurt Blyilte. Ved det sure Udtræk maa ogsaa tilsættes Ammoniak. Det først fældede, der indeholder mest Pepsin, benyttes ikke; men Resten samles og sønderdeles med fortyndet Svovlsyre. For at fjerne de sidste Spor af Pepsin i denne Opløsning, fældes den ved Tilsætning af en Opløsning af Kolestearin. Efter Udvaskning af Fældningen og Opløsning af Kolestearinet i Æther faas det rene Ferment. Det vilde imidlertid være temmelig omstændeligt hyppigt at benytte denne Fremgangsmaade, og da Produktet heller ikke kunde blive aldeles ensartet, har jeg anvendt følgende Methode:

100 Gr. Løbepulver<sup>1)</sup> udrøres med 300 Gr. Vand, Væsken filtreres fra og Resten presses. Den ca. 8 Gr. tunge Pressebage udrøres med 5 Gr. Vand, tilblandes 25 Gr. Pimpstenspulver og tørres. Løbepulveret er i sig selv meget rent Kymosin, idet det kun indeholder Spor af Pepsin og ialt kun c. 3 pCt. organiske Stoffer; Resten er Klornatrium, som for største Delen fjernes ved Behandlingen med Vandet, medens dette kun borttager en ringe Mængde af Fermentet, der kun er lidet opløseligt i koncentreret

---

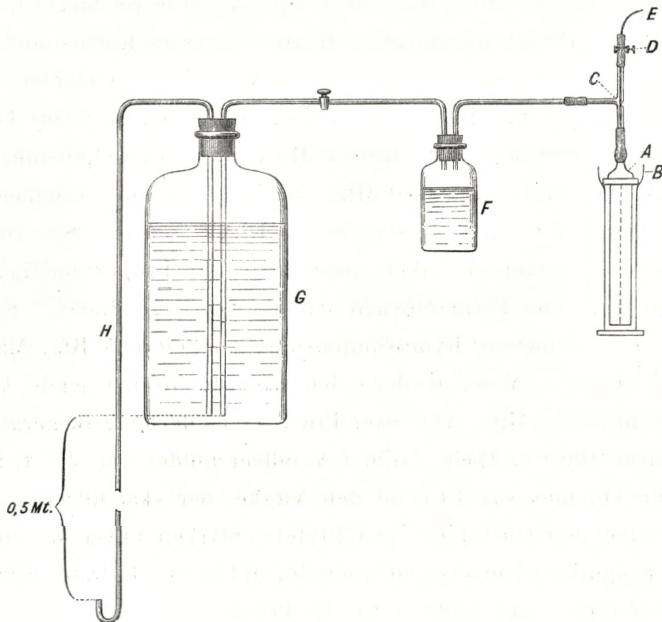
<sup>1)</sup> Fra Chr. Hansens tekn.-kem. Laboratorium i København.

Saltopløsning. En Del organiske Bestanddele findes ogsaa i den fraskilte Saltopløsning; en Del er uopløselig i den omtrent saltfri Opløsning, som benyttes til Prøverne, og endelig bliver en ikke ringe Del uopløselig ved Tørringen paa Pimpstenen. Dette Pulver har i sex Maaneder tabt ca. 10 pCt. af sin Styrke. Til Prøverne toges 1,5 Gr. til 500 Cc. destilleret Vand, og det filtreres efter 1—2 Timers Henstand. 1 Cc. af denne Opløsning koagulerer ved 37° C. 100 Cc. Mælk i ca. 5 Min. Opløsningen indeholder højest 0,02 pCt. Klornatrium og fældes ligesom Hammarstens rene Kymosin ikke af kold Salpetersyre, Jod eller Alkohol. Garvesyre og neutralt eddikesurt Bly giver dog en ringe Uklarhed, hvad Hammarstens Kymosin ikke gør, og da det tillige giver en svag Hellers Reaktion, indeholder det endnu Spor af Æggehvdestof, hvad neppe har Betydning til disse Forsøg, hvor det er mere vigtigt altid at have samme Stof at arbejde med. Som det vil ses af det følgende, giver 0,02 pCt. tørt Æggehvde sig tydeligt tilkende ved Filtreringsprøverne, saa at det neppe kan være ret meget deraf der findes i Pulveropløsningen. Hammarstens Kymosinopløsning er af en saadan Styrke, at det ved 37° C. koagulerer 5 Gange sit Rumfang Mælk i  $\frac{3}{4}$ —3 Min. Pulveropløsningens Fermentevne svarer til den kraftigste af Hammarstens Opløsninger, idet den f. Ex. bringer 100 Rfg. Mælk til at løbe sammen i 5 Min. ved 37° C., hvilket svarer til 5 Rfg. i  $\frac{1}{4}$  Min. Saa korte Tidsrum bør imidlertid ikke anvendes, idet Proportionaliteten mellem Tiden og Fermentevnen da ikke mere genfindes. Saaledes vil den nævnte Kymosinopløsning koagulere 5 Rfg. Mælk ved 37° C. i  $\frac{3}{4}$  Min., medens den efter det ovenstaaende kun skulde bruge  $\frac{1}{4}$  Min. Ved hver Prøve tages derfor 2 Bægerglas, hver med 100 Cc. Mælk, som i Vandbad holdes ved 37° C.; i det ene kommes saa 1 Cc. af den Væske, der skal filtreres, og i det andet ligeledes 1 Cc. af Filtratet. Styrken bliver saa omvendt proportional med Sammenløbningstiden. Er Filtratet meget fermentfattigt, tages indtil 5 Cc. til Prøven.

Til Filtreringen benyttes et Filter, mærket: F-Filtre, Chamberland, Système Pasteur. Dets indre Hulhed rummer c. 75 Cc., og den porøse Væg suger c. 20 Cc. Væske. Disse 20 Cc. maa tages i Betragtning ved det først filtrerede, da Filtret, inden Prøven foretages, vædes med en fermentfri Væske, som saa fortynder Filtratet. Efter hver Prøve skylles Filtret godt med Vand ved Sugning, tørres og glødes stærkt over flere Bunsenske Brændere. Det er nødvendig at gløde Filtrene, da Resultaterne ellers ikke blive ens paa Grund af det organiske Stof, der samler sig i Porerne. Medens Filtret endnu er glødende, maa Gassen slukkes straks, og ikke lidt efter lidt, da den porøse Væg ellers indsuger forskellige Forbrændingsprodukter, rimeligvis lidt Svovlsyre, som kan have ikke ringe Virkning paa Resultaterne.

Filtreringen udføres dels ved svag Sugning (0,5 Mt. Vand), og dels ved stærk Sugning (0,5 Atm.).

Til svag Sugning benyttes følgende Apparat.



Filtret (*A*), som er nedsat i et Cylinderglas (*B*) med en Udvidning foroven, er med en Kautschukslange forbundet med *T*-Røret (*C*). Dette er foroven forlænget med et lille Stykke Slange forsynet med Klemhane. Derigennem og helt ned til Bunden af Filterhulheden er anbragt en tynd Kautschukslange (*E*), som benyttes til at suge Filtret tomt, uden at Apparatet behøver at skilles ad, og Tillukningen sker med Klemhanen (*D*). *T*-Rørets tredje Gren fører til Forlaget (*F*), som atter staar i Forbindelse med det konstante Sugeapparat, der bestaar af en Mariottes Flaske med Sugerør paa 0,5 Mt.

Ved Sugning paa 0,5 Atm. benyttes en tom Flaske paa ca. 10 Litr., som i Proppen er forsynet med to Rør med Haner og et Rør, der gaar til et Kvægsølvmanometer. Det ene af de to Rør staar i Forbindelse med Forlaget (*F*), og det andet gaar til en Vandsugepumpe. Ved Pumpen suges Kvægsølvet op til ca. 41 Ctm. Højde; naar Hanen til Forlaget derefter aabnes, synker det til ca. 38,5 Ctm., for derpaa under Forsøgets Gang at synke ca. 1 Ctm. Trykket har saaledes kun differeret ca. 0,5 Ctm. over og under de 38 Ctm. Før hver Prøve er der gennem Filtret suget ca. 200 Cc. Vand eller vedkommende Salt eller Syreopløsning; hvor der er tilsat Æggehvide, er dette dog udeladt. Derpaa tømmes Filtret gennem Kautschukslangen (*E*), Klemhanen lukkes og den Væske, som skal prøves, bringes i Cylinderglasset, der stadig holdes fyldt ved en Styrteflaske. Naar der ikke er bemærket andet, er der filtreret 300 Cc. over i Forlaget; dette Filtrat samles for sig og Resten i Filtret for sig. Gennemløbningstiden for de 375 Cc. var med svag Sugning 65—75' og med stærk 6—8'.

Følgende Filtreringsforsøg ere foretagne, og Resultatet er Gennemsnit af flere Prøver, men den indbyrdes Variation har ikke været stor. Paa nogle faa Undtagelser nær (som ville blive anførte) ere alle Forsøg foretagne baade med svag og stærk Sugning, men Resultatet har stadig været, at Styrken af Filtratet var ens.

## Filtrering af vandig neutral Kymosin-Opløsning:

De første 300 Cc. . . 30 pCt.<sup>1)</sup>, Resten i Filtret . . 70 pCt.

Det ses, at Filtret i Begyndelsen tilbageholder betydelig mere end senere hen. For at undersøge dette Forhold nærmere samledes ved svag Sugning den filtrerede Væske, hver Gang Filtret løb fuldt, altsaa for hver 75 Cc. Det gav følgende Resultat<sup>2)</sup>:

1. Filtrat . .	0 pCt.	6. Filtrat . .	77 pCt.
2. — . .	9 —	7. — . .	84 —
3. — . .	40 —	8. — . .	90 —
4. — . .	62 —	9. — . .	95 —
5. — . .	70 —	10. — . .	100 —

Altsaa de første 75 Cc. ere fermentfri, de næste meget svage, og først 3. Filtrat indeholder en nogenlunde rigelig Mængde Kymosin. Derpaa stiger Mængden efter 4. Filtrat jævnt, men naar først ved 10. til sin fulde Styrke.

For at undersøge, om den engang filtrerede Kymosinopløsning forholder sig anderledes end den oprindelige Væske, samledes 500 Cc. af Filtratet og filtreredes om gennem samme samme Filter, efter at det var glødet. Det gav:

300 Cc. à 8 pCt.

Resten i Filtret à 46 pCt.

Den en Gang filtrerede Væskes Fermentevne er her sat lig 100 pCt. Filtret tilbageholder altsaa nu mere end første Gang, hvilket maa skyldes, at Væsken er befriet for en Del organiske Stoffer.

Heraf følger, at jo tykkere Filtrevæggen er, desto mere absorberes der.

<sup>1)</sup> Den oprindelige Væske sat lig 100 pCt.

<sup>2)</sup> Under 2 pCt. regnes lig 0 pCt.

Tilsætningen af 5 pCt. Klornatrium forandrer kun lidt, hvorimod 5 pCt. Klorammonium bevirker, at der gaar betydelig mere igennem. Dog maa Saltet være absolut neutralt, da selv en meget svag sur Reaktion forringer Mængden meget. Kymosinopløsningen laves af dobbelt Styrke og fortyndes efter Filtringen med lige Rumfang Saltopløsning af 10 pCt.

Kymosinopløsning + 5 pCt.  $NH_4 Cl$  gav:

300 Cc. à 50 pCt.

Resten i Filtret à 100 pCt.

Svovlsur Ammoniak giver samme Resultat; men det maa ogsaa være fuldstændig neutralt.

Stærkt virker ogsaa en ringe Tilsætning af flydende Hønsæggehvide. Æggehviden fortyndes med 10 Dele Vand og filtreres, inden den blandes med Fermentopløsningen.

Kymosin uden Æggehvide gav 300 Cc. à 30 pCt., Rest 70 pCt.

—	+ 0,02	—	—	—	- 40	—	,	—	78	—
—	+ 0,05	—	—	—	- 70	—	,	—	100	—
—	+ 0,1	—	—	—	- 100	—	,	—	100	—

Det beror altsaa paa Fermentets Renhed, hvor meget Kymosin der gaar gennem Filtret. Er den porøse Væg først mættet med Æggehvide, gaar Fermentet fuldstændigt igennem. Deraf kommer, at et brugt Filter giver uensartet Resultat, naar det ikke glødes.

Reaktionen spiller en meget stor Rolle og det er vist derfor, at Hammarsten meget vanskeligt faar Kymosinet til at gaa gennem Filtret. Selve Fermentet er neppe meget renere end det her anvendte; men da det faas ved Fældning af en sur Væske med Kolestearin, kan det nemt rive lidt Syre med, og der skal yderst lidt for at gøre betydelig Forandring. Alkaliske Væsker kan der ikke være Tale om at forsøge, da Kymosinet meget hurtigt ødelægges, selv om der kun er Spor tilstede.



Til sur Opløsning bruges 0,2 pCt. Normal Svovlsyre, som tilsættes den filtrerede Opløsning.

Sur Kymosinopløsning gav:

300 Cc. à 0 pCt.

Rest à 0 —

Selv ved yderligere at filtrere 300 Cc. gik intet igennem.

Filtret tilbageholder i Begyndelsen en Del Syre, saaledes at det først filtrerede, selv om der kun filtreres fortyndet Syre, næsten er fuldstændigt neutralt. Det senere opnaar dog snart den normale Syregrad.

For at undersøge, hvorledes det forholder sig med det fra en slig, svag sur Opløsning tilbageholdte Kymosin, filtreredes ved svag Sugning 600 Cc., Filtratet var frit for Ferment. Derpaa sugedes destilleret Vand igennem, og deri henstod Filtret til Dagen efter, hvorpaa der atter sugedes mere Vand igennem. Der gik stadig intet Kymosin igennem. Vandet tømtes saa ud, og der tilsattes en 5 pCt. neutral Klorammoniumopløsning. Det gav:

1ste Filtrat 200 pCt. og ialt 370 Cc. à 120 pCt.

Der udkom saaledes  $\frac{3}{4}$  af den Kymosinmængde, der var tilbageholdt, Resten er rimeligvis ødelagt ved at henstaa i den porøse Væg.

Saalænge der er Syre tilstede, vil Tilsætning af Salte ikke fremme Filtrationen. Ved Opløsninger af sædvanlig Syrestyrke (0,2 pCt., Norm  $H_2SO_4$ ) gør 5 pCt. Kloratrium ingen Virkning, og 5 pCt. Klorammonium bevirker kun, at der, efter at der er passeret 300 Cc., gaar en Væske paa 3—4 pCt. igennem.

Æggehvide gør ogsaa her en betydelig Virkning, saaledes giver en Tilsætning af 0,5 pCt. Hønsæggehvide:

300 Cc. à 20 pCt.

Resten i Filtret à 75 pC.

For at undersøge mere urene Opløsninger fremstilles et saltsurt Udtræk af Kalvemaver<sup>1)</sup>, som neutraliseredes med Natron. Disse Filtreringsforsøg ere kun udførte med stærk Sugning, da det gaar meget langsomt igennem, paa Grund af at der samler sig en slimagtig Masse udenpaa Filtret, som næsten helt stoppes. De første 75 Cc. filtreredes saaledes paa ca. 20' og de næste paa ca. 70'. Fermentevnen af det saltsure Udtræk var omtrent 6 Gange saa stort som den ovenfor anvendte rene Kymosinopløsning:

	1. Filtrat.	2. Filtrat.
Neutralt Løbeudtræk . . . . .	28 pCt.	71 pCt.
Do. + 10 pCt. $NH_4 Cl$ . . . . .	100 —	100 —
Do. + 0,5 Norm $H_2 SO_4$ . . . . .	9 —	35 —
Do. + Do. + 10 pCt. $NH_4 Cl$	100 —	100 —

Her tages mere Syre og Klorammonium paa Grund af den store Mængde organiske Stoffer. Uagtet disse Udtræk indeholde meget mere organisk Stof end ren Kymosin tilsat 0,1 pCt. Æggehvide, berøver Filtret det dog betydeligt af Fermentevnen, og det ses saaledes, at det ikke er ligemeget, hvilke organiske Stoffer Væsken indeholder og at Æggehvide virker særlig heldigt. Syren virker heller ikke saa kraftigt her, men den giver dog en betydelig Different. Klorammonium derimod er ogsaa her meget virksomt og det endog i sur Vædske.

Om andre Fermenter eller ogsaa Bakterierprodukter forholde sig paa samme Maade som Kymosinet ved Filtrering, er selvfølgelig umuligt at sige, men Pachutin's og Arloings Undersøgelser tyde dog paa, at der er stor Lighed derimellem. Efter mine Undersøgelser kan jeg fremstille Lovene for Kymosinets Filtrering gennem Chamberlands Filter i følgende Résumé:

Filtrene skulle, naar de ere brugte før, glødes inden Anvendelsen, da ellers Resultatet bliver uensartet.

<sup>1)</sup> Hammarsten, Lärobok i fysiologisk Kemi, Upsala 1889, Pag. 155.

Mængden af Kymosin der gaar gennem Filtret afhænger dels af Reaktionen, dels af Renheden og dels af Væggens Tykkelse.

Af det først filtrerede tilbageholdes mest Ferment.

Ren sur Kymosinopløsning gaar ikke igennem.

Ammoniaksalte og Æggehvide befordre Gemmemgangen i høj Grad.

Styrken af den Fermentopløsning der gaar igennem er uafhængig af Trykket indenfor 0,5 Atm.

---