

Pepsin und Chymosin.

Von

J. W. A. Gewin.

(Aus dem physiologischen Laboratorium der Universität Utrecht.)

(Der Redaktion zugegangen am 2. November 1907.)

Schon in seiner ersten Arbeit über die Milchgerinnung¹⁾ hat Hammarsten die Frage, ob Lab und Pepsin als zwei verschiedene Enzyme zu betrachten sind, bejahend beantwortet. Er untersuchte Extrakte von Magenschleimhäuten von Säugtieren und kam zu dem Schluß, daß daraus Lösungen erhalten werden konnten, welche Milchgerinnung nicht hervorgerufen konnten, sondern wohl, bei saurerer Reaktion, Eiweiß zu verdauen imstande waren, daß also Pepsin vom Chymosin getrennt werden konnte.

Inzwischen wurden mehrere alte und neue Erfahrungen ans Licht gebracht, aus welchen hervorging, daß Milch, bei neutraler Reaktion, nicht nur mittels eines von der Magenschleimhaut herrührenden Enzyms, sondern auch mittels Pankreassaftes, ja mittels verschiedener Bestandteile von tierischen und sogar von pflanzlichen Organen gelabt werden kann. Es stellte sich heraus, daß überall, wo proteolytische Wirkung gefunden wird, auch bei Bakterien, soweit dieselben darauf untersucht sind, Labwirkung nachgewiesen werden kann.²⁾ Dieses Zusammengehen drängte zu einer erneuten Erforschung der Frage, ob nicht beide Wirkungen an eine und dieselbe Substanz gebunden sein dürften.

¹⁾ Über die Milchgerinnung und die dabei wirkenden Fermente. Ref. in Malys Jahresber., 1872, S. 118.

²⁾ Van der Leek. Zentralblatt f. Bakteriologie, II, 2. Abt., Bd. XVII. S. 370.

Bei seinen Untersuchungen über Pepsin kam Pekelharing¹⁾ zu dem, in bezug auf Hammarstens Mitteilungen überraschenden Befund, daß Pepsin, auch nach lange dauernder Digestion mit Salzsäure und nach sorgfältiger Reinigung, imstande ist, bei neutraler Reaktion Milch zur Gerinnung zu bringen.

Nencki und Sieber²⁾ bestätigten diesen Befund und stellten die Hypothese auf, daß das Pepsin als ein Riesemolekül zu betrachten sei, mit Seitenketten, deren eine, bei saurerer Reaktion, Hydrolyse von Eiweiß, eine andere, bei neutraler Reaktion, Gerinnung von Milch veranlassen könnte — eine Auffassung, welcher Pekelharing sich in einer späteren Mitteilung³⁾ anschloß.

Pawlow und Parastschuk⁴⁾ gingen weiter und betrachteten die Eiweißverdauung und die Käsebildung nicht als von verschiedenen Atomgruppen, sondern als von einer und derselben Substanz, unter verschiedenen Bedingungen wirkend, verursacht. Sawjalow⁵⁾ ging noch einen Schritt weiter und glaubte die Bildung von Paracasein aus Casein als einen speziellen Fall von Eiweißverdauung betrachten zu dürfen.

Die Anhänger der Dualität waren dadurch aber nicht überzeugt. Von Schmidt-Nielsen⁶⁾ wurde die alte Auffassung energisch verteidigt und Bang⁷⁾ glaubte sogar, neben Pepsin und Chymosin noch ein anderes labendes Enzym, Parachymosin, nachweisen zu können.

Es wäre nicht undenkbar, daß die Verschiedenheit der Ansichten, wenigstens teilweise, aus den verschiedenartigen für die Versuche gebrauchten Enzymlösungen zu erklären sein würde.

Daß beigemischte Stoffe, Verunreinigungen, auf die Enzymwirkung großen Einfluß haben können, ist von Pawlow und Parastschuk schon nachgewiesen worden, indem sie zeigten,

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXII, S. 233.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXII, S. 291.

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXV, S. 8.

⁴⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLII, S. 415.

⁵⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLVI, S. 307.

⁶⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLVIII, S. 92.

⁷⁾ Pflügers Archiv, Bd. LXXIX, S. 425.

daß Handelspräparate von Lab, welche, mit Salzsäure versetzt, Eiweiß gar nicht verdauten, sobald sie nur von gewissen Beimischungen in irgend einer Weise befreit waren, kräftig proteolytisch wirksam wurden. Da die schwedischen Forscher mit Enzymlösungen, welche sicher viele Beimischungen enthielten — Magenschleimhautextrakte, Handelslab — gearbeitet haben, könnten vielleicht ihre Ergebnisse von den Verunreinigungen beeinflußt sein.

Dasselbe gilt von den Befunden Glässners, nach welchen es möglich wäre, durch Behandlung von Magenschleimhautauszügen mit Uranylacetat und Natriumphosphat, Chymosin und Pepsin zu trennen.¹⁾ Daß die von Glässner in dieser Weise bereitete Lablösung keine Pepsinwirkung zeigte, konnte, wie Pawlow und Parastschuk bemerkten, der Verunreinigung mit Natriumacetat zugeschrieben werden. Die Richtigkeit dieses Einwandes wurde von Pekelharing²⁾ bewiesen, der der Glässnerschen Methode folgte, nur mit dieser Änderung, daß das Filtrat vom Uranylphosphat einige Zeit gegen verdünnte Salzsäure dialysiert wurde; dann trat die proteolytische Wirkung ebenso kräftig hervor, als die labende. Auch fand Pekelharing, im Gegensatz zu Glässner, daß aus dem Pylorusteil der Magenschleimhaut des Schweines eine Enzymlösung zu erhalten ist, deren labendes Vermögen dem proteolytischen parallel geht.

Auch Van der Leck,³⁾ der die Dualität befürwortet, stützt seine Meinung auf Versuche mit ungereinigten Handelspräparaten von Lab und Pepsin und mit Auszügen von Kalbsmagenschleimhaut, welche einesteils mit viel Kochsalz, andern-teils mit allerhand in Salzsäure löslichen Bestandteilen der Schleimhaut verunreinigt waren.

Schrumpf⁴⁾ teilt mit, aus Magenpreßsaft eine sehr wirksame Pepsinlösung ohne Labwirkung hergestellt zu haben, und fügt hinzu, daß «die Vermutung, daß im vorliegenden Fall die

¹⁾ Hofmeisters Beiträge, Bd. I, S. 3.

²⁾ Arch. d. Sciences biol., T. XI, Suppl. p. 36.

³⁾ l. c.

⁴⁾ Hofmeisters Beiträge, Bd. VI, S. 396.

Labwirkung durch einen fremden Zusatz verdeckt war, im Hinblick auf die Darstellung kaum festgehalten werden kann. Man muß zugeben, daß in diesem Fall Verunreinigung in größerer Menge nicht anwesend sein konnte. Der Preßsaft war erst durch ein Chamberlandfilter geschickt, dann 24 Stunden gegen fließendes Wasser dialysiert und darauf mit alkoholisch-ätherischer Cholesterinlösung gefällt. Der Niederschlag wurde in Wasser suspendiert und das Cholesterin durch Ausschütteln mit Äther entfernt. Schließlich wurde die Lösung durch eine Kitasato-kerze filtriert.

Dennoch scheint mir der Befund Schrumpfs nicht beweiskräftig. Erstens war die Labwirkung in drei von den vier mitgeteilten Fällen neben der proteolytischen vorhanden. Und zweitens liegt der Verdacht nahe, daß irgend eine, wenngleich in geringfügiger Menge vorhandene Beimischung einen störenden Einfluß gehabt hat, nachdem mitgeteilt wird, daß die Enzymlösungen nach 3—4 Stunden immer völlig unwirksam geworden waren, während doch Pepsinlösungen, auch so gut gereinigte, daß sie bei genügender Verdünnung die Eiweißreaktionen nicht mehr erkennen lassen, bei Zimmertemperatur und saurer Reaktion aufbewahrt, die proteolytische und die labende Wirkung lange Zeit behalten. Vielleicht hat der Äther, der für Pepsin sehr schädlich ist, einen nachteiligen Einfluß auf die Labung geübt. Jedenfalls scheint es mir nicht gerechtfertigt, aus dem Befund, daß es in vier Versuchen mit einer außergewöhnlich schlecht haltbaren Enzymlösung einmal vorkam, daß Labwirkung nicht beobachtet werden konnte, während Proteolyse gut hervortrat, zu schließen, daß es gelungen sei, Chymosin von Pepsin zu trennen.

Auch die von Hemmeter¹⁾ angeführten Gründe scheinen mir nicht hinreichend, um darauf einen Unterschied zwischen Pepsin und Chymosin anzunehmen. Hemmeter untersuchte bei einigen Kranken den Mageninhalt nach einer Probemahlzeit und fand, daß beim Aufbewahren, viele Tage lang, das proteolytische und das labende Vermögen zwar beide abnahmen, aber nicht mit genau derselben Geschwindigkeit. Bei einem

¹⁾ Berl. klin. Wochenschr., 1905, Festnummer C. A. Ewald gew., S. 14.

gesunden Individuum fand er Milch, nach einem Verbleib von $1\frac{1}{3}$ Stunden im Magen, unverändert. Nach Zusatz von Calciumcarbonat gerann diese Milch erst in drei Stunden. Bei derselben Person zeigte, nach einer Ewaldschen Probemahlzeit, der filtrierte Magensaft eine schwache proteolytische Wirkung. — Ein genauer Parallelismus von Pepsin und Chymosinwirkung wäre bei Hemmeters Versuchsanordnung, wie ich glaube, kaum zu erwarten.

Ich habe versucht, die Frage in Angriff zu nehmen mit besonderer Rücksicht auf den Einfluß von Verunreinigungen in der Enzymlösung.

Erstens habe ich das Enzym gebraucht, aus Schweinsmagenschleimhaut nach der von Pekelharing angegebenen Methode bereitet. Für jede Bereitung wurden 10 Magenschleimhäute verwendet. Aus dem, durch 5tägiges Digerieren, erhaltenen Infus wurde die erste Portion des Enzyms einfach durch Dialyse, die zweite mittels ammoniakalischer Bleiessiglösung und Oxalsäure, die dritte mittels Ammonsulfat bereitet. Nachdem ein Unterschied zwischen diesen drei Portionen nach gehöriger Reinigung nicht zu bemerken ist, habe ich dieselben, in der Absicht, über größere Mengen von Enzym verfügen zu können, in 0,2%iger HCl gelöst, vereinigt. Solche Lösungen halten sich, bei kühler Temperatur aufbewahrt, lange Zeit recht gut. Das in dieser Weise bereitete Enzym ist, wie Pekelharing hervorgehoben hat, nicht rein; es ist nicht farblos und enthält das eine Mal mehr, das andere weniger Phosphor. Die Verunreinigungen des ursprünglichen Mageninfuses sind doch aber bis auf sehr kleine Reste entfernt.

Anders ist es bei der Bereitung des Enzyms aus der Kalbsmagenschleimhaut. Hier stößt man immer auf eine schleimige Substanz, welche bei der Dialyse sich mit dem Enzym ausscheidet und sich bei 39° C. in Salzsäure teilweise wieder löst. Sie macht das Filtrieren sehr schwierig, mitunter sogar unmöglich. Auch ist das Filtrat beinahe niemals völlig klar. Gewöhnlich aber, obgleich nicht immer, gelang es mir, folgendermaßen ein klares Filtrat zu erhalten. Der Niederschlag aus den Dialysatoren wurde in eine nicht zu große Menge 0,2%iger HCl

gebracht. Durch kräftiges Umrühren bildete sich eine dünn-schleimige Flüssigkeit, welche, unter öfterem Rühren 1 Stunde lang auf 37° C. gehalten und dann in eine kühle Umgebung gebracht wurde.

Nach 24 Stunden hatte die Flüssigkeit sich geklärt, indem sich ein Niederschlag abgesetzt hatte, dessen obere Schicht viel leichter gefärbt war als die untere. Jetzt war, durch Erwärmen bis auf 39° C., die obere Schicht, nötigenfalls unter Zusatz von mehr Salzsäure, leicht zur Lösung zu bringen, während die untere, eine zähe Masse bildende Schicht sich so gut wie gar nicht löste und gut abfiltriert werden konnte. Bei der Dialyse dieses Filtrates setzte das Enzym sich wieder als ein, nicht als bei der Bereitung aus Schweinsmagen körniger, sondern schleimiger, dem Dialysator anhaftender Niederschlag ab, löste sich aber leicht und klar in Salzsäure.

Das aus Kalbsmagen bereitete Enzym ist also immer wohl mehr verunreinigt als das aus Schweinsmagen erhaltene. Hier war auch aus der mit Oxalsäure behandelten, dialysierten und zentrifugierten Lösung mittels Ammonsulfat kein gut filtrierbares Enzym mehr abzuscheiden.

Bang gebrauchte nicht mit Salzsäure digerierte Infuse von Kalbsmagenschleimhäuten, sondern bei Zimmertemperatur bereitete Extrakte. Ich erhielt aber damit keine besseren Resultate. Gut zerkleinerte Schleimhäute wurden in 0,4%ige HCl gebracht. Nach einigen Stunden erhielt ich durch Absaugen ein klares, sehr wirksames Filtrat, aus welchem aber, bei der Dialyse, das Enzym sich als ein ebenso schleimiger und klebriger Niederschlag ausschied, wie aus den bei Körpertemperatur hergestellten Infusen.

Auch habe ich versucht, ob durch Auspressen erhaltenes Enzym sich vielleicht besser reinigen ließ. 320 g zerhackte Kalbsmagenschleimhaut wurde mit Kieselguhr und Sand zerrieben, mit 160 ccm 0,2%iger HCl vermischt und in der Buchnerschen Presse bei 250 Atmosphären ausgepreßt. Es wurden 250 ccm nach Filtration ganz klarer Saft erhalten, mit einer Acidität von 0,058% HCl. Dieser Saft besaß kräftig labendes, aber kaum peptisches Vermögen. Hier konnte also

darán gedacht werden, daß nur Chymosin, aber kein oder beinahe kein Pepsin in den Preßsaft übergegangen war. Dann mußte das Pepsin in dem Preßrückstand zurückgeblieben sein. Deshalb wurde dieser Rückstand in 0,5%ige HCl verteilt, auf Körpertemperatur digeriert und nach 3 Tagen filtriert. Sowohl die proteolytische als die labende Wirkung des klaren Filtrates war sehr schwach. Ein zweiter Versuch, wobei der Schleimhautbrei vor dem Auspressen mit 0,5%iger statt mit 0,2%iger HCl verrieben wurde, um sicher zu sein, daß alles Propepsin in Pepsin umgesetzt wurde, lieferte denselben Erfolg.

Aus der Unfähigkeit des kräftig labenden Preßsaftes Eiweiß zu verdauen darf nicht gefolgert werden, daß hier Pepsin vom Chymosin getrennt war, denn es ließ sich nachweisen, daß der Preßsaft Antipepsin enthielt. Mit Mettschen Röhren wurde die Proteolyse bestimmt, 1. des ohne nennenswerte Verdünnung auf 0,2%iger HCl angesäuerten, 2. des mit 4 Volumen 0,2%iger HCl verdünnten Preßsaftes. Im ersten Fall wurden in 24 Stunden 0,4 mm, im zweiten 2,4 mm verdaut.

Auch der folgende Versuch war beweisend. Von einer sehr wirksamen Kalbsenzymlösung wurde je 1 ccm verdünnt **a** mit 9 ccm 0,2%iger HCl, **b** mit 9 ccm auf 0,2%ige HCl angesäuertem Preßsaft. Beide Portionen wurden mit Mettschen Röhren digeriert. Nach 20 Stunden hatte **a** 8,8 mm, **b** 0,6 mm verdaut.

Daß ich den Preßsaft kräftig labend fand, spricht nicht gegen die Meinung Sawjaloffs, nach welcher auch die Chymosinwirkung von Antipepsin gehemmt wird, sondern ist aus meiner sogleich zu beschreibenden Versuchsanordnung zu erklären, bei welcher die Enzymlösung mit ihrem fünffachen Volumen Milch verdünnt wurde.

In dem Gehalt an Antipepsin fand ich Ursache genug, um den Preßsaft der Magenschleimhaut für meine Versuche nicht zu gebrauchen. Nur will ich hier die Bemerkung einschalten, daß ich den Befund von Pawlow und Paratschuk, in bezug auf das Vorkommen von Pepsinwirkung hemmenden Stoffen in Handelslab, habe bestätigen können.

Ich untersuchte zwei Präparate, ein holländisches, von

Van Hasselt und ein dänisches, von Hansen. Beide sind ganz oder nahezu neutral, wirken kräftig labend, verdauen aber angesäuert Eiweiß so gut wie gar nicht. Dialyse ist imstande, die hemmenden Stoffe teilweise wegzuschaffen, viel besser als beim Magenpreßsaft, der durch Dialyse gegen 0,2%ige HCl zwar einige, aber doch unbedeutende proteolytische Wirkung erhielt. So fand ich z. B. bei Lab von Hansen, das gar kein Eiweiß verdaute, nach Dialyse, erst 2 Tage gegen fließendes Wasser und dann 5 Tage gegen wiederholt erneuerte 0,2%ige Salzsäure, mit Mettschen Röhrchen eine Verdauung von 3,2 mm in 24 Stunden. Noch bessere Resultate erhielt ich folgenderweise. Die Lablösung wurde 24 Stunden gegen fließendes Wasser dialysiert und dann mit verdünnter Essigsäure versetzt, wodurch ein Niederschlag entstand, welcher abzentrifugiert und in 0,2%iger HCl gelöst wurde. Durch passendes Verdünnen mit 0,2%iger HCl wurde eine Lösung hergestellt, welche neutralisiert das gleiche labende Vermögen besaß als das ursprüngliche Präparat. Diese Lösung verdaute jetzt 2,1 mm in 5 Stunden. Die (nicht verdünnte) Lösung des Essigsäureniederschlags in 0,2%iger HCl wurde gegen destilliertes Wasser dialysiert. Am folgenden Tage hatte sich im Dialysator ein Niederschlag gebildet, welcher in Salzsäure gelöst, und soweit mit 0,2%iger HCl verdünnt, daß die neutralisierte Lösung wieder das ursprüngliche labende Vermögen besaß, in 5 Stunden 2,3 mm Eiweiß löste. Sowohl aus Van Hasselts sowie aus Hansens Lab ist also, wenn gleich sie, so wie sie im Handel geliefert werden, peptisch unwirksam sind; ein Enzym zu bereiten, das in Wirkung und in Löslichkeit von Pepsin nicht zu unterscheiden ist.

Für die Bestimmung der Proteolyse wurden die nach Mett mit geronnenem Hühnereiweiß gefüllten Röhrchen immer in großer Zahl hergestellt, sorgfältig ausgesucht zur Entfernung von Luftblasen enthaltenden Röhrchen, und alle zusammen in einer geschlossenen Flasche mit 0,2%iger HCl, unter Zusatz von einem Thymolkrystall aufbewahrt. Für jeden Versuch wurden je zwei Röhrchen mit ausgeglühter Pinzette der Flasche entnommen, mit genau 10 ccm der zu untersuchenden, auf 0,2% Salzsäuregehalt gebrachten Enzymlösung in eine kleine, gut ge-

reinihte Petrischale gebracht und bei 37° C. digeriert. Meistens dauerte die Verdauung 5 Stunden. Die Länge der gelösten Eiweißsäulchen wurde unter dem Mikroskop bei schwacher Vergrößerung mit dem Okularmikrometer gemessen.

Von der Schütz-Borissowschen Regel fand ich nur dann Abweichungen, wenn bei hoher Konzentration die Enzymlösung lange Zeit, oder bei sehr geringem Gehalt an Pepsin kurze Zeit digerierte. Zum Beispiel: Reiner Hundemagensaft wurde unverdünnt, zweimal und viermal mit Salzsäure von einer dem Magensaft entsprechenden Konzentration verdünnt digeriert. Ich fand folgendes. Die Zahlen geben die Quadrate der verdauten Millimeter Eiweiß.

	unverdünnt	2 \times verd.	4 \times verd.
Nach 5 Stunden	1,2	0,64	0,16
» 22 »	22	15,2	7,3

In 5 Stunden hat also die 4 mal verdünnte, nach 22 Stunden die unverdünnte Lösung zu wenig verdaut.

Zur Labbestimmung habe ich abgerahmte Milch gebraucht. jeden Tag frisch aus einer größeren Molkerei bezogen, wo die Milch von einer großen Zahl von Kühen gemischt wurde. Täglich wurde die Gerinnungsfähigkeit dieser Milch mit Van Hasselts Lab, einem sehr lange Zeit konstant bleibenden Präparat, kontrolliert. Dabei fand ich nur sehr geringe Abweichungen. Eine Mischung von 2 ccm 10 mal mit Wasser verdünntem Lab mit 8 ccm Milch brauchte zur Gerinnung immer 30—40 Sekunden, gewöhnlich 35. Spontane Gerinnung kam nur vor, wenn die Milch über Nacht bei Körpertemperatur aufbewahrt wurde, niemals innerhalb 7 Stunden, die längste Zeit, die meine Versuche über Labgerinnung in Anspruch nahmen. Für die Bestimmung wurden in einem Proberöhrchen 8 ccm Milch genau abgemessen in ein Wasserbad bei 37° gestellt. Ein anderes Röhrchen mit 2 ccm Enzymlösung wurde in dasselbe Wasserbad gestellt. Sobald die beiden Röhrchen die Temperatur des Wassers erreicht hatten, wurde die Milch in die Enzymlösung gegossen. Die Mischung wurde im Wasserbad auf Temperatur gehalten, und dann und wann einen kurzen Augenblick daraus entfernt zur Beobachtung, ob Gerinnung eingetreten war. In

dieser Weise konnte die Gerinnungszeit, wenn diese nur nicht kürzer war als 5 Sekunden, mit genügender Genauigkeit bestimmt werden.

Ich habe neutrale und saure Enzymlösungen untersucht. Die Neutralisation fand statt mit $n/10$ -Natronlauge, unter fortwährendem Schütteln der Flüssigkeit, mit Lackmus- oder Lackmoidpapier als Indikator; oder durch Zusatz von fein zerriebenen CaCO_3 in geringem Überschuß zu den schon abgemessenen und in das Proberöhrchen gefüllten 2 ccm Enzymlösung. Ich zog das dem Neutralisieren einer größeren Menge der Enzymlösung mit CaCO_3 vor, da dann vor dem Abmessen filtriert werden mußte und ich bald bemerkte, daß die Enzymwirkung nach dem Neutralisieren geringer wird. Zeitverlust mußte deshalb vermieden werden. Bei der Neutralisation mit Lauge konnte sogleich ein Teil zur Prüfung abgemessen werden und fiel also diese Fehlerquelle fort.

Bei den Gerinnungsversuchen mit saurer Enzymlösung wurde durch Verdünnen mit Wasser die Acidität der Flüssigkeit auf 0,1 % HCl gebracht. Die Milchenzymmischung enthielt also 0,02 % HCl, wovon keine Caseinfällung hervorgerufen wird.

Ich werde jetzt erstens meine Befunde mitteilen in bezug auf den von Bang angegebenen Unterschied zwischen Chymosin und Parachymosin.

Bang fand, im Anschluß an eine von Thunberg gemachte Beobachtung, daß eine kräftig wirksame Pepsinlösung, wovon 1 ccm mit $n/10$ -Alkali neutralisiert, 10 ccm Milch sogleich gerinnen machte, nach 96 stündiger Digestion keine Gerinnung mehr verursachen konnte, wenn sie mit Alkali neutralisiert war; bei Neutralisation mit CaCO_3 aber gerann die Milch noch sofort und erst nach 11 tägiger Digestion war das Labungsvermögen auch nach Neutralisieren mit CaCO_3 verschwunden. Dieser Befund stimmte nicht mit der Beobachtung Hammarstens, nach welcher eine Lablösung durch 24—48 stündige Digestion mit Salzsäure ihre Wirksamkeit ganz verliert.

Zum Vergleich wiederholte Bang den Versuch mit einem Handelslabpräparat und mit einem Auszug aus Kalbsmagenschleimhaut. Jetzt fand er die Labwirkung sowohl bei Neu-

tralisation mit CaCO_3 als mit Alkali nach 24—48 Stunden völlig verschwunden.

Dieser Unterschied veranlaßte Bang, zwei besondere Enzyme, Pepsinlab und gewöhnliches Lab, anzunehmen. «Es hat sich», so folgert er,¹⁾ «auch in der Tat herausgestellt, daß das Pepsinlab ein von dem gewöhnlichen verschiedenes Labferment ist. Dies neue Labferment bezeichne ich mit dem Namen Parachymosin.»

Daß das Chymosin, wie Bang in Übereinstimmung mit Hammarsten fand, durch 24—48stündige Digestion in salzsaurer Lösung ganz zerstört wird, habe ich ebenso wie Fuld²⁾ nicht bestätigen können. Im Gegenteil, ich habe mich öfters davon überzeugen können, daß eine Kalbsenzymlösung in 0,2%iger HCl gewöhnlich viel länger digeriert werden muß, bevor sie, nach Neutralisation mit Alkali, unwirksam wird. Falls mit CaCO_3 neutralisiert wird, kann man, wie Bang es für das Parachymosin fand, noch viel länger Gerinnung beobachten, wie aus dem folgenden Beispiel hervorgeht. Zerkleinerte Kalbsmagenschleimhaut wurde mit HCl 0,5% 37 Stunden digeriert. Dann wurde durch zusammengepreßten Brei von Filtrierpapier abgesogen und das klare Filtrat weiter bei 37° C. digeriert. Von Zeit zu Zeit wurden Proben genommen, mit $\frac{n}{10}$ -NaHO neutralisiert und mit Wasser auf das Doppelte des ursprünglichen Volumens gebracht. Von jeder Probe wurden 2 ccm in der oben beschriebenen Weise mit 8 ccm Milch gemischt. Einmal wurde eine Probe genommen von 1 ccm, mit 1 ccm Wasser verdünnt und mit CaCO_3 neutralisiert. Das Resultat war:

Stunden nach Ablauf der Filtration:	0	46	114	210	236	
Neutralisiert mit:		NaHO	NaHO	NaHO	NaHO	CaCO_3
Gerinnungszeit in Minuten:		2 $\frac{3}{4}$	15 $\frac{1}{2}$	66	75	>180 3 $\frac{1}{2}$

Nach 210 stündiger Digestion, also noch Gerinnung in 75 Minuten, und erst nach 236 Stunden war beim Neutralisieren mit NaHO die Gerinnungszeit nicht gut mehr zu bestimmen, während bei Neutralisation mit CaCO_3 die Labung noch in 3 $\frac{1}{2}$ Minuten stattfand.

¹⁾ Pflügers Archiv, Bd. LXXIX, S. 427.

²⁾ Ergebnisse d. Physiol., Jahrg. I, Abt. I, S. 479.

Daß auch meine gereinigten Kalbsenzympräparate bei Digestion in salzsaurer Lösung nicht in ein paar Tagen unwirksam werden, geht aus den in Tabelle I erwähnten Versuchen hervor. Erst in 9 Tagen war die Gerinnungszeit von $2\frac{5}{12}$ Minuten auf 45 Minuten angestiegen, während sie bei Neutralisation mit CaCO_3 am 9ten Tage nur 110 Sekunden betrug. In der in Tabelle III angeführten Versuchsreihe stieg die Gerinnungszeit in 5 Tagen von $1\frac{5}{6}$ Minuten auf mehr als 2 Stunden an und rief dieselbe Enzymmenge mit CaCO_3 neutralisiert in 5 Minuten Gerinnung hervor.

Die Beobachtungszeit muß aber nicht allzu kurz genommen werden — in Bangs Versuchen ging sie nicht weiter als 1 Stunde —, zumal weil bei schwacher Wirkung die Gerinnungszeit öfters länger ist, als der Konzentration entspricht.

Zur Unterscheidung von Chymosin und Parachymosin gibt Bang vier Merkmale an, erstens das ungleiche Verhalten beim Verdünnen, zweitens bei Zusatz von CaCl_2 , drittens die verschiedene Resistenz gegen Erhitzen und viertens gegen Alkali.

Bei Kalbs- und Schweinsenzymlösungen habe ich diese Merkmale wiederholt untersucht; die Resultate folgen hier.

Das von Soxhlet für Chymosin festgestellte, sogenannte Zeitgesetz habe ich bestätigt gefunden unter dieser Bedingung, daß die Verdünnung nicht zu weit geht. Dann fand ich in zweifacher Hinsicht eine Abweichung: erstens fand ich oft, wenn zwei oder mehr Versuche mit derselben verdünnten Lösung in möglichst gleicher Weise gemacht wurden, die Gerinnungszeit nicht ganz gleich, sodaß die Bestimmung nicht als so genau wie bei größerer Konzentration betrachtet werden darf; zweitens werden die Gerinnungszeiten länger, als zu erwarten war. Z. B.:

Konzentration:	unverdünnt	2 × verd.	4 × verd.	8 × verd.	16 × verd.
Gerinnungszeit:	$1\frac{3}{8}$ Min.	3 Min.	$5\frac{1}{2}$ Min.	$11\frac{1}{2}$ Min.	26 Min.

Ist die Gerinnungszeit sehr lang geworden, so kann man den Augenblick, wo die Gerinnung stattfindet, nicht genau mehr bestimmen; allmählich bilden sich Flocken und es kann ziemlich lange dauern, bevor es zur vollständigen Gerinnung kommt; bisweilen bleibt sogar die Gerinnung unvollständig. Parachymosin folgt nun nach Bang bei neutraler Reaktion dem Zeit-

gesetz nicht. Bei großer Konzentration der Enzymlösung fand er die Gerinnungszeit kürzer als die erwartete und beim Verdünnen wird sie bald verhältnismäßig viel zu lang oder bleibt die Gerinnung ganz aus.

Auch in meinen Versuchen trat diese Eigentümlichkeit vom Schweinsenzym (Bangs Parachymosin) gegenüber dem Kalbsenzym hervor, wie aus folgendem Beispiel ersichtlich ist.

Von in der oben angegebenen Weise möglichst gereinigtem Enzym, einerseits aus Schweinsmagen, andererseits aus Kalbsmagen, wurden konzentrierte Lösungen gemacht in HCl 0,2%. Ein Teil wurde mit $n/10$ -NaHO neutralisiert und mit Wasser auf das Doppelte des ursprünglichen Volumens gebracht. Von dieser Lösung wurden Verdünnungen gemacht mittels Zusatz einer NaCl-Lösung, welche durch Neutralisation von 0,2%iger HCl mit NaHO und Zusatz von Wasser bis zum Doppelten des ursprünglichen Volumens hergestellt war, in bezug auf den NaCl-Gehalt also der Enzymlösung entsprach. Zwar haftet diesem Verfahren ein Nachteil an, denn es ist dabei unumgänglich, daß die späteren Verdünnungen einige, wenn auch nicht lange Zeit nach der Neutralisation auf ihr Labungsvermögen geprüft werden. Dieser Nachteil ist, wie ich bald hervorheben werde, nicht ganz unwesentlich, aber, wie ich glaube, nicht so groß wie derjenige, der aus der Neutralisation jeder Verdünnung für sich hervorgehen würde, nachdem es doch wohl kaum möglich ist, bei starker Verdünnung jedesmal genau denselben Neutralisationsgrad zu erreichen.

Zweitens wurde die Gerinnungszeit bestimmt nach Neutralisation mit CaCO_3 . Für die erste Probe wurde die ursprüngliche Lösung mit dem gleichen Volumen 0,2%iger HCl verdünnt in der Absicht, den Enzymgehalt demjenigen der neutralisierten Lösung gleich zu machen.

Drittens wurde die Labwirkung bei saurer Reaktion geprüft. Für die erste Probe wurde die Lösung wieder, um den Enzymgehalt gleich zu machen, und um die Acidität auf 0,1% HCl zu bringen, mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt. Die weitere Verdünnung fand mit 0,1%iger HCl statt. Wie gesagt, wurde für jede Probe 2 ccm Enzymlösung mit 8 ccm Milch ge-

mischt. Ich erinnere daran, daß die Gerinnungszeit nur gut bestimmt werden konnte, wenn sie wenigstens 5 Sekunden betrug. Bei der unverdünnten, sauren, war sie sicher, bei der mit CaCO_3 neutralisierten Lösung vielleicht kürzer.

In den beiden untenstehenden Tabellen findet man in horizontaler Richtung gleichen Enzymgehalt, in vertikaler gleichen Salz-, resp. Säuregehalt.

Schweinsenzym.

Verdünnung	Neutralisiert mit NaHO	Neutralisiert mit CaCO_3	Saure Reaktion
1. unverdünnt	40 Sekunden	5 Sekunden	5 Sekunden
2. $2 \times$ verd.	90 „	5 „	5 „
3. 4 „	7—17 Minuten	5—10 „	5 „
4. 8 „	mehr wie 1 Stunde	15 „	10 „
5. 16 „	—	30—35 „	15—20 „
6. 32 „	—	80—90 „	30 „
7. 64 „	—	8—11½ Minuten	60 „
8. 128 „	—	—	110 „
9. 256 „	—	—	6 „

Kalbsenzym.

Verdünnung	Neutralisiert mit NaHO	Neutralisiert mit CaCO_3	Saure Reaktion
1. unverdünnt	50 Sekunden	5 Sekunden	5 Sekunden
2. $2 \times$ verd.	95 „	10 „	5 „
3. 4 „	160—170 „	15 „	10 „
4. 8 „	330—375 „	20 „	15 „
5. 16 „	8½—12½ Minuten	50 „	30 „
6. 32 „	24 „	100 „	55 „
7. 64 „	37—>60 „	3½ Minuten	2 Minuten
8. 128 „	—	6½ „	4⅓ „
9. 256 „	—	15½ „	13 „
10. 512 „	—	>40 „	>60 „

Nach Neutralisation mit NaHO folgt also das Schweinsenzym dem Zeitgesetz schon nicht mehr bei 4 maliger Verdünnung, während beim Kalbsenzym die Wirkung erst bei 64 maliger Verdünnung deutliche Abweichung zeigt. Auch nach Neutralisation mit CaCO_3 zeigt sich derselbe Unterschied, obgleich in erheblich geringerem Maße. Bei saurer Reaktion folgt das Schweinsenzym dem Zeitgesetz noch bei 128 maliger Verdünnung; hier fällt der Unterschied mit dem Kalbsenzym nicht oder kaum mehr in Betracht.

Beurteilt nach der Wirkung bei saurer Reaktion, war die Lösung des Schweinsenzyms doppelt so stark als diejenige des Kalbsenzyms. Wurde bei dieser Reaktion so weit verdünnt, daß die Gerinnungszeit auf 10 Sekunden kam, so labte bei neutraler Reaktion das Kalbsenzym in 160—170 Minuten, das Schweinsenzym aber erst in mehr als einer Stunde. Man kann also sagen, daß das Schweinsenzym durch Neutralisation mit Alkali mehr geschädigt wird als das Kalbsenzym.

Bang fand, daß das Schweinsenzym, sein Parachymosin, viel empfindlicher ist für Alkali als das Kalbsenzym. Neutrale Reaktion ist aber auch nicht ohne Einfluß. Man kann sich leicht davon überzeugen, daß die Wirksamkeit des Enzyms auf die Dauer dadurch abnimmt. Mit derselben neutralisierten Schweinsenzymlösung, mit welcher die oben erwähnten Versuche angestellt wurden, wiederholte ich 25 Minuten nach der Neutralisation die zwei ersten Proben. Mit der unverdünnten Lösung fand ich dann statt 40 Sekunden 50—60 und 70 Sekunden, mit der zweimal verdünnten statt 90 Sekunden $3\frac{1}{2}$ Minuten. Auch nach Neutralisation mit CaCO_3 geht die Wirksamkeit des Schweinsenzyms allmählich herab. Mit einer durch 4 malige Fällung mittels Dialyse gereinigten, mit CaCO_3 neutralisierten Lösung gerann die Milch in 25 Sekunden. Ein Teil der neutralen Lösung blieb bei Zimmertemperatur 5 Stunden stehen. Jetzt rief sie in $1\frac{1}{2}$ Stunden noch keine Gerinnung hervor. Auch ist es nicht gleichgültig, ob eine kleine oder eine größere Menge der Lösung neutralisiert wird, wenn auch dafür gesorgt wird, daß das Alkali vorsichtig und genau in entsprechender Menge zugesetzt wird. So fand ich beim Neutralisieren von $2\frac{1}{2}$ ccm einer Lösung mit

1,3 ccm $n/10$ -NaHO eine Gerinnungszeit von 15 Minuten, beim Neutralisieren von 10 ccm derselben Lösung mit 5,2 ccm NaHO eine Gerinnungszeit von $12\frac{1}{2}$ Minuten.

Der erste von Bang hervorgehobene Unterschied zwischen Chymosin und Parachymosin scheint mir also auf eine verschiedene Empfindlichkeit von Kalbs- und Schweinsenzym gegen alkalische resp. neutrale Reaktion zurückzuführen zu sein. Der zweite Unterschied, der verschiedene Einfluß von CaCl_2 , ist, wie ich glaube, vom ersten abhängig. Die Labung durch Parachymosin wird nach Bang viel mehr als die Labung durch Chymosin von CaCl_2 gefördert. Nun sind aber, wie ich soeben betont habe, neutrale Chymosin- und Parachymosinlösungen, welche in derselben Zeit Gerinnung der Milch verursachen, keineswegs gleich konzentriert. Wird der Enzymgehalt nach der Wirkung bei saurer Reaktion berechnet, so enthält die Parachymosinlösung mehr Enzym. Dasselbe geht auch aus Bangs eigenen Versuchen hervor. Bei Vergleichung einer Pepsin-(Parachymosin-)lösung mit einer Lösung von Barnekows Löpe (Chymosin) in verschiedener Verdünnung fand er:

Enzymlösung ccm	Wasser ccm	Milch ccm	Zeit für Pepsin in Minuten	Zeit für B. Löpe in Minuten
1. 1	—	10	2,30	4
2. $\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	10	7,30	0,30
3. $\frac{1}{4}$	$\frac{3}{8}$	10	40	17
4. $\frac{1}{8}$	$\frac{7}{8}$	10	Keine	30,30

In Versuch 1 ist die Pepsinlösung stärker als die Chymosinlösung, in den folgenden drei Versuchen also auch, und dennoch ist in 3 die Gerinnungszeit für Chymosin 17, für Pepsin 40 Minuten. Wenn also eine Parachymosinlösung bei gleicher oder sogar längerer Gerinnungszeit mehr Enzym enthält als eine Chymosinlösung, kann es nicht wundern, daß der gleiche CaCl_2 -Zusatz in der konzentrierteren Parachymosinlösung einen größeren Einfluß hat als in der Chymosinlösung. Man hat daraus dann aber nicht zu folgern, daß das CaCl_2 die Parachymosinwirkung mehr beschleunigt als die Chymosinwirkung, sondern

daß das Parachymosin bei neutraler Reaktion, ohne CaCl_2 , schwächer wirkt als das Chymosin.

Bang teilt weiter mit, daß eine kleine Menge von CaCl_2 , welche auf Chymosin keinen beschleunigenden Einfluß mehr hat, die Parachymosinwirkung noch fördert, und gibt als Grenzwert an einen Gehalt der Milchenzymmischung von 0,02% CaCl_2 , der für Parachymosin noch von Einfluß sein soll, für Chymosin aber nicht. Das habe ich für meine Chymosinlösungen nicht gefunden: 0,02% CaCl_2 , und sogar weniger, verursachte darin noch Beschleunigung, wie aus den folgenden Zahlen hervorgeht. Für diesen Versuch wurde eine mit $\frac{n}{10}$ -NaHO neutralisierte Lösung von gereinigtem Kalbsenzym gebraucht.

Milch ccm	Neutralisierte Enzymlösung ccm	Wasser ccm	1 ccm CaCl_2 -Lösung ‰	‰	Gerinnungs- zeit
10	1	1	—	—	4½ Min.
10	1	—	½	0,0416	40 Sek.
10	1	—	¼	0,0208	70 "
10	1	—	⅓	0,0140	110 "
10	1	—	⅙	0,0052	2½ Min.
10	1	—	⅓₂	0,0026	3 "
10	1	—	⅙₄	0,0013	4 "

Zum Vergleich mit einem von Bang erwähnten Versuch mit schwächerer Enzymlösung, in welchem die Gerinnung in 13 Minuten, nach CaCl_2 -Zusatz in 12 Minuten stattfand, wurde die Lösung so weit verdünnt, daß die Milch in 12 Minuten gerann. Dann wurde folgendes gefunden.

Milch ccm	Neutralisierte Enzymlösung ccm	Wasser ccm	1 ccm CaCl_2 -Lösung ‰	‰	Gerinnungs- zeit Minuten
10	1	1	—	—	12
10	1	—	0,4	0,033	2
10	1	—	0,2	0,0165	4
10	1	—	0,1	0,00825	8½

Solche Versuche habe ich öfters wiederholt und immer größeren Einfluß von CaCl_2 auf Chymosin gefunden, als Bang angibt.

Dieser Unterschied zwischen Chymosin und Parachymosin scheint mir also nicht sehr bedeutend. Insoweit aber derselbe festgestellt ist, kann die Ursache der größeren Empfindlichkeit des Parachymosins gegen neutrale Reaktion zugeschrieben werden.

Ich komme jetzt auf den dritten und den vierten Unterschied, das verschiedene Verhalten unter dem Einfluß von Erhitzen und von Alkali. Zur besseren Übersichtlichkeit werde ich diese beiden Einwirkungen zusammen behandeln.

Bang bemerkt, daß Chymosin sehr empfindlich ist gegen Hitze. Ein Wärmegrad von 70°C. ist, bei neutraler Reaktion, genügend, es in kurzer Zeit zu zerstören; bei saurer Reaktion ist die Empfindlichkeit noch größer. Während Chymosin durch Erhitzen auf 70°C. , eine Minute lang, zerstört wird, erträgt dagegen Parachymosin diese Temperatur 10 Minuten lang, obgleich es dann an Wirksamkeit etwas verliert. Bei 75°C. wird aber auch das Parachymosin zerstört. Bang empfiehlt, bei diesen Versuchen die Parachymosinlösung neutral zu machen gegen Lackmoid, so daß sie gegen Lackmus schwach sauer ist, etwa $0,05\% \text{ HCl}$.

Ich habe bisweilen Lackmoid gebraucht, meistens aber Lackmus, und neutralisierte dann bis auf ein paar Zehntelkubikzentimeter $\frac{n}{10}\text{-NaHO}$. Dann wurden 2 Proberöhrchen mit je 2 Kubikzentimetern der Lösung beschickt, in ein geräumiges, mit auf 70°C. erhitztem Wasser gefülltes Becherglas getaucht, nach 10 Minuten herausgenommen, abgekühlt, wieder auf 37°C. erwärmt und mit je 8 ccm auf dieselbe Temperatur erwärmter Milch vermischt.

Der vierte Unterschied besteht darin, daß das Parachymosin viel weniger resistent ist gegen Alkali als das Chymosin. Ein Alkaligehalt von $0,01\%$ zerstört ersteres in $\frac{1}{2}$ Stunde, während Chymosin davon nur wenig geschadet wird. Bang erwähnt folgenden Versuch.

Eine neutralisierte Pepsin(Parachymosin)lösung und ein neutralisierter Auszug aus Kalbsmagenschleimhaut (Chymosin)

wurden in zwei Teile verteilt, von welchen je einer gekocht wurde. 5 ccm ungekochte Parachymosinlösung wurde vermischt mit 5 ccm gekochter Chymosinlösung und 5 ccm ungekochtes Chymosin mit 5 ccm gekochtem Parachymosin. Beide Mischungen machten gleiche Mengen Milch in 5–6 Minuten gerinnen. Beide wurden mit Alkali versetzt bis zu 0,01% und nach $\frac{1}{2}$ Stunde wieder neutralisiert. Das Gemisch mit ungekochtem Parachymosin hatte jetzt seine Wirksamkeit völlig verloren, das andere labte die Milch in 5 Minuten.

Bang schließt also, daß das Parachymosin zerstört, das Chymosin intakt geblieben war. Er fügt aber hinzu, daß in anderen Versuchen das Parachymosin bisweilen erst nach einer Stunde Alkaliwirkung deutlich geschadet war, immer aber mehr als das Chymosin.

Der Zweck der Versuchsanordnung war, die Bedingungen für beide Enzyme möglichst gleich zu machen. Bang selbst hatte gefunden, daß albumosenreiche Lösungen resistenter gegen Alkali sind als reinere. Die Albumosen schützen das Enzym, wahrscheinlich durch Bindung von Alkali. In diesen Versuchen war Bang deshalb bestrebt, die von verschiedenem Albumosengehalt herrührende Fehlerquelle zu vermeiden.

Ich erlaube mir aber die Bemerkung, daß in Auszügen der Kalbsmagenschleimhaut das Enzym nicht nur von Albumosen, sondern von vielen anderen Stoffen verunreinigt ist, welche vielleicht mehr wie Albumosen durch Kochen verändert werden. Ich erinnere nur an die oben besprochene schleimige Substanz. Tatsächlich fand ich dann auch, daß beim Erhitzen auf 70° C. bei neutraler Reaktion während 10 Minuten meine Kalbsenzymlösungen sich bisweilen stark, bisweilen leicht trübten, mitunter auch ganz klar blieben. Man hat also das Recht nicht, mit Bang anzunehmen, daß der Unterschied zwischen einer gekochten und einer ungekochten Chymosinlösung nur darin besteht, daß in ersterer das Enzym zerstört ist.

Wenn man annehmen dürfte, daß Auszüge der Kalbsmagenschleimhaut eine das Enzym gegen Alkaliwirkung schützende Substanz enthalten, welche den Auszügen der Schweinmagenschleimhaut fehlt und durch Kochen das schützende

Vermögen verliert, so wäre hierdurch der von Bang gefundene Unterschied zwischen Chymosin und Parachymosin, soweit es die Alkaliwirkung betrifft, erklärt. Für diese Annahme glaube ich einen guten Grund beibringen zu können.

Das Filtrat einer in 0,5% iger HCl verdauten Kalbsmagen-schleimhaut wurde ohne Neutralisation etwa eine Stunde lang auf 80° C. erhitzt und dann neutralisiert. Beim Erhitzen und beim Neutralisieren blieb die Flüssigkeit vollkommen klar. In dem gewohnten Verhältnis mit Milch gemischt, rief sie in 3 $\frac{1}{3}$ Stunden keine Gerinnung hervor. Von dieser Flüssigkeit wurden 12,7 ccm vermisch mit 5 ccm einer sauren Lösung von gereinigtem Schweinsenzym. Das Gemenge wurde mit 2,3 ccm $\frac{n}{10}$ -NaHO gegen Lackmus, wie oben angegeben, beinahe neutralisiert. Zum Vergleich wurden 5 ccm derselben Schweinsenzym-lösung mit 12,7 destilliertem Wasser und 2,3 ccm $\frac{n}{10}$ -NaOH versetzt. Von beiden Mischungen wurde das labende Vermögen bestimmt und der Einfluß von 10 Minuten langem Erhitzen auf 70° C. und von Alkali untersucht.

Für die Alkaliprobe wurde erst genau neutralisiert, dann wurden beide Lösungen auf einen Alkaligehalt von 0,01% ge-bracht und nach einer halben Stunde durch Zusatz von $\frac{n}{10}$ -HCl auf dieselbe beinahe neutrale Reaktion gebracht wie zuvor. Da die zwei Gemische nicht gleich viel NaCl enthielten, wurde noch ein drittes hergestellt, aus 5 ccm Schweinsenzym-lösung und 12,7 ccm einer dem Salzgehalt des neutralisierten Kalbs-magenextraktes entsprechenden Kochsalzlösung, welches dann in ganz derselben Weise als die beiden ersten behandelt wurde. Die Gerinnungsproben gaben folgenden Ausschlag.

Enzymlösung ver- dünnt mit		Nach dem Erhitzen	Nach Alkalibehandlung
Wasser	$\frac{1}{2}$ Min.	2 $\frac{1}{2}$ Minuten	Keine Gerinnung in 3 $\frac{1}{3}$ Stunden
Filtrat	$\frac{1}{2}$ "	Keine Gerinnung in 2 $\frac{1}{2}$ Stunden	11 Minuten
NaCl-Lösung	50 Sek.	?	Keine Gerinnung in 4 Stunden

Beim Erhitzen verhielt sich also das mit Wasser verdünnte Schweinsenzym als Parachymosin, nach Zusatz des erhitzten Kalbsmagenextraktes aber als Chymosin. Die mit Kochsalz verdünnte Probe fing nach 13 Minuten an flockig zu werden, gerann aber nicht vollständig. Die Möglichkeit, daß der Kalbsmagenauszug den schädlichen Einfluß auf das Schweinsenzym beim Erhitzen seinem Kochsalz verdankte, ist also nicht ganz von der Hand zu weisen. Aus weiter mitzuteilenden Versuchen wird aber hervorgehen, daß wahrscheinlich andere Bestandteile des Extraktes die Hauptrolle spielten. In bezug auf die Widerstandsfähigkeit gegen Alkali verhielt sich das Schweinsenzym sowohl nach Wasser- als nach Kochsalzzusatz als Parachymosin. Vermischung mit dem erhitzten Kalbsmagenauszug hatte dagegen einen auffallenden beschützenden Einfluß. Daß dieses schützende Vermögen durch die Erhitzung auf 80° C. entstanden sein würde, ist wohl weniger wahrscheinlich, als daß es in Bangs soeben erwähntem Versuch verloren gegangen ist. Ich habe weiter den Einfluß von Alkali und von Erhitzen nicht wie Bang mit den Auszügen, deren Zusammensetzung so kompliziert und so wechselnd ist, sondern mit Lösungen des möglichst gereinigten Schweins- und Kalbsenzym untersucht. Das Schweinsenzym verhält sich in dieser Hinsicht als Parachymosin, wie aus folgenden Versuchen hervorgeht, in welchen mit Rücksicht auf die Frage nach der Identität von Lab und Chymosin auch der Einfluß auf die verdauende Kraft untersucht wurde. Dazu wurden 8 ccm der für die Bestimmung der Gerinnungszeit beinahe neutralisierten Lösung mit 2 ccm HCl 2% versetzt. Eine solche Probe wurde 10 Minuten auf 70° C. erhitzt, eine andere alkalisiert bis 0,01% NaHO und nach 1/2 Stunde angesäuert bis auf 0,4% HCl. Die Bestimmung der Gerinnungszeit fand, wie immer, in Doppelversuchen statt. Gefunden wurde:

	Nach Erhitzen	Nach Alkalibehandlung
Gerinnungszeit:	25 Sek.	40 Sek.
		Keine Gerinnung in 5 1/2 Stunden
Digestion in 5 Stunden: mm ²	6,76	4,41
		0

Der Einfluß von Alkali und von Erhitzen auf die verdauende Kraft war demjenigen auf das labende Vermögen genau proportional. Nach dem Erhitzen war die Gerinnungszeit $\frac{8}{5}$ mal

länger, die Eiweißverdauung $\frac{3}{5}$ mal weniger geworden: nach der Alkalieinwirkung war die Wirksamkeit in beiden Richtungen aufgehoben. Ein anderer Versuch gab insoweit ein abweichendes Resultat, als der Alkalieinfluß, wenngleich größer als die Hitzewirkung, nicht so bedeutend war als in dem vorigen.

	Nach Erhitzen	Nach Alkalibehandlung
Gerinnungszeit:	5—10 Sek. 15 Sek.	30 Sek.
Digestion in 5 Stunden: mm ²	11.56 7.84	4.81

Dem Ausspruch Bangs Durch die Erhitzung wird das Pepsin gänzlich zerstört, das Parachymosin nicht,¹⁾ kann ich also nicht beistimmen.

Bei dem Kalbsenzym waren die Befunde verschieden, je nachdem die Lösung mehr oder weniger verunreinigt war. Durch Digestion bei 37° C. oder bei Zimmertemperatur bereitete Auszüge ertrugen Erhitzen nicht, Alkaliwirkung aber viel besser. Als Beispiel gebe ich einen Versuch mit einem bei Zimmertemperatur bereiteten Auszug. 370 g Kalbsmagenschleimhaut wurden zerkleinert und mit 1 l 0,4%iger HCl angerührt. Nach einigen Stunden wurde filtriert und das Filtrat 24 Stunden gegen fließendes Wasser dialysiert: der dabei entstandene Niederschlag wurde abzentrifugiert und die Flüssigkeit bis auf 0,2% HCl angesäuert. Nach Neutralisation mit Natronlauge wurde die Gerinnungszeit bestimmt und der Einfluß von Erhitzen und von Alkali untersucht.

Gefunden wurde:

	Nach Erhitzen	Nach Alkalibehandlung
Gerinnungszeit: 20 Sek.	Keine Gerinnung in 2 St.	35 Sek.

Der Auszug verhielt sich also als eine Chymosinlösung.

Anders war es aber mit dem in der angegebenen Weise gereinigten Kalbsenzym. Dann wurde der Einfluß von Alkali viel größer, der vom Erhitzen aber zu gleicher Zeit kleiner. So fand ich bei einem mittels Dialyse gereinigten Kalbsenzym:

	Nach Erhitzen	Nach Alkalibehandlung
Gerinnungszeit:	3½ Min. 7½ Min.	Keine Gerinnung in 7 Stunden
mm ² verdautes Eiweiß in 20 Stunden:	15.20 4.84	0

¹⁾ Pflügers Archiv. Bd. LXXIX. S. 434.

Der einzige Unterschied mit dem oben erwähnten Parachymosinversuch war, daß die Enzymlösung von Anfang an eine schwächere Wirkung hatte.

Ich habe diesen Versuch öfters wiederholt und immer dasselbe gefunden, wenn nur das Enzym möglichst vollständig gereinigt war. So fand ich ein anderes Mal:

	Nach Erhitzen		Nach Alkalibehandlung
Gerinnungszeit:	7½ Min.	11 Min.	Keine Gerinnung in 5½ Stunden
mm² verdautes Eiweiß in 5 Stunden:	4	1,96	0

Wie ich schon oben erwähnt habe, stößt man bei der Reinigung des Kalbsenzym auf Schwierigkeiten, welche sich das eine Mal besser als das andre beseitigen lassen. Ein mit Bleiessig und Ammoniak gefälltes und weiter in der gewohnten Weise behandeltes Enzym gab bei der letzten Dialyse gegen destilliertes Wasser einen ziemlich großen Niederschlag, der abzentrifugiert und in 40 ccm 0,2%iger HCl gelöst wurde. Die Menge des Niederschlags ließ eine große Konzentration des Enzyms erwarten, umsomehr, als die Lösung sich beim Neutralisieren ein wenig trübte. Die Gerinnungszeit betrug aber 3½ Minuten und entsprach also der Menge der gelösten Substanz nicht.

Es war also sicher, daß das Enzym ziemlich stark verunreinigt war. Die Lösung verhielt sich nun gegen Erhitzen und gegen Alkali ganz wie Chymosin; die proteolytische Kraft war der labenden nahezu proportional.

		Nach Erhitzen	Nach Alkalibehandlung
Gerinnungszeit:	3½ Min.	Keine Gerinnung in 5 Stunden	6½ Min.
mm² verd. Eiweiß in 5 Stunden:	2,25	0	0,81

Diese Befunde stimmen mit dem von Bang angegebenen Unterschied zwischen Chymosin und Parachymosin schlecht. Vielmehr weisen sie darauf hin, daß der Unterschied nicht in den Enzymen selbst, sondern in Verunreinigungen zu suchen sei. Daß in den Lösungen bei der oben beschriebenen Behandlung etwas anderes als die Entfernung verunreinigender Stoffe

stattfinden würde, ist nicht anzunehmen, zumal in bezug auf die erste einfach durch Dialyse des Filtrats der verdauten Schleimhaut gefällte Portion des Enzyms.

Da ich bei der Enzymbereitung aber von bei Körpertemperatur bereiteter Schleimhaut ausging, während Bang bei Zimmertemperatur bereitete Auszüge gebrauchte, habe ich auch aus einem so erhaltenen Extrakt das Enzym bereitet. 350 g zerhackte Kalbsmagenschleimhaut wurde mit 1 l 0,4 %iger HCl angerührt. Nach einigen Stunden Stehen bei Zimmertemperatur wurde filtriert. Das klare Filtrat zeigte deutliche Chymosinreaktion:

	Nach Erhitzen	Nach Alkalibehandlung
Gerinnungszeit: 15 Sek.	Keine Gerinnung in $\frac{1}{2}$ St.	15 Sek.

Der Auszug wurde 2 Tage gegen fließendes Wasser dialysiert. Es bildete sich ein Niederschlag, welcher abzentrifugiert, in wenig 0,2 %iger HCl aufgelöst und filtriert wurde. Diese Lösung wurde 24 Stunden gegen destilliertes Wasser dialysiert und der jetzt entstandene Niederschlag in 0,2 %iger HCl gelöst, neutralisiert und in der gewohnten Weise untersucht.

Gefunden wurde:

	Nach Erhitzen	Nach Alkalibehandlung
Gerinnungszeit: 10 Sek.	12 $\frac{1}{2}$ Min.	Keine Gerinnung in 30 Min.

Wenn auch die Erhitzung beträchtlich geschadet hatte, so hatte die Wirkung doch viel weniger abgenommen als bei demselben Enzym vor der Reinigung. Im Verhalten gegen Erhitzen und noch viel mehr gegen Alkali ist es dem Parachymosin sehr ähnlich geworden. Es ist wohl nicht sehr gewagt, anzunehmen, daß es völlig damit übereinstimmen würde, wenn es möglich wäre, es ganz von Verunreinigungen zu befreien. Die Handelspräparate von van Hasselt und von Hansen habe ich auf dieselbe Weise untersucht.

In 24 Stunden gegen fließendes Wasser dialysiertem Lab von van Hasselt wurde durch Zusatz von verdünnter Essigsäure ein Niederschlag hervorgerufen. Derselbe wurde abzentrifugiert, in Wasser aufgeschwemmt, wieder zentrifugiert und in 0,2 %iger HCl gelöst. Zum Vergleich wurde ungereinigtes Lab, zehnmal mit Wasser verdünnt, untersucht.

Gerinnungszeit	Nach Erhitzen	Nach Alkalibehandlung
Ungereinigt: 45 Sek.	Keine Gerinn. in 1½ St.	45 Sek.
Essigs. Niederschl.: 45 „	9 Min.	7 Min.

Das Handelslab gab also Chymosinreaktion: gereinigt näherte das Enzym sich zum Parachymosin.

In gleicher Weise behandelt, nur nach der Fällung mittels Essigsäure nicht mit Wasser ausgewaschen, war das Hanse-sche Lab wohl weniger resistent gegen Alkali geworden, die Empfindlichkeit gegen Erhitzen war aber dieselbe geblieben. Nun wurde der in HCl gelöste Essigsäureniederschlag 24 Stunden gegen destilliertes Wasser dialysiert. Der jetzt entstandene Nieder-schlag stimmte in seinen Eigenschaften mit Parachymosin überein. Zum Vergleich wurde mit Wasser verdünntes Lab von Hansen gebraucht.

Gerinnungszeit	Nach Erhitzen	Nach Alkalibehandlung
Ungereinigt: 30 Sek.	Keine Gerinnung	40 Sek.
1. Niederschlag: 30 „	„ „	1¾ Min.
2. „ : 1½ Min.	5½ Min.	13 „

Auch diese Handelspräparate verlieren also durch Reini-gung die von Bang als charakteristisch für Chymosin betrach-teten Eigenschaften in bezug auf die Einwirkung von Hitze und von Alkali.

Die Unterschiede in bezug auf diese beiden Einwirkungen müssen also nicht dem Enzym selbst, sondern Beimischungen, welche aus den vom Kalb herstammenden Enzymlösungen be-sonders schwer zu entfernen sind, zugeschrieben werden, und geben keinen Grund, um mit Bang zwei verschiedene Arten von Lab, Chymosin und Parachymosin anzunehmen. Es bleibt zur Begründung dieses Unterschiedes nur noch das verschiedene Verhalten bei Verdünnung und bei CaCl_2 -Zusatz übrig. Wie oben angeführt ist, kann der Effekt von Chlorcalcium auf den Einfluß der Verdünnung zurückgeführt werden und ist dieser Einfluß selbst mit Alkaliwirkung in Zusammenhang zu bringen, auch wenn das Alkali nur zur Herstellung der neutralen Reak-tion hinreicht.

Ich betone nochmals, daß neutrale Reaktion ebensowenig gleichgültig ist für das Enzym als alkalische.

Pawlow fand, daß Neutralisation mit Na_2CO_3 Zerstörung des Enzyms zur Folge hatte. Dieser Forscher arbeitete mit dem Magensaft des Hundes, der wenig Beimischungen enthält. Ich habe auch einige Male die Gelegenheit gehabt, Magensaft des Hundes zu untersuchen, und fand, daß es bei kräftig verdauender und nach Neutralisation mit CaCO_3 labender Wirkung nur sehr schwache Wirkung zeigte, wenn es mit Natronlauge neutralisiert war. Becker¹⁾ fand, daß die Wirkung des Enzyms weniger kräftig war, wenn er es neutralisierte und dann mit angesäuerter Milch mischte, als wenn er die saure Enzymlösung zu gewöhnlicher Milch hinzusetzte, und er konnte Verringerung der Wirksamkeit feststellen, wenn er den Saft erst neutralisierte und dann wieder ansäuerte. Ich werde weiter unten noch andere Beobachtungen mitteilen, aus welchen die von Pawlow schon so nachdrücklich betonte Tatsache hervorgeht, daß Alkali dem Enzym nicht nur schadet, wenn es im Übermaß vorhanden ist, sondern auch schon, wenn es die früher vorhandene Säure genau neutralisiert.

Über die Art und Weise, wie das Alkali auch in neutraler Lösung für das Enzym von Bedeutung sein kann, werde ich keine Vermutung äußern. Daß aber, sobald Na- und OH-Ionen zu gleicher Zeit in der Lösung vorhanden sind — und das ist auch nach Neutralisation mit Natronlauge der Fall — das Enzym Gefahr läuft, ist sicher. Wenn ich nun glauben darf, nachgewiesen zu haben, daß in den Lösungen, welche Bang Parachymosinlösungen genannt hat, gewisse Stoffe ganz oder nahezu fehlen, welche in den «Chymosin»-Lösungen enthalten sind und imstande sind, das Enzym für den schädlichen Einfluß alkalischer Reaktion — eines Übermaßes also von Na- (oder K-) und OH-Ionen zu schützen; wenn man weiter bedenkt, daß es eben die an diesen Stoffen armen, die Parachymosinlösungen sind, welche von der Verdünnung am meisten leiden, so scheint es mir nicht zu gewagt, anzunehmen, daß auch der bei der Verdünnung gefundene Unterschied nicht in dem Enzym selbst, sondern in Beimischungen gelegen ist.

¹⁾ Hofmeisters Beiträge, Bd. VII, S. 115.

Daß auch der Unterschied in bezug auf den Verlust an Wirksamkeit durch Erhitzung an Beimischungen zugeschrieben werden muß, geht, wie ich glaube, aus meinen Versuchen deutlich hervor. In den «Chymosin»-Lösungen finden sich Stoffe, welche die Verringerung des Enzymgehaltes beim Erhitzen fördern. Je besser diese Stoffe entfernt werden, umsomehr verschwindet auch dieser Unterschied zwischen Chymosin und Parachymosin.

Meine Schlußfolgerung ist also, daß man keinen Grund hat, in dem Magensaft verschiedener Tierarten zwei verschiedene Arten von Labenzym, Chymosin und Parachymosin anzunehmen, daß, soweit jetzt bekannt, das durch die Magenschleimhaut gelieferte Labenzym nur durch das Wort Chymosin angedeutet werden kann.

Jetzt komme ich zu der Frage, ob man das Recht hat, Pepsin und Chymosin als zwei gesonderte Enzyme, als zwei verschiedene Stoffe zu betrachten.

Es ist bis jetzt nicht gelungen, durch eine vollständige Trennung des Enzyms in ein nur proteolytisch, ein anderes nur labend wirkendes Enzym die Dualität einwandfrei nachzuweisen. Wie oben mitgeteilt, ist es auch mir nicht gelungen, die Angabe Bangs, man sei imstande, «sich in zwei Minuten durch Erhitzen ein pepsinfreies Parachymosin zu verschaffen und nach Digestion von zwei Tagen ein Kalbspepsin zu bereiten, welches nach der Neutralisation mit CaCO_3 keine Milch koaguliert»,¹⁾ zu bestätigen.

Ich habe die Trennung noch in anderer Weise versucht. Erstens habe ich ein auch schon von Jacoby²⁾, allerdings ohne positiven Erfolg angewandtes Mittel gebraucht. Es wäre nämlich möglich, daß, wenn Pepsin und Chymosin zwei verschiedene Stoffe sind, das Vermögen von Eiweißstoffen, Pepsin festzuhalten, sich nicht auch auf Chymosin beziehen würde. Ebenso aber wie Jacoby in bezug auf Casein, fand ich, daß Hühnereiweiß einer Enzymlösung sowohl die labende als die proteolytische Kraft entzieht. Von einer Lösung des gereinigten Schweinsenzyms in 0,2 %iger HCl , welche in 5 Stunden 2,1 mm

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLIII, S. 360.

²⁾ Biochem. Zeitschrift, Bd. I, S. 66.

Eiweiß verdaute und, mit CaCO_3 neutralisiert in 20 Sekunden, bei saurer Reaktion nach zweimaliger Verdünnung mit Wasser in 15 Sekunden die Milch koagulierte, wurden 22 ccm mit gekochtem und fein zerriebenem Hühnereiweiß angerührt und an einen kühlen Ort gestellt. Nach 21 Stunden wurde filtriert. Das Volumen des Filtrats betrug 21 ccm. In der üblichen Weise mit Milch vermischt, rief dieses Filtrat weder nach Neutralisation mit CaCO_3 , noch bei saurer Reaktion, mit 2 Volumen Wasser verdünnt, oder sogar unverdünnt, in 5—6 Stunden Gerinnung hervor. Von den Mettschen Röhrchen verdaute es in 21 Stunden 0,33 mm. Das abfiltrierte Eiweiß wurde, nach Zusatz von 21 mm 0,2%iger HCl , in den Brutofen gestellt und war nach 24 Stunden völlig gelöst.

Zweitens habe ich versucht, ob Pepsin und Chymosin mittels Dialyse zu trennen seien. Wenn das Enzym in 0,2%iger HCl gelöst, gegen destilliertes Wasser dialysiert wird, bildet sich ein Niederschlag, am reichlichsten, wenn die Acidität im Dialysator auf 0,02% HCl herabgefallen ist und bei niedriger Temperatur. Dennoch, wie günstig die Bedingungen auch sind, das Enzym scheidet sich immer nur teilweise aus; ein beträchtlicher Teil bleibt gelöst und kann dann, wenn wenigstens die Lösung nicht viel Verunreinigungen mehr enthält, mittels Halbsättigen mit Ammonsulfat ausgesalzen werden.

Enthält nun die der Dialyse unterworfenene Lösung zwei verschiedene Enzyme, Pepsin und Chymosin, so ist es wohl nicht unwahrscheinlich, daß dieselben nicht genau gleich löslich sein werden in 0,02%iger HCl , daß also das eine im Niederschlag, das andere im Filtrat des Dialysatorinhalts in größerer Menge vertreten sein wird. Durch Lösen des Niederschlags in 0,2%iger HCl und nochmaliges Dialysieren würde dann ein Niederschlag erhalten werden, der das weniger lösliche Enzym in relativ noch größerer Menge enthielt. Einige Male wiederholt, würde diese Operation schließlich zu einem Niederschlag führen, der die Eigenschaft des weniger löslichen Enzyms in viel höherem Maße zeigen würde, als diejenige des leichter löslichen.

Von diesem Gedanken ausgehend, habe ich eine beträchtliche Menge möglichst gereinigtes Schweinsenzym in 0,2%iger

HCl aufgelöst und dialysiert. Das Filtrat und ein kleiner Teil des wieder in 0,2%iger HCl gelösten Niederschlages wurden für die Bestimmung der Verdauungsgeschwindigkeit und der Gerinnungszeit gebraucht. Für die erstgenannte Bestimmung wurde das Filtrat wieder auf 0,2% HCl gebracht, für die Koagulationsprobe wurden beide Lösungen mit CaCO_3 neutralisiert. Der übrige Teil der Lösung des Niederschlages wurde wieder dialysiert und das nach 24 Stunden ausgeschiedene Enzym mit dem neuen Filtrat verglichen. Die Menge des Enzyms reichte hin zur sechsmaligen Wiederholung dieser Operation. Der Befund war folgender:

		Niederschlag	Filtrat		
Nach der 1. Dialyse	Verdauung in mm	7,7	8	in 5 Stunden	
	Gerinnung	sofort	sofort		
" 2. "	Verdauung	7,1	6,4	" 5 "	
	Gerinnung	sofort	5 Sek.		
" 3. "	Verdauung	6	4,8	" 5 "	
	Gerinnung	5 Sek.	10 Sek.		
" 4. "	Verdauung	6,3	6,3	" 5 "	
	Gerinnung	10 Sek.	sofort		
" 5. "	Verdauung	6,1	5,2	" 5 "	
	Gerinnung	10 Sek.	15 Sek.		
" 6. "	Verdauung	5,6	4,6	" 5 "	
	Gerinnung	15 Sek.	10 Sek.		

Es ist klar, daß von irgend einer Anreicherung des Niederschlages in der einen oder der anderen Richtung infolge der wiederholten Fällung keine Andeutung zu finden ist. Enthielt die dialysierte Lösung zwei Enzyme, Pepsin und Chymosin, von denen das eine bei der Dialyse sich leichter als das andere ausscheiden würde, so wäre doch nach sechsmaliger Ausfällung das Verhältnis zwischen der proteolytischen und der labenden Wirkung nicht unverändert geblieben. Zwar findet man in obigen Zahlen nicht den Ausdruck einer genauen Proportionalität. Das wäre auch bei der in allen Proben hohen Enzymkonzentration, wobei die den Bestimmungen anhaftenden Fehlerquellen einen beträchtlichen Wert erreichen, nicht zu erwarten. Das ist aber klar, daß vom Anfang bis zum Ende des Versuchs proteolytische und labende Wirkung in ungefähr gleicher Kraft

nebeneinander bestehen blieben. Wenn also Pepsin und Chymosin zwei verschiedene Stoffe sind, so muß man auch annehmen, daß sie in bezug auf die Löslichkeit in 0,02%iger HCl unter sich nicht merkbar verschieden sind.

In allen Fällen, wo man bis jetzt geglaubt hat, in einer Enzymlösung entweder nur proteolytisches oder nur labendes Vermögen annehmen zu dürfen, hat sich nachweisen lassen, daß auch die fehlende Enzymwirkung durch Beseitigung von hemmenden Beimischungen hervorgerufen werden kann. Das gilt auch vom einige Tage bei saurer Reaktion digerierten Kalbsmagenschleimhautauszug, welcher, wie Hammarsten fand, nach Neutralisation keine, oder so gut wie keine Labwirkung mehr besitzt. Aus einem solchen Auszug läßt sich, wie aus meinen oben mitgeteilten Versuchen hervorgeht, nach der von Pekelharing angegebenen Methode ein Enzym bereiten, in welchem die labende Eigenschaft ebenso gut vertreten ist, als die proteolytische. Damit ist aber die Identität von Pepsin und Chymosin nicht bewiesen. Es wäre denkbar, daß bei der Digestion des Infuses das Chymosin tatsächlich teilweise zerstört worden war ohne Schädigung des Pepsins, und daß bei der Dialyse nur Pepsin und Chymosin zusammen in festem Verhältnis ausgefällt wurden, indem der Überschuß von Pepsin gelöst blieb und sich dadurch der Beobachtung entzog. Man wird aber zu derartigen Hypothesen erst dann seine Zuflucht nehmen, wenn es feststeht, daß bei der Digestion in saurer Lösung das Chymosin, nicht aber das Pepsin zerstört wird.

Das ist nun nach Schmidt-Nielsen der Fall.¹⁾ Dieser Forscher digerierte mit Salzsäure angesäuerte Kalbsmageninfusionen so lange bei 40° C., daß ihre labende Wirkung sehr stark herabgesetzt war. Dieses Infus und ein anderer, nicht erwärmter Teil desselben wurden mit $\frac{n}{10}$ -NaHO gegen Lackmus neutralisiert. Der nicht erwärmte Teil wurde dann so weit verdünnt, daß er ebenso schwach labte als der erwärmte. Dann wurden beide Lösungen auf einen Gehalt von 0,1% HCl gebracht und mit in Salzsäure gequollenen Fibrinflocken auf ihren Pepsingehalt geprüft. Auch wurde das labende Vermögen bei

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLVIII, S. 92.

saurer Reaktion, durch Mischung der neutralisierten Lösungen zu angesäuerter Milch, bestimmt. Das Resultat war, daß bei gleich schwacher Labung in neutraler Lösung das erwärmte Infus immer viel kräftiger Fibrin verdaute und bei saurer Reaktion labte, als die mit Wasser verdünnte, nicht erwärmte. Der Schluß ist, daß beim Erwärmen des Infuses das Chymosin größtenteils zerstört worden ist, das Pepsin, dem auch die Gerinnung der Milch in saurer Lösung zugeschrieben wird, aber nicht, daß also die Identität von Pepsin und Chymosin mit Bestimmtheit in Abrede gestellt werden muß.

Wie schlagend die von Schmidt-Nielsen angeführten Gründe auch scheinen, machten doch meine Erfahrungen über den Einfluß von Alkali, auch wenn dasselbe nur bis zur Neutralisation der Enzymlösung zugesetzt wird, mich zweifeln, ob nicht eine andere Erklärung seiner Befunde möglich war. Das Kalbsmageninfus enthält Stoffe, welche das Enzym gegen die Einwirkung von Alkali zu schützen imstande sind. Es war fraglich, ob diese Stoffe bei längerer Digestion bei Körpertemperatur unverändert bleiben. Widrigenfalls würde Neutralisation der digerierten Lösung einen anderen Einfluß auf das Enzym haben, als Neutralisation des in der Kälte aufbewahrten Infuses. Diese Erwägung führte mich zu folgenden Versuchen.

Eine ziemlich konzentrierte Lösung von gereinigtem Kalbsenzym in 0,2%iger HCl (ich erinnere daran, daß das Enzym vom Kalb nicht so gut zu reinigen ist, als dasselbe vom Schwein) wurde in zwei Teile verteilt. Der eine Teil wurde in den Brutofen gestellt bei 37° C., der andere in kalter Umgebung aufbewahrt. Tabelle I A gibt die Zahlen an, welche bei der Prüfung des labenden und des proteolytischen Vermögens der digerierten Lösung gefunden wurden. An den in Stab 1 angegebenen Tagen wurde je eine Probe der Lösung in zwei Teile verteilt. Der eine Teil wurde neutralisiert und mit destilliertem Wasser auf das doppelte Volumen gebracht für die in Stab 2 erwähnten Bestimmungen. Zu je 9 ccm der neutralisierten Lösung wurde 1 ccm 2%iger HCl zugesetzt für die Bestimmung der Proteolyse. Zum Vergleich wurde die Proteolyse, ohne vorhergehende Neutralisation, in derselben Digestionsphase bestimmt (Stab 4).

Tabelle I.

1	2	3	4	5	6	7
A.	Neutralisierte Lösung		Saure Lösung		Neutralisation	Lab v. Hasselt Gerinnung in Sekunden
	Gerinnung in Minuten	9 ccm + 1 ccm 2% HCl Proteolyse	Verdünt mit Salzsäure Proteolyse	Verdünt mit HCl + NaCl Proteolyse		
14. April	2 ⁵ / ₁₂	7,84	— 15,21	—	20 ccm + 10,7 n/10-NaOH + 9,3 H ₂ O	40
15. „	4 ¹ / ₆	—	—	—	2 ¹ / ₂ „ + 1,3 „ + 1,2 „	—
16. „	8 ¹ / ₂	—	—	—	2 ¹ / ₄ „ + 1,3 „ + 1,2 „	—
17. „	5 ¹ / ₂	4	4,41	—	20 „ + 10,6 „ + 9,4 „	35
18. „	5 ¹ / ₂	—	—	—	2 ¹ / ₂ „ + 1,3 „ + 1,2 „	35—40
19. „	6 ¹ / ₆	—	3,61	—	2 ¹ / ₂ „ + 1,3 „ + 1,2 „	30—35
20. „	6	2,25	3,61	—	10 „ + 5,2 „ + 4,8 „	40
22. „	24—26	0,36	2,89	—	10 „ + 5,2 „ + 4,8 „	30—35
23. „	45	0,16	2,25	1,44	10 „ + 5,2 „ + 4,8 „	30
B.	12 ¹ / ₂	1	2,89	1,44	10 „ + 5,3 „ + 4,7 „	35

Hierzu gebrauchte ich je $4\frac{1}{2}$ ccm der sauren Enzymlösung mit $5\frac{1}{2}$ ccm 0,2%iger HCl verdünnt, sodaß die Konzentration dieselbe war als in den unter 3 angegebenen Proben. Dann wurde (Stab 5) wieder die saure Enzymlösung gebraucht, unter Zusatz jedoch von soviel Kochsalzlösung, daß die Konzentration in bezug auf Enzym, HCl und außerdem NaCl, derselben der in 3 gebrauchten Lösung gleich war. Stab 6 gibt die für 2 und 3 gebrauchten Flüssigkeitsmengen und 7 die Gerinnungszeit der mit zehnfach verdünntem Handelslab vermischten Milch, zur Kontrolle. Die ersten Bestimmungen, am 14. April, fanden statt, bevor die Lösung in den Brutofen gestellt wurde.

Vergleicht man Stab 2 mit Stab 4, so sieht man in den ersten Tagen keine große Abnahme der Labwirkung im Verhältnis zu der Proteolyse. Im Gegenteil, die proteolytische Wirkung nimmt eher ein wenig mehr ab als die labende. Am 22. April hat sich dies plötzlich geändert: während die Eiweißverdauung nur unbedeutend verringert ist seit der vorigen Bestimmung, erfordert die Gerinnung 4mal soviel Zeit. Mit der Hammarstenschenschen Auffassung ist das schwer in Einklang zu bringen. Wenn das Lab durch die Digestion zerstört wird, würde man doch einen allmählichen Fortschritt der Zerstörung erwarten, und nicht erst eine Abnahme ungefähr der Autodigestion des Pepsins parallel laufend und dann, nach Verlauf einiger Tage, eine viel größere. Viel leichter dagegen ist die Erklärung bei der Annahme, daß die Lösung das Enzym gegen die Neutralisation schützende Stoffe enthält, welche bei der Digestion zersetzt werden. So lange diese Stoffe in reichlicher Menge da sind, erträgt das Enzym die Neutralisation. Ist aber nach tagelangem Digerieren der Vorrat verbraucht, so treten die schädlichen Folgen des Alkalizusatzes ans Licht. Diese Erklärungsweise wird umsomehr einleuchtend, wenn man Stab 3 mit Stab 4 vergleicht. In den ersten Tagen war die proteolytische Wirkung der vorher neutralisierten Lösung nur wenig herabgesetzt, am 20. April ist der Unterschied zwischen Stab 3 und Stab 4 noch gering und 2 Tage später findet man, in Übereinstimmung mit der sprunghaften Verlängerung der Ge-

rinnungszeit, für die vorher neutralisierte Lösung eine 8 mal geringere Verdauung als für die nicht neutralisierte. Daß das bei der Neutralisation entstandene NaCl nicht die Ursache war der geringen Verdauung, geht aus den Zahlen vom 23. April, Stab 3 und 5 hervor. Zwar hemmte das Kochsalz die Verdauung, die Wirkung des neutralisierten Enzyms war aber doch 9 mal geringer als diejenige des nicht neutralisierten, welches ebensoviel Kochsalz enthielt. Zwischen 20. und 22. April war also der Gehalt an schützenden Stoffen soviel geringer geringer geworden, daß das Alkali das Enzym, das proteolytische sowohl als das labende, angreifen konnte. Ist diese Auffassung richtig, so müßte auch eine nicht erwärmte Enzymlösung größeren Widerstand gegen neutralisieren mit Alkali zeigen, auch wenn sie zuvor mit Alkali neutralisiert worden war. Der Pepsin-gehalt der erwärmten Lösung war am 23. April bis etwa $\frac{1}{6}$ herabgesetzt. Der bei niedriger Temperatur aufbewahrte Teil der Lösung wurde dementsprechend 6 mal mit 0,2%iger HCl verdünnt und in derselben Weise als der erwärmte Teil geprüft. Das Ergebnis findet man in Tab. I, B. Die proteolytische Wirkung der sauren Lösung ist ungefähr ebenso groß als diejenige der erwärmten Lösung am 23. April und in den mit NaCl versetzten Proben sind die Zahlen genau dieselben. Der Einfluß der Neutralisation auf die verdauende Kraft ist aber viel geringer und in Übereinstimmung damit ist die Gerinnungszeit bei neutraler Reaktion viel kürzer. In dieser Lösung hat also die proteolytische sowohl als die labende Wirkung viel größeren Widerstand gegen Neutralisation als in der erwärmten.

Eine neue Versuchsreihe (Tab. II) ergab ganz dasselbe. Es wurde hier auch die labende Wirkung bei saurer Reaktion geprüft.

Am 1. Mai wurde die Lösung in den Brutofen gestellt, nachdem ein Versuch angestellt war.

An den in Stab 1 angegebenen Tagen wurden 10 ccm der Lösung abgemessen, mit $\frac{n}{10}$ -NaHO neutralisiert und mit destilliertem Wasser bis zum doppelten Volumen verdünnt (Stab 13). Die neutralisierte Lösung wurde in 4 Portionen geteilt: 2 à 2 ccm für die Bestimmung der Labungszeit bei neutraler Reak-

Tabelle II.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Datum	Neutralisierte Lösung				Saure Lösung			Saure Lösung			Lab von v. Has- selt	Neutralisation
	2 ccm	2 ccm	Bis 0,1% HCl angesäuert		2 ccm	0,4ccm + 1,6ccm W	9 ccm + 1/2 ccm HCl	1 ccm +	0,2ccm +	4 1/2 ccm +		
			Gerin- nung in Min.	Gerin- nung in Sek.								
1. Mai	1	5	3 1/3	12,25	5	2 1/6	14,44	5	1 2/3	32,49	35	10 ccm + 5,3 NaOH + 4,7 Wasser
3. „	2 1/6	10	8 1/2	5,76	5	5 1/2	6,76	5	5	11,56	35	10 „ + 5,3 „ + 4,7 „
4. „	3 1/4	10	12 1/2	4,84	5—10	7 1/2—9	5,76	5—10	8	10,89	40	10 „ + 5,3 „ + 4,7 „
6. „	12 1/2	20	> 90	1,21	10	25—29	4	10	34—37	6,76	40	10 „ + 5,3 „ + 4,7 „
7. „	8	15	—	1,69	10	—	2,89	10	—	7,29	35	10 „ + 5,3 „ + 4,7 „
8. „	53—60	30	—	0,64	10	—	2,25	15	—	4	40	10 „ + 5,3 „ + 4,7 „

tion (Stab 2), 1 à 9 ccm, welche nach Zusatz von 1 ccm 2%iger HCl für die Bestimmung der Proteolyse verwendet wurde (Stab 5), und 1 à 6 ccm, welche mit 0,3 ccm 2%iger HCl auf eine Acidität von 0,1% gebracht wurde. Mit dieser letzten Portion wurde dann die Labung bei saurer Reaktion bestimmt, wozu in 2 Proben 2 ccm angesäuerte Lösung gebraucht wurden (Stab 3); in 2 anderen 0,4 ccm, mit 1,6 ccm destilliertem Wasser verdünnt (Stab 4). Die Zahlen des 6., 7. und 8. Stabes geben die Wirkung der sauren Enzymlösung an, nachdem so viel Kochsalz zugesetzt war, als in der entsprechenden Lösung des 3., 4. und 5. Stabes vorhanden war. Die saure Lösung wurde dazu 2 mal verdünnt mit einer NaCl-Lösung, welche 2 mal so viel Kochsalz enthielt als die neutralisierte Enzymlösung. Die Labung wurde dann bestimmt mit 2 ccm dieses Gemisches und mit 0,4 ccm nach Zusatz von 1,6 ccm Wasser (Stab 6 und 7), die Proteolyse mit 9 ccm nach Zufügen von $\frac{1}{2}$ ccm 2%iger HCl und $\frac{1}{2}$ ccm 0,2%iger HCl (Stab 8). In Stab 9, 10 und 11 wurde nur der Enzym- und Säuregehalt durch Wasser- resp. Salzsäurezusatz mit demjenigen der vorigen Proben ausgeglichen. Dazu wurde genommen 1 ccm saure Lösung + 1 ccm Wasser (Stab 9), 0,2 ccm Lösung + 1,8 ccm Wasser (Stab 10) und $4\frac{1}{2}$ ccm Lösung + $5\frac{1}{2}$ ccm 0,2%iger HCl (Stab 11). Diese Versuchsanordnung gestattet eine Beurteilung der labenden Wirkung in den verschiedenen Phasen der Digestion, bei neutraler Reaktion, bei saurer Reaktion, nachdem die Lösung neutralisiert gewesen war, und bei saurer Reaktion, mit und ohne Zusatz von Kochsalz. Was die proteolytische Wirkung anbetrifft, konnte ich dasselbe bestimmen.

Stab 2, 5, 8 und 11 ergeben wieder dasselbe als Tab. 1; die labende Wirkung bei neutraler Reaktion wird in den ersten 3 Tagen herabgesetzt, proportional der Pepsinwirkung bei saurer Reaktion, ohne Unterschied, ob NaCl zugesetzt ist oder nicht, und ob die Lösung neutralisiert gewesen ist. Nach einer Digestion von 5 Tagen hört die Proportionalität des 2. mit dem 8. und 11. Stabe auf, mit dem 5. dauert sie noch fort. Die Zahlen des 8. und 11. Stabes ergeben, daß der Kochsalzzusatz die Proteolyse nahezu bis zur Hälfte herabsetzt, die des 5.

und 8. Stabes, daß Neutralisieren in den ersten 3 Tagen keine andere Einwirkung auf das proteolytische Enzym hat, als die, welche vom entstehenden Kochsalz abhängig ist. Nach 5 Tagen, der starken Abnahme der labenden Kraft entsprechend, macht die Neutralisation sich auch auf das proteolytische Enzym viel mehr geltend. Die bei der Tab. I gegebene Deutung erklärt auch hier den Befund. Daß die Periode, in welcher die Neutralisation wenig einwirkt, in der ersten Tabelle 6 Tage, hier 3 Tage dauert, führt zu der Folgerung, daß die hier verwendete Lösung weniger schützende Substanz enthielt als die vorige.

Vergleicht man auch die labende Wirkung bei saurer Reaktion in den verschiedenen Phasen (Stab 3, 6 und 9 und Stab 4, 7 und 10), dann sieht man, daß der Kochsalzzusatz die Labungszeit nicht viel ändert, daß Neutralisieren hingegen die Wirkung sehr verzögert, wenn die Lösung längere Zeit digeriert worden ist. Dies stimmt mit dem Befunde bei der proteolytischen Wirkung überein.

Die Versuche der III. Tabelle sind wieder eingerichtet wie die der II. Tabelle. Nur wurde für Stab 4, 7 und 10 eine stärkere Lösung gebraucht. Ebenso wie in den Versuchen Schmidt Nielsens wurde ein Teil der Lösung in Eis aufbewahrt; hiervon wurde jedesmal 5 ccm neutralisiert mit 2,6 ccm $n/10$ -NaHO und durch Zusatz von 2,4 ccm destilliertem Wasser auf ein Volumen von 10 ccm gebracht (Stab 13 B). Diese neutrale Lösung wurde dann mit einer entsprechenden Kochsalzlösung 2, 3 und 6 mal verdünnt (Stab I B) und für die Proben zum Teil wieder angesäuert und verwendet in demselben Verhältnis als die neutralisierte Lösung bei A.

Zu den Proben des 6. bis 11. Stabes wurde die saure Lösung 2, 3 und 6 mal verdünnt mit 0,2%iger HCl und weiter behandelt als die saure digerierte Lösung von Stab 6 bis 11 A.

Vergleicht man Tab. III A und B, so sieht man, wie in Tab. I, daß Neutralisieren mehr Effekt hat in der digerierten Lösung als in der verdünnten, sowohl auf labende als auf proteolytische Wirkung.

Ein Ergebnis verdient noch nähere Beachtung. Als die Digestion lange gedauert hat, und die Zeiten für die Labung

Tabelle III.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
A.	Neutralisierte Lösung				Saure Lösung			Saure Lösung		Neutralisation	Lab von v. Has-selt ¹⁾		
	Bis 0,1 % HCl angesäuert				2 × mit NaCl-Lösung verdünnt			1 ccm 0,4 ccm 4 1/2 ccm					
	2 ccm	2 ccm	0,8 ccm + 1,2 ccm W	9 ccm + 1 ccm 2 % HCl	2 ccm 0,8 ccm + 1,2 ccm W	9 ccm + 1 1/2 ccm 2 % HCl	1 ccm 1,6 ccm W	+	+				
Datum	Gerin-nung in Min.	Gerin-nung in Sek.	Gerin-nung in Min.	Pro-teolyse in Min.	Gerin-nung in Sek.	Gerin-nung in Min.	Pro-teolyse in Min.	Gerin-nung in Sek.	Gerin-nung in Min.	Pro-teolyse in Sek.	Gerin-nung in Sek.	Pro-teolyse in Sek.	
29. Mai	1 5/6	5-10	1 2/3	4,62	10	1 5/12	7,29	10	1 1/6	9	40-50	10 ccm + 5,2 ccm + 4,8	
30. "	6	20	4 2/3	4	15	2 1/2	4,84	15	3	7,29	50	10 " + 5,2 " + 4,8	
31. "	13	25	8 1/2	1,1	15	3 1/2	3,24	15	4 1/4	4,2	50	10 " + 5,2 " + 4,8	
1. Juni	25-29	30	12 1/2	0,94	20	4 1/2	1,69	20	5 1/2	2,78	50	10 " + 5,2 " + 4,8	
2. "	45	25	16-17	0,36	15	3 3/4	2,1	15	5 3/4	2,89	45-50	10 " + 5,2 " + 4,8	
3. "	> 2 St.	55	40-53	0,13	25-30	11	0,81	25	11	1,21	45-50	10 " + 5,2 " + 4,8	
B.	nicht verdünnt	1 5/6	5-10	1 2/3	4,62	10	1 5/12	7,29	10	1 1/6	9	45-50	10 " + 5,2 " + 4,8
	2 × "	3 1/2	20	3 1/2	2,25	15	2 1/6	2,89	15	2 1/3	4,41	50	5 " + 2,6 " + 2,4
	3 × "	5 1/4	30	5	1,96	20	3 1/2	1,56	20	4	3,24	50	5 " + 2,6 " + 2,4
	6 × "	10	50	11	0,49	40	7	0,64	35	6-6 1/2	1,21	45-50	5 " + 2,6 " + 2,4

¹⁾ Hier wurde eine weniger konzentrierte Lösung gebraucht als in den anderen Kontrollproben.

bei neutraler Reaktion sehr lange geworden sind, so sieht man, daß die Digestionsproben mit nach der Neutralisation wieder angesauerter Lösung proportional zu hohe Zahlen geben. (Tab. II 8. Mai, Tab. III 3. Juni.) Dies kann wohl erklärt werden. Abgesehen davon, daß bei so schwacher Wirkung die Koagulation der Milch und die Lösung von Eiweiß keine gleich genaue Reaktionen sind, zur Bestimmung der Enzymkonzentration, worauf schon von Pawlow hingewiesen ist, so muß man wohl im Auge behalten, daß die neutralisierte Lösung für die Digestionsprobe wieder angesäuert wird. Zwischen der Neutralisation und dem Ansäuern verliefen niemals mehr als einige Minuten. Es ist also sehr wahrscheinlich, daß das Enzym in der angesäuerten Lösung weniger von der Neutralisation geschadet wird, als der Teil, welcher für die Labung bei neutraler Reaktion verwendet wurde. Fuld¹⁾ hat ja gefunden, daß der Zerstörung durch Alkali eine reparabele Störung voran geht.

So kann es auch verstanden werden, daß Schmidt-Nielsen Ergebnisse erhielt, die ihn zum Schluß führten, daß Pepsin und Chymosin zwei verschiedene Stoffe sind. Er teilte eine konzentrierte Kalbsenzymlösung in zwei Portionen; die eine wurde digeriert, die andere in Eis aufbewahrt. Als nun die digerierte Lösung ihre labende Kraft bei neutraler Reaktion größtenteils verloren hatte, wurden beide Lösungen neutralisiert. Die nicht digerierte Lösung wurde so weit verdünnt, daß sie in derselben Zeit (4—6 Stunden) Milch zur Gerinnung brachte, als die digerierte. Von beiden Lösungen wurde dann ein Teil angesäuert zur gleichen Acidität und die proteolytische Wirkung mit Fibrinflocken bestimmt. Er fand, daß die digerierte Lösung in kürzerer Zeit das Fibrin löste, als die nicht digerierte, und daraus schließt er, daß bei der Digestion mehr Lab als Pepsin zerstört wurde. Nach dem oben Gesagten meine ich, daß man dies so zu erklären hat: in der digerierten Lösung wird das Enzym durch Neutralisieren abgeschwächt, durch darauffolgendes Ansäuern wird aber ein Teil behalten, der imstande ist, eine Fibrinflocke in ziemlich kurzer Zeit zu lösen, während in der nicht digerierten Lösung das Enzym durch Neutralisieren weniger

¹⁾ Ergebn. der Physiol., 1. Jahrg., 1. Abt., S. 50.

geschadet wird, und labende und proteolytische Wirkung durch Verdünnen in gleichem Maße abnehmen.

Aus Tabelle III geht hervor, daß dies auch wirklich so ist. Die Versuchsanordnung war zum Teil derjenigen Schmidt-Nielsens gleich. Die Ergebnisse sind auch dieselben. Zum Beispiel: Am 31. Mai hat die labende Wirkung bei neutraler Reaktion auf $\frac{1}{7}$ abgenommen; wird die Lösung wieder angesäuert, so digeriert sie 1,1. Nach Schmidt-Nielsen muß man also die nicht digerierte Lösung siebenmal verdünnen. Dazu kann man aus Tabelle III B die sechsfache Verdünnung nehmen: hier war die Labungszeit 10 Minuten, die Proteolyse 0,49.

Schmidt-Nielsen würde daraus schließen, daß die digerierte Lösung bei nahezu gleichem Labgehalt zweimal so viel Pepsin enthielt. Beobachtet man aber auch die Zahlen in Stab 2 A, so sieht man, daß die proteolytische Wirkung der digerierten Lösung eigentlich nicht 1,1, sondern 4,2 war. Die Zahl 1,1 ist nur vom Neutralisieren abhängig, die Zahl 13 in Stab 2 A wird also auch wohl zum größten Teil von der Neutralisation bedingt sein. In der verdünnten Lösung ist der Einfluß des Neutralisierens geringer (1,21 und 0,49) und, wie aus Stab 8 B hervorgeht, nahezu ganz dem entstehenden Kochsalz zuzuschreiben, was in der digerierten Lösung nicht der Fall ist. Ich schließe also daraus, daß die Wirkung der neutralisierten digerierten und der neutralisierten verdünnten Lösung gar keine Konklusion über die Abnahme des proteolytischen und labenden Enzyms durch Digestion rechtfertigt.

Macht man umgekehrt die proteolytische Wirkung der nicht digerierten Lösung durch Verdünnen mit 0,2%iger HCl derjenigen der digerierten Lösung gleich, so findet man das folgende: Am 31. Mai hatte der Pepsingehalt der digerierten Lösung auf die Hälfte abgenommen (Stab 2 A). Wurde die in der Kälte aufbewahrte Lösung zweimal mit Salzsäure verdünnt, so ergab sie dementsprechend die Zahl 4,41 (Stab 2 B). Die digerierte und die verdünnte Lösung enthielten also sicher eine gleiche Quantität Pepsin. In den entsprechenden neutralisierten Lösungen findet man für die verdünnte Lösung stärkere Proteolyse und Labung als in der digerierten. Daß keine Pro-

portionalität besteht (für die Digestion in dem Verhältnis $1/2$, für die labende Wirkung $1/4$), glaube ich dem zuschreiben zu dürfen, daß die zur Labung bestimmte Enzymlösung nicht wieder angesäuert wird, was für das digerierte Enzym von mehr Bedeutung ist, als für das nicht digerierte. Hieraus geht also hervor, daß Schmidt-Nielsen nicht bewiesen hat, daß Pepsin und Chymosin zwei verschiedene Stoffe sind.

Auch beim Enzym der Schweinsmagen habe ich untersucht, welche Änderung labende und digerierende Wirkung erfahren, wenn die Lösung längere Zeit auf 37° erwärmt wird. Nachdem ich aus den Versuchen über Chymosin-Parachymosin erfahren hatte, daß das Schweinsenzym die Neutralisation mit Natronlauge schlecht erträgt, habe ich diesen Versuch ein wenig anders eingerichtet. Ich bereitete eine konzentrierte Lösung von gereinigtem Schweinsenzym in 0,2%iger HCl und stellte dieselbe in den Brutofen. An verschiedenen Tagen (Tab. IV Stab 1) wurden 10 ccm der Lösung abgemessen und die proteolytische Wirkung bestimmt (Stab 6). Zur Labung bei saurer Reaktion wurde 1 ccm der Lösung verdünnt mit 1 ccm Wasser und wie gewöhnlich nach Vorwärmung mit 8 ccm Milch gemischt (Stab 5). In 3 anderen Röhrchen wurden jedesmal 2 ccm abgemessen: zwei dieser Röhrchen wurden mit einem kleinen Überschuß von pulverisiertem Calciumcarbonat neutralisiert, eines wurde 1 Minute ins Wasserbad gestellt und dann die Milch zugegossen (Stab 2), das zweite wurde erst nach einer halben Stunde mit Milch gemischt (Stab 3); das dritte Röhrchen blieb zur Kontrolle $1/2$ Stunde bei Zimmertemperatur stehen, wurde dann neutralisiert und nach 1 Minute Vorwärmung mit Milch versetzt (Stab 4). Immer wurde dafür gesorgt, daß im ersten und dritten Röhrchen die Milch genau 1 Minute nach der Neutralisation zugefügt wurde. Wie bei dem Kalbsenzymversuche wurden alle Proben doppelt genommen. Die Röhrchen mit neutralisierter Lösung enthielten zweimal so viel Enzym, als die zur sauren Labung verwendeten. Da es nur auf die Bestimmung der relativen Abnahme der Enzymwirkung in den verschiedenen Proben und auf die Vergleichung derselben mit der Abnahme der Proteolyse ankommt, ist das übrigens ohne Belang. Tabelle IV zeigt also die Ab-

nahme der digerierenden Wirkung, der labenden Wirkung bei saurer und neutraler Reaktion und den Einfluß einer eine halbe Stunde dauernden neutralen Reaktion in den verschiedenen Phasen der Digestion.

Tabelle IV.

1	2	3	4	5	6	7
Datum	Mit CaCO_3 neutralisiert	Nach $\frac{1}{2}$ Stunde neutraler Reaktion	Nach $\frac{1}{2}$ Stunde neutralisiert	Saure Reaktion 2 \times mit Wasser verdünnt	Proteolyse in 5 Stunden	Lab von v.Hasselt
	Sekunden	Sekunden	Sekunden	Sekunden		Sekunden
8. Febr.	10	5	—	5	9,6	35—40
12. „	10	10—15	10	10	5,3	35
13. „	15—20	15—20	15—20	10—15	5	35—40
14. „	15—20	15—20	15—20	10	5,3 $\frac{1}{2}$	40
16. „	10—15	15—20	15—20	10—15	3,6	35
18. „	25—30	20—30	30	15—20	2,56	35
19. „	25	25—35	20	15	3,2	30—35
20. „	30—40	35—55	25—30	20	3,2 $\frac{1}{3}$	35
21. „	45—50	85—120	70	20—25	3,2	35—40
22. „	45	70—75	40	25	2,7 $\frac{1}{4}$	40
23. „	50—75	80—160	60	25—30	2,1	40
25. „	100—130	3—6 M.	50	35	1,56	35—40
26. „	70—100	4 $\frac{1}{2}$ „	2 $\frac{1}{6}$ Min.	30	1,32 $\frac{1}{6}$	40
27. „	65—105	8 „	1 „	35	2,56	35
28. „	4 $\frac{1}{2}$ —9 M.	17—45 „	6 „	40	1,1 $\frac{1}{8}$	35—40
1. März	8—22 „	44—48 „	13—20 „	65—80	0,81	35—40
2. „	22—25 „	>1 Stunde	—	70—85	0,49	35
4. „	—	—	—	165—270	—	40
5. „	>1 Stunde	—	—	150—160	—	40
7. „	—	—	—	4 $\frac{1}{2}$ —5 $\frac{1}{2}$ M.	0,49	40
12. „	—	—	—	>5 Stund.	0,49	40
20. „	—	—	—	—	0,04	35

Übersichtlichkeitshalber habe ich in Stab 6 angegeben, wann das proteolytische Enzym nahezu auf $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{3}$ usw. abgenommen hatte.

Vergleicht man an diesen Stellen die Labungszeiten in Stab 5 mit der proteolytischen Wirkung, dann stellt sich heraus, daß diese zunehmen nahezu umgekehrt proportional der Abnahme der Proteolyse. Aus dem ganzen Stab 5 und 6 darf man wohl schließen, daß proteolytisches und labendes Enzym gleich stark abnehmen. Am 1. März hört die Proportionalität auf; hier ist man wieder an der Grenze angekommen, wo die Enzymlösung zu schwach wird, um im Verhältnis 2 : 8 mit genügender Genauigkeit Milch zur Gerinnung zu bringen, zur Vergleichung dieses Ergebnisses mit demjenigen der Digestionsprobe. Zur gleichen Zeit fangen die beiden Proben an, verschiedene Zeitdauer aufzuweisen. Die labende Wirkung der neutralisierten Lösung (Stab 2) zeigt anfangs ebenso Proportionalität mit der proteolytischen. Hier hört die Proportionalität aber früher auf, und am 5. März war keine Labung mehr wahrzunehmen, wohl noch bei saurer Reaktion, während auch noch eine gut wahrnehmbare verdauende Wirkung bestand. Stab 3 zeigt nun, wie die halbstündige neutrale Reaktion in den ersten Tagen, als die Lösung noch konzentriert war, das Enzym noch wenig beeinflusste; je mehr aber die Konzentration abnimmt, desto größer wird die Einwirkung der neutralen Reaktion. Daß die neutrale Reaktion und nicht die Abkühlung zur Zimmertemperatur die Wirkung herabsetzt, geht aus den Zahlen des 4. Stabes hervor. Neutrale Reaktion schadet also in den späteren Proben der Wirkung, und dies erklärt genügend, warum die labende Kraft bei neutraler Reaktion eher von der proteolytischen abweicht und früher ganz verschwindet, als bei saurer Reaktion. Zerstörung einer schützenden Substanz, wie ich beim Kalbsenzym fand, ist hier nicht die Ursache. Dies zeigt Tabelle V; der erste Teil A ist gerade so eingerichtet wie Tabelle IV. Der zweite Teil B enthält Proben mit der nicht digerierten, in verschiedenen Graden mit 0,2 % iger HCl verdünnten Lösung. Von jeder Verdünnung wurde eine Probe à 2 ccm sofort nach der Neutralisation mit Milch gemischt, eine zweite nach halbstündiger neutraler Reaktion. Wie man sieht, schadet die Neutralisation in der konzentrierten Lösung der Wirkung nicht beträchtlich, wohl aber in der verdünnten. Es wird also auch in der digerierten

Tabelle V.

1	2	3	4	5	6	7
Datum	Mit CaCO_3 neutrali- siert	Nach $\frac{1}{2}$ Stunde neutraler Reaktion	Nach $\frac{1}{2}$ Stunde neutrali- siert	Saure Reaktion $2 \times$ mit Wasser verdünnt	Proteolyse in 5 Stunden	Lab von v. Hasselt
A.						
11. Febr.	5 Sek.	5 Sek.	—	5 Sek.	14,4	35–40 Sek.
14. „	5 „	15 „	5 Sek.	5 „	10,5	40 „
16. „	5–10 „	10 „	10 „	5–10 „	$6,5\frac{1}{2}$	35 „
19. „	10 „	10 „	10–15 „	10 „	4,4	30–35 „
20. „	15 „	20–40 „	30 „	10–15 „	5,7	35 „
21. „	25–50 „	35–70 „	30 „	15 „	$4,4\frac{1}{3}$	35–40 „
22. „	30–35 „	65–95 „	55 „	15 „	5	40 „
23. „	30–40 „	30–40 „	35 „	20 „	3,24	40 „
25. „	40–85 „	60–130 „	50 „	25 „	$3,61\frac{1}{4}$	35–40 „
26. „	60–70 „	2–4 Min.	60 „	20–25 „	3,24	40 „
27. „	40–120 „	$1\frac{1}{2}$ – $1\frac{3}{4}$ „	40 „	25 „	1,96	35 „
28. „	60–65 „	>1 Stunde	65 „	25–30 „	3,24	35–40 „
1. März	1– $4\frac{1}{2}$ M.	>5 „	$6\frac{1}{2}$ Min.	40 „	$1,69\frac{1}{8}$	35–40 „
2. „	2– $3\frac{1}{2}$ „	—	—	35–40 „	1,69	35 „
4. „	—	—	—	80 „	$1,1\frac{1}{13}$	40 „
5. „	>1 Stunde	—	—	65–70 „	0,81	40 „
7. „	—	—	—	80 „	0,64	40 „
12. „	—	—	—	$3\frac{1}{2}$ Min.	—	40 „
20. „	—	—	—	>5 Stund.	0,16	35 „
B.						
nicht verdünnt	10 Sek.	10 Sek.	—	—	—	35–40 „
$2 \times$ „	20 „	30 „	—	—	—	35–40 „
$4 \times$ „	35–40 „	45–70 „	—	—	—	35–40 „
$8 \times$ „	$2\frac{1}{2}$ –4 M.	>20 Min.	—	—	—	35–40 „
$16 \times$ „	Nach 8 M. flockig	—	—	—	—	35–40 „

Lösung die zunehmende Einwirkung des Neutralisierens wohl der Konzentrationsabnahme zuzuschreiben sein. Jedenfalls besteht kein Grund zur Annahme, daß bei der Digestion mehr Lab als

Pepsin zerstört wird. Zur weiteren Begründung meiner Auffassung habe ich die Methode Schmidt-Nielsens, ein wenig geändert, auch beim Schweinsenzym angewendet. Eine Lösung in 0,2%iger HCl, welche nach Neutralisation mit CaCO_3 Milch in 5 Sekunden dick legte, bei saurer Reaktion, 2 mal mit Wasser verdünnt, in 5 Sekunden und in 5 Stunden 3,4 mm der Mett-schen Röhrchen verdaute, wurde zum Teil kalt aufbewahrt, zum Teil auf 37° erwärmt. Letztere zeigte nach 11 Tagen Digerierens eine Labungszeit von 30 Sekunden. Dementsprechend wurde die nicht digerierte Lösung soweit mit 0,2%iger HCl verdünnt, daß sie nach Neutralisation mit CaCO_3 die Milch in derselben Zeit gerinnen machte. Beide Lösungen wurden nun auch auf ihre labende und proteolytische Wirkung bei saurer Reaktion geprüft:

	Digerierte Lösung	Verdünnte Lösung
Gerinnung. Neutralisiert mit CaCO_3 :	30 Sek.	30 Sek. 35 Sek.
• Saure Reaktion 2 × ver-		
• dünn mit Wasser:	25 • 20—25 •	25 • 30 •
Digestion in 5 Stunden:	1,4 mm	1,4 mm

Nach 11 Tagen Digerierens war also nicht mehr Lab zerstört als Pepsin.

Eine zweite, ebenso gemachte Probe ergab das folgende: Die ursprüngliche Lösung brachte die Milch zur Gerinnung, neutralisiert in 5 Sekunden, bei saurer Reaktion 2 mal mit Wasser verdünnt, in 5 Sekunden, die Verdauung war in 5 Stunden 4,6 mm. Nach 11 Tagen Digerierens wurde der nichtdigerierte Teil durch Verdünnung mit 0,2%iger HCl dem digerierten wieder gleichgemacht. Die Proben ergaben das folgende:

	Digerierte Lösung	Verdünnte Lösung
Gerinnung. Neutralis. m. CaCO_3 :	25 Sek. 30—35 Sek.	30 Sek. 30—35 Sek.
• Saure Reakt. 2 × ver-		
• dünn mit Wasser:	15 • —	20 • 15—20 •
Digestion in 5 Stunden:	2 mm	1,9 mm

Der eine Teil wurde weiter digeriert. Nach 19 Tagen konnte ich die Labung bei neutraler Reaktion nicht mehr bestimmen. Einige Proben gerannen in einigen Minuten, andere noch nicht in 10 Minuten. Bei saurer Reaktion war die Wirkung noch gut zu bestimmen. Die nichtdigerierte Lösung wurde nun so weit mit 0,2%iger Salzsäure verdünnt, daß die Labung bei

saurer Reaktion in der gleichen Zeit stattfand, als bei dem digerierten Teil.

	Digerierte Lösung	Verdünnte Lösung
Gerinnung. Saure Reaktion		
2 × verdünnt mit Wasser:	35 Sek. 35 Sek.	35—40 Sek. 40 Sek.
Digestion in 5 Stunden:	1.9 mm	1.9 mm

Daß in diesem Versuche die Abnahme der Mettschen Röhrchen derjenigen nach 11 tägiger Digestion gleich ist, obwohl die Labungszeit zugenommen hat, rührt daher, daß in dieser letzten Probe andere, neu bereitete Röhrchen verwendet wurden.

Wenn nun irgend ein Unterschied zwischen Pepsin und Chymosin nicht nachgewiesen worden ist, so hat man auch nicht das Recht, die Anwesenheit von zwei verschiedenen Enzymen, Pepsin und Chymosin, anzunehmen. Der von Hemmeter¹⁾ gegen Pawlows Arbeit gemachte Einwand, daß es möglich ist, daß zwei durcheinander gemischte Stoffe sich der Einwirkung der verschiedenartigsten Agentien gegenüber so vollkommen gleich verhalten, daß ihre Wirkung proportional immer dieselbe bleibt, kann auch gegen meine Versuche geltend gemacht werden. Ein Beweis für die Identität, wie Hemmeter es wünscht, kann aber nicht zu Recht gefordert werden. Man kann aus Magenschleimhäuten einen Stoff absondern, welcher Eiweiß löst und Milch zur Gerinnung bringen kann. A priori besteht kein Grund, anzunehmen, daß dies ein Gemisch zweier Substanzen ist. Erst seitdem Hammarsten meinte, daß es möglich sei, diesen Stoff zu spalten in zwei, deren jeder einzelne eine der Funktionen besaß, entstand die Meinung, daß Lab ein anderer Stoff sei als Pepsin. Pawlow hat gezeigt, daß es nicht gelingt, eine Spaltung zustande zu bringen, weder durch Präzipitation mit Magnesiumcarbonat, noch durch eine der anderen Methoden. Er vermutet, daß die scheinbare Abnahme der Labwirkung, der Proteolyse gegenüber, durch Digerieren mit Salzsäure der Neutralisation zuzuschreiben sei. Daß dies wirklich so ist, glaube ich oben bewiesen zu haben. Solange nicht endgültig bewiesen ist, daß die Spaltung wohl gelingt, solange besteht kein Grund zur Annahme, daß Pepsin und Chymosin zwei verschiedene Substanzen sind.

¹⁾ Berliner klin. Wochenschrift. Festnummer für C. A. Ewald. 1905, S. 14.

Auch ist jetzt kein Grund mehr vorhanden für die Annahme, das Enzym würde seine zweifache Wirkung, die proteolytische und die labende, besonderen an verschiedenen Stellen des Riesenmoleküls sich befindenden Atomgruppen verdanken. Diese Annahme war nur nötig, solange man glaubte, daß unter gewissen Verhältnissen das Enzym seine Wirksamkeit in der einen Richtung verlieren, in der andern behalten konnte. Viel mehr hat meiner Ansicht nach die von Sawjalow verteidigte Auffassung für sich, nach welcher die Paracaseinbildung nichts anderes ist, als der Anfang der peptischen Verdauung des Caseins. Dafür sprechen die Ergebnisse der neueren Untersuchungen über die Veränderungen des Caseins unter dem Einfluß des Labenzym. Petry, der nachgewiesen hat, daß bei der Labung eine stets fortschreitende Spaltung des Caseins stattfindet, hält zwar an der Meinung fest, daß Lab etwas anders ist als Pepsin, und nimmt an, daß im Lab neben dem paracaseinbildenden Chymosin noch ein anderes, für Casein spezifisches, proteolytisches Enzym enthalten ist.¹⁾

Daß die gefundene Proteolyse nicht von Pepsinwirkung herrührte, schließt Petry aus Versuchen, in welchen eine durch längere Digestion so weit geschwächte Pepsinlösung, daß sie nach Neutralisation Milch in 12 Stunden nicht imstande war dick zu legen, bei saurer Reaktion aber noch geronnenes Serumalbumin verdaute, neutralisiert keine Spaltung von Casein hervorrief, und aus der Beobachtung, daß Labextrakte, speziell Casein, nicht aber oder kaum andere Eiweißstoffe anzugreifen vermögen. In Anbetracht des schädlichen Einflusses des Neutralisierens ist, wie ich glaube, den erstgenannten Versuchen keine beweisende Kraft beizumessen. In bezug auf die größere Empfindlichkeit von Casein im Gegensatz zu anderen Eiweißstoffen möchte ich noch, abgesehen von den Schwierigkeiten, welche einer richtigen Beurteilung der Beobachtungen entgegenstehen, wenn nur mit ungereinigtem, die Proteolyse hemmende Stoffe enthaltendem Labextrakte gearbeitet wird, auf die vor kurzem veröffentlichten Untersuchungen von Frl. Van Herwerden²⁾ hinweisen.

¹⁾ Hofmeisters Beiträge, Bd. VIII, S. 356.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. LII, S. 184.

Daraus geht hervor, daß die Labwirkung eine Proteolyse ist, welche aber nicht ohne weiteres der Bildung von Albumosen z. B. aus Hühnereiweiß gleich gestellt werden darf. Wenn das Enzym, sei es Handelslab oder möglichst gereinigtes Pepsin, bei neutraler oder schwach saurer Reaktion auf Casein wirkt, findet eine Spaltung statt in Paracasein A, Paracasein B und ein drittes Produkt, vorläufig Substanz C genannt. Erst viel später, falls wenigstens das Paracasein A bei Abwesenheit von Kalksalzen in Lösung bleibt, kommt es zur Bildung von primären Albumosen. In derselben Zeit aber bildet das Enzym bei der gleichen Reaktion der Lösung auch aus gekochtem Hühnereiweiß zwar eine geringe, aber doch nachweisbare Menge primärer Albumosen. Es ist also nicht das Enzym, welches eine Sonderstellung einnimmt, sondern das Casein. Von den anderen bekannten Eiweißstoffen unterscheidet es sich dadurch, daß es sehr leicht einer zwar geringfügigen Spaltung unterworfen ist. Wie Van Herwerden fand, wird in Lösungen von sorgfältig nach Hammarsten gereinigtem Casein bei Körperwärme, selbst ohne irgend welchen Enzymzusatz die Substanz C in geringer Menge abgespalten. Die Eigentümlichkeit des Paracaseins A, bei Anwesenheit von Kalksalzen als eine unlösliche Gallerte auszufallen, macht eben bei Casein die Proteolyse schon augenfällig in einer Phase, in welcher sie sich bei anderen Eiweißstoffen noch der Beobachtung entzieht.

Es scheint mir deshalb am besten den Beobachtungen entsprechend, die Labung der Milch als den Ausdruck der anfangenden Pepsinverdauung des Caseins zu betrachten. Bei Anwesenheit einer genügenden Konzentration von H-Ionen geht dieselbe bald weiter; andernfalls scheidet sich, wenn Kalksalze vorhanden sind, der Käse aus.

Bei dieser Auffassung ist es auch nicht sonderbar, daß allerhand proteolytische Enzyme Gerinnung der Milch hervorrufen können, auch wenn sie unter natürlichen Verhältnissen niemals mit Casein in Berührung kommen. Die Eigentümlichkeit ist dann in dem Casein, nicht in dem Enzym zu suchen.