

Über die vermeintliche Identität von Pepsin und Chymosin.

Von

Sigval Schmidt-Nielsen.

(Aus dem med.-chem. Institut Upsala. Prof. Hammarsten.)

(Der Redaktion zugegangen am 24. April 1906.)

Da im Tierreiche, so weit die Verhältnisse bekannt sind, der Magensaft neben einer peptischen regelmäßig auch eine milchkoagulierende Wirkung entfaltet, und da ferner der Sinn einer Absonderung von einem besonderen milchkoagulierenden Enzym in den Magen solcher Tiere, Fische u. a., die niemals Milch genießen, nicht zu verstehen ist, kann man sich eigentlich nicht verwundern, wenn wiederholt die Ansicht auftaucht, daß es hier nicht um zwei verschiedene Enzyme, sondern vielmehr um zwei verschiedenartige Wirkungen eines und desselben Enzyms sich handle.

Für eine solche Ansicht, welche zuerst von Nencki und Sieber⁽¹⁾ und Pekelharing⁽²⁾ ausgesprochen wurde, ist in den letzten Jahren namentlich Pawlow⁽³⁾ und seine Schüler ins Feld getreten.

Während Nencki, Sieber und Pekelharing sich die Sache so vorstellen, als wäre das proteolytische Magenenzym mit zwei nach Art der «Seitenketten» unabhängig von einander wirkenden Gruppen, nämlich einer milchkoagulierenden und einer peptonisierenden, versehen, und während sie also eigentlich nicht die Selbständigkeit der beiden Enzymwirkungen leugnen, formuliert dagegen Pawlow auf Grund seiner mit Parastschuk zusammen ausgeführten, im Jahre 1904 veröffentlichten Untersuchungen seine Ansicht dahin, daß es überhaupt keine selbständige Labwirkung gebe, und daß die Milchgerinnung also eigentlich nur eine Art Pepsinwirkung sei. Pawlow und Parastschuk stützen ihre Ansicht auf zahlreiche Versuche mit

natürlichem Hundemagensaft, in welchen sie eine regelmäßige Parallelität zwischen milchkoagulierender und peptonisierender Fähigkeit des Magensaftes beobachteten. Kurz nach dem Erscheinen der Pawlowschen Arbeit, die übrigens durch einen Vortrag in Helsingfors im Monat Juli 1902 den Naturforschern bekannt wurde, hat jedoch Bang⁽⁴⁾ hervorgehoben, daß die von Pawlow mit Hundemagensaft ausgeführten Koagulationsversuche darauf hindeuten, daß es in ihnen um das von Bang entdeckte Parachymosin sich handelte und daß Pawlow somit niemals einen Vergleich von Pepsin mit typischem Chymosin angestellt hat.

Gegen die Pawlowsche Auffassung haben sich weiter Schrumpf⁽⁵⁾ und Hemmeter⁽⁶⁾ ausgesprochen. Schrumpf hat aus Schweinemagenpreßsaft durch Cholesterinfällung eine Pepsinlösung dargestellt, die Eiweiß kräftig verdaute, ohne zu laben. Da seine Lösungen indessen konstant nach 3—4 Stunden völlig unwirksam wurden, können seine Versuche für diese Frage keine Beweiskraft tragen. Hemmeter sah, daß menschliche Magensäfte trotz Pepsinwirkung nicht labten, und weiter deutet er an, daß durch Immunisierungsversuche eine weitere Stütze für die Nichtidentität sich gewinnen läßt.

Endlich hat Sawjalow⁽⁷⁾ sich der unistischen Auffassung Pawlows angeschlossen, indem nämlich auch er die Existenz eines selbständigen Chymosins leugnet und die milchkoagulierende Eigenschaft der Magensäfte ausschließlich dem Pepsin zuschreibt. Außer in einer Parallelität der beiden Wirkungen glaubt Sawjalow auch in seinen Untersuchungen über die Geschwindigkeit der Enzymwirkung bei verschiedenen Enzymkonzentrationen eine Stütze für die unistische Auffassung gefunden zu haben. Von diesem Standpunkte erklärt Sawjalow die Chymosinwirkung als eine peptische Digestion, «eine maskierte Verdauung des Caseins».

Da ich seit zwei Jahren mit einer Untersuchung über die Koagulation von Caseinlösungen sowohl mit Säure allein wie mit Lab beschäftigt bin, mußte ich natürlich auch Stellung zu der Frage nehmen, ob das Pepsin und Chymosin zwei verschiedene Enzyme seien oder nicht, und aus dem Grunde mußte ich auch hierüber einige besondere Untersuchungen ausführen.

Da diese Untersuchungen einen selbständigen, abgeschlossenen Teil meiner Arbeit darstellen, sehe ich keinen Grund dazu, die Veröffentlichung derselben bis zum Abschluß der ganzen Arbeit aufzuschieben. In der jetzigen Lage dieser Enzymfrage scheint mir eher eine direkte Aufforderung zur baldigen Veröffentlichung meiner Versuchsergebnisse zu liegen, indem dieselben nämlich mit den Ansichten von Pawlow und Parastschuk und Sawjalow nicht zu vereinbaren sind, während sie dagegen die Richtigkeit der alten Ansicht, derzufolge die Chymosinwirkung eine selbständige Enzymwirkung ist, nach meiner Meinung sicherstellen.

Bevor ich zu der Besprechung meiner eigenen Versuche übergehe, will ich jedoch erst einige ältere, meistens unbekannte oder übersehene Beobachtungen in Erinnerung bringen.

Seit den grundlegenden Untersuchungen Hammarstens betrachtet man als für das Chymosin charakteristisch, daß es die Fähigkeit besitzt, Milch oder Caseinlösungen bei gegen Lackmus neutraler oder wohl richtiger amphoterer Reaktion zur Gerinnung zu bringen, d. h. das Casein in einen neuen Stoff, das Paracasein, umzuwandeln. Für das Pepsin ist es dagegen charakteristisch, daß es bei neutraler Reaktion auf Eiweiß, also auch auf Caseinlösungen oder Milch, unwirksam ist, während es dagegen bei saurer Reaktion seine bekannte proteolytische Fähigkeit entfaltet.

Nun hat bekanntlich Hammarsten⁽⁸⁾ Chymosinlösungen dargestellt, welche in neutraler Flüssigkeit eine kräftige Labwirkung entfalteten, während sie bei saurer Reaktion nicht peptisch wirkten, trotzdem sie weder Chlormagnesium (wie Pawlow vermutet) noch andere bekannte, die Pepsinverdauung störende Verunreinigungen enthielten. Auf der anderen Seite hat er ferner auch gezeigt, daß man durch Erhitzen eines sauren künstlichen Magensaftes einige Tage bei Körpertemperatur eine saure Pepsinlösung erhalten kann, die Eiweiß kräftig verdaut, nach der Neutralisation dagegen keine Labwirkung (oder nur eine geringe) ausübt. Diese seine Beobachtungen beziehen sich auf die Enzyme des Kalbsmagens, und da Pawlow nur mit

Hundemagensaft gearbeitet hat, kann man sich fragen, ob nicht vielleicht die Verhältnisse beim Hunde anders als beim Kalbe liegen.

Man kann aber noch weiter gehen und die Frage stellen, ob die von Pawlow beobachtete koagulierende Wirkung des Hundemagensaftes auf Milch überhaupt eine reine Chymosinwirkung war. Schon in den alten Untersuchungen Hammarstens⁽⁸⁾ wird nämlich behauptet, daß dem Pepsin bei saurer Reaktion, unabhängig von dem Chymosin, eine selbständige milchkoagulierende Wirkung zukommt.

In Malys Jahresberichten, Bd. II, 1874, referiert Hammarsten seine in der schwedischen Sprache erschienene Arbeit:⁽⁸⁾ «Über die Milchgerinnung und die dabei wirksamen Fermente in der Magenschleimhaut». Nachdem er auf die sehr energische koagulierende Wirkung, die seine Magenfermente bei saurer Reaktion auf die Milch entfalten, aufmerksam gemacht hat, sagt er, daß seine in oben angegebener Weise durch Erhitzen dargestellten labfreien (sauren) Pepsinlösungen «die Milch noch ziemlich rasch koagulieren», und summiert seine Erfahrungen in dem folgenden sperrgedruckten Satze: «Obwohl das Pepsin in einer neutralen Flüssigkeit ganz ohne Einfluß auf die Milchgerinnung ist, kann man ihm also in saurer Lösung eine derartige Wirkung nicht ganz absprechen». Infolge der Knappheit dieses Referates in der deutschen Literatur hat man diese Angabe übersehen oder jedenfalls nicht als einen entscheidenden Beweis für die milchkoagulierende Wirkung des Pepsins betrachten können. Da man allgemein der Meinung ist, daß das Chymosin bei saurer Reaktion viel kräftiger als bei neutraler wirkt, könnte man nämlich wohl denken, daß, trotzdem kein Chymosin durch Koagulationsversuche bei neutraler Reaktion sich nachweisen ließ, doch kleine Chymosinmengen zurückgeblieben waren, welche Anlaß zu der Koagulation in saurer Flüssigkeit gaben. Diesem Einwande ist indessen in der schwedischen Originalarbeit Hammarstens entgegnet worden, indem er bei Besprechung eines hierher gehörenden Versuches S. 81 sagt: «Man wird vielleicht den Einwand erheben, daß, da das Lab am besten bei saurer Reaktion wirkt, das letztere in diesem

Falle nicht völlig zerstört worden, sondern in so geringer Menge in der Lösung zugegen sei, daß es trotz völliger Unwirksamkeit in der neutralen Mischung doch bei saurer Reaktion eine Koagulation hervorrufen könnte.» Nachdem er das unberechtigte eines solchen Einwandes besprochen hat, sagt er dann: «Dieser Einwand wird jedoch noch besser durch einen Kontrollversuch mit derselben Milch unter sonst gleichen Verhältnissen widerlegt». Der Versuch war, kurz referiert, folgender Art: Eine saure Mageninfusion war durch Erwärmen während 48 Stunden dermaßen chymosinarm geworden, daß sie nach Neutralisation die Milch (im Verhalten 1 zu 5) erst in 6 Stunden und 10 Minuten koagulierte. Durch Zusatz von Salzsäure wurde die neutrale Lösung auf den Säuregrad 0,1 % gebracht, und sie koagulierte nun die Milch in 12 Minuten, wobei durch Kontrollversuche gezeigt wurde, daß hier nicht eine Säurewirkung allein vorlag. Eine andere, pepsinfreie Lablösung mit Wasser so weit verdünnt, daß sie bei neutraler Reaktion dieselbe Milch erst nach 45 Minuten koagulierte, wurde ebenfalls auf den Säuregrad 0,1 % gebracht; sie koagulierte die Milch in 20 Minuten. Die Gerinnungsbeschleunigung durch Säure war also unverhältnismäßig viel stärker mit der pepsinreichen, fast chymosinfreien, als mit der chymosinhaltigen, pepsinfreien Lösung, und dies spricht seiner Meinung nach entschieden dafür, daß das Pepsin in saurer Lösung eine milchkoagulierende Wirkung hat.

Wenn aber dies der Fall ist, so kann man natürlich den Pawlowschen Untersuchungen, welche mit einer Milch-enzymmischung, die mehrere Zehntel pro Mille Salzsäure enthielt, ausgeführt sind, keine Beweiskraft für die Frage, ob Pepsin und Chymosin identische Enzyme sind, beimessen. Pawlow hat nämlich nur die eiweißverdauende Wirkung des sauren Magensaftes mit der milchkoagulierenden Wirkung des ebenfalls sauren Saftes verglichen, und dabei eine vollständige Parallelität gefunden, was ja unter dieser Voraussetzung ganz selbstverständlich, aber gleichzeitig als Beweis für die Identität von Lab und Pepsin hinfällig ist.

Wenn wirklich Chymosin und Pepsin identische Enzyme sind, sollte man natürlich unter verschiedenen Versuchsbedingungen eine Parallelität zwischen Milchgerinnung und Eiweißverdauung konstatieren können und vor allem sollte es dann nicht möglich sein, durch besondere Eingriffe nur die eine und nicht auch die andere Wirkung zu vernichten. Dies ist indessen nach den oben erwähnten alten, von späteren Forschern bestätigten Angaben Hammarstens wohl möglich, indem es nämlich durch Erhitzen auf Körpertemperatur gelingt, saure Magensäfte in einigen Tagen derart zu verändern, daß sie nach der Neutralisation kaum mehr normale Milch zum Gerinnen bringen, trotzdem sie vor dem Erhitzen nach Neutralisation so kräftig wirkten, daß die neutralisierte Lösung nach Verdünnung auf das 10fache Volumen doch Milch in dem Verhältnis 1 : 5 bei 38° C. im Laufe von 1 Minute zur Koagulation brachte, und trotzdem daß sie nach dem Erhitzen fortwährend Eiweiß kräftig verdauten (s. S. 100 ff.).

Von dieser Erfahrung ausgehend habe ich nun mit Salzsäure angesäuerte Infusionen auf Kalbsmagen so lange bei ca. 40° erhitzt, bis ihre labende Wirkung dermaßen herabgesetzt worden, daß die Infusionen nach erfolgter Neutralisation mit $\frac{n}{10}$ -Lauge die Milch in dem Verhältnis 1 : 5 bei 38—40 C. erst in etwa 4—6 Stunden zur Gerinnung brachten. Diese erwärmte sehr schwach labende Infusion können wir mit A bezeichnen. Ein anderer Teil derselben sauren Infusion, der nicht erwärmt worden war, wurde ebenfalls mit derselben Lauge gegen Lackmus neutralisiert und danach so stark verdünnt, daß er unter genau denselben Versuchsbedingungen wie A die neutrale Milch in etwa derselben Zeit zur Gerinnung brachte. Wir werden diese verdünnte Infusion als B bezeichnen. Die beiden Lösungen A und B wirken also bei neutraler Reaktion ungefähr gleich rasch auf Milch und enthalten dementsprechend etwa dieselbe Menge Chymosin. Vorausgesetzt nun, daß diese beiden Lösungen nur ein einziges Enzym enthielten, welches sowohl der caseinkoagulierenden Wirkung bei neutraler wie der eiweißverdauenden Wirkung bei saurer Reaktion fähig wäre, was hätte man dann zu erwarten, wenn man die beiden Lös-

ungen auf denselben Säuregrad brachte und dann unter sonst gleichen Verhältnissen teils auf Milch und teils auf Fibrin einwirken ließ? Natürlich müßten beide die Milch bei saurer Reaktion in ungefähr derselben Zeit koagulieren und sie müßten das Fibrin mit etwa derselben Geschwindigkeit verdauen.

Wenn aber diese Voraussetzung nicht zutraf, wenn vielmehr die eine Lösung, z. B. A, ungemein viel kräftiger verdaute und auch viel rascher die Milch zur Gerinnung brachte als die andere, Lösung B, so war es nicht länger möglich, an eine Identität von Pepsin und Chymosin zu denken, und gleichzeitig war ein Beweis für die Existenz eines zweiten, bei saurer Reaktion wirkenden milchkoagulierenden Enzymes in diesen Infusionen geliefert worden.

Nach diesem Prinzip habe ich nun meine Versuche angeordnet. Ehe ich auf ihre Ergebnisse eingehe, muß ich jedoch die Details der Versuchsanordnung ein wenig näher besprechen.

Der frische Labmagen von Saugkälbern wurde erst mit Wasser genau abgespült, bis die Schleimhaut ganz frei von sichtbaren fremden Partikeln war. Dann wurde von den Falten des Fundusteiles des Magens die Drüsenschicht mit einem Urglase abgeschabt, in der 10fachen Menge Salzsäure von 5⁰/₁₀₀ fein zerteilt und über Nacht kalt hingestellt. Dann wurde mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt und filtriert. Die so gewonnene Infusion wurde nachträglich mit dem gleichen Volumen 2,5⁰/₁₀₀iger Salzsäure verdünnt und in zwei Portionen geteilt. Die Hauptportion wurde im Brutschrank bei einer Temperatur von ca. 40—42° C. 1—3 Tage erhitzt, während gleichzeitig die andere Portion als Kontrollprobe (Vergleichsflüssigkeit) bei 0° hingestellt wurde. Von der erwärmten Probe wurden von Tag zu Tag kleine Proben herausgenommen, nach dem Abkühlen genau neutralisiert und auf ihre labende Fähigkeit geprüft. Wenn die letztere hinreichend herabgesetzt war, ging ich zu den eigentlichen Versuchen über. Es wurde zu dem Ende einerseits die erwärmte Infusion und andererseits die Kontrollportion in genau derselben Weise mit derselben ⁿ/₁₀-Natronlauge durch sorgfältige Titrierung gegen Lackmus neutralisiert. Die Kontrollinfusion (also die nicht erwärmte) wurde

dann mit destilliertem Wasser (1 : 200 bis 1 : 800 für verschiedene Infusionen) verdünnt, bis sie unter ganz denselben Verhältnissen wie die erwärmte, neutralisierte Infusion die Milch in etwa derselben Zeit wie diese koagulierte. In dieser Weise wurden, dem oben Gesagten entsprechend, die beiden (S. 97) angedeuteten Versuchsflüssigkeiten A und B erhalten.

Bezüglich der Koagulationsversuche mache ich außerdem ausdrücklich darauf aufmerksam, daß sie in allen Serien in genau derselben Weise ausgeführt sind. Zu jedem Versuche wurden je 10 ccm Milch und 2 ccm der zu prüfenden Infusion verwendet. Die angewandte Milch war frische, ein paar Stunden alte Vollmilch. In jedem einzelnen Versuche wurden erst in das zu verwendende Probierröhrchen die genau abgemessenen 2 ccm Enzymlösung eingeführt, danach die abgemessenen 10 ccm Milch auf einmal hineingegossen, das mit einem Kautschuckstopfen sofort verschlossene Röhrchen ein paarmal leise geschüttelt und in das auf 38—40° C. erwärmte Wasserbad hineingestellt. Die zu derselben Versuchsserie gehörigen Proben wurden hierbei möglichst rasch nacheinander angefertigt und in das Wasserbad hineingestellt, wobei für jede Probe die Zeit genau notiert wurde. Da ein Zusatz von Antiseptika auf die Enzymwirkung hätte hemmend einwirken können, wurde jeder Zusatz von solchen absichtlich vermieden.

In der nun beschriebenen Weise verfuhr ich auch in den Koagulationsversuchen bei saurer Reaktion. Anstatt die neutralisierten Versuchslösungen wieder anzusäuern, habe ich es jedoch vorgezogen, die Milch mit einer entsprechenden Menge Salzsäure (gew. 0,4 ‰) zu versetzen, und die saure Milch zu den abgemessenen neutralen Enzymlösungen gefügt. Hierbei wurde immer so verfahren, daß die Säure der Milch gleich vor dem Anfange des Versuches zugesetzt wurde. Durch dies Verfahren, welches unter der genannten Bedingung genau die gleichen Resultate gibt, als wenn man der Milchenzymmischung denselben Säuregrad durch Zusatz von saurer Enzymlösung zu neutraler Milch erteilt, glaube ich für eine und dieselbe Serie größere Genauigkeit erreicht zu haben.

Die eiweißverdauende Kraft der Versuchslösungen wurde

durch Digestionsversuche mit nach Grützner (9) dargestelltem Karminfibrin bei 1⁰/₁₀₀ Salzsäuregehalt angestellt. Ich verfuhr dabei so, daß 1 g des in 1⁰/₁₀₀ Salzsäure aufgequollenen und darauf sorgfältig ausgepreßten Karminfibrins genau abgewogen und darauf in 10 ccm der neutralen Infusion fein verteilt wurde. Durch Zusatz von 10 ccm Salzsäure von 2⁰/₁₀₀ wurde darauf das Ganze auf den Säuregrad 1⁰/₁₀₀ gebracht. Als Maß für die verdauende Kraft habe ich gewöhnlich die zu völliger Auflösung des Fibrins bei Zimmertemperatur erforderliche Zeit benutzt. Zuweilen habe ich jedoch nach einer bestimmten Zeit die in den verschiedenen Proben vorhandenen Farbenintensitäten nach der Grütznerschen Skala verglichen.

Nach dieser Besprechung der Versuchsanordnung lasse ich nun die Versuchsergebnisse folgen, indem ich unten die an 5 verschiedenen Mageninfusionen angestellten Versuche zusammengestellt habe.

Ich erinnere nochmals daran, daß die Versuchslösung A die erwärmte Infusion, die Lösung B dagegen die verdünnte Kontrollprobe bedeutet. Als neutrale Milchkoagulation bezeichne ich der Kürze halber diejenige Versuchsanordnung, wo normale Milch mit einer neutralen Enzymlösung, und als saure Milchkoagulation diejenige, wo die mit Salzsäure angesäuerte Milch ebenfalls mit einer neutralen Infusion versetzt wurde.

Versuch I.

	Lösung A	Lösung B
Neutrale Milchkoagulation . .	370 Minuten	355 Minuten
Saure > . .	6 >	215 >
Pepsinverdauung	3 Stunden	80 Stunden

Versuch II.

	Lösung A	Lösung B
Neutrale Milchkoagulation . .	420 Minuten	360 Minuten
Saure > . .	18 >	250 >
Pepsinverdauung	3—4 Stunden	80 Stunden

Versuch III.

	Lösung A	Lösung B
Neutrale Milchkoagulation . .	300 Minuten	300 Minuten
Saure » . .	5 »	200 »
Pepsinverdauung	2 Stunden	30 Stunden

Versuch IV.

	Lösung A	Lösung B
Neutrale Milchkoagulation . .	300 Minuten	220 Minuten
Saure » . .	10 »	25 »
Pepsinverdauung	2 Stunden	36 Stunden

Versuch V.

	Lösung A	Lösung B
Neutrale Milchkoagulation . .	280 Minuten	300 Minuten
Saure » . .	10 »	45 »
Pepsinverdauung	5 Stunden	75—80 Stunden

Außer diesen mehr vollständigen Versuchsreihen lasse ich auch einige früher ausgeführte Versuche ohne Bestimmung der peptischen Verdauungskraft der Lösungen hier folgen. Die Versuche VI und VII referieren sich zu demselben Saft wie in dem Versuche I, jedoch mit anderen Verdünnungen und anderer Milch.

Versuch VI.

	Lösung A	Lösung B
Neutrale Milchkoagulation . .	300 Minuten	165 Minuten
Saure » . .	8 »	40 »

Versuch VII.

	Lösung A	Lösung B
Neutrale Milchkoagulation . .	250 Minuten	270 Minuten
Saure > . .	8 $\frac{1}{2}$ >	180 >

In sämtlichen hier mitgeteilten und in mehreren anderen Versuchen, deren Wiedergabe hier überflüssig sein dürfte, zeigte es sich nun, wie aus den Zahlen deutlich hervorgeht, daß die Lösung A, trotz derselben¹⁾ oder einer schwächeren Labwirkung als die Lösung B bei neutraler Reaktion, bei saurer Reaktion immer einer weitaus kräftigeren Milchkoagulation fähig war, und ebenfalls eine viel kräftigere Pepsindigestion ausübte.

Gegen diese Resultate wird man vielleicht einwenden, daß die Koagulation bei neutraler Reaktion über einen so langen Zeitraum sich hinausgedehnt hat, daß es dabei nicht um eine Enzymwirkung, sondern um eine durch spontane Säuerung erfolgte Koagulation sich gehandelt hat. Daß dies nicht der Fall ist, davon habe ich mich durch Kontrollversuche überzeugt. Es zeigte sich hierbei, daß sowohl die neutrale wie die mit Salzsäure angesäuerte Milch mit gekochten Enzymlösungen versetzt (unter sonst denselben Versuchsbedingungen wie in den Hauptversuchen), stets erst mehrere Stunden später als die enzymhaltigen Proben gerannen.

Ein zweiter Einwand von großer Bedeutung wäre der, daß bei dem Erhitzen der sauren Infusionen keine Vernichtung des bei neutraler Reaktion labenden Enzymes, sondern statt dessen eine Entstehung von hemmenden Antikörpern stattgefunden hätte. Man könnte sich vorstellen, daß das Pepsin wirklich das die Milch bei neutraler Reaktion koagulierende Enzym wäre und daß infolge des Erhitzens Antikörper sich gebildet hätten, welche nur bei neutraler Reaktion wirksam wären und also weder die Pepsinverdauung noch die Koagulation der angesäuerten Milch verhinderten. Diese Annahme wäre um so

¹⁾ Hierzu rechne ich auch Versuche 5 und 7, wo A unbedeutend kräftiger wirkte.

plausibler, als nach Schwarz⁽¹⁰⁾ durch Erhitzen einer Mageninfusion Antikörper des Pepsins angeblich gebildet werden sollen. Ich sah mich nicht veranlaßt, die Richtigkeit der Schwarzschen Angabe besonders nachzuprüfen, fühlte mich aber verpflichtet, auch dieser Möglichkeit besondere Rechnung zu tragen und dieselbe durch besondere Versuche zu prüfen. Ich teile hier zwei solche Versuche mit.

Versuch VIII: Von einer nicht erwärmten, neutralisierten Mageninfusion wurde eine Portion mit ihrem 8fachen Volumen einer erwärmten (also unbedeutend labenden), nachträglich neutralisierten Mageninfusion, und eine andere Portion mit ihrem 8fachen Volumen einer der erwärmten, neutralisierten Infusion entsprechenden Chlornatriumlösung verdünnt. Sofort nach Bereitung der Lösungen zeigten sie mit normaler Vollmilch in dem Verhältnis 2 : 10 versetzt eine Koagulationszeit von 18 und 14 Minuten respektive. Nach $\frac{1}{2}$ Stunde, bzw. nach 24 Stunden wurden neue Koagulationsversuche mit diesen zwei Lösungen angestellt und die Koagulationszeiten waren fortwährend dieselben.

Versuch IX: Dieser Versuch wurde in ganz derselben Weise wie der vorige, aber mit einer anderen Mageninfusion und einer anderen Milch angestellt. Die Koagulationszeiten betragen für beide Proben sofort nach der Bereitung 11 Minuten und nach 24 Stunden 10 Minuten.

Von einer Antiwirkung bei neutraler Reaktion war also in meinen Versuchen nichts zu sehen, und die Einwendung, daß die Unwirksamkeit der erwärmten, neutralisierten Infusionen durch die Anwesenheit von infolge des Erwärmens entstandenen Antikörpern bedingt sei, kann also als unbegründet zurückgewiesen werden.

Man könnte nun weiter denken, daß das Chymosin doch nicht durch das Erwärmen vernichtet, sondern in eine neue Modifikation umgewandelt worden sei, die bei neutraler Reaktion nicht koagulierend wirkt. Auf diese Möglichkeit werde ich weiter unten zurückkommen.

Für die Beweiskraft der oben beschriebenen Versuche ist es natürlich gleichgültig, ob das Chymosin vernichtet oder

in eine neue Modifikation übergegangen ist. Meine Versuche zeigen nämlich, daß gar kein Parallelismus zwischen der milchkoagulierenden Wirkung bei neutraler Reaktion und der Pepsinverdauung bei saurer Reaktion besteht, und daß folglich verschiedene Enzymwirkungen hierbei stattfinden.

Aus meinen Versuchen glaube ich somit folgenden Schluß ziehen zu können: «Dasjenige Enzym, welches neutrale Milch koaguliert, das Chymosin, kann nicht mit dem Pepsin identisch sein».

Frägt man, durch welches Agens die bei Anwendung einer durch Erwärmen fast chymosinfrei gemachten Infusion bei saurer Reaktion stattfindende Milchgerinnung zustande kommt, so hat man, soweit ich ersehen kann, an drei Möglichkeiten zu denken. Das Chymosin könnte in eine neue, nicht bei neutraler, sondern nur bei saurer Reaktion wirkende Modifikation umgewandelt sein. Es könnte zweitens das Pepsin und endlich drittens ein vorher nicht bekanntes, nur bei saurer Reaktion wirkendes Enzym das wirksame Agens sein. Diese letztgenannte Möglichkeit dürfte jedoch erst dann in Betracht kommen können, wenn die zwei ersteren vollständig ausgeschlossen wären.

Die erste Möglichkeit betreffend ist natürlich zuerst an das Bangsche Parachymosin⁽¹¹⁾ zu denken, welches ebenfalls in neutraler Lösung auf normale Milch unwirksam ist. Es wirkt dagegen nach Zusatz von kleinen Mengen löslicher Kalksalze, und da nun beim Salzsäurezusatz zu der Milch Chlorcalcium sich bilden muß, könnte die Annahme einer Umwandlung des Chymosins in Parachymosin ganz plausibel erscheinen. Das Parachymosin wirkt, wie gesagt, auf neutrale Milch rasch und kräftig nach Zusatz von löslichem Kalksalz und zur Prüfung auf Parachymosin habe ich aus dem Grunde in mehreren Fällen meine erwärmten Infusionen mit Calciumcarbonat statt mit Alkali neutralisiert. Wenn die so neutralisierten Infusionen in dem Verhältnis 1 : 5 mit neutraler Milch gemischt wurden, trat Koagulation bei 38° C. erst nach mehreren Stunden ein. In anderen Fällen, wo ich mit Infusionen arbeitete, die ich mit Natronlauge neutralisiert hatte, wurde die Milch mit Chlorcalcium

bis zu 1⁰/₀₀, eine Menge, die nach Bang die Parachymosinwirkung kräftig befördert, versetzt, aber trotzdem fand auch hier die Koagulation erst nach mehreren Stunden statt. Meine Beobachtungen sprechen also entschieden gegen die Annahme einer Umwandlung des Chymosins in Parachymosin infolge des Erwärmens der sauren Infusionen.

Wenn aber das Chymosin nicht in Parachymosin umgesetzt wird, könnte es vielleicht, wie oben angegeben, in eine andere, nur bei saurer Reaktion wirkende Modifikation sich umgewandelt haben. Diese Möglichkeit, wie auch die Annahme eines etwa vorhandenen, bisher unbekanntes dritten Enzyms in den Mageninfusionen stehen in so naher Beziehung zu der Frage von der Wirkung des Pepsins auf die Milch bei saurer Reaktion, daß sie passend erst, wenn eine Pepsinwirkung ausgeschlossen ist, zum Gegenstand besonderer Untersuchungen gemacht werden dürften.

Wenn das Pepsin die bei der sauren Milchkoagulation wirksame Substanz wäre, hätte man bei den fast chymosin-freien Lösungen, womit ich gearbeitet habe, eine Parallelität zwischen Pepsinverdauung und saurer Milchkoagulation zu erwarten. Aus den Daten der Versuche I—V lassen sich indessen hierüber keine Schlüsse ziehen, indem nämlich zu den verschiedenen Versuchen nicht dieselbe Milch und auch nicht zu allen dasselbe Karminfibrin verwendet wurde. Diese Versuche sind also miteinander nicht völlig vergleichbar. Aus dem Grunde habe ich auch zur Prüfung einer etwa bestehenden Parallelität zwischen Fibrinverdauung und saurer Milchkoagulation Versuche angestellt. Die Anzahl dieser Versuche ist indessen so klein und die Schwierigkeiten ihrer exakten Ausführung so groß, daß ich aus ihnen noch keine bestimmten Schlüsse zu ziehen wage. Ich habe jedenfalls keine sicheren Beweise dafür gefunden, daß das Pepsin die bei der sauren Milchgerinnung bei Abwesenheit von Chymosin wirksame oder allein wirksame Substanz ist. Für meine Hauptaufgabe, den Nachweis der Nichtidentität von Pepsin und Chymosin, ist diese Frage¹⁾ übrigens

¹⁾ Für ihre Lösung ist die später folgende Untersuchung über das chemische Geschehen bei der «sauren Koagulation» von Bedeutung.

von so untergeordneter Bedeutung, daß ich sie bis auf weiteres als unentschieden beiseite lassen kann.

Für das Chymosin wird es bekanntlich als charakteristisch angesehen, daß die Koagulationszeiten bei abnehmender Enzymmenge der letzteren umgekehrt proportional sind, so daß das Produkt von Enzymkonzentration und Koagulationszeit konstant bleibt. Dieses sogenannte Zeitgesetz muß für Kälberlab in dessen Verhalten zu neutraler Milch sowohl für kurze, nur wenige Minuten, wie für längere, mehrere Stunden dauernde Koagulationszeiten als bewiesen angesehen werden.

Wie das Zeitgesetz für das Chymosin bei saurer Reaktion sich verhält, ist meines Wissens nach bis jetzt nicht untersucht worden. Dies ist ja auch eine schwierige Aufgabe, indem sie mit Notwendigkeit die Reindarstellung des Chymosins erfordert. Das bei saurer Reaktion wirksame Enzym oder Gemenge von Enzymen in den Mageninfusionen läßt sich in dieser Richtung viel leichter untersuchen, indem es durch Erhitzung vom typischen Chymosin befreit werden kann. Ich habe nun einige Versuche mit erwärmten Mageninfusionen angestellt, um einen Einblick in ihr Wirkungsgesetz zu gewinnen. Die Versuchsanordnung war die oben S. 99 beschriebene, indem die Koagulationszeit für 10 ccm Milch und 2 ccm Enzymmischung bei 38—40° C. bestimmt wurde. Um die Verhältnisse möglichst gleich zu machen, wurden statt Wasser gekochte, neutrale Mageninfusionen als Verdünnungsflüssigkeit verwendet.

Versuch X.

Milch mit 0,3‰ Salzsäure ccm	Erwärmte und dann neutralisierte Infusion ccm	Gekochte (neutrale) Infusion ccm	Enzym- konzentration = c	Koagulations- zeit = t	c t
10	2	0	1	23 Minuten	23 = 1
10	1	1	0,5	135	67 = 3
10	0,5	1,5	0,25	unbestimmbar	—

Versuch XI.

Milch mit 0,4‰ Salzsäure ccm	Erwärmt und dann neutralisierte Infusion ccm	Gekochte, neutrale Infusion ccm	Enzym- konzentration = c	Koagulations- zeit = t	c t
10	2	0	1	9½ Min.	9½ = 1
10	1	1	0,5	35 >	17½ = 2
10	0,5	1,5	0,25	ca. 300 >	75 = 8

Diese zwei Versuche zeigen also, daß das für Chymosin bei neutraler Reaktion gültige Zeitgesetz für das die angesäuerte Milch koagulierende Agens, dies sei nun Pepsin, modifiziertes Chymosin oder ein neues Enzym, gar nicht Gültigkeit hat.

Da das Gesetz für das reine Chymosin bei saurer Reaktion nicht bekannt ist, und da man nicht weiß, ob die erwärmten sauren Infusionen nur ein Enzym oder ein Gemenge von mehreren enthält, sind jedoch Versuche dieser Art von weniger Interesse und deshalb sind sie auch hier nur mehr beiläufig angeführt worden.

Nachdem ich in dem vorigen gezeigt habe, daß das Chymosin und Pepsin nicht identische Enzyme sind, und daß bei saurer Reaktion neben dem Chymosin auch ein zweites Enzym (beziehungsweise Enzymgemenge) milchkoagulierend wirkt, welches jedenfalls anderen Wirkungsgesetzen als das Chymosin bei neutraler Reaktion gehorcht, bleibt mir nur noch übrig, auf ein paar praktische Folgerungen die Aufmerksamkeit zu lenken.

Es ist von verschiedenen Forschern, so z. B. von Becker⁽¹²⁾ vorgeschlagen worden, die Empfindlichkeit der Chymosinprobe durch Zusatz von Salzsäure (und zwar 2 ccm Normal-HCl auf 100 ccm Milch, d. h. 0,7‰) zu der Milch zu erhöhen. Dies Verfahren ist natürlich für alle Untersuchungen, in welchen es um eine besondere Prüfung auf Lab sich handelt, ganz wertlos, indem man dann, wie oben gezeigt, die Gesamtwirkung mindestens zweier verschiedener Enzyme bekommt.

Wenn die Koagulationsprobe bei saurer Reaktion, z. B. einfach für klinische diagnostische Zwecke verwendet wird, um die

Anwesenheit von Magenenzymen überhaupt nachzuweisen, so ist sie allerdings nicht ohne Wert, aber man muß ausdrücklich darauf aufmerksam sein, daß durch die Anwesenheit der Säure die Koagulationsfähigkeit ungemein gesteigert wird und dadurch zu der Annahme gar zu großer Enzymmengen leicht Anlaß geben kann.

Um zu zeigen, in welchem hohen Grade sogar sehr kleine Säuremengen die Koagulation der Milch beschleunigen können, führe ich hier als Beispiele die folgenden 2 Versuche an, die ich mit erwärmten und darauf neutralisierten Infusionen angestellt habe. Die Versuchstabellen dürften ohne weiteres leicht verständlich sein.

Versuch XII.

Milch ccm	1%ige Salzsäure ccm	Wasser ccm	Enzym- lösung ccm	Berechnete Salzsäure in der Mischung ‰	Koagulations- zeit in Minuten
9	0,5	0,5	2	ca. 0,42	3½
9	0,4	0,6	2	> 0,33	5
9	0,3	0,7	2	> 0,25	10
9	0,2	0,8	2	> 0,17	42
9	0,1	0,9	2	> 0,08	280
9	0,0	1,0	2	> 0,00	unbestimmbar

Versuch XIII.

Milch ccm	1%ige Salzsäure ccm	Wasser ccm	Enzym- lösung ccm	Berechnete Salzsäure in der Mischung ‰	Koagulations- zeit in Minuten
9	0,5	0,5	2	ca. 0,42	ca. 2½
9	0,4	0,6	2	> 0,33	> 3
9	0,3	0,7	2	> 0,25	> 4½
9	0,2	0,8	2	> 0,17	9
9	0,1	0,9	2	> 0,08	75
9	0,0	1,0	2	> 0,00	300

Man ersieht aus diesen Tabellen, daß schon ein Gehalt von 0,1 bis 0,2‰ Salzsäure in dem Gemenge die Enzym-

wirkung höchst bedeutend beschleunigt — selbstverständlich in wechselndem Grade bei Anwendung verschiedener Milch und verschiedenen Enzymlösungen. In meinen Versuchen habe ich nie mehr als bis zu 0,4⁰/₁₀₀ HCl verwendet, eine Menge, welche sehr kräftig wirkt, und es ist also leicht ersichtlich, zu welchen fehlerhaften Schlüssen bezüglich der Enzymmenge man bei klinischen Untersuchungen kommen kann, wenn man den hier besprochenen Verhältnissen nicht gebührende Rechnung trägt und mit angesäuerten Milchgemengen arbeitet.

Literatur.

1. Nencki und Sieber, Beiträge zur Kenntnis des Magensaftes und der chemischen Zusammensetzung der Enzyme, Diese Zeitschrift, Bd. XXXII, 1901, S. 291.

2. Pekelharing, Mitteilungen über Pepsin, Diese Zeitschrift, Bd. XXXV, 1902, S. 8.

3. Pawlow und Parastschuk, Über die ein und demselben Eiweißfermente zukommende proteolytische und milchkoagulierende Wirkung verschiedener Verdauungssäfte, Diese Zeitschrift, Bd. XLII, 1904, S. 415.

4. J. Bang, Sind die proteolytischen und milchkoagulierenden Fermentwirkungen verschiedene Eigenschaften eines und desselben Fermentes? Diese Zeitschrift, Bd. XLIII, 1905, S. 358.

5. P. Schrumpf, Darstellung des Pepsinfermentes aus Magenpreßsaft, Hofmeisters Beiträge, Bd. VI, 1905, S. 396.

6. J. C. Hemmeter, Are the proteolytic and milk coagulating effects of gastric and pancreatic juice due to one and the same enzyme? Berliner klinische Wochenschr., Festnummer für C. A. Ewald, 1905, S. 14.

7. W. Sawjalow, Zur Frage nach der Identität von Pepsin und Chymosin. Diese Zeitschrift, Bd. XLVI, 1905, S. 307.

8. O. Hammarsten, Om mjölkystningen och de dervid verksamma fermenterna i magslemhinnan. Upsala Läkaref. Forh., Bd. VIII, 1872, S. 63. Unter dem Titel: Über die Milchgerinnung und die dabei wirkenden Fermente der Magenschleimhaut als Autoreferat in Maly, Bd. II, 1872, S. 118.

9. P. Grützner, Neue Untersuchungen über die Bildung und Ausscheidung des Pepsins. Habilitationsschr., Breslau 1875.

10. Osw. Schwarz, Zur Kenntnis der Antipepsine, Hofmeisters Beitr., Bd. VI, 1905, S. 524.

11. J. Bang, Über Parachymosin, ein neues Labferment, Pflügers Archiv, Bd. LXXIX, 1900, S. 425.

12. G. Becker, Untersuchungen über das Zeitgesetz des menschlichen Labfermentes und dessen quantitative Bestimmung, Hofmeisters Beiträge, Bd. VII, 1905, S. 89.