

Zur Frage nach der Identität der Pepsin- und Chymosinwirkung.

Von
Olof Hammarsten.

(Der Redaktion zugegangen am 21. April 1908.)

Ohne auf die Geschichte dieser strittigen Frage und die hierher gehörende Literatur des näheren einzugehen,¹⁾ will ich daran erinnern, daß zwei wesentlich verschiedene Ansichten hier einander gegenüberstehen. Die eine, von Pawlow,²⁾ Sawjalow³⁾ u. a. und in der allerletzten Zeit von Sawitsch⁴⁾ und namentlich von Gewin⁵⁾ vertretene Ansicht lautet dahin, daß beide Wirkungen von einem und demselben Enzyme herühren, und nach Sawjalow und Gewin soll die Milchgerinnung nichts anderes als der Anfang der Pepsinverdauung sein.

Nach der zweiten Ansicht sind dagegen die beiden Enzymwirkungen nicht identisch, sondern verschiedener Art. Hier sind nun aber zwei Möglichkeiten denkbar. Man kann sich das Pepsin und Chymosin als zwei verschiedene Enzyme vorstellen, oder man kann mit Nencki und Sieber,⁶⁾ denen Pikelharing⁷⁾ später sich anschloß, annehmen, daß das sogenannte Pepsin aus einem Riesenmolekül mit Seitenketten besteht, deren eine bei saurer Reaktion Hydrolyse von Eiweiß, die andere dagegen bei neutraler Reaktion Gerinnung von Milch

¹⁾ Man wird mir wahrscheinlich den Vorwurf machen, daß ich in diesem Aufsätze die Arbeiten anderer zu wenig besprochen habe. Dies war aber notwendig, um dem Aufsätze einen nicht zu großen Umfang zu geben.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLII.

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLVI.

⁴⁾ Diese Zeitschrift, Bd. LV.

⁵⁾ Diese Zeitschrift, Bd. LIV.

⁶⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXII.

⁷⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXV.

veranlaßt. Eine experimentelle Entscheidung zwischen diesen beiden Möglichkeiten dürfte schwer sein, denn selbst wenn es gelingt, eine Lösung darzustellen, welche nur die eine Wirkung zeigt, während die andere vernichtet worden ist, kann man nämlich ebenso gut sich vorstellen, daß man das eine Enzym wie daß man eine Seitenkette zerstört hat. Gemeinsam für diese beiden Anschauungen ist es aber, daß sie die zwei Enzymwirkungen als verschiedenartige betrachten, während die erstgenannte Ansicht die labende und die proteolytische Wirkung als eine und dieselbe, nur infolge der ungleichen Beschaffenheit des Substrates oder der ungleichen äußeren Bedingungen in verschiedener Weise sich äußernde Enzymwirkung betrachtet.

Ich lege nun wenig Gewicht darauf, ob es zwei verschiedene Enzyme oder zwei verschiedenartig wirkende Atomkomplexe desselben großen Moleküles gebe: für mich ist es die Hauptfrage, ob man die eine Enzymwirkung von der anderen trennen kann oder nicht. Diese Frage soll auch der Hauptgegenstand dieses Aufsatzes sein.

Wenn die labende und die proteolytische Wirkung nur verschiedene Seiten einer und derselben Enzymwirkung sind, so ist man berechtigt, eine gewisse Parallelität zwischen den beiden Wirkungen zu erwarten; und es muß deshalb eine wichtige Aufgabe sein, zu prüfen, inwieweit eine solche Parallelität tatsächlich besteht. Viel wichtiger ist es jedoch, wenn möglich, eine Trennung der beiden Enzymwirkungen in der Weise durchzuführen, daß man Lösungen darstellt, welche nur die eine, aber nicht die andere Wirkung zeigen.

Auf diesem letztgenannten Wege habe ich schon vor 36 Jahren versucht, diese Frage ihrer Lösung entgegenzuführen. Ich habe nämlich Methoden ausgearbeitet,¹⁾ mittels welcher es mir gelang, auf der einen Seite Lösungen darzustellen, welche Milch koagulierten, während sie proteolytisch unwirksam waren, und auf der anderen Lösungen, welche Eiweiß in saurer Lösung verdauten, während sie Milch nicht koagulierten.

Die erste meiner Methoden, welche auf die Darstellung labender, aber peptisch unwirksamer Lösungen hinielte, ist

¹⁾ Vgl. Malys Jahresberichte, Bd. II für das Jahr 1872.

meines Wissens bisher nie eingehend nachgeprüft worden. Nach Gewin¹⁾ soll Pawlow allerdings gezeigt haben, daß eine Trennung der beiden Enzymwirkungen nach dieser Methode nicht gelingt; in dem Folgenden werde ich aber Gelegenheit finden, zu zeigen, daß in den Versuchen von Pawlow (und Parastschuk) die für ein Gelingen meiner Methode notwendigen Voraussetzungen fehlten und daß folglich ihre Versuche mißlingen mußten. Da diese meine Methode nur in schwedischer Sprache beschrieben worden ist, und da von ihr nur ein knappes Referat in den Jahresberichten Malys (für das Jahr 1872) vorliegt, werde ich in einem besonderen Abschnitte dieses Aufsatzes diese Methode ausführlicher beschreiben.

Die zweite Methode, welche die Darstellung von chymosin-freien Pepsinlösungen bezweckte, basiert darauf, daß man, wie ich gefunden hatte, durch Erwärmen einer sauren Mageninfusion sämtliches Chymosin zerstören kann, während ein Teil des Pepsins noch zurückbleibt. Diese meine Angaben sind von einigen Seiten bestätigt, von anderen dagegen geleugnet worden. Da man an die Richtigkeit der einen Beobachtungen ebenso wenig wie an die der anderen zu zweifeln berechtigt ist, muß man wohl annehmen, daß hier, wie in so vielen anderen Fällen, eine ungleiche Versuchsanordnung eine wichtige Rolle spielen kann. Aus diesem Grunde will ich auch diese Methode und die mit ihr gewonnenen Resultate in einem besonderen Abschnitte behandeln, damit auch andere Forscher instand gesetzt werden, den Wert meiner Angaben zu beurteilen.

Bevor ich zu den besonderen Abschnitten übergehe, muß ich jedoch erst meine Stellung zu einigen Fragen mehr allgemeiner Natur etwas präzisieren.

Eine solche Frage ist die, was man als eine typische Chymosinwirkung betrachten soll. Das Einzige, was, so weit man bisher kennt, eine echte Chymosinwirkung charakterisiert, ist, daß eine neutrale Enzymlösung in einer ebenfalls neutralen Caseinlösung eine Paracaseinbildung erzeugt. In der Milch scheidet sich das Paracasein bekanntlich infolge der Gegenwart von Kalksalzen als eine geronnene Masse aus, und darum

¹⁾ l. c.

benutzt man auch allgemein die Milch als das einfachste Reagens auf Chymosin. Auch hier muß man indessen die Forderung aufstellen, daß die Gerinnung bei neutraler oder alkalischer Reaktion geschieht. Der Beweis für die Anwesenheit von Chymosin ist also nach meiner Ansicht nur in dem Falle geliefert, wenn eine neutrale Enzymlösung frische, amphoter reagierende Kuhmilch, bevor noch Säuerung der letzteren eintritt, zur Gerinnung bringt.

Denjenigen Resultaten, welche man bei Anwendung von stark sauer reagierenden Infusionen oder überhaupt bei saurer Reaktion erhält, kann ich für die Lösung der jetzt vorliegenden Frage in der Regel keine Beweiskraft zuerkennen und ich finde es sogar prinzipiell nicht richtig, wenn man die Frage nach der Identität, bezw. Nichtidentität der beiden Enzymwirkungen, hauptsächlich durch Labungsversuche mit sauren Infusionen oder angesäuerter Milch zu entscheiden sucht.

Nach der bisher gang und gäben Vorstellung ist das Pepsin gerade dadurch charakterisiert, daß es nur bei Gegenwart von freien H-Ionen wirkt, während es für die Chymosinwirkung ebenso charakteristisch ist, daß sie bei Abwesenheit von H-Ionen und, wie ich¹⁾ schon vor vielen Jahren zeigte und in neuerer Zeit Schmidt-Nielsen²⁾ und v. Herwerden³⁾ bestätigt haben, auch in alkalisch reagierender Milch, also bei Gegenwart von HO-Ionen, zur Geltung kommt. Durch Ansäuern der Milch oder der Enzymlösung kann man also die für eine Pepsinwirkung notwendigen Bedingungen schaffen, und es wäre ja sehr wohl möglich, daß der Anfang der Pepsinwirkung auf die Milch durch eine Gerinnung sich kundgibt, welche der Labgerinnung ähnelt, ohne mit ihr identisch zu sein. Man darf nämlich nicht vergessen, daß nicht jede Milchgerinnung eine Paracaseinbildung ist. Man glaubte lange, daß die Gerinnung der Milch bei ihrer spontanen Säuerung und bei der Labung identische Prozesse waren, trotzdem sie, wie wir nunmehr wissen, grundverschieden sind. Ob die mit einer Mageninfusion bei neutraler und bei

¹⁾ Vgl. Malys Jahresberichte, Bd. II.

²⁾ Festschrift für Olof Hammarsten, 1906.

³⁾ Diese Zeitschrift. Bd. LII.

saurer Reaktion stattfindenden Gerinnungen derselben Art sind, weiß man nicht, und diese Frage hat meines Wissens noch niemand in exakter Weise zu lösen versucht.

Als typisches Chymosin betrachte ich bis auf weiteres nur das Chymosin aus dem Kalbsmagen, und zwar aus Gründen, die ich in dem ersten Abschnitte dieses Aufsatzes bei Besprechung meiner vergleichenden Untersuchungen über Pepsin- und Chymosinwirkungen bei einigen Tieren darlegen werde. Hier mag es genügen, die Aufmerksamkeit darauf zu lenken, daß meine Methode zur Darstellung einer pepsinfreien Chymosinlösung ausschließlich für das Kalbsmagenchymosin ausgearbeitet worden ist.

Eine andere wichtige Frage ist die von der relativen Empfindlichkeit der zur Prüfung der peptischen Wirkung einerseits und der labenden andererseits üblichen Reaktionen. Kann man z. B. die labende Wirkung noch sicher beobachten bei einer Verdünnung der Enzymlösung, bei welcher die Eiweißverdauung nicht merkbar ist, oder umgekehrt? Diese Frage, welche für das Studium einer etwa vorhandenen Parallelität der beiden Enzymwirkungen besonders wichtig ist, hat im Hinblick auf eine Aussage von Pawlow erhöhtes Interesse gewonnen. Nach Pawlow, dem Gewin¹⁾ in diesem Punkte sich anschließt, sind die beiden Reaktionen von so ganz verschiedener Empfindlichkeit, daß sie nicht miteinander verglichen werden können, und zur Begründung dieser Ansicht äußert sich Pawlow (mit Parastschuk) in folgender Weise:²⁾

Zur Bestimmung der proteolytischen Wirkung wurde meist ein sehr empfindliches Reagens, das Fibrin, für das es überhaupt keine Grenze der Empfindlichkeit gibt, angewandt. Zur Untersuchung der milchkoagulierenden Wirkung nahm man neutralisierten Saft, bei welchem im Falle der Verminderung seiner Konzentration sehr bald die Grenze seiner Wirksamkeit erreicht wird: dieser Fall mußte umsomehr eintreten, als die Autoren augenscheinlich aus Furcht, die Milch könnte spon-

¹⁾ l. c.

²⁾ Diese Zeitschrift. Bd. XLII, S. 434.

tan säuern, ganz willkürlich einen im allgemeinen kurzen Grenztermin für den Eintritt der Gerinnung wählen.

Ein einfaches Beispiel beweist die Richtigkeit unserer Behauptung: nimmt man kräftigen Brotsaft, so kann man ihn mehrere hundert-, sogar tausendmal verdünnen und dennoch sicherlich nach 1, 1 $\frac{1}{2}$ —2 Stunden Fibrinauflösung mit demselben erzielen. Derselbe, mit NaHCO₃ neutralisierte Brotsaft koaguliert sogar, wenn er 10-, 20mal verdünnt ist, Milch nur nach vielen Stunden, verdünnt man ihn noch mehr, so bleibt die Milch ganz ungeronnen.*

Hier ist nun allerdings kein direkter, beweisender Versuch von Pawlow mitgeteilt worden: aber trotzdem dürfte man wohl aus dem angeführten Passus den bestimmten Schluß ziehen können, daß man in dem Hundemagensaft (denn um solchen handelt es sich hier) unendlich viel kleinere Enzymmengen mit der Fibrinverdauungsprobe als mit der Milchgerinnungsprobe nachweisen kann. Wenn nun der Hundemagensaft sich so verhält, so ist es von nicht geringem Interesse, daß, wenigstens nach meiner Erfahrung, das Verhalten des Kalbsmagensaftes ein ganz anderes ist. Ich werde dies in dem Folgenden durch besondere Versuche zeigen, und des Vergleiches halber werde ich in demselben Abschnitte auch einige vergleichende Versuche mit Mageninfusionen von Pferd, Huhn und Hecht mitteilen.

Da ich es zweckmäßig gefunden habe, diese Versuche mit Infusionen auf Tiermägen meiner Beschreibung der Methoden zur Trennung der Enzyme voranzuschicken, so habe ich dementsprechend diesen Aufsatz in folgende 3 Abschnitte geteilt, nämlich: 1. Vergleichende Untersuchungen der Pepsin- und Chymosinwirkung bei einigen Tieren, 2. Methode zur Darstellung pepsinfreier Chymosinlösungen und 3. die Darstellung chymosinfreier Pepsinlösungen.

Bevor ich zu diesen besonderen Abschnitten übergehe, will ich indessen, um Wiederholungen zu vermeiden, einige Bemerkungen, welche auf sämtliche Infusionen sich beziehen, vorausschicken.

Ich bereite nie meine Infusionen durch Selbstverdauung

bei Körpertemperatur und ich lasse im Gegenteil das angesäuerte Wasser (0,2% HCl) bei niedriger Temperatur, etwa + 2 à 3° C. einwirken. Durch Selbstverdauung erhält man allerdings enzymreichere Lösungen; aber sie werden gleichzeitig so stark von Verdauungsprodukten verunreinigt, daß sie zu gewissen Versuchen ungeeignet sind.¹⁾ Durch die Selbstverdauung kann man ferner die ursprüngliche Relation zwischen den beiden Enzymwirkungen dermaßen verändern, daß man zu fehlerhaften Schlüssen kommt, und endlich ist ein großer Gehalt an Enzym nicht für alle Untersuchungen günstig. Man kann im Gegenteil Unterschiede in der Intensität der beiden Enzymwirkungen manchmal viel besser beobachten und beurteilen bei einem mäßigen als bei einem sehr großen Enzymgehalte.

Aus diesen Gründen arbeite ich in den meisten Fällen mit verdünnten Lösungen. Über die Reinheit derselben, namentlich im Vergleiche mit den von anderen benützten, kann ich selbstverständlich nichts Sicheres sagen. Weil aber Gewin in seinem Aufsätze geschrieben hat, daß «die schwedischen Forscher mit Enzymlösungen, welche sicher viele Beimischungen enthielten — Magenschleimhautextrakte, Handelslab — gearbeitet haben», erlaube ich mir, zu bemerken, daß ich bei meinen Versuchen, die Pepsin- und Chymosinwirkungen zu trennen, erstens nie mit Handelslab gearbeitet habe und zweitens zuletzt Chymosinlösungen erhielt, die beim Sieden nicht gerannen, von Alkohol, Salpetersäure, Gerbsäure und Bleizucker nicht gefällt wurden und die Xanthoproteinsäurereaktion nicht gaben.²⁾

Statt mit Infusionen zu arbeiten, hat Gewin Lösungen von dem nach Pekelharing³⁾ gereinigten Enzym verwendet. Dieses Enzym war indessen nicht rein. Es war nicht farblos, enthielt das eine Mal mehr, das andere weniger Phosphor und soll außerdem, was nach Gewin besonders wichtig ist, von unbekanntem Stoffen verunreinigt sein, welche die Enzyme gegen

¹⁾ Dagegen lasse ich die filtrierten Infusionen, wenn nötig, einige Zeit im Brutofen stehen, bis ich sicher bin, daß alles Zymogen in Enzym umgewandelt worden ist.

²⁾ l. c. Malys Jahresber., Bd. II.

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXII u. XXXV.

die schädliche Wirkung der Neutralisation mit Alkali schützen sollen. Wenn nun aber solche Schutzstoffe wirklich existieren, wie kann man sicher sein, daß nicht gerade diese Stoffe (wie z. B. Enzyme bei der Dialyse) von den Proteinsubstanzen mit niedergerissen und demnach gewissermaßen konzentriert werden, während andere für die Enzymwirkungen nicht gleichgültige Stoffe bei der Reinigung in Lösung bleiben und verloren gehen? Wie es hiermit sich verhält, wissen wir nicht, und über den Wert dieser partiellen Reinigung für das Studium der hier vorliegenden Frage kann man noch kein Urteil fällen. Eine Infusion enthält voraussichtlich alle diejenigen Stoffe, welche für ihre Enzymwirkungen von Belang sind, und aus dem Grunde muß nach meiner Ansicht eine Untersuchung der Infusionen dem Studium besonderer Fraktionen derselben vorgehen. Dies zur Erklärung, warum ich in dem ersten Abschnitte mit den « unreinen » Infusionen und nicht mit den teilweise gereinigten Enzymen gearbeitet habe.

Maßgebend für die Reinheit einer Enzymlösung ist wenigstens einigermaßen ihr Gehalt an festen Stoffen, und Angaben hierüber erleichtern jedenfalls einen Vergleich der von verschiedenen Forschern erhaltenen Resultate. Es ist deshalb zu bedauern, daß solche Angaben so oft fehlen. Da ich stets mit Infusionen von bekanntem Gehalte an festen Stoffen arbeite, werde ich auch in dem folgenden in jedem Versuche den Gehalt der Lösungen an solchen angeben.

Arbeitet man mit Infusionen oder Enzymlösungen, welche einen bekannten Gehalt an Salzsäure — in meinen Versuchen fast immer 0,2% HCl — haben, so kann man behufs Bestimmung der Konzentration einfach in der Weise verfahren, daß man eine abgemessene Menge, 10—20 ccm, mit $\frac{n}{10}$ -Lauge genau neutralisiert und von dem Gewichte des bei 110° getrockneten Rückstandes das Gewicht des gebildeten Kochsalzes abzieht. Dieses Verfahren ist natürlich nicht ganz genau, und des Vergleiches halber habe ich auch in vielen Fällen durch Einäschern des Rückstandes den Gehalt an organischen Stoffen und Mineralstoffen bestimmt. Der Unterschied zwischen den nach beiden Methoden erhaltenen Zahlen ist indessen, wenigstens wenn man

mit verdünnteren Infusionen arbeitet, so gering, daß er für die hier in Rede stehenden Untersuchungen ohne Belang ist. Aus dem Grunde habe ich auch meistens das einfachere Verfahren benutzt. Desselben Verfahrens haben auch Nencki und Sieber¹⁾ bei ihren Analysen des Hundemagensaftes sich bedient, und meine Zahlen sind also mit den ihrigen vergleichbar. Damit es dem Leser möglich werden möge, wenigstens irgend einen Anhaltspunkt für die Beurteilung der Konzentration meiner Lösungen zu gewinnen, will ich hier daran erinnern, daß der Gehalt des reinen Hundemagensaftes an festen Stoffen in den Analysen von Nencki und Sieber durchschnittlich 0,306%, in den von Schoumow-Simanowsky²⁾ 0,47% und in den von Rosemann³⁾ 0,4277% betrug.

Endlich habe ich nur noch hinzuzufügen, daß alle meine Arbeiten über diesen Gegenstand nur in den Wintermonaten ausgeführt wurden und daß die Mägen stets so unmittelbar als möglich nach dem Schlachten der Tiere in Arbeit genommen wurden.

I. Vergleichende Untersuchungen der Pepsin- und Chymosinwirkung bei einigen Tieren.

A. Infusionen auf Kalbsmägen.

Ich benutze nur Mägen von Saugkälbern. Der Labmagen wird von dem Darne und den drei anderen Mägen getrennt, längs der kleinen Curvatur aufgeschnitten und von dem Inhalte durch Ausspülen mit Wasser befreit. Dann schneide ich den Pylorusteil weg und zwar so reichlich, daß wenigstens 3—5 cm von den großen Falten des Fundusteiles mit weggenommen werden. Der Grund hierzu liegt darin, daß der Pylorusteil eine mehr schleimreiche Infusion liefert, während er gleichzeitig weniger reich an Enzymen als der Fundusteil ist. Der Rest des Magens wird nun ausgespannt und gründlich mit dem kalten Wasser aus der Leitung abgespült, wobei man darauf achtet,

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXII.

²⁾ Arch. f. exp. Path. u. Pharm., Bd. XXXIII. und Arch. f. [Anat. u.] Physiol., 1895.

³⁾ Pflügers Arch., Bd. CXVIII.

daß alle Partikelchen und Schleimflöckchen, auch die, welche hinter den Falten sich vorfinden, entfernt werden; widrigenfalls erhält man leicht eine schleimige Infusion. Darauf schabt man mit dem Rande eines Uhrgläschens die Drüsenschicht ab und zwar auf beiden Seiten je einer Falte, wägt die Masse und zerteilt sie in verdünnter Salzsäure von 0,1—0,2% HCl (ich brauche regelmäßig 0,2% HCl). Es kommen hierbei auf je einen Gewichtsteil Drüsenmasse 10—20 cem Säure. Man kann natürlich die Masse nach dem Wägen mit Sand zerreiben, aber dies ist nicht nötig. Nun läßt man die verdünnte Säure bei niedriger Temperatur, etwas über 0°, 12—24 Stunden während mehrmaligen Umschüttelns einwirken und filtriert nach dieser Zeit.

Das so erhaltene Filtrat kann, je nach seiner Konzentration und dem mit ihm beabsichtigten Zwecke, unverdünnt oder nach passender Verdünnung mit Säure benutzt werden. Trotz der obengenannten Vorsichtsmaßregeln ist die leicht filtrierende Infusion bisweilen ein wenig fadenziehend; aber dennoch ist sie nicht besonders reich an festen Stoffen, was leicht verständlich ist, wenn man bedenkt, wie äußerst wenig Schleimsubstanz in vielen Fällen genügt, um eine Lösung etwas fadenziehend zu machen.

Die Anordnung der zum Vergleiche der labenden und verdauenden Wirkung angestellten Versuche war bei den Versuchen mit den anderen Infusionen, wenn nichts anderes angegeben wird, dieselbe wie in den Versuchen mit Kalbsmageninfusionen, und das für die letzteren hier unten Gesagte gilt deshalb auch für die Versuche mit Infusionen auf Mägen anderer Tiere.

Zu den Verdauungsversuchen habe ich teils die Mettschen Röhren, welche ich in Wasser unter Toluol aufbewahre, und teils ungekochtes, in Glycerin unter Toluol aufbewahrtes Fibrin benutzt. Von den Röhren mit Eiweiß (Hühnereiweiß) wurden nach dem Abspülen mit Wasser und Abtrocknen derselben erst die beiden mit dem Toluolwasser in Berührung gewesenen Enden abgeschnitten und dann das übrige Stück in passende kleinere Stückchen zerschnitten, so daß zu den mit einander zu vergleichenden Lösungen immer Teile derselben größeren Röhre verwendet wurden. Der Säuregrad war in den

Mettschen Versuchen, wenn nichts anderes angegeben wird, 0,2% HCl und die Versuche wurden bei Körpertemperatur im Thermostaten ausgeführt.

Eine genaue Ablesung der Länge der verdauten Strecke war mir nicht immer möglich, denn die Grenze zwischen Gelöstem und nicht Gelöstem ist nicht immer ganz scharf. Namentlich bei langsamer Verdauung findet man eine mehr oder weniger halbdurchsichtige, unscharfe Schicht, und einen Fehler von einigen Zehnteln Millimeter bei den Ablesungen habe ich in vielen Fällen nicht vermeiden können. Übrigens ist die verdaute Strecke nicht immer gleich groß in den beiden Röhren, ja sogar nicht immer in den beiden Enden eines und desselben Röhrenstückchens. Ich habe deshalb das Mittel aus den abgelesenen Zahlen genommen und daraus das Quadratverhältnis, welches regelmäßig als Maß der Verdauung angeführt wird, berechnet. Das von Jastrowitz¹⁾ verbesserte Verfahren habe ich aus äußeren Gründen leider nicht benutzen können.

Die Verdauungsproben mit Fibrin wurden stets bei Zimmertemperatur (15—18° bei verschiedenen Gelegenheiten) und bei einem Säuregrad von 0,1% HCl ausgeführt. Der Kontrolle halber wurde ein Versuch mit Säure und Fibrin allein angeordnet, und ein solcher Kontrollversuch ist auch ein gutes Mittel, um den Anfang und den Fortgang der Verdauung in den anderen Proben beurteilen zu können. Nach Brücke kann man teils den Anfang und teils das Ende der Verdauung bestimmen. Ich habe auch den Zeitpunkt annotiert, wo etwa die Hälfte des Fibrins verdaut war, finde es aber hinreichend, in dem folgenden nur die beiden erstgenannten Zeitpunkte anzuführen. Ganz genau kann man übrigens dieselben nicht bestimmen.

Es ist nämlich schwer, ganz gleichartiges Fibrin für die verschiedenen Proben auszuwählen und man beobachtet dementsprechend nicht selten am Ende der Verdauung gequollene Fibrinbröckchen, die in der einen Probe resistenter als in der anderen sind und eine genaue Bestimmung des Endpunktes der Verdauung unmöglich machen. Kleinere Unterschiede in den Enzymmengen kann man also mit dieser Probe nicht nach-

¹⁾ Biochemische Zeitschrift, Bd. II.

weisen. Wenn es aber, wie in meinen Versuchen, um sehr bedeutende Unterschiede sich handelt, ist sie, besonders wenn man in ihrer Handhabung genügende Übung hat, völlig brauchbar. Der Grund, warum ich gerade mit den nun genannten Verdauungsproben trotz ihrer Mängel gearbeitet habe, ist der, daß sie diejenigen sind, welche bei Arbeiten auf diesem Gebiete von anderen allgemein gebraucht worden sind und daß meine Versuchsergebnisse hierdurch mit denjenigen anderer besser vergleichbar werden. Ein besonderer Grund zur Anwendung der Fibrinprobe lag übrigens darin, daß Pawlow in seiner oben zitierten Arbeit gerade die Empfindlichkeit der Gerinnungsprobe und der Fibrinprobe verglichen hat.

Da die Milchgerinnungsversuche in erster Linie mit neutralen Lösungen auszuführen sind, habe ich für diese Versuche die Infusionen mit CaCO_3 oder mit $\frac{n}{10}$ -Natronlauge neutralisiert. Bei der letztgenannten Neutralisation ließ ich die Lauge aus einer Bürette Tropfen um Tropfen unter starkem Umrühren zufließen, bis die Lösung auf empfindliches rotes und blaues Lackmuspapier ohne Wirkung war. Da die hierzu erforderliche Menge Lauge um etwa 5,5 ccm auf je 10 ccm Infusion ein wenig schwankt, hat die neutralisierte Infusion einen Gehalt von etwa 0,207% NaCl oder rund 0,2%. Zur Verdünnung der Vergleichsproben, wenn dieselbe nicht mit Wasser oder CaCl_2 -Lösung geschah, benutzte ich deshalb eine NaCl-Lösung von 0,2%. Die zur Verdünnung in einem Teile der Versuche benutzte CaCl_2 -Lösung bereitete ich durch Neutralisation von Salzsäure von 0,2% mit CaCO_3 in derselben Weise wie die Infusionen.

Die Milch war ganz frische Kuhmilch, die in allen in den Abschnitten I und III mitgeteilten Versuchen stets Mischmilch von denselben 2 Kühen war. Das Verhältnis zwischen Infusion und Milch war, wenn nichts anderes gesagt wird, 1 ccm Infusion auf je 10 ccm Milch, die vor dem Zusammenmischen vorerwärmt waren. Die Röhren standen in einem besonderen Gestelle in einem Wasserbad, dessen Temperatur in einem und demselben Versuche nicht um mehr als 1° schwankte. In den verschiedenen Versuchen schwankte sie zwischen 37,5° und 39°.

Wenn der Enzymgehalt so klein ist, daß die Milchgerinnung erst nach mehreren Stunden eintritt, ist es schwer, den Zeitpunkt der Gerinnung genau zu bestimmen, und man kann die Proben nicht ununterbrochen überwachen. Wenn man in solchen Fällen alle 10 Minuten prüft, so kann man jedoch gute Resultate erhalten, wenn man eine Viertelstunde nach dem Einstellen der Röhre in das Wasserbad eine zweite gleichartige Serie einstellt. Die Fehler, welche man in den Beobachtungen der ersten Reihe macht, können dann durch die zweite korrigiert werden. In den Fällen, wo es (besonders bei kürzerer Gerinnungszeit) nötig war, habe ich auch Doppelproben angeordnet.

Die Neutralisation mit Lauge kann, wie längst bekannt ist, etwas schädigend auf die Magenenzyme einwirken. Wenn nun Pepsin und Chymosin ein und dasselbe Enzym ist, muß diese Schädigung in gleichem Grade auf beide Enzymwirkungen sich geltend machen, und ich bemerke deshalb ausdrücklich, daß ich zu den Verdauungsversuchen in saurer Lösung dieselbe neutralisierte Infusion wie zu den Milchgerinnungsversuchen benutzte, nachdem sie wieder passend angesäuert worden war. Eine neutralisierte Kalbsmageninfusion kann nun tagelang kalt aufbewahrt werden, ohne an Wirksamkeit auf die Milch merkbar abzunehmen, und es ist deshalb gleichgültig, ob man eine solche neutralisierte Infusion etwas früher oder später wieder ansäuert. Da aber Gewin das Gegenteil behauptet, habe ich in den Versuchen mit Kalbsmageninfusionen, in welchen die Chymosinwirkung regelmäßig kräftiger als die Pepsinwirkung ist, das Wiederansäuern des einen Teiles der neutralisierten Lösung stets vor der Anordnung der Milchproben unternommen, so daß also die zur Milchgerinnung verwendete Lösung ein wenig längere Zeit neutralisiert gestanden hatte.

Die Versuche mit Kalbsmageninfusionen hatten zunächst zum Zweck, die Intensität der Pepsin- und Chymosinwirkung zu vergleichen, und nach den nun vorausgeschickten Bemerkungen teile ich hier einige solche Versuche mit.

Versuch 1. Die Infusion enthielt 0,229% feste Stoffe. Säuregrad 0,2% HCl. Nach der Neutralisation mit $n/10$ -Lauge wurde sie 20 Stunden kalt aufbewahrt und dann mit einer NaCl-Lösung von 0,2% auf die Ver-

dünnungen A = $\frac{1}{16}$, B = $\frac{1}{32}$, C = $\frac{1}{64}$ und D $\frac{1}{128}$ gebracht. Für die Verdauungsversuche mit den Mettschen Röhren kamen auf je 8 ccm 2 ccm Salzsäure von 1% und für die Fibrinverdauung 9 ccm auf je 1 ccm derselben Säure.

	Milchgerinnung nach Minuten	Verdauung (Mett) nach Stunden			Fibrinverdauung	
		24	48	72	Anfang	Ende
A $\frac{1}{16}$	6	0,25	1,0	4,0	10—15 Min.	3 St.
B $\frac{1}{32}$	11	0,0	0,36	1,0	30 Min. ungefähr	5—5½ St.
C $\frac{1}{64}$	20	0,0	0,0	0,0	1—1½ St.	> 9 St. < 20 St.
D $\frac{1}{128}$	42	0,0	0,0	0,0	3 St. ungefähr	> 20 St. 1)

Bei den Verdünnungen $\frac{1}{64}$ und $\frac{1}{128}$ und bei einer Gerinnungszeit von bezw. 20 und 42 Minuten war die Verdauung nach Mett = 0 und die Fibrinverdauung war nach 9, bezw. 20 Stunden noch nicht beendet.

Versuch 2. Infusion mit 0,163% festen Stoffen, 0,2% HCl. Neutralisation mit Natronlauge und ein paar Stunden später Verdünnung mit Wasser zu $\frac{1}{100}$.

Milchgerinnung in 31 Minuten. Verdauung nach Mett in 72 Stunden negativ. Fibrinverdauung: Anfang gegen 3 Stunden, Ende nicht vor 12 Stunden, aber im Laufe der Nacht innerhalb 20 Stunden.

Bei einer Gerinnungszeit von 31 Minuten war also die Verdauung nach Mett in 72 Stunden negativ und die Fibrinverdauung erforderte jedenfalls mehr als 12 Stunden.

Versuch 3. Feste Stoffe 0,340%, Säuregrad 0,2% HCl. Die mit $\frac{1}{10}$ -Lauge neutralisierte Infusion wurde, 20 Stunden nach der Neutralisation, mit Wasser zu den folgenden Konzentrationen verdünnt: A = $\frac{1}{50}$, B = $\frac{1}{100}$, C = $\frac{1}{200}$ und D = $\frac{1}{400}$.

Bei dem Enzymgehalte $\frac{1}{100}$, $\frac{1}{200}$ und $\frac{1}{400}$ waren also die Gerinnungszeiten bezw. 15, 38 und 85 Minuten. Bei diesen Verdünnungen gab die Mettsche Probe ein negatives Resultat und die Verdauung des Fibrins war erst nach resp. 3, 4,6 und 6—6,5 Stunden beendet.

1) In C war die Verdauung im Laufe der Nacht vollendet. In D waren am folgenden Morgen, nach 20 Stunden, noch mehrere durchsichtige, unverdaute Reste des Fibrins zu sehen.

	Milchgerinnung nach Minuten	Verdauung (Mett) nach Stunden			Fibrinverdauung	
		24	48	72	Anfang	Ende
A ¹ / ₅₀	8	0,36	1	2,25	30 Min. ungefähr	2 St. ungefähr
B ¹ / ₁₀₀	15	0,0	0,0?	0,0 ¹⁾	45 > >	3 > >
C ¹ / ₂₀₀	38	0,0	0,0	0,0	60 > >	4 > 40 Min. >
D ¹ / ₄₀₀	85	0,0	0,0	0,0	90 > >	6—6 St. 30 Min.

Versuch 4. Feste Stoffe 0,68 %; Säuregrad 0,2% HCl. Nach der Neutralisation mit $\frac{1}{10}$ -Lauge wurde mit Wasser auf $\frac{1}{100}$ verdünnt (A). Nach 24 Stunden wurde der feine Niederschlag gleichmäßig in der Flüssigkeit durch Schütteln verteilt und dann mit Wasser die folgenden Verdünnungen (A = $\frac{1}{100}$) B = $\frac{1}{200}$, C = $\frac{1}{400}$, D = $\frac{1}{800}$ und E = $\frac{1}{1600}$ hergestellt.

Infolge der starken Verdünnungen wurde hier die Mettsche Probe nicht versucht. Fibrinverdauung wie gewöhnlich bei 0,1% HCl.

	Milchgerinnung nach Minuten	Fibrinverdauung	
		Anfang	Ende
A ¹ / ₁₀₀	3	5 Min. ungefähr	1 St. ungefähr
B ¹ / ₂₀₀	5 $\frac{1}{2}$	8 > >	2 > >
C ¹ / ₄₀₀	12	15 > >	3—3 $\frac{1}{2}$ St.
D ¹ / ₈₀₀	21	20—25 Min.	5—5 $\frac{1}{2}$ >
E ¹ / ₁₆₀₀	40	45 Min. ungefähr	6 $\frac{1}{2}$ —7 >

Vergleicht man die Gerinnungszeit mit dem Beginne der Fibrinverdauung, so verlaufen beide Prozesse in diesem Falle etwa gleich rasch. Nimmt man dagegen als Maß das Ende der Verdauung, so ist die Gerinnung in viel kürzerer Zeit beendet.

Dieser Versuch hat ein besonderes Interesse, weil er zeigt, wie kräftig die labende Wirkung einer mit Lauge neutralisierten Kalbsmageninfusion sein kann. Ihre Wirksamkeit wurde erst 24 Stunden nach der Neutralisation (und Verdünnung auf $\frac{1}{100}$) geprüft und trotzdem koagulierte sie die Milch in 40 Minuten

¹⁾ Das Eiweiß war in den Enden der Röhren halb durchsichtig, eine wirkliche Verdauung konnte man aber nicht sicher beobachten.

bei dem Verdünnungsgrade 1 : 1600. Ich prüfte dann etwas später die Wirkung derselben Lösung bei der Verdünnung 1 : 3200 und sie koagulierte nun die Milch 1 : 10 im Laufe von 90 Minuten. Diese Verdünnung entspricht rund einem Gehalte von 0,002 mg festen Stoffes in 1 ccm: und wenn man annehmen wollte, daß in der unreinen Infusion $\frac{1}{4}$ der festen Stoffe aus Chymosin bestand, würde dies also bedeuten, daß in diesem Falle 0,0005 mg Enzym 300 mg Casein (in 10 ccm Milch), d. h. 1 : 600000 koaguliert hatten.

Durch die nun mitgeteilten Versuche habe ich nicht die relative Empfindlichkeit der Gerinnungsprobe und der Fibrinprobe feststellen wollen. Hierzu sind sie nicht geeignet, und zwar um so weniger, als man die Empfindlichkeit der Fibrinprobe mit steigenden Temperaturen bis zu einem gewissen Grade und die Empfindlichkeit der Gerinnungsprobe durch steigende Zusätze von CaCl_2 äußerst stark erhöhen kann. Ich habe durch diese Versuche nur prüfen wollen, ob die von Pawlow am Hundemagensafte gemachten Erfahrungen auch für die Kalbsmageninfusionen zutreffend sind, und in dieser Hinsicht sind die Versuche belehrend genug. Sie zeigen nämlich alle, daß dies nicht der Fall ist. Der neutralisierte Hundemagensaft koaguliert nach Pawlow, wenn er 10—12mal verdünnt ist, die Milch nur nach Stunden und wenn man ihn noch mehr verdünnt, so bleibt die Milch ungeronnen, während auf der anderen Seite der hundert- oder sogar tausendmal verdünnte Hundemagensaft (Brotsaft) nach 1, $1\frac{1}{2}$ —2 Stunden Fibrinlösung bewirken soll. Eine neutralisierte Kalbsmageninfusion kann dagegen hundertmal mit Wasser verdünnt werden und sie koaguliert trotzdem die Milch in 15—30 Minuten, während sie mit der Auflösung einer Fibrinflocke erst nach mehreren Stunden, bisweilen nicht innerhalb 12 Stunden fertig ist. Eine Kalbsmageninfusion kann sogar bei dem Verdünnungsgrade $\frac{1}{400}$, $\frac{1}{800}$, $\frac{1}{1600}$ die Milch in viel kürzerer Zeit als der nur 20mal verdünnte Hundemagensaft koagulieren.

Daß dies nicht von einer besonders großen Konzentration meiner Kalbsmageninfusionen herrührt, kann man aus den Versuchen ersehen. In dem Versuche 4, in welchem die neutra-

lisierte Infusion in der Verdünnung 1 : 1600 die Milch in 40 Minuten labte, war allerdings der Gehalt an festen Stoffen ziemlich hoch (0,68 %); bedeutend höhere Werte haben aber Pawlow und Schoumow-Simanowsky¹⁾ in mehreren Fällen in dem Hundemagensafte erhalten. In dem Versuche 2 war er dagegen nur 0,163 %, und ein so niedriger Wert ist meines Wissens nur einmal in einem Hundemagensaft (von Nencki und Sieber)²⁾ beobachtet worden. In dem Versuche 3 war er 0,340 %, also unterhalb des für Hundemagensaft meistens gefundenen Mittelwertes, und trotzdem koagulierten diese Infusionen bei der Verdünnung $\frac{1}{100}$ die Milch in jenem Falle in 31 und in diesem Falle in 15 Minuten. Nimmt man konzentrierte Infusionen, so können diese mehrere tausendmal verdünnt werden und sie koagulieren trotzdem die Milch in verhältnismäßig kurzer Zeit.

Da ich selbst nicht Gelegenheit gehabt habe, natürlichen Hundemagensaft zu untersuchen, basiert der obige Vergleich zwischen ihm und Kalbsmageninfusionen ausschließlich auf den Erfahrungen Pawlows über den ersteren. Die Relation zwischen den beiden Enzymwirkungen ist also beim Hunde und Kalbe eine ganz verschiedene, und man ist also nicht berechtigt, auf Grund der Versuche mit Hundemagensaft die an Kalbsmageninfusionen gemachten Erfahrungen als unrichtig zu bezeichnen.

Eine Kalbsmageninfusion weicht aber, wie es scheint, auch in anderer Hinsicht von dem Hundemagensafte ab. Nach Pawlow und Parastschuk kann man nämlich den letzteren nicht mit Lauge und kaum mit Na_2CO_3 neutralisieren, ohne das Enzym zum Teil zu zerstören und die labende oder überhaupt enzymatische Wirkung wesentlich zu schwächen. Man soll ihn mit NaHCO_3 (oder CaCO_3) neutralisieren. Die Kalbsmageninfusionen scheinen viel weniger empfindlich gegen Alkali zu sein. Auch hier kann man durch Natronlauge das Enzym ein wenig schwächen; bei vorsichtiger Arbeit ist aber diese Wirkung ohne Bedeutung, und die mit Lauge neutralisierte Infusion wirkt dementsprechend äußerst kräftig labend. Ich bemerke dies, weil Pawlow die

¹⁾ l. c. und Arch. f. (Anat. u.) Physiol., 1895.

²⁾ l. c.

Beweiskraft einiger meiner älteren Versuche durch die Annahme entkräftigen will, daß ich das Enzym bei der Neutralisation zerstört habe.

Für die Kalbsmageninfusionen ist also die Neutralisation mit Alkalilauge (Natronlauge) eine ziemlich unschädliche Operation. Die neutralisierten Infusionen sind auch recht haltbar, und die neutrale Reaktion an sich hat keine wesentlich schädigende Wirkung. Dies geht schon aus drei der oben mitgeteilten Versuche hervor; aber ich habe wiederholt neutralisierte Lösungen mehrere Tage, einmal im Januar 14 Tage, kalt aufbewahrt, ohne eine Änderung in ihrer Wirkung konstatieren zu können. In einem Falle hatte ich in einer Infusion mit 0,163% festen Stoffen und 0,2% HCl durch Erwärmen auf 42—44° C. die labende Wirkung von 55 Sekunden auf 43 Minuten herabgesetzt, und diese Infusion ließ ich nach der Neutralisation 5 Tage kalt stehen. Sie wurde jeden Tag geprüft und die Gerinnungszeit schwankte zwischen 42 und 44 Minuten.

Man könnte nun vielleicht meinen, daß das, im Vergleich mit dem Hundemagensafte, entgegengesetzte Verhältnis zwischen Pepsin- und Chymosinwirkung in den Kalbsinfusionen daherrührte, daß infolge der Neutralisation mit Alkali die Pepsinwirkung viel stärker als die Chymosinwirkung gelitten hatte. Wenn dem so wäre, würde dies entschieden gegen die Identität der beiden Enzymwirkungen sprechen, denn wenn Pepsin und Chymosin dasselbe Enzym ist, kann man nicht die eine Wirkung mit Schonung der anderen lähmen. Nun verhält es sich aber nicht so. Die Neutralisation mit Natronlauge und die Aufbewahrung bei neutraler Reaktion (in der Kälte) wirkten nicht merkbar schädlicher auf die Pepsin- als auf die Chymosinwirkung, wovon ich mich durch vergleichende Versuche überzeugt habe.

Ein Vergleich der obigen 4 Versuche untereinander zeigt, daß auch in den Kalbsmageninfusionen nicht immer eine Parallelität der zwei Enzymwirkungen besteht. So entspricht z. B. eine Gerinnungszeit von 42 und 40 Minuten einer Anfangszeit der Fibrinverdauung von 3 Stunden im Versuche 1 und 45 Minuten im Versuche 4. Da ich aber unten kräftigere Beweise für die Nichtparallelität der beiden Enzymwirkungen liefern

werde, will ich nicht länger bei diesen Versuchen verweilen, sondern gehe zu den Versuchen mit anderen Infusionen über.

B. Infusionen auf Pferdemägen.

Zu diesen Infusionen habe ich ausschließlich den enzymreichen, rötlich grauen, dunkelgefärbten Teil des Magens verwendet. Die Schleimhaut wurde abpräpariert, in einer Fleischmühle fein zerschnitten, mit Salzsäure von 0,2% HCl in dem Verhältnisse 1 : 10 extrahiert, kalt aufbewahrt und nach 24 Stunden filtriert.

Die Enzyme des Pferdemagens sind ebenfalls ziemlich resistent gegen die Neutralisation, sie sind aber etwas empfindlicher als die des Kalbsmagens. So habe ich z. B. einmal beobachtet, daß eine mit CaCO_3 neutralisierte Infusion nach 3 Tagen unwirksam auf Milch war, während sie noch Fibrin verdaute. Auf der anderen Seite habe ich aber auch wiederholt gesehen, daß mit Natronlauge neutralisierte Infusionen nach 24 Stunden ihre labende Wirkung nicht wesentlich vermindert hatten. Im Vergleiche zu den Kalbsmageninfusionen war die Chymosinwirkung, wie wir sehen werden, regelmäßig schwächer als die Pepsinwirkung, und aus dem Grunde habe ich hier immer die Verdauungsversuche etwas später als die Gerinnungsversuche angeordnet. Dasselbe war, was ich, um Wiederholungen zu vermeiden, schon hier bemerke, auch bei den Versuchen mit Hühner- und Hechtmageninfusionen der Fall.

Wenn man eine Infusion mit verdünnter Salzsäure von 0,2% HCl bereitet, so hat die fertige Infusion in der Regel nicht genau diesen Säuregrad, was leicht verständlich ist, wenn man bedenkt, daß der Säuregrad durch Aufnahme von Wasser und verschiedenen Stoffen aus der Schleimhaut etwas geändert werden kann. Für Versuche mit Infusionen derselben Art ist dies allerdings von geringerer Bedeutung; wenn man aber zwei verschiedenartige Infusionen, wie z. B. von Kalb und Pferd, mit einander vergleichen will, müssen beide genau auf denselben Säuregrad gebracht werden. Dies habe ich auch, wo es nötig war, getan. Bezüglich der Verdauungsversuche kann ich übrigens hinzufügen, daß meine Infusionen nach dem Ver-

dünnen mit dem gleichen oder einem größeren Volumen Säure nie kräftiger, sondern immer etwas schwächer als in unverdünntem Zustande verdauten. Der Gehalt an verdauungshemmenden Stoffen, wenn solche überhaupt vorhanden waren, hatte also keine störende Wirkung.

In dem Vorigen, in einer Fußnote, habe ich bemerkt, daß ich die filtrierten Infusionen im Brutofen erwärme, bis ich sicher bin, daß keine weitere Vermehrung des Enzymgehaltes stattfindet. Dies war für die Pferdeinfusionen besonders wichtig. Eine solche, neubereitete Infusion, welche einige Tage kalt aufbewahrt worden ist, kann nämlich nach dem Neutralisieren fast unwirksam auf Milch sein, während sie Eiweiß reichlich verdaut, und man könnte also glauben, daß sie fast nur Pepsin und kein Chymosin enthält. Läßt man sie aber mehrere Stunden im Brutofen stehen, so kann sie nach der Neutralisation die Milch vielleicht in 5—10 Minuten koagulieren, während sie vorher erst nach Stunden wirkte. Für die Kalbsmageninfusionen, welche schon von Anfang an kräftig labend wirken, ist der Unterschied bedeutend kleiner. Wahrscheinlich handelt es sich hier um eine Umwandlung des Zymogens in Enzym, wenn auch andere Möglichkeiten denkbar sind. Für die Versuchsordnung ist dieses Verhalten jedenfalls von der allergrößten Wichtigkeit, weil man ohne Kenntnis hiervon ganz fehlerhafte Schlüsse ziehen könnte.

Versuch 1. Magen von einem alten Pferde. Die unverdünnte Infusion enthielt 0,89% feste Stoffe. Sie wurde mit Salzsäure von 0,2% verdünnt, so daß der Gehalt an festen Stoffen 0,340% war. Dies geschah, um einen Vergleich mit einer Kalbsmageninfusion von ebenfalls 0,340% festen Stoffen zu ermöglichen. Beide wurden mit CaCO_3 neutralisiert und nach 20 Stunden filtriert.

A. Pferdemageninfusion koagulierte Milch in 55—60 Minuten.

B. Die Kalbsmageninfusion koagulierte die Milch so rasch, daß sie mit CaCl_2 -Lösung (aus 0,2% HCl, durch Neutralisation mit CaCO_3 bereitet) auf $\frac{1}{10}$ verdünnt wurde. Die so verdünnte Infusion labte die Milch in 1 Minute 45 Sekunden, also in rund 2 Minuten.

Es wurden nun beide Lösungen auf den Säuregrad 0,2% HCl gebracht behufs Verdauungsversuche nach Mett.

Nach 24 Stunden. Nach 48 Stunden.

A (Pferd)	4.9	20.25
B Kalb)	1.0	1.00

In diesem Falle verdaute also die Pferdeinfusion reichlich viermal so kräftig wie die Kalbsinfusion, ihre labende Wirkung war aber nur $\frac{1}{30}$ von der der letzteren.

Versuch 2. Magen von einem jungen Pferde, 5 Jahre alt. Zum Vergleich mit einer Kalbsmageninfusion mit 0,72% festen Stoffen wurde die Infusion mit Säure ebenfalls zu einem Gehalte von 0,72% festen Stoffen verdünnt und beide auf 0,2% HCl gebracht.

Nach der Neutralisation mit Alkalilauge koagulierte diese Infusion die Milch in 9 Minuten. Die neutralisierte Kalbsmageninfusion wirkte so rasch koagulierend, daß die Zeit nicht genau angegeben werden konnte.

Es wurden nun beide Infusionen mit CaCO_3 neutralisiert und nach etwa $\frac{1}{2}$ Stunde filtriert. Die Gerinnungszeit für die Pferdeinfusion war nun 3 Minuten. Die Kalbsmageninfusion mußte mit CaCl -Lösung auf $\frac{1}{50}$ verdünnt werden, um der Pferdeinfusion einigermaßen äquivalent zu werden.

Gerinnungszeit für A (Pferd) 3 Minuten

B (Kalb) 2— $2\frac{1}{2}$ Minuten.

Verdauung nach Mett in 20 Stunden (0,2% HCl).

A (Pferd) 9,6

B (Kalb) 0,0

Fibrinverdauung (0,2% HCl)

Anfang

Ende

A (Pferd)

< 5 Minuten

35—40 Minuten

B (Kalb)

etwa 1 Stunde

6—7 Stunden

Auch in diesem Versuche findet man denselben vollständigen Mangel an Parallelität zwischen der verdauenden und der labenden Fähigkeit der beiden Infusionen. Die Relation zwischen den beiden Wirkungen war eine ganz andere in der Pferde- als in der Kalbsmageninfusion.

Versuch 3. Mageninfusion von einem 3. Pferde, 15 Jahre alt, wurde mit Salzsäure auf den Gehalt 0,337% festen Stoffen verdünnt und mit einer Kalbsmageninfusion von 0,340% festen Stoffen verglichen. Säuregrad in beiden 0,2% HCl. Die Kalbsmageninfusion war nicht dieselbe wie in Versuch 1.

Es wurden beide Infusionen mit $\frac{n}{10}$ -Natronlauge neutralisiert. Nach Verdünnen der Kalbsmageninfusion auf $\frac{1}{5}$ koagulierte sie die Milch in $1\frac{1}{2}$ Minute.

Gerinnungszeit A (Pferd) = 8 Minuten.

„ B (Kalb $\frac{1}{5}$) = 1,5 „

Verdauung nach Mett (0,3% HCl) nach 20 Stunden

A 2,06.

B 0,16.

In diesem Versuche verdaute also die Pferdeinfusion etwa zwölfmal so rasch wie die Kalbsmageninfusion; aber diese koagulierte umgekehrt die Milch fünfmal so rasch wie jene, also ein umgekehrtes Verhältnis in beiden.

Diese Versuche, denen ich noch andere als Beispiele hinzufügen könnte, zeigen also, daß die Relation zwischen den beiden Enzymwirkungen eine ganz andere in den Pferdemageninfusionen als in den Kalbsinfusionen ist und daß in jenen die Chymosinwirkung ganz wie in dem Hundemagensafte der Pepsinwirkung gegenüber zurücktritt. Dies beweist natürlich nicht, daß die Chymosin- und Pepsinwirkung nicht identisch sein können, denn der Unterschied könnte ja durch verschiedene Annahmen erklärt werden.

Man könnte annehmen, daß im Pferdemagensafte hemmende Stoffe enthalten sind oder bei der Neutralisation gebildet werden und daß sie nur bei neutraler, nicht aber bei saurer Reaktion wirksam sind. Solche Stoffe habe ich indessen nicht nachweisen können. Vermischte ich eine neutralisierte Kalbsmageninfusion mit einer größeren Menge, z. B. 10 Volumen einer äußerst langsam wirkenden Pferdeinfusion und auf der anderen Seite 1 Volumen derselben Kalbsmageninfusion mit 10 Volumen NaCl-Lösung von entsprechender Konzentration, so war die labende Wirkung der beiden Gemenge ungefähr dieselbe. Die Gerinnung geschah in beiden Fällen in einigen (3—4) Minuten. Ich habe jedoch diese Frage nicht mehr eingehend geprüft, weil die bald anzuführenden Versuche solche Untersuchungen überflüssig machten.

Infolge der kräftig labenden Wirkung der Kalbsmageninfusionen im Verhältnis zu den Pferdemageninfusionen mußte man die ersteren in ein paar der obigen Versuche stark mit CaCl_2 -Lösung verdünnen, was allerdings notwendig war, um die Lösungen unter einander vergleichbar zu machen, auf der anderen Seite aber die Versuche etwas kompliziert. Es fragt sich deshalb, ob man nicht eine noch einfachere Versuchsanordnung finden könnte.

Die beliebteste Erklärung des wiederholt beobachteten Mangels an Parallelität der beiden Enzymwirkungen ist die

Annahme, daß man durch die Neutralisation mit Alkali das Enzym zerstört oder schwächt. Von einer Zerstörung nur des einen Enzymes, z. B. des Chymosins, durch das Alkali kann es natürlich nicht die Rede sein, wenn man die Identität der beiden Enzyme annimmt. Es müssen in dem Falle beide Enzymwirkungen durch die Neutralisation aufgehoben werden. Man kann also höchstens annehmen, daß das Enzym durch die Neutralisation zwar nicht zerstört, aber geschädigt oder gelähmt und durch das Wiederansäuern reaktiviert wird. In der neutralisierten Infusion sollte also das Pepsin infolge seiner Lähmung durch das Alkali auf Milch unwirksam sein, während es nach der Reaktivierung durch die Säure fortwährend Eiweiß verdauen sollte.

Gegen eine solche Hypothese läßt sich allerdings vieles einwenden: es dürfte aber überflüssig sein, derselben eine Kritik zu widmen, da sie einer experimentellen Prüfung nicht unzugänglich ist.

Auf der einen Seite kann man die Frage nach der Dualität oder Identität der beiden Enzymwirkungen nicht entscheiden ohne Versuche, in welchen man die Säurewirkung eliminiert hat: auf der anderen Seite darf man aber, um die von der Neutralisation der Säure herrührenden modernen Einwände zu vermeiden, die Säure weder durch NaOH noch durch Na_2CO_3 oder sogar durch CaCO_3 neutralisieren. Man muß also, wenn möglich, die Säure in anderer Weise unschädlich machen, und der einfachste Weg zu diesem Ziele wäre wohl, die sauren Infusionen so stark mit Wasser zu verdünnen, daß die Säure für die Gerinnung ohne Belang ist und daß die Infusionen praktisch neutral oder fast neutral sind. Geht man von zwei Infusionen aus, welche bezüglich der verdauenden Wirkung äquivalent sind, so müssen diese beiden Infusionen auch bezüglich ihrer Wirkung auf Milch äquivalent sein. Verdünnt man die eine mit Wasser, bis ihre labende Wirkung aufhört, so muß die labende Wirkung der anderen auch wenigstens annähernd bei derselben Verdünnung aufhören, und es muß bei den verschiedenen, schwächeren Verdünnungsgraden eine annähernde Parallelität zwischen beiden Infusionen bestehen.

Die Anordnung derartiger Versuche ist außerordentlich einfach. Man nimmt zwei Infusionen, welche genau denselben Säuregrad haben und welche hinsichtlich der verdauenden Wirkung — z. B. nach der Mettschen Methode gemessen — äquivalent sind, verdünnt sie gleich stark mit Wasser zu steigenden Verdünnungen und prüft mit Milch. Um die Säure unschädlich zu machen, glaubte ich die Infusionen stark verdünnen zu müssen, und in einem ersten Versuche fing ich deshalb mit dem Verdünnungsgrad $1/50$ an. Bei dieser Verdünnung labte die Kalbsinfusion die Milch in 8 Minuten, während die Pferdeinfusion nach 7 Stunden noch keine Gerinnung erzeugt hatte.

Ich fand dann, daß besonders große Verdünnungen gar nicht notwendig sind. Schon bei der Verdünnung $1/3$ kamen große Unterschiede zum Vorschein, und aus dem Grunde habe ich meistens mit den Verdünnungsgraden $1/3$, $1/6$, $1/12$, $1/24$ und $1/48$ gearbeitet. Die Unterschiede sind übrigens so groß und so augenfällig, daß es gar nicht nötig ist, mit pepsinäquivalenten Lösungen zu arbeiten, wenn man nur die relative Verdauungsfähigkeit der beiden Infusionen kennt.

Da die Versuchsanordnung so einfach ist, stelle ich die Resultate tabellarisch zusammen und begnüge mich damit, hier einige kürzere Angaben bezüglich der fraglichen Versuche zu machen.

Versuch 4. Kalbsinfusion 0,340% feste Stoffe; Pferdeinfusion 0,356%. Säuregrad in beiden 0,2%. Verdauung nach Mett 20 Stunden bei 38—39° C.

Versuch 5. Kalbs- und Pferdemageninfusionen enthielten beide 0,72% feste Stoffe und 0,2% HCl. Verdauung nach Mett 20 Stunden bei 38—39° C.

Versuch 6. Kalbsmageninfusion 0,340% feste Stoffe, aber nicht dieselbe wie im Versuch 4. Pferdemageninfusion 0,337% feste Stoffe. Säuregrad in beiden 0,2% HCl. Verdauung nach Mett 20 Stunden bei 37—38° C.

Versuch 7. Pferdemageninfusion 0,221% feste Stoffe. Kalbsmageninfusion 0,216% feste Stoffe. Säuregrad in beiden 0,2% HCl. Verdauung nach Mett 20 Stunden bei 38—39° C.

Die Tabelle, welche ohne besondere Erklärung verständlich sein dürfte, enthält das Quadratverhältnis der Verdauung nach

Tabelle I.

Gerinnungszeiten =	Versuch 4		Versuch 5		Versuch 6		Versuch 7		Verdünnung mit Wasser
	Kalb	Pferd	Kalb	Pferd	Kalb	Pferd	Kalb	Pferd	
Quadratverhältnis nach Mell =	16	: 25	16,8	: 27,46	9	: 7,61	12,25	: 7,84	
45 Sek.		keine Gerinnung in 7 Stunden	20 Sek.	5 Min.	20 Sek.	7 Min.	25 Sek.	11 Min.	1/3
95 „			35 „	13 „	35 „	23 „	45 „		1/6
3 Min.			1 Min.	43 „	90 „	keine Gerinnung in 7 St.	80 „	keine Gerinnung in 7 Stunden	1/12
6 „			2 „	nicht in 7 Stunden	2 Min. 50 Sek.		2 Min. 35 Sek.		1/24
„			—	—	5 „ 30 „	—	5 „ 15 „	—	1/48
„			—	—	10 Min.	—	10 „ 20 „	—	1/96
„			—	—	22 „	—	21 Min.	—	1/192
„			—	—	50 „	—	—	—	1/384

Mett und die Gerinnungszeiten für die Labung bei den entsprechenden, in dem letzten Stabe enthaltenen Verdünnungsgraden der beiden sauren Infusionen (Verdünnung mit destilliertem Wasser).

Diese Versuche zeigen in schlagender Weise, daß in den Kalbs- und Pferdemageninfusionen gar keine Parallelität zwischen Pepsin- und Chymosinwirkung besteht. In den Kalbsinfusionen folgt die Gerinnung dem gewöhnlichen Labungsgesetze, während dies in den Pferdeinfusionen nicht der Fall ist. Anfangs ist die Abweichung nicht so merkbar, wenn man mehr konzentrierte und kräftiger wirkende Infusionen als die hier als Beispiele angeführten wählt; aber auch in diesen Fällen wird sie bald größer, und eine Pferdeinfusion wird ganz unwirksam bei einer Verdünnung, bei welcher eine Kalbsinfusion noch kräftig wirkt.

Bei dieser Versuchsanordnung fallen nun alle diejenigen Einwände weg, die man in der schädigenden Wirkung des Alkalis bei der Neutralisation gesucht hat. Ebenso wenig kann die Wirksamkeit des Pepsins durch infolge der Neutralisation entstandene oder nur bei neutraler Reaktion hemmende Stoffe verhindert werden, denn die Relation zwischen Säure und Enzym wird nicht bei dieser Versuchsanordnung geändert.

Nun könnte man vielleicht meinen, daß in den nicht geronnenen Proben mit Pferdeinfusionen trotzdem eine Gerinnung stattgefunden hätte, aber eine so feine, daß sie der Beobachtung entgangen war. Dies ist aber nicht der Fall. Nach Verlauf von 7 Stunden habe ich nämlich zu jeder Probe 1 ccm neutralisierter Kalbsmageninfusion gesetzt, und in allen Fällen, ohne Ausnahme, trat dabei innerhalb einiger (gewöhnlich 1—2) Minuten eine Gerinnung auf. Das Casein ist also während vieler Stunden nicht nachweisbar von dem Pepsin verändert worden. Nur in dem Versuche 4, bei der Verdünnung $\frac{1}{3}$, wo also die Gerinnung bei einem noch verhältnismäßig hohen Säuregrad ausgeblieben war, trat nach Zusatz von neutralisierter Kalbsmageninfusion die Gerinnung etwas langsamer (im Laufe von 4—5 Minuten) auf und die Gerinnsel wurden nicht so typisch und fest wie sonst immer. Bei diesem Säuregrade hatte also vielleicht das Pepsin eine schwache Wirkung ausgeübt; wenn dem aber so ist, so spricht dies jedenfalls nicht

für, sondern gegen die Annahme, daß die Milchgerinnung das erste Stadium der peptischen Proteolyse ist.

Die obigen Versuche zeigen wohl vielmehr, daß das Pferdepepsin bei sehr schwach saurer Reaktion die Milch nicht koaguliert und daß es also schwerlich der bei der Labung wirksame Stoff ist. Man wollte hiergegen vielleicht einwenden, daß die Pepsinlösung durch die Verdünnung mit Wasser dermaßen verdünnt worden ist, daß sie nicht auf die Milch wirken konnte. Die Unhaltbarkeit einer solchen Annahme ist jedoch offenbar. Die Verdünnung war nämlich dieselbe wie in den Kalbsinfusionen. Diese waren in zwei Fällen ärmer an Pepsin als die Pferdeinfusionen und trotzdem koagulierten sie die Milch in 2—6 Minuten, während die Pferdeinfusionen bei derselben Verdünnung und etwas größerem Pepsingehalte unwirksam waren. Es widerspricht auch aller Erfahrung, daß eine kräftig verdauend wirkende Pepsinlösung nicht bis auf $\frac{1}{6}$ — $\frac{1}{12}$ verdünnt werden könnte, ohne ihre Wirksamkeit einzubüßen. Ich habe mich übrigens selbstverständlich durch eigens darauf gerichtete Versuche davon überzeugt, daß die angewandten Pferdeinfusionen nach Verdünnung auf $\frac{1}{50}$ — $\frac{1}{100}$ und Ansäuerung mit Salzsäure noch Eiweiß verdauten. Es zeigen also diese Versuche, und dies dürfte wohl ihr wichtigstes Resultat sein, daß das Pferdepepsin bei sehr niedrigem Säuregehalte und in Verdünnungen, in welchen es noch auf Eiweiß verdauend wirkt, die Kuhmilch nicht koaguliert.

Hier kann man nun weiter denselben Einwand machen, den Pawlow für den Hundemagensaft gemacht hat, daß nämlich die Milchgerinnung ein viel weniger empfindliches Pepsinreagens als die Eiweißverdauung, besonders die Fibrinverdauung, ist. Der Pferdemagensaft verhält sich ja in der Tat auch der Verdünnung mit Wasser gegenüber wie der Hundemagensaft, und wenn man einen solchen Einwand macht, will ich nur erwidern, daß für die Kalbsmagenezyme ein ganz anderes Verhalten gilt und daß dem entsprechend die Enzyme in dem Kalbsmagensaft auf der einen und in dem Pferde- und Hundemagensaft auf der anderen Seite kaum identisch sein können. Daß zwei verschiedene Enzyme, Pepsin und Chymosin, in ver-

schiedenen Mengenverhältnissen in den Magensäften verschiedener Tierarten vorkommen können, ist nicht schwer anzunehmen: daß aber ein und dasselbe Enzym bei dem einen Tier eine ganz andere Relation zwischen den zwei Wirkungen als bei einem anderen zeigt, ist schwieriger zu erklären. Es sprechen also diese Beobachtungen sehr zugunsten der Anschauung von Bang,¹⁾ daß es ein Parachymosin gibt; und die in letzter Zeit von Gewin²⁾ und Sawitsch³⁾ gegen seine Ansicht gemachten Einwände haben auf mich nicht überzeugend gewirkt. Wenn man aber verschiedene Chymosine annimmt, so muß man konsequenterweise, wenn man Pepsin und Chymosin als identisch auffaßt, auch das Vorkommen verschiedener Pepsine annehmen, eine Annahme, die schon Klug⁴⁾ und Wroblewski⁵⁾ experimentell zu begründen versucht haben.

C. Infusionen auf Hühnermägen.

Bei der Darstellung dieser Infusionen wurde der aufgeschnittene Drüsenmagen erst abgospült mit Wasser und dann mit Filtrierpapier von der oberflächlichen schleimähnlichen Schicht befreit. Darauf wurde mit dem Rande eines Uhrgläschens oder der Rückenseite einer Messerklinge die Drüsenmasse aus den Öffnungen der Drüsenaggregate herausgedrückt. Die so gewonnene rötlich graugelbe Zellen- und Drüsenmasse wurde mit Salzsäure von 0,2% HCl in dem Verhältnis 1 : 75 oder 1 : 100 infundiert. Nach 24 Stunden wurde filtriert und die wasserklare, farblose Infusion im Brutofen erwärmt, bis alles Zymogen in Enzym umgesetzt war.

Auch mit Hühnerinfusionen habe ich nach der Neutralisation mit Alkali oder mit CaCO_3 Versuche ausgeführt, und zwar Vergleichsversuche mit entsprechend behandelten Kalbsmageninfusionen nach dem in dem vorigen Abschnitte über Pferdeinfusionen erwähnten Prinzip. Da aber diese Versuche

¹⁾ Pflügers Arch. f. d. gesamt. Physiol., Bd. LXXIX.

²⁾ l. c.

³⁾ l. c.

⁴⁾ Pflügers Arch. f. d. gesamt. Physiol., Bd. LX.

⁵⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXII.

von geringerem Interesse als die Verdünnungsversuche mit Wasser sind, dürfte ich, im Interesse eines nicht zu großen Umfangs meines Aufsatzes, dieselben hier übergehen können. Ich will nur erwähnen, daß die Hühnerinfusionen ähnliche Resultate als wie die Pferdeinfusionen gaben, und als Beispiel kann ich folgendes anführen: Es wurde eine Hühnerinfusion mit 0,145% und eine Kalbsinfusion mit 0,210% festen Stoffen nach der Neutralisation mit CaCO_3 verglichen. Der Pepsin-gehalt in der Hühnerinfusion war doppelt so groß wie in der Kalbsinfusion; die Chymosinwirkung der letzteren war aber 19mal so groß wie die der ersteren.

Ich teile hier zwei Verdünnungsversuche mit Wasser, nach demselben Prinzipie wie die Versuche mit Pferdeinfusionen ausgeführt, mit

Versuch 1. Hühnerinfusion 0,145% und Kalbsinfusion 0,170% feste Stoffe. Säuregrad 0,2%. Verdauung nach Mett 16 Stunden bei 38–39° C.

Versuch 2. Hühnerinfusion 0,190%, Kalbsmageninfusion 0,340% feste Stoffe. Säuregrad 0,2% HCl. Verdauung nach Mett 20 Stunden bei 38–39° C.

Tabelle II.

	Versuch 1		Versuch 2		Verdünnung mit Wasser
	Kalb	Huhn	Kalb	Huhn	
Quadratverhältnis nach Mett =	10,56 :	4,4	9 :	4	
Gerinnungszeit =	50 Sek. 2 St. 25 Min.	keine Gerinnung in 6 Stunden	20 Sek.	keine Gerinnung in 7 Stunden	1/3
„ =	2 Min.		35 „		1/6
„ =	4 „		1 Min. 30 Sek.		1/12
„ =	8 „		2 „ 50 „		1/42
„ =	—		5 „ 30 „		1/48
„ =	—		10 Min.		1/96

Auch in diesen Reihen habe ich kontrolliert, teils, daß die nicht geronnenen Lösungen nach Zusatz von neutralisierter Kalbsmageninfusion rasch und typisch koagulierten, und teils,

daß bei den auf Milch unwirksamen Verdünnungen die Lösung bei saurer Reaktion Eiweiß verdaute.

Man findet also auch hier denselben Mangel an Parallelität zwischen den zwei Enzymwirkungen wie in den Versuchen mit Pferdemageninfusionen, und auch das Hühnerpepsin kann also auf Milch unwirksam sein in einer Verdünnung, bei welcher es verdauend wirkt. Es gilt also dasselbe für eine Hühnermageninfusion wie für den Hundemagensaft und die Pferdemageninfusionen, nämlich, daß bei Verdünnung mit Wasser die labende Wirkung viel früher als die verdauende aufhört.

D. Infusionen auf Hechtmägen.

Die gereinigte Schleimhaut wurde von den übrigen Schichten des Magens getrennt und nach weiterem Abspülen mit Wasser zerschnitten und mit 0,2%iger HCl in dem Verhältnisse 1:10—20 infundiert. Ich habe die Schleimhaut von sowohl verdauenden wie nüchternen Tieren verwendet, ohne einen bestimmten Unterschied in der Wirkung der Infusionen konstatieren zu können. Bei Darstellung dieser Infusionen fand immer, selbst bei niederer Temperatur, eine Selbstverdauung statt, und ich filtrierte gewöhnlich schon nach 18—20 Stunden.

Bei Versuchen mit diesen Infusionen stieß ich bald auf das unerwartete Verhalten, daß sie, trotzdem sie äußerst kräftig Fibrin verdauten, auf das Eiweiß in den Mettschen Röhren fast ganz unwirksam waren. Ich fand ferner, daß sie auch das mehrere Minuten gekochte Fibrin nicht verdauten, während sie das nur kurze Zeit erhitzte Fibrin noch lösten.

Es schien also, als ob der Hechtmagensaft nicht hart gekochtes Eiweiß zu lösen vermochte; aber dies ist nicht der Fall. Wenn ich nämlich die Infusionen auf die Mettschen Röhren bei $+ 4^{\circ}$ C. oder bei Zimmertemperatur einwirken ließ, fand die Verdauung, wenn auch langsam, statt. Man könnte deshalb annehmen, daß das Hechtpepsin besser bei einer niedrigen als bei einer höheren Temperatur wirkt, aber auch eine solche Annahme erwies sich als nicht richtig. Eine Infusion, welche eine Fibrinflocke bei Zimmertemperatur in etwa 25 Minuten gelöst hatte, löste bei 38° eine ähnliche

Flocke in etwa 7 Minuten. Die Erklärung des obigen Verhaltens liegt darin, daß das Hechtpepsin in saurer Lösung bei Brutofentemperatur leicht zerstört wird. Eine enzymärmere Infusion kann schon nach einer Stunde unwirksam werden. Konzentriertere Infusionen werden langsamer zerstört; aber die Pepsinmenge nimmt auch hier so rasch ab, daß nur eine unbedeutende Einwirkung auf das Eiweiß zu sehen ist. Bei neutraler Reaktion scheint das Pepsin widerstandsfähiger zu sein.

Die Chymosinwirkung geht bei Brutofentemperatur ebenfalls allmählich verloren und rascher in saurer Lösung. Da diese Verhältnisse indessen an der Seite des eigentlichen Themas liegen, habe ich sie nicht eingehender studiert. Daß das Hechtpepsin bei Brutofentemperatur ganz anders als die Pepsine der warmblütigen Tiere sich verhält, ist aber sicher und nicht ohne Interesse. Es spricht dies nämlich dafür, daß dieses Pepsin nicht mit den Pepsinen der Warmblüter identisch ist. Man könnte allerdings annehmen, daß in den Magensäften besondere Stoffe enthalten sind, welche das Pepsin gegen die schädliche Wirkung der höheren Temperatur der Warmblüter schützen und daß diese Stoffe bei dem Hechte fehlen; aber diese Annahme hat wenig Wahrscheinlichkeit und die erstere ist viel einfacher. Ich sehe also in dem Verhalten des Hechtpepsins bei gewöhnlicher Körpertemperatur einen Wahrscheinlichkeitsbeweis dafür, daß es verschiedenartige Pepsine (und Chymosine) gibt.

Da die Mettsche Probe also in den Versuchen mit Hechtmageninfusionen nicht anwendbar war, habe ich behufs eines Vergleiches von den Pepsinmengen in ihnen und den Kalbsmageninfusionen die Fibrinverdauungsprobe benutzt, und zwar nach dem Brückeschen Verfahren mit Reihen von steigenden Verdünnungsgraden.

Die Infusionen auf Hechtmägen können sowohl mit Natronlauge wie mit CaCO_3 neutralisiert werden und sie laben in beiden Fällen je nach ihrer Konzentration die Milch langsamer oder schneller. Ich habe solche neutralisierte Infusionen sowohl bezüglich der labenden wie der peptischen Wirkung mit

entsprechend neutralisierten Kalbsmageninfusionen verglichen. Da aber diese Versuche infolge der Einwände, welche man wegen der beobachteten schädlichen Wirkung der Neutralisation gegen sie richten kann, nicht von demselben Interesse wie die Verdünnungsversuche mit Wasser sind, finde ich es überflüssig, sie hier ausführlicher mitzuteilen, und begnüge mich deshalb damit, als Beispiele die Resultate ein paar derartiger Versuche hier anzuführen.

In einem Falle, wo die Kalbsmageninfusion 0,306 und die Hechtmageninfusion 0,310% feste Stoffe enthielt, wurden beide mit CaCO_3 neutralisiert und die Kalbsinfusion mit CaCl_2 -Lösung verdünnt, bis der Unterschied in der Koagulationszeit nicht zu groß war. Die Kalbsinfusion labte die Milch in $3\frac{1}{2}$ Minuten, die Hechtinfusion in 13 Minuten. Die Chymosinwirkung in jener war also etwa 4 mal so stark wie in dieser, während die Pepsinwirkung, nach Brücke gemessen, nur $\frac{1}{20}$ von der der Hechtmageninfusion war.

In einem anderen Falle, wo die Versuchsanordnung dieselbe war und die Infusionen enthielten: Kalb 0,210 und Hecht 0,190% feste Stoffe, war die Chymosinwirkung in der Kalbsinfusion doppelt so stark wie in der Hechtinfusion. Die Pepsinwirkung in jener war aber nur $\frac{1}{30}$ von der in der letzteren.

Ein dritter Fall ist folgender. Die beiden Infusionen enthielten: Kalb 0,113 und Hecht 0,110% feste Stoffe. Nach der Neutralisation mit CaCO_3 und Verdünnung der Filtrate mit je dem gleichen Volumen Wasser labte die Kalbsinfusion die Milch in etwa 1 Minute; die Hechtinfusion labte nicht die Milch in 6 Stunden, aber sie wirkte 1,5—2 mal so stark peptisch wie die Kalbsinfusion.

Diese Versuche zeigen also, daß die Hechtmageninfusionen je nach ihrer Konzentration die Milch mit wechselnder Geschwindigkeit laben und daß die zwei Enzymwirkungen zu einander in einem ganz anderen Verhältnisse als in den Kalbsmageninfusionen stehen. Sie zeigen ferner, daß eine Hechtinfusion, welche verdauend wirkt, auf die Milch unwirksam sein kann.

Von größerem Interesse sind die Verdünnungsversuche mit

Wasser, welche in derselben Weise wie in den zwei nächst vorangegangenen Abschnitten angeordnet wurden.

Versuch 1. Kalbsmageninfusion 0,72%, Hechtmageninfusion 0,5%, feste Stoffe. Säuregrad in beiden 0,2% HCl. Pepsinverdauung bestimmt nach Brücke bei Zimmertemperatur.

Versuch 2. Hechtmageninfusion 0,190%, feste Stoffe, 0,2% HCl. Die Kalbsmageninfusion wurde mit 0,2% HCl verdünnt, bis sie bezüglich der Pepsinwirkung (nach Brücke) der vorigen äquivalent war. Sie enthielt nun 0,084% feste Stoffe.

Versuch 3. Hechtmageninfusion 0,402% und Kalbsmageninfusion 0,380% feste Stoffe. Beide enthielten 0,2% HCl und waren in bezug auf den Pepsingehalt fast äquivalent; die Hechtmageninfusion ein wenig kräftiger.

Versuch 4. Hechtmageninfusion 0,110% und Kalbsmageninfusion 0,113% feste Stoffe. Säuregrad 0,2% HCl. Pepsinbestimmung nach Brücke bei Zimmertemperatur.

Die Hechtmageninfusion in dem Versuche Nr. 4 der Tabelle ist dieselbe, die in dem dritten Falle (S. 49) erwähnt wurde und welche dort nach Neutralisation mit CaCO_3 und Verdünnung des Filtrates mit Wasser die Milch in 6 Stunden nicht labte. Der Unterschied ist natürlich durch die ungleiche Versuchsanordnung bedingt, indem im Versuche 4 keine Neutralisation stattgefunden hatte. Man findet übrigens in den vier Versuchen (S. 51) eine wesentlich verschiedene labende Wirkung je nach dem verschiedenen Reichtume an Enzym. In den Versuchen 1 und 3 mit den enzymreichsten Infusionen folgt die Gerinnung ziemlich gut, wenigstens bis zu einer stärkeren Verdünnung, dem gewöhnlichen Labungsgesetze, und bei Anwendung von mehr konzentrierten Infusionen würde man dies wahrscheinlich noch besser beobachten können.

Als Hauptresultat ergaben jedoch diese Versuche ganz wie diejenigen mit Pferde- und Hühnerinfusionen, daß das Verhältnis zwischen Pepsin- und Chymosinwirkung beim Hechte ein ganz anderes als beim Kalbe ist. Ich habe natürlich auch in diesen Reihen kontrolliert, daß die auf Milch unwirksamen Verdünnungen noch peptisch wirksam waren, und als Beispiel kann ich erwähnen, daß die Infusion in dem Versuche 3 bei der Verdünnung $1:100$ eine Fibrinflocke im Laufe von rund 2 Stunden bei Zimmertemperatur verdaute. Es gilt also für die Magen-

Tabelle III.

Relative Pepsinmengen	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3		Versuch 4		Verdünnung mit Wasser
	Kalb	Hecht	Kalb	Hecht	Kalb	Hecht	Kalb	Hecht	
	1	6	1	1	1	1	1	1	
Gerinnungszeiten	10—15 Sek.	4 Min. 30 Sek.	55 Sek.	42 Min.	10—15 Sek.	3 Min.	40 Sek.	1 St. 55 Min.	$\frac{1}{3}$
	15—20 "	10 Min.	2 Min.	2 St. 44 Min.	20—25 "	6 $\frac{1}{2}$ "	75—80 Sek.		$\frac{1}{6}$
	30—35 "	24 "	4 Min. 10 Sek.	keine Gerinnung in 7 Stunden	50 Sek.	18 "	2 $\frac{1}{2}$ Min.	keine Gerinnung in 7 Stunden	$\frac{1}{12}$
	1 Min. 5 Sek.	1 St. 22 Min.	8 Min.		1 Min. 30 Sek.	42 "	5 "		$\frac{1}{24}$
	2 Min.	keine Gerinnung in 7 Stunden			3 Min.	1 St. 30 Min.	10 "		$\frac{1}{48}$
	4 Min. 5 Sek.				6 "	keine Gerinnung in 7 Stunden			$\frac{1}{96}$
					12 $\frac{1}{2}$ bis 12 $\frac{1}{3}$ Min.				$\frac{1}{192}$
					24—25 Min.				$\frac{1}{384}$

infusionen aller drei von mir untersuchten Tierarten, daß sie bei Verdünnung mit Wasser, ganz so wie der Hundemagensaft, aber im Gegensatz zu den Kalbsmageninfusionen, ihre labende Wirkung viel früher als ihre verdauende verlieren. Man kann also aus den Infusionen der obengenannten Tierarten einfach durch Verdünnung mit Wasser Enzymlösungen erhalten, welche nicht labend wirken, während sie, passend angesäuert, Eiweiß verdauen.

Wie man dies mit der Annahme, daß die Milchgerinnung nichts anderes als eine Pepsinwirkung ist, vereinbaren soll, kann ich wenigstens augenblicklich nicht sehen. Man kann zwar sagen, daß, wie Pawlow schon für den Hundemagensaft gesagt hat, die Eiweißverdauung bei diesen Tieren eine viel empfindlichere Reaktion als die Milchgerinnung ist; aber damit hat man wohl auch zugestanden, daß die Enzyme im Kalbsmagen nicht mit denen der anderen Tiere identisch sein können. Wenn man der Vorsicht halber keine mehr weitgehenden Schlüsse aus meinen jetzt mitgeteilten Versuchen ziehen will, so dürfte man wohl jedoch mit mir darüber einig sein können, daß in den Kalbsmageninfusionen entweder andere Enzyme vorkommen, oder andere (noch unbekannt) Verhältnisse als in den anderen Infusionen obwalten. Dies sind einige der Gründe, warum ich bis auf weiteres nur das Kalbschymosin als das typische Chymosin betrachte.

Wenn man die obige Annahme macht, so kann man natürlich sagen, daß meine Experimente mit den verschiedenen Infusionen und der durch sie nachgewiesene Mangel an Parallelität der beiden Enzymwirkungen die Frage nach der Identität der letzteren nicht entscheiden können. Erst wenn man in einer und derselben Infusion die eine Enzymwirkung mit Erhaltung der anderen vernichten oder die ursprüngliche Relation zwischen beiden umkehren kann, läßt sich die Ansicht von der Identität beider Enzymwirkungen kaum länger aufrecht erhalten. Inwiefern eine solche Trennung der beiden Wirkungen möglich ist, werde ich in den folgenden zwei Abschnitten zu zeigen mich bemühen.

II. Methode zur Darstellung pepsinfreier Chymosinlösungen.

Wenn man den Magensaft oder die Infusionen mit verschiedenen Stoffen fällt, so erhält man regelmäßig Niederschläge, welche beide Enzymwirkungen zeigen, und wenn man die eine Wirkung zum Teil vernichtet, so findet man ebenfalls eine Abschwächung der anderen. Wir kennen also, so weit mir bekannt, kein Agens, welches nur auf das eine Enzym — wenn man zwei solche annimmt — wirkt; aber dagegen hat es sich gezeigt, daß wenigstens in den Kalbsmageninfusionen nicht alle Fällungsmittel die beiden Enzyme gleich vollständig ausfällen und nicht alle Agentien gleich stark auf beide einwirken. Hierin liegt die Möglichkeit, Enzymlösungen darzustellen, welche nur die eine, aber nicht die andere Wirkung zeigen.

Die zur Darstellung pepsinfreier Chymosinlösungen verwendeten Methoden bestehen in der fraktionierten Fällung mit Bleiacetat oder Magnesiumcarbonat, und ich werde nur die Anwendung des letztgenannten Fällungsmittels hier besprechen. Beim Schütteln mit Magnesiumcarbonat (Hydratocarbonas magnesius, in dem folgenden der Kürze halber einfach Magnesia genannt) werden beide Enzyme zum Teil niedergerissen und zum Teil, infolge der entstandenen alkalischen Reaktion, zerstört. Dies gilt indessen nicht in gleich hohem Grade für beide, sei es, daß die Infusion von Anfang an verhältnismäßig mehr Chymosin als Pepsin enthält, oder daß das letztere leichter gefällt oder vernichtet wird. Darum kann man nach diesem Prinzip Enzymlösungen erhalten, welche noch kräftig labend wirken, aber peptisch fast oder praktisch ganz unwirksam sind.

Eine unbedingte Voraussetzung für das Gelingen der Methode muß also die sein, daß die Infusion von Anfang an kräftig labend wirkt. In meinem im Jahre 1872 in schwedischer Sprache erschienenen Aufsatz habe ich deshalb auch gesagt, daß die Infusion so chymosinreich sein muß, daß sie nach der Neutralisation und Verdünnung mit dem zwanzigfachen Volumen Wasser die Milch in dem Verhältnisse 1:5 innerhalb einer Minute bei 37° koagulieren kann, eine Forderung, die

ich später dahin erweitert habe, daß sie auch für die Relation Enzymlösung: Milch = 1:10 gilt. Bei einem solchen Reichtum an Chymosin kann man hoffen, mit der Methode zum Ziele zu kommen, bei geringerem Chymosingehalte ist es dagegen kaum der Mühe wert zu versuchen.

Wenn man sich nun vergegenwärtigt, daß der Hundemagensaft vielleicht kein typisches Chymosin enthält, und daß er, selbst wenn dies der Fall wäre, nach Pawlow nach der Neutralisation und Verdünnung mit dem zwanzigfachen Volumen Wasser die Milch nur nach vielen Stunden koaguliert, so findet man leicht, daß der Hundemagensaft ein zur Darstellung pepsinfreier Chymosinlösungen nach meiner Methode wohl vollständig unbrauchbares Material sein muß. Es ist nunmehr auch leicht zu verstehen, warum die Versuche Pawlows nicht **gelingen** konnten und folglich auch nicht die Unbrauchbarkeit meiner Methode zeigen können. Die Anwendung natürlichen Hundemagensaftes hat ferner die Unannehmlichkeit, daß infolge seines hohen Säuregrades viel $MgCl_2$ gebildet wird, welches bei der Prüfung der Filtrate auf Pepsinwirkung hinderlich ist. Da ich Infusionen von höchstens 0,2% HCl benutze und dieselben oft erst mit dem gleichen Volumen Wasser verdünne oder sogar mit Alkali neutralisiere, wird diese Unannehmlichkeit bei meiner Versuchsanordnung geringer. Infolge der fördernden Einwirkung des Magnesiumchlorids auf die Labung läuft man auch Gefahr, die Menge des Chymosins bei Gegenwart von größeren Mengen des Salzes ganz falsch zu beurteilen.

Nachdem man von der kräftigen Wirkung der neutralisierten Infusion sich überzeugt hat, geht man zu der fraktionierten Fällung mit Magnesia über. Da man nach jeder solchen Fällung das Filtrat auf Chymosin und Pepsin prüfen muß, so dürfte es angebracht sein, erst die Ausführung dieser Proben etwas zu besprechen.

Infolge des Gehaltes des Filtrates an Magnesiumchlorid, welches die Wirkung des Chymosins begünstigt, soll man nie von dem Filtrate mehr als 1 ccm auf 10 ccm Milch zusetzen. Man kann auch einen Teil des Filtrates mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnen und 1 ccm hiervon zu 10 ccm Milch

setzen. Wenn ein solches Gemenge bei 38° C. in 1 oder höchstens 2 Minuten koaguliert, so kann man ein gutes Resultat der fortgesetzten Arbeit hoffen. Erfordert dagegen die Koagulation 3—5 Minuten, so ist der Gehalt an Chymosin zu klein, und es ist kaum der Mühe wert, den Versuch fortzusetzen.

Infolge der verdauungshemmenden Wirkung des Magnesiumchlorids muß man ferner für die Prüfung auf Pepsin immer das Filtrat vor dem Ansäuern mit Wasser verdünnen. Man kann auch nicht hier die wenig empfindliche Mettsche Probe brauchen, sondern muß der Fibrinprobe sich bedienen. Das mit Salzsäure neutralisierte Filtrat wird mit mindestens dem gleichen Volumen Wasser verdünnt und auf den Säuregrad 0,1% HCl gebracht. Um die Empfindlichkeit der Probe zu erhöhen und die Verdauungszeit abzukürzen, macht man die Fibrinprobe bei Körpertemperatur; und es ist deshalb auch unbedingt notwendig, eine Kontrollprobe mit Fibrin, Salzsäure und derselben Menge Magnesiumchlorid anzuordnen.

Die Fällung mit Magnesia geschieht so, daß je 100 ccm Infusion mit etwa 1 g Magnesia versetzt und einige Minuten wiederholt damit geschüttelt werden. Dann wird rasch filtriert und auf Pepsin und Chymosin geprüft. Bei Ausführung der Pepsinprobe bei Körpertemperatur zeigt es sich bald, ob das Filtrat noch viel Pepsin enthält, in welchem Falle man das Filtrat noch einmal in derselben Weise mit Magnesia behandelt. Man wiederholt dieses Verfahren, bis man ein Filtrat erhält, welches Milch kräftig koaguliert, während es nur sehr schwach auf Fibrin wirkt. Gewöhnlich erreicht man dieses Resultat nach dreimaliger Behandlung mit Magnesia und im Laufe von weniger als 1½ Stunde. Wenn man so weit gekommen ist, daß das letzte Filtrat unter oben angegebenen Verhältnissen die Milch in 1 Minute koaguliert, während das Fibrin nach 1 Stunde zwar stark gequollen, aber sonst kaum sicher angegriffen ist, so ist das Filtrat für weitere Verarbeitung brauchbar.

Das Filtrat reagiert stark alkalisch, aber trotzdem ist es nicht zweckmäßig, dasselbe zwischen den verschiedenen neuen Behandlungen mit Magnesia zu neutralisieren oder anzusäuern, weil hierdurch der Gehalt desselben an Magnesia stetig anwächst.

Auf der anderen Seite wird aber sowohl die Pepsin- wie die Chymosinwirkung durch längere Einwirkung der alkalischen Reaktion abgeschwächt. Hieraus entsteht — da die Pepsinproben immer einige Zeit erfordern — eine gewisse Schwierigkeit, die man indessen in der Weise umgehen kann, daß man durch einen Vorversuch mit 100 ccm die Anzahl der nötigen Fällungen und die erforderliche Zeit ermittelt und dann erst den Hauptversuch ausführt.

Pawlow und Parastschuk haben am Hundemagensaft die Beobachtung gemacht, daß das alkalisch reagierende Filtrat, wenn man es unmittelbar ansäuert, sich trübt, einen Niederschlag ausscheidet und peptisch unwirksam ist. Läßt man es dagegen einige Stunden neutralisiert stehen, so entsteht nun beim Ansäuern kein Niederschlag und es ist peptisch wirksam. Durch eine länger dauernde neutrale Reaktion des Mediums soll also das Pepsin aus einem latenten in einen tätigen Zustand übergehen.

Da ich seit vielen Jahren nicht nach dieser meiner Methode gearbeitet habe, weiß ich nicht, wie die Kalbsmageninfusionen in dieser Hinsicht sich verhalten. Ich weiß nur, daß ich oft und wohl am öftesten unmittelbar angesäuert habe; aber ich kann mich nicht erinnern, daß ich die obenerwähnte Trübung, bezw. den Niederschlag beobachtet habe, und ebensowenig kann ich einige Annotationen hierüber finden. Andererseits weiß ich auch, daß ich, wenn ich verhindert war, die Arbeit unmittelbar zu Ende zu führen, und infolgedessen das neutralisierte Filtrat gegen 24 Stunden stehen ließ, das nun angesäuerte Filtrat peptisch unwirksam oder fast unwirksam gefunden habe. Vielleicht war dies nun wiederum eine zu lange Zeit; und da ich keine besonderen Untersuchungen in dieser Richtung ausgeführt habe, will ich gern annehmen, daß die Kalbsinfusionen und der Hundemagensaft in dieser Hinsicht in derselben Weise sich verhalten. Wenn dem aber so ist, muß man natürlich eine Reaktivierung des Pepsins vermeiden, und da dies durch unmittelbares Ansäuern erreicht wird, ist es unbedingt zu empfehlen, das Endfiltrat unmittelbar anzusäuern. In mehreren Fällen habe ich auch das (neutralisierte) Filtrat erst mit ein

wenig Bleizucker und dann das neue Filtrat mit Bleiessig gefällt, diesen zweiten Niederschlag mit verdünnter Schwefelsäure zerlegt und dann das saure Filtrat zu der zweiten Phase der Methode verwendet. Dieses umständlichere Verfahren ist aber nicht notwendig und hat den Nachteil, daß noch weitere Mengen des Chymosins verloren gehen. Man kann das obengenannte, magnesiumsalzhaltige, angesäuerte Filtrat direkt zu der zweiten Phase verwenden.

Diese Phase besteht darin, daß man dieses Filtrat mit einer Lösung von Cholesterin in Alkohol und etwas Äther rasch vermischt und kräftig umschüttelt. Dann sammelt man das Cholesterin auf ein Filtrum, wäscht mit Wasser, schlämmt das Cholesterin sehr fein in nicht zu viel Wasser auf, setzt Äther hinzu und schüttelt leise. Die untere wässerige Lösung wird rasch von der oberen ätherischen Cholesterinlösung getrennt und in eine große, flache Schale hineinfltriert, damit ein Verdunsten des Äthers erleichtert werde. Statt einer Lösung von Cholesterin in Alkohol-Äther habe ich auch mehrere Male eine Lösung von Stearinseife in Wasser benutzt, um das Chymosin aus der sauren Lösung auszufällen.

Diese zweite Phase ist der schwierigste Teil des Verfahrens und man mißglückt oft, ohne daß ich die Gründe hierzu sicher angeben kann. In diesem Teile ist also das Verfahren entschieden einer Verbesserung bedürftig, und ich bin auch darauf bedacht gewesen, eine solche vorzunehmen. In erster Linie mußte ich jedoch die Methode zur Darstellung chymosinfreier Pepsinlösungen einer erneuten Prüfung unterziehen, und aus dem Grunde wurde ich genötigt, mit der Revision und Umarbeitung der in diesem Abschnitte beschriebenen Methode bis auf weiteres anstehen zu lassen.

Nach dieser Methode habe ich nun Enzymlösungen dargestellt, welche beim Sieden sich nicht trübten, die Xanthoproteinsäurereaktion nicht gaben und weder von Alkohol noch von Gerbsäure gefällt wurden. Solche Lösungen koagulierten die Milch in dem Verhältnisse 1 : 5 in 5 Minuten oder weniger, während sie bei Gegenwart von 0.2% HCl gekochtes Fibrin im Laufe von 12 Stunden bei Körpertemperatur nicht merkbar verdauten.

Ich kann jedoch nicht umhin, gegen die volle Beweiskraft dieser Versuche nunmehr einige Bedenken zu hegen. Durch die obige Äther- oder Alkohol-Ätherbehandlung werden beide Enzymwirkungen abgeschwächt, und man könnte deshalb annehmen, daß in diesen Chymosinlösungen sehr kleine Pepsinmengen noch vorhanden wären, welche bei den Verdauungsversuchen bei Körpertemperatur ebenso wie das Pepsin des Hechtmagens so leicht zerstört werden, daß ihre Wirkung nicht zur Geltung kommt. Dies ist ein zweiter Grund, die oben geschilderte Methode einer erneuten Prüfung zu unterwerfen.

Aber selbst wenn diese meine Bedenken berechtigt wären, so lehrt diese Methode jedenfalls, daß man nach ihr die beiden Enzymwirkungen durch ein und dasselbe Mittel in sehr verschiedenem Grade schwächen kann, und diese Tatsache gewinnt an Interesse, wenn man hiermit die Versuchsergebnisse von Pawlow und Parastschuk vergleicht.

Diese Versuche von Pawlow werden auffallenderweise wiederholt als ein Beweis gegen die Brauchbarkeit meiner Methode und als eine Stütze für die Lehre von der Identität des Pepsins und Chymosins angeführt, während sie nach meiner Ansicht weder das eine noch das andere beweisen. Pawlow hat nie die zweite, sondern nur die erste Phase meiner Methode, also nur die Einwirkung der Magnesia studiert. Ich hatte gefunden, daß man nach dieser Methode ein Filtrat erhalten kann, welches Milch kräftig labt, während es keine oder fast keine Verdauungskraft hat. Die Richtigkeit dieser meiner Angabe hat Pawlow vollauf bestätigt und anerkannt. Die Unfähigkeit des Filtrates, Fibrin zu verdauen, erklärte ich durch die Annahme, daß es ganz oder fast ganz pepsinfrei war. Nun hat Pawlow gefunden, daß das Filtrat allerdings kein aktives, sondern nur ein inaktives Pepsin enthält, welches man unter gewissen Voraussetzungen reaktivieren kann. Meine Annahme in diesem Punkte war also unrichtig. Nun kann man die Reaktivierung des Pepsins dadurch verhindern, daß man das Filtrat ohne vorhergegangene Neutralisation mit Salzsäure ansäuert, und warum sollte es nicht möglich sein, aus diesem Filtrate durch die zweite Phase der Methode eine von wirksamem Pepsin freie Chymo-

sinlösung darzustellen? Nun kann man sagen, daß es mir doch nicht sicher gelungen ist, pepsinfreie Chymosinlösungen darzustellen, denn sie waren vielleicht von inaktivem Pepsin verunreinigt. Diese Möglichkeit gebe ich gern zu und über die Reinheit einer Enzymlösung ist es nicht der Mühe wert, zu streiten; in der Realität ist es aber nach meiner Meinung gleichgültig, ob meine Chymosinlösungen kein Pepsin überhaupt oder nur ein unwirksames Pepsin enthielten. Dies ändert nämlich nichts an der Tatsache, daß ich Lösungen habe darstellen können, welche nur die Chymosinwirkung zeigten.

Es ist auch wichtig, daß Pawlów zu ähnlichen Resultaten in der Hauptsache gekommen ist, und ich erlaube mir hier folgenden Passus aus seiner Arbeit¹⁾ zu zitieren. «Als wir versuchten, die milchkoagulierende und proteolytische Wirkung des nach Schütteln mit Magnesiumcarbonat gewonnenen Filtrates genauer zu vergleichen, konnte uns die hervorragende Unproportionalität beider Wirkungen nicht entgehen. Während wir aus der milchkoagulierenden Wirkung des Filtrates schließen konnten, daß das entsprechende Ferment eine Verminderung, welche einigemal bis einige Zehner von Malen betrug, erfahren hatte, war von dem proteolytischen Fermente, seiner Wirkung nach zu urteilen, nur noch ein Bruchteil, welcher einige Hundertstel bis Tausendstel des anfänglichen Wertes ausmachte, übrig geblieben.» Auf der nächsten Seite heißt es, daß sie (die Verfasser) zugeben mußten, «daß Alkalien das proteolytische Ferment stärker zersetzen, als wie das milchkoagulierende»,²⁾ und endlich wird in der Tabelle XVI ein Versuch mitgeteilt, in welchem durch Schütteln mit Magnesiumcarbonat die labende Wirkung auf $\frac{1}{75}$, die verdauende stärker als auf $\frac{1}{4000}$ herabgesetzt wurde. Derselbe Versuch zeigt, daß durch Neutralisation und ein nach einigen Stunden vorgenommenes Ansäuern beide Enzymwirkungen zum Teil wieder hergestellt werden, aber wiederum nicht in demselben Grade. Die Reaktivierung der Pepsinwirkung fand nämlich in viel höherem Grade als die der Chymosinwirkung statt.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLII, S. 440.

²⁾ Die Heraushebung dieser Zeilen rührt von mir her. O. H.

Durch diese Untersuchungen glaubt nun Pawlow «der althergebrachten Meinung, daß die proteolytische und die milchkoagulierende Fermentwirkung spezifischen Fermenten angehören, jeglichen Boden unter den Füßen» entzogen zu haben. Dies ist mir nicht recht verständlich und ich kann dieser Ansicht nicht beitreten. Wenn die peptisch fast unwirksame, aber Milch koagulierende Lösung kein wirksames Pepsin enthält, sondern nur einen Stoff, welcher in solches übergeführt werden kann, schließt dies wohl nicht die Möglichkeit aus, daß die zwei Enzymwirkungen an zwei verschiedene Enzyme gebunden sind. Eine solche Möglichkeit muß wohl im Gegenteil sehr plausibel erscheinen.

Auch der Umstand, daß nicht nur die eine Enzymwirkung, sondern beide gleichzeitig aufgehoben, bezw. abgeschwächt und wieder erweckt werden können, schließt nicht eine solche Möglichkeit aus. Wenn beide in gleich hohem Grade beeinflußt wurden, wäre es etwas anderes; aber die Beobachtung, daß man zwei Enzymwirkungen in ungleich hohem Grade vernichten oder schwächen kann, dürfte man wohl schwerlich als einen Beweis für die Anwesenheit nur eines Enzymes heranziehen können. Wenn man eine Lösung mit zwei Enzymen hätte, von welchen das eine leichter zerstört und gelähmt, aber auch umgekehrt leichter reaktiviert wird als das andere, so ist wenigstens theoretisch eine Versuchsanordnung möglich, durch welche man bei passend starker Zerstörung und Lähmung mit darauffolgender Reaktivierung die ursprüngliche Relation zwischen den zwei Enzymwirkungen wiederherstellen könnte. Selbst wenn es durch eine passende Versuchsanordnung gelingen würde, durch das von Pawlow ausgearbeitete Verfahren die ursprüngliche Proportionalität zwischen Pepsin- und Chymosinwirkung wieder herzustellen, würde dies also nicht die Identität der Pepsin- und Chymosinwirkung beweisen können, und ein solches Versuchsergebnis — welches nicht in der Arbeit von Pawlow und Parastschuk vorliegt — wäre leicht mit der Annahme von zwei Enzymen in Einklang zu bringen. Für die Tatsache dagegen, daß man durch ein und dasselbe Reagens unter ganz denselben Versuchsbedingungen

von zwei Enzymwirkungen die eine mehrere hundertmal stärker als die andere herabsetzen kann, trotzdem es nur ein Enzym oder richtiger nur eine Enzymwirkung geben soll, kann ich keine befriedigende Erklärung finden.

III. Darstellung chymosinfreier Pepsinlösungen.

Das Prinzip dieser Methode besteht darin, daß man die saure Enzymlösung bei 40° oder einer etwas höheren Temperatur erwärmt. Das Kalbschymosin wird hierbei rascher als das Pepsin zerstört, und man kann folglich nach einiger Zeit eine Lösung erhalten, welche nicht mehr labend wirkt, während sie dagegen Eiweiß verdaut.

Es ist selbstverständlich, daß man keine bestimmte Zeit angeben kann, innerhalb welcher dieses Resultat erreicht wird. Das eine Mal kommt man früher, das andere später zum Ziele, denn die nötige Zeit hängt außer von der Temperatur auch von dem Säuregrade und dem Reichtum der angewandten Lösungen an Enzym und an Eiweißstoffen ab. Da die letzteren die Enzyme gegen das Erhitzen schützen und da sie die Säure teilweise binden, ist es leicht ersichtlich, daß man je nach der verschiedenen Konzentration wechselnde Resultate erhalten muß. Eine durch Selbstverdauung erhaltene, sehr unreine Infusion gibt dementsprechend auch ein ganz anderes Resultat als eine kalt bereitete, welche viel weniger konzentriert ist. Dies hat auch Fuld¹⁾ richtig erkannt. Ihm gelang es nämlich nicht, das Chymosin im Laufe von mehreren Tagen zu zerstören, und den Grund hierzu sucht er darin, daß seine Lösungen wahrscheinlich viel stärker als die meinigen gewesen sind.

Um die Beweiskraft der von verschiedenen Forschern erhaltenen Resultate beurteilen zu können, ist es also notwendig, die Versuchsbedingungen, unter welchen sie gearbeitet haben, genauer zu kennen; und aus dem Grunde teile ich in dem Folgenden nicht nur die Resultate, sondern auch die nötigen Daten einiger Versuche mit.

Versuch 1. Kalbsinfusion 0,179% feste Stoffe und 0,2% HCl. Nach der Neutralisation mit Alkali Koagulation der Milch 1:10 in 2 Mi-

¹⁾ Ergebnisse d. Physiol., Jahrg. I, Abt. I, S. 479.

nuten bei $37,5^{\circ}$ C. Erwärmung bei $36-37^{\circ}$ während 48 Stunden. Nach der Neutralisation Milchgerinnung in 32 Minuten. Nach Erwärmung, 96 Stunden: die neutralisierte Lösung verlabte nicht die Milch in 6 Stunden, die nicht erwärmte, neutralisierte Infusion wirkte dagegen in 2 Minuten. Verdauung nach Mett¹⁾ in 24 Stunden bei $36-37^{\circ}$ C.

Kontrolle 2,1 mm = 4,4.

Erwärmt 1-1,1 „ = 1,1.

Bei einem Quadratverhältnis der Pepsinverdauung von rund 4 : 1 koagulierte also die Kontrollprobe in 2 Minuten und die erwärmte Probe nicht in 6 Stunden. Um zu prüfen, ob eine Reaktivierung des durch das Alkali geschwächten Enzyms bei dem Wiederansäuern stattgefunden hatte, wurde die auf 0,1% HCl angesäuerte Lösung, welche Faserstoff gut verdaute, 24 Stunden stehen gelassen und dann mit CaCO_3 neutralisiert. Das Filtrat koagulierte nicht die Milch im Laufe von 6 Stunden.

Versuch 2. Kalbsinfusion 0,104% feste Stoffe, 0,2% HCl. Erwärmung auf $38-39^{\circ}$ C. 12 Stunden und dann auf $40-42^{\circ}$ während 30 Stunden, also insgesamt 42 Stunden. Nach der Neutralisation mit Alkali koagulierte die Infusion nicht die Milch in 6 Stunden; die nicht erwärmte Kontrollprobe, ebenfalls mit Alkali neutralisiert, koagulierte die Milch in rund 1 Minute. Verdauung nach Mett bei $37-38^{\circ}$ C. 24 Stunden.

Kontrolle 3 mm = 9.

Erwärmt 1,9 „ = 3,6.

Das Quadratverhältnis der Pepsinwirkung war also hier in der nicht erwärmten Kontrollprobe nicht dreimal so groß wie in der erwärmten, und trotzdem koagulierte die letztere die Milch nicht in 6 Stunden, die Kontrollprobe dagegen in rund 1 Minute. Es findet sich also hier ebenso wenig wie in dem vorigen Versuche eine Spur von Parallelität der beiden Wirkungen. Es wurde hier auch der Versuch gemacht, die erwärmte Probe mit CaCO_3 — teils direkt und teils nach der Neutralisation mit Alkali, Wiederansäuern und Stehenlassen 24 Stunden vor der Neutralisation mit CaCO_3 — zu neutralisieren. In beiden Fällen fand keine Gerinnung der Milch in 6 Stunden statt. Die Kontrollprobe koagulierte unter ähnlichen Verhältnissen in weniger als 1 Minute.

¹⁾ Es gilt hier selbstverständlich, daß, wie überall, wo nicht anderes gesagt wird, die Verdauungsversuche mit den erst neutralisierten und dann wieder angesäuerten Infusionen ausgeführt wurden.

Versuch 3. Kalbsinfusion 0,163% feste Stoffe, 0,2% HCl. Nach der Neutralisation mit Lauge koagulierte sie die Milch in etwa 50 Sekunden. Nach Erwärmung auf 41—43° 10 Stunden: Gerinnung in 21 Minuten; nach neuen 6 Stunden bei 43—44°: Gerinnung in 42 Minuten. Es wurde nun 11 Stunden bei 43—45° C. erwärmt, also insgesamt 27 Stunden. Nach der Neutralisation mit Alkali: keine Milchgerinnung in 6 Stunden; nach der Neutralisation mit CaCO₃: Koagulation in gegen 4 Stunden.

Verdauung nach Mett 24 Stunden bei 37—38° C.

Kontrolle 1,8—2 mm = 3,61.

Erwärmt 0,8—1 „ = 0,81.

In diesem Versuche fanden sich also noch Spuren von Chymosin, indem die erwärmte Probe nach der Neutralisation mit CaCO₃ in gegen 4 Stunden koagulierte. Die mit Alkali neutralisierte Kontrollprobe koagulierte aber die Milch in 50 Sekunden oder rund in einer Minute. Vergleicht man hiermit das Quadratverhältnis der Verdauung (rund) 4,5 : 1, so tritt der vollständige Mangel an Parallelität der beiden Enzymwirkungen klar zutage.

Versuch 4. 0,170% feste Stoffe, 0,2% HCl. Die nicht erwärmte, mit Alkalilauge neutralisierte Kontrollprobe koagulierte die Milch in 1½ Minuten. Erwärmung 7 Stunden bei — 45 und 2 Stunden bei — 47° C. Milchgerinnung nach 2 Stunden 20 Minuten. Neue Erwärmung bei 44—45° C. während 3 Stunden. Milchgerinnung (nach der Neutralisation mit Alkali) fand nicht in 6 Stunden statt; die mit CaCO₃ neutralisierte Infusion koagulierte die Milch in 1¾ Stunden. Nach neuem Erwärmen auf 44—45° 3 Stunden, also insgesamt 15 Stunden, koagulierte die mit CaCO₃ neutralisierte Infusion nicht die Milch in 7 Stunden.

Verdauung nach Mett bei 38—39° C. während 20 Stunden.

Kontrolle 2,2 mm = 4,8.

Erwärmt 1,2 „ = 1,4.

Nach einer 15 Stunden dauernden Erwärmung auf 44—45°, meistens 45°, und einem 2 stündigen Erwärmen auf — 47° C., war also die Infusion dermaßen frei von Chymosin geworden, daß sie nach der Neutralisation mit CaCO₃ die Milch nicht in 7 Stunden verlabte. Die Pepsinwirkung war dagegen nicht ganz auf ¼ des ursprünglichen Wertes herabgesetzt worden. Also auch hier ein vollständiges Auseinandergehen der beiden Enzymwirkungen.

Gegen die nun mitgeteilten Versuche kann man die Einwendung machen, daß ich mit Natronlauge oder mit CaCO₃

neutralisiert hatte, und daß alle die Fehler oder Fehlschlüsse, welche aus der Neutralisation hervorgehen können, hier zur Geltung kamen. Es war deshalb notwendig, auch hier die Neutralisation zu vermeiden und die Säurewirkung nur durch Verdünnung mit Wasser auszuschalten. Dies habe ich auch schon in diesem Versuche Nr. 4 gemacht, und das Resultat war folgendes. Die erwärmte Lösung, mit destilliertem Wasser auf die Verdünnungen $\frac{1}{3}$, $\frac{1}{6}$ und $\frac{1}{12}$ gebracht, koagulierte nicht die Milch in 7 Stunden; die nicht erwärmte Kontrollprobe koagulierte dagegen die Milch in resp. 1, $2\frac{1}{3}$ und $4\frac{1}{2}$ Minuten. Die nach 7 Stunden nicht geronnenen Proben koagulierten alle fest und typisch in etwa 1 Minute nach Zusatz von 1 ccm mit Alkali neutralisierter Kontrolllösung.

Versuch 5. 0,216% feste Stoffe, 0,2% HCl. Erwärmung insgesamt 16 Stunden, nämlich 12 Stunden bei $45-46^{\circ}$ und 4 Stunden bei 47° C. Die erwärmte Lösung koagulierte nach der Neutralisation mit Alkali die Milch nicht in 6 Stunden; nach der Neutralisation mit CaCO_3 koagulierte sie die Milch in 3 Stunden 22–25 Minuten.

Verdauung nach Mett in 24 Stunden bei $38-39^{\circ}$ C.

Kontrolle 3,1 mm = 9,61.

Erwärmt 1,9 > = 3,61. —

Es wurde nun ein Verdünnungsversuch mit Wasser gemacht. Die zu $\frac{1}{3}$, $\frac{1}{6}$, $\frac{1}{12}$ verdünnte, erwärmte, saure Infusion koagulierte nicht die Milch in 7 Stunden (feste Gerinnung nach Zusatz von 1 ccm neutralisierter Kalbsmageninfusion). Die Kontrollprobe in den Verdünnungen $\frac{1}{3}$, $\frac{1}{6}$, $\frac{1}{12}$, $\frac{1}{24}$ und $\frac{1}{48}$ koagulierte die Milch in resp. 20 Sekunden, 45 Sekunden, 1 Minute 20 Sekunden, $2\frac{1}{3}$ Minuten, $5\frac{1}{3}$ Minuten.

In diesem Versuche war also durch das 16stündige Erhitzen das Chymosin nicht ganz vollständig zerstört worden, indem nämlich die mit CaCO_3 neutralisierte Infusion die Milch nach 3 Stunden 22–25 Minuten koagulierte. Daß die Wirkung dieser Spuren nicht nach der Verdünnung mit Wasser sich kund gab, beruht darauf, daß bei der Neutralisation mit CaCO_3 erstens die Konzentration der Enzymlösung nicht geändert und zweitens das die Gerinnung sehr beschleunigende CaCl_2 gebildet wird. Durch die Neutralisation mit CaCO_3 schafft man also besondere, die Koagulation begünstigende Verhältnisse.

Durch das Erwärmen war also diese Infusion bis auf

Spuren chymosinfrei geworden, die Pepsinwirkung war aber nicht ganz auf ein $\frac{1}{3}$ herabgegangen.

Versuch 6. Kalbsinfusion, 0,192% feste Stoffe, 0,2% HCl. Nach dem Erwärmen auf 45° während 8 Stunden koagulierte die mit Wasser auf $\frac{1}{3}$ verdünnte, nicht neutralisierte Lösung die Milch in 21 Minuten. Die saure, nicht erwärmte Lösung mußte mit Wasser zu $\frac{1}{100}$ verdünnt werden, um der erwärmten Lösung einigermaßen äquivalent zu werden. In dieser Verdünnung koagulierte die Kontrollprobe die Milch in 18 Minuten. Es wurden nun die beiden, fast äquivalenten Lösungen auf den Säuregrad 0,1% HCl gebracht, unter Beobachtung, daß der Verdünnungsgrad beider hierdurch nicht geändert wurde, und dann die Fibrinprobe angestellt. Die erwärmte Lösung verdaute den Faserstoff in 40–50 Minuten, die bezüglich der Chymosinwirkung mit ihr äquivalente Kontrolllösung in 5 $\frac{1}{2}$ –6 Stunden.

Die saure Infusion wurde nun weitere 12 Stunden bei 45–46–46,5° erwärmt, also insgesamt 20 Stunden bei 45–46 $\frac{1}{2}$ °. Sie koagulierte nunmehr die Milch weder nach Verdünnung mit Wasser auf $\frac{1}{3}$, noch nach der Neutralisation mit CaCO₃ im Laufe von 6 Stunden. Die mit Wasser auf $\frac{1}{3}$ verdünnte Kontrollprobe koagulierte in 35 Sekunden.

Verdauung nach Mett 20 Stunden bei 37–38° C.

Kontrolle 3 mm = 9.

Erwärmt 1,4–1,6 „ = 2,25.

Der Versuch zeigt also, daß die beiden Proben, die erwärmte und die nicht erwärmte, wenn sie, nach teilweiser Zerstörung des Chymosins in der ersteren, durch Verdünnung der letzteren mit Wasser bezüglich der Chymosinwirkung ungefähr äquivalent gemacht worden, in der peptischen Fähigkeit einen so großen Unterschied zeigten, daß dieselbe Fibrinmenge von der erwärmten in 40–50 Minuten und von der verdünnten Kontrollprobe dagegen erst nach 5 $\frac{1}{2}$ –6 Stunden verdaut wurde. Er zeigt ferner, daß man die Chymosinwirkung vollständig aufheben konnte, ohne den Pepsingehalt um mehr als um $\frac{3}{4}$ herabzusetzen. –

Versuch 7. Kalbsinfusion 0,312% feste Stoffe, 0,2% HCl. Nach dem Erwärmen auf 45–46 $\frac{1}{2}$ ° während 8 Stunden koagulierte die nicht neutralisierte, mit 2 Volumen Wasser auf $\frac{1}{3}$ verdünnte Infusion die Milch erst nach 50–53 Minuten. Die mit 2 Volumen Wasser verdünnte, nicht erwärmte Kontrollösung koagulierte die Milch in 30–35 Sekunden. Nach Verdünnung mit Wasser zu $\frac{1}{100}$ und auf den Säuregrad 0,2% HCl gebracht, war die Kontrollprobe der erwärmten Lösung bezüglich der Labwirkung ziemlich äquivalent, indem sie mit 2 Volumen Wasser verdünnt die Milch in 44 Minuten labte.

Die erwärmte, nicht verdünnte Lösung und die äquivalente, zu dem Säuregrad 0,2% HCl gebrachte Kontrolle (Verdünnung $\frac{1}{250}$) wurden nun mit der Mettschen Probe bei 37,5—38,5° während 24 Stunden geprüft. Die Kontrolle verdaute gar nicht, die erwärmte 3,1 mm.

Für die Fibrinprobe wurden beide mit Wasser (dem gleichen Volumen) auf den Säuregrad 0,1% HCl gebracht.

Die Kontrolle verdaute nach 10—11 Stunden.

• erwärmte Infusion nach 50—60 Minuten.

Es wurde nun 6½ Stunden bei 45—46° und 1½ Stunde bei 48° C. erwärmt.

Nach Verdünnung mit 2 Volumen Wasser ($\frac{1}{3}$) oder nach der Neutralisation mit CaCO_3 koagulierte die erwärmte Infusion die Milch nicht in 6 Stunden. Beide Lösungen, unverdünnt (0,2% HCl), wurden nach Mett geprüft bei 38—39° C. während 24 Stunden.

Kontrolle 4,9—5,1 mm = 25.

Erwärmt 2,8—3,0 „ = 8,41.

Hier sieht man wiederum, wie die Chymosinwirkung durch Erwärmen der sauren Infusion vernichtet werden kann, ohne daß die Pepsinwirkung um mehr als etwa $\frac{2}{3}$ herabgesetzt wird. Der Mangel an Parallelität der beiden Wirkungen ist auch sehr stark. Zwei Infusionen, die bezüglich der Labwirkung annähernd äquivalent waren, wirkten so verschieden stark peptisch, daß die eine das Fibrin in etwa 1 Stunde, die andere erst in 10 bis 11 Stunden verdaute.

Sämtliche hier mitgeteilten Versuche zeigen also, daß es wirklich möglich ist, durch Erwärmen einer sauren Kalbsmageninfusion die Chymosinwirkung, mit Erhaltung der verdauenden Wirkung, zu vernichten. Die hierzu erforderliche Zeit kann, wie voraussichtlich war, wechseln. Bei höherer Temperatur ist sie kürzer und umgekehrt. Da es natürlich ein Vorteil ist, möglichst bald mit den Versuchen fertig zu werden, habe ich in der letzten Zeit durch Anwendung höherer Temperaturen die Zeit des Erwärmens abgekürzt. Ich habe keinen Nachteil hiervon gesehen, und es scheint fast, als wäre im Gegenteil ein mehr kurzdauerndes Erwärmen auf höhere Temperaturen günstiger für die Erhaltung des Pepsins als ein längeres Erwärmen bei etwas niedrigerer Temperatur. Ich wage indessen dies nicht bestimmt zu behaupten, denn zur Entscheidung dieser Frage sind besondere Versuche notwendig. Wahrscheinlich

kann jedoch die Methode durch systematische Untersuchungen in dieser Richtung verbessert werden.

Die Versuche zeigen ferner, daß man das ursprüngliche Verhältnis der zwei Enzymwirkungen zueinander in einer Kalbsmageninfusion durch Erwärmen derselben vollständig umkehren kann. Dies zeigt sich besonders deutlich bei den Mettschen Versuchen. Bei Verdünnung der nicht erwärmten Infusion mit Wasser versagt nämlich die Mettsche Probe früher als die Gerinnungsprobe, während in der erwärmten Infusion, welche nicht die Milch koaguliert, die Mettsche Probe positiv ausfällt.

Das wichtigste Resultat ist jedoch, daß man durch Erwärmen pepsinhaltige Lösungen darstellen kann, welche nicht labend wirken, trotzdem man sie nicht mit Alkali neutralisiert hat, sondern einfach durch Verdünnung mit 2 Volumen Wasser die Säure unschädlich machte.¹⁾ Eine solche, mit 2 Volumen Wasser verdünnte Lösung verdaut nun nicht nur Fibrin, sondern auch, wie besondere Versuche zeigten, hartgekochtes Hühnereiweiß und das Eiweiß der Mettschen Röhren. Hier fallen nun alle die Einwände und Erklärungsversuche, die man auf der schädlichen Wirkung des Alkalis gegründet hat, weg. Wenn ich nun ferner daran erinnere, daß diese, nach 6 oder 7 Stunden noch nicht geronnenen Milch-Infusionsgemenge nach Zusatz von neutralisierter, nicht erwärmter Infusion typisch gerannen, und daß also das Casein in dieser langen Zeit nicht sichtbar verändert worden war, so zeigen diese Versuche, daß das Pepsin, wenn die Anzahl der freien H-Ionen zu niedrig ist, auf die Milch ohne Wirkung bleibt. Ob das Pepsin bei einer stärker sauren Reaktion die Milch koagulieren kann oder bei größerer Konzentration seiner Lösungen erst bei noch niedrigeren Säuregraden als in meinen Versuchen auf die Milch unwirksam wird, muß Gegenstand einer besonderen Unter-

¹⁾ Man wird es vielleicht inkonsequent finden, daß ich prinzipiell gegen Versuche mit sauren Lösungen bin und trotzdem auf die nun mitgeteilten Versuche großes Gewicht lege. Da ich aber in diesen Versuchen die Säure durch Verdünnung mit Wasser unschädlich mache, dürfte dieser formell begründete Einwand belanglos sein und nicht zu Mißverständnissen führen können.

suchung werden. Ich will deshalb hier die Versuchsergebnisse nur so formulieren, daß ich sage, daß man nach der obigen Methode Pepsinlösungen darstellen kann, welche bei sehr schwach saurer Reaktion auf die Milch unwirksam sind in einer Konzentration, bei welcher sie, passend angesäuert, sowohl Fibrin als koaguliertes Eiweiß verdauen. Daß ich unter solchen Umständen der Ansicht von Sawjalow und Gewin, daß die Milchgerinnung das erste Stadium der Pepsinverdauung ist, nicht beipflichten kann, ist leicht verständlich.

Gegen meine oben mitgeteilten Versuche macht man vielleicht die Einwendung, daß die erwärmten sauren Infusionen, trotzdem sie die Milch nicht koagulierten, dennoch nicht vollständig chymosinfrei gewesen sind. Diese Möglichkeit will ich gern zugeben; denn jede Reaktion hat eine Grenze ihrer Empfindlichkeit. Für die hier vorliegende Frage ist dies jedoch gleichgültig. Wenn nämlich diese erwärmten sauren Infusionen, trotz einer Verunreinigung mit Spuren von Chymosin, die Milch nicht koagulierten, tritt die Unwirksamkeit des Pepsins als milchkoagulierendes Agens noch schärfer hervor.

Meine Untersuchungsergebnisse stehen, wie man sieht, nicht im Einklange mit den Untersuchungen einiger anderer Forscher, und ich bin darum genötigt, auch ihre Arbeiten ein wenig zu besprechen.

Auf die Arbeit von Pawlow und Parastschuk,¹⁾ die ich schon in dem Vorigen besprochen habe, ist es nicht notwendig, hier etwas näher einzugehen. Ihre Untersuchungen sind nämlich nach einem Prinzip ausgeführt worden, welches nach meiner Ansicht für die Lösung dieser Frage nicht recht brauchbar ist und jedenfalls keinen Vergleich mit meinen Versuchen gestattet.

Dasselbe gilt zum großen Teil auch von der Arbeit von Sawitsch,²⁾ welcher auch die Untersuchungen von Schmidt-Nielsen³⁾ zur Prüfung aufgenommen und ihre Richtigkeit bestätigt hat. Da er aber den Versuchsergebnissen Schmidts

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLII.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. LV.

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLVIII.

Nielsens durch die Annahme einer schädlichen Wirkung des Alkalis auf das Enzym die Beweiskraft absprechen will, so muß ich hiergegen einwenden, daß man dasselbe Resultat nach meinen Untersuchungen erhält, wenn man die Neutralisation vermeidet und die Säure nur durch Verdünnung mit Wasser unschädlich macht. Diese Annahme von Sawitsch ist also nicht stichhaltig, und ebenso wenig beweisend gegen die Versuche von Schmidt-Nielsen ist die Angabe von Sawitsch, daß er ein Zusammenfallen der beiden Wirkungen erhielt, wenn er vor dem Zusatze der mit Alkali neutralisierten Infusion die Milch angesäuert hatte. Bei einer solchen Versuchsanordnung kann nämlich ein Zusammenwirken von Pepsin und Säure noch nicht ausgeschlossen werden.

Sawitsch hat, wie so viele andere Forscher, mehrmals ein Auseinandergehen der beiden Enzymwirkungen beobachtet: er konnte aber in einigen Fällen durch Zusatz von großen Mengen CaCl_2 die Differenzen in der Labungsfähigkeit wieder ausgleichen. Dies veranlaßt mich, einiges über die Wirkung des CaCl_2 hier zu sagen.

Durch Zusatz von so bedeutenden Mengen CaCl_2 , wie in Sawitschs Versuchen, 0,7—1% CaCl_2 , zu der Milch führt man in die Versuchsanordnung ein neues Moment hinein, dessen Bedeutung wir gegenwärtig nicht klar beurteilen können. In dieser Hinsicht will ich daran erinnern, daß man durch derartige und sogar kleinere CaCl_2 -Mengen die Gerinnung so stark beeinflussen kann, daß sie sogar bei Zimmertemperatur fast momentan geschieht. Durch passenden CaCl_2 -Zusatz habe ich auch die Gerinnungszeit für eine und dieselbe, teils auf 1/100 und teils auf 1/200 verdünnte Infusion auf so kurze Zeit, 20—25 Sekunden, zusammendrängen können, daß der Zeitunterschied innerhalb der Beobachtungsfehler lag. Wenn man also, wie in dem einen Falle von Sawitsch, die Parallelität erst dann herstellen kann, wenn man die Gerinnungszeit durch Zusatz von 0,7% CaCl_2 auf 35 Sekunden zusammengedrängt hat, kann man aus einem solchen Versuche kaum sichere Schlüsse ziehen.

Hierzu kommt nun aber auch ein anderer Umstand. Schon

im Jahre 1877 habe ich gezeigt,¹⁾ daß es für die Wirkung des CaCl_2 auf die Gerinnung ein Optimum gibt, oberhalb welches das Kalksalz dieselbe wieder verlangsamt, eine Beobachtung, deren Richtigkeit später von Lörcher²⁾ bestätigt wurde. Wie dies Optimum unter verschiedenen Verhältnissen sich ändert, habe ich nicht eingehender untersucht; wiederholt habe ich aber Fälle beobachtet, wo ein Gehalt von 0,25 oder 0,5% viel kräftiger als ein Gehalt von gegen 1% CaCl_2 wirkte. Dementsprechend kann man auch für eine und dieselbe Enzymlösung in ungleichen Verdünnungsgraden, wie z. B. $\frac{1}{100}$ und $\frac{1}{200}$, mit einer kleineren CaCl_2 -Menge (z. B. 0,25%) dieselbe Gerinnungszeit für die verdünntere Lösung wie mit einer größeren CaCl_2 -Menge (z. B. 1%) für die konzentriertere zustande bringen — in beiden z. B. 50 Sekunden.

Mit dem nun Gesagten habe ich nur daran erinnern wollen, daß die Wirkung des CaCl_2 ziemlich verwickelt ist und daß man ohne tiefere Kenntnis seiner Wirkungsweise kaum klare und bindende Schlüsse aus den Versuchen mit großen CaCl_2 -Zusätzen ziehen können dürfte. Eine solche Kenntnis besitzen wir noch nicht, und darum kann ich auch nicht den Vorschlag empfehlen, daß man die Koagulationsmethode unter Zusatz von großen CaCl_2 -Mengen schon jetzt «als klinisches Verfahren zwecks Bestimmung der Fermente» im Mageninhalt prüfen sollte. Man muß erst darüber einig sein, ob die Verdauung und die Milchkoagulation identische oder ganz verschiedene enzymatische Prozesse sind, und im letzteren Falle muß man erst die Wirkung der Kalksalze auf jede Enzymwirkung gesondert studiert haben.

Den wichtigsten Beitrag zur Klärung der nun vorliegenden strittigen Frage hat, wie es mir scheint, in neuester Zeit Gewin³⁾ durch seine sehr sorgfältigen Untersuchungen geliefert.

Gewin bestreitet ebenfalls nicht die Richtigkeit der Untersuchungen von Schmidt-Nielsen, er spricht ihnen aber ebenso wie Sawitsch die Beweiskraft aus dem Grunde ab, daß er

¹⁾ Nova Acta Reg. Soc. Scient. Upsal. Vol. extr. ord. 1877.

²⁾ Pflügers Archiv, Bd. LXIX.

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. LIV.

ebenfalls eine schädigende Wirkung des Alkalis bei der Neutralisation beobachtet hat. Ich kann also gegen ihn dasselbe wie gegen Sawitsch anführen, daß man nämlich ähnliche Resultate ohne Anwendung von Neutralisation erhalten kann, und es könnte deshalb vielleicht überflüssig erscheinen, etwas ausführlicher auf die Arbeit Gewins einzugehen. Da aber Gewin in seinen eigenen Versuchen auch Beweise für die Identität der beiden Enzymwirkungen zu finden glaubt, muß ich ein wenig bei seiner Arbeit verweilen.

Zwischen den Versuchsergebnissen von Gewin und von mir besteht ein scheinbarer Widerspruch, insofern als er, selbst nach tagelangem Erwärmen der Infusionen, nicht die Chymosinwirkung vernichten konnte, während mir dies ziemlich leicht und rasch gelang. Dieser Widerspruch ist jedoch, wie angedeutet, nur scheinbar und er findet in der ungleichen Versuchsanordnung seine Erklärung. Zum Teil liegt diese in den ungleichen Temperaturen, bei denen wir gearbeitet haben, zum wesentlichsten Teil dürfte sie aber in der verschiedenen Konzentration unserer Enzymlösungen begründet sein.

Ich habe absichtlich mit verdünnten Lösungen gearbeitet, er hat aber eine «ziemlich konzentrierte» oder eine «konzentrierte» Lösung angewandt, und dies macht einen großen Unterschied. Je reicher eine Lösung an der zu zerstörenden Enzymsubstanz ist, um so mehr Zeit muß im allgemeinen die Zerstörung erfordern. Je konzentrierter die Lösung ist, um so mehr Eiweiß enthält sie; und da das Eiweiß schützend wirkt, muß hieraus eine Verzögerung der Vernichtung der Enzymwirkung resultieren. Da es nun bekannt ist, daß Enzyme überhaupt (und ebenso das Labenzym) um so leichter zerstört werden, je kleiner ihre Menge in der Lösung ist, so könnte man im voraus erwarten, daß bei Anwendung von konzentrierteren Lösungen ein Auseinandergehen der zwei Enzymwirkungen erst dann zum Vorschein kommen würde, wenn die Enzymmenge etwas stärker herabgesetzt worden ist. Dies ist nun auch in einigen der Versuche Gewins der Fall; wenn er aber zu diesem Punkte gelangt ist, betrachtet er den Versuch nicht länger als beweisend, weil er glaubt, daß bei ge-

ringerem Enzymgehalte die Gerinnungs- und die Verdauungsproben nicht einander genau vergleichbar sind.

Als Beispiel will ich die Tabelle IV, S. 73, nehmen, in welcher es um die Veränderungen einer konzentrierten Enzymlösung sich handelt. Da Gewin viel Gewicht auf die schädliche Wirkung der Neutralisation legt und die mit neutralisierter Lösung angestellten Versuche als weniger beweisend betrachtet, will ich hier und in dem Folgenden mich nur an seine ohne Neutralisation ausgeführten Versuche halten. Ich will also die Gerinnungsversuche mit saurer Infusion (Stab 5) und die Proteolyseversuche (Stab 6) vergleichen.

Durch Erwärmen während 20 Tagen hatte er die Änderung in der Chymosinwirkung nicht weiter bringen können, als daß die Gerinnungszeit von 5 zu 40 Sekunden sich verlängert hatte. Die Proteolyse war gleichzeitig von 9,6 auf 1,1 herabgegangen. Ein paar Tage später ändern sich aber die Verhältnisse vollständig. In 10 Tagen (vom 2.—12. März) bleibt die Proteolyse unverändert 0,49, während die Gerinnungszeit von 1 Minute 25 Sekunden bis zu mehr als 5 Stunden sich verlängert hatte und die Chymosinwirkung also auf mehr als $\frac{1}{200}$ herabgesunken ist.

Hier tritt nun also der Mangel an Parallelität sehr schlagend zutage, aber sonderbarerweise erwähnt Gewin dies nicht. Er sagt zwar S. 74, daß am 1. März die Proportionalität aufhört; aber er sagt auch, daß man nun, wo die Gerinnungszeit 65 bis 80 Sekunden war, an der Grenze angekommen ist, «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». Ich gestehe, daß mir dies nicht recht verständlich ist, und ich glaube umgekehrt, daß es von diesem Punkte ab fast leichter als vorher war, die Unterschiede in der Gerinnungszeit zu beobachten. Wenn die Gerinnungszeit in 16 Tagen nur zwischen 10 und 40 Sekunden schwankt, so kann man leicht Fehler in den Beobachtungen machen; wenn dagegen die Gerinnung an einem Tage 1 Minute 10—15 Sekunden, 5 Tage später $4\frac{1}{2}$ bis $5\frac{1}{2}$ Minuten und 5 Tage darnach mehr als 5 Stunden erfordert.

so ist dies sehr leicht zu erkennen und die unvermeidlichen Beobachtungsfehler sind belanglos. Wenn man zu dem Punkte gekommen ist, wo die wenig empfindliche Mettsche Probe nicht länger brauchbar ist, so kann man ja übrigens zu der Fibrinprobe übergehen.

Ich habe in meiner Versuchsanordnung großes Gewicht darauf gelegt, bedeutende und stark in die Augen springende Unterschiede zu erhalten, und ich finde es sogar leichter, zu bestimmen, ob die Milch in ungefähr 15 oder 30 Minuten, als ob sie in 15 oder 30 Sekunden gerinnt. Wenn man mit so unsicheren Methoden wie der Mettschen Probe und der Fibrinprobe arbeitet, ist es auch notwendig, ziemlich große Unterschiede zu erhalten, um die Versuchsfehler unschädlich zu machen. Die Fibrinprobe nach Brücke ist bekanntlich nur unter der Voraussetzung brauchbar, daß man mit hinreichend verdünnten Lösungen arbeitet: wenn man dies aber tut und die Verdauung in der einen Probe 1—2 Stunden und in der anderen 8 oder 12 oder noch mehrere Stunden erfordert, so werden die unvermeidlichen Beobachtungsfehler bedeutungslos.

Ein prinzipieller Unterschied in den Untersuchungen von Gewin und mir liegt also darin, daß er wenigstens in mehreren Fällen mit konzentrierten und ich mit verdünnteren Enzymlösungen arbeitete. In der Anwendung von konzentrierten Lösungen liegt auch vielleicht der Grund, warum seine Resultate zum Teil so schwer verständlich und einander widersprechend sind. Ein paar Beispiele aus seinen Tabellen werden dies zeigen.

Aus dem oben angegebenen Grunde will ich mich auch hier nur an die Versuche mit nicht neutralisierten Lösungen halten, und ich erlaube mir, hier einen Auszug aus der Tabelle II S. 66 zu machen:

Ich habe mir erlaubt, diesem Auszuge aus der Tabelle auch die Zahlen, welche die Abnahme der Enzymwirkungen angeben, beizufügen. In 5 Tagen war also die Proteolyse auf gegen $\frac{1}{5}$ herabgegangen. Wie verhält es sich aber mit der Chymosinwirkung? Nach dem Stabe 9 zu urteilen, ist sie auf $\frac{1}{2}$ und also bedeutend weniger als die Proteolyse, nach dem Stabe 10 dagegen auf $\frac{1}{21}$, also reichlich viermal stärker als die

Proteolyse, herabgegangen, und trotzdem handelt es sich hier um eine und dieselbe erwärmte, saure Lösung.

Datum	9	10	11
	Saure Lösung		
	1 ccm + 1 ccm Wasser.	0.2 ccm + 1,8 ccm Wasser.	4 $\frac{1}{2}$ ccm + 5 $\frac{1}{2}$ ccm 0.2% HCl.
	Gerinnung in Sek.	Gerinnung in Min.	Proteolyse
1 Mai	5	1 $\frac{2}{3}$	32,49
6 "	10	34—37	6,76
Abnahme .	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{21}$	$\frac{1}{4.8}$

Ähnlichen schwerverständlichen und einander widersprechenden Versuchsergebnissen begegnet man, wenn auch nicht gleich stark hervortretend, beim Vergleiche der Stäbe 6, 7 und 8 derselben Tabelle und bei einer kritischen Prüfung der Tabelle III. Einer Abnahme der Proteolyse zu rund $\frac{1}{7}$ (Stab 11) entspricht hier eine Abnahme der Chymosinwirkung, in dem einen Stabe (9) zu $\frac{1}{2.5}$ und in dem anderen (10) zu $\frac{1}{9.5}$, und doch ist die Lösung in beiden Fällen eine und dieselbe. Ähnliche Mißverhältnisse findet man in derselben Tabelle III in den Stäben 6, 7 und 8 und sogar in dem Abschnitte B, in den Versuchen mit der nicht erwärmten Kontrollösung.

Ein Blick auf den obigen Auszug aus der Tabelle II zeigt, daß der Unterschied zwischen den Lösungen (Stab 9 und 10) nur in einer ungleich starken Verdünnung mit Wasser besteht. Man sieht also, daß eine und dieselbe Lösung, wenn sie reicher an Enzym und Säure ist, eine bedeutend geringere Abnahme der Chymosinwirkung anzeigt, als wenn sie ärmer an Enzym und Säure ist, und demselben Verhalten begegnet man auch in der Tabelle III.

Soll man nun die Abnahme der Proteolyse mit der Chymosinwirkung im Stabe 9 oder im Stabe 10 Tabelle II vergleichen? In dem einen Falle hat die Chymosinwirkung weniger stark, in dem anderen bedeutend stärker als die Proteolyse abgenommen, und in keinem der beiden Fälle findet man eine Parallelität in der Abnahme der beiden Enzymwirkungen. Mir scheint es schwer.

in diesen Versuchen eine Stütze für die Identität der Pepsin- und Chymosinwirkung zu sehen.

Gewin hat übrigens selbst, S. 58 und 59, einen Versuch mitgeteilt, in welchem es ihm gelungen ist, eine Pepsinlösung darzustellen, welche auf Milch unwirksam war. Eine Lösung des gereinigten Schweineenzym in 0,2% HCl wurde mit gekochtem und fein zerriebenem Hühnereiweiß angerührt und an einen kühlen Ort gestellt. Nach 21 Stunden wurde filtriert. Dieses Filtrat, in der üblichen Weise mit Milch vermischt, rief 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 Röhren verdaute es in 21 Stunden 0,33 mm. Dies ist nun allerdings keine kräftige Pepsinverdauung; aber die Mettsche Probe ist auch eine wenig empfindliche Pepsinprobe. Legt man neben den Mettschen Röhren einige Stäbchen von geronnenem Eiweiß in die zu prüfende saure Pepsinlösung hinein, so findet man oft die letzteren vollständig oder größtenteils verdaut, bevor noch 0,1—0,2 mm des Röhreninhaltes verdaut worden sind. Mit der Fibrinprobe kann man noch rascher kleine Pepsinmengen nachweisen. Da das von Gewin untersuchte Filtrat zu der Mettschen Probe positiv sich verhielt, beweist dies ganz sicher, daß es Pepsin enthielt, während es keine Chymosinwirkung zeigte.

Ich kann also nicht finden, daß die zugunsten der Identität der Pepsin- und Chymosinwirkung bisher angeführten Versuche besonders beweiskräftig sind.

Wie stellen sich nun meine Untersuchungsergebnisse zu den verschiedenen Ansichten in dieser strittigen Enzymfrage?

Daß sie sich alle mit der Annahme von zwei verschiedenen Enzymen oder Enzymwirkungen leicht vereinbaren lassen, ist ohne weiteres klar; aber sie sind ebensogut nach der Hypothese von Nencki und Sieber erklärlich. Man kann sich nämlich wohl vorstellen, daß das große Enzymmolekül beim Kalbe reich an labenden Seitenketten, bei dem Pferde und mehreren anderen Tieren dagegen arm an solchen wäre. Das Vernichten der Labwirkung bei Erhaltung der Pepsinwirkung, durch Erwärmen einer sauren Kalbsinfusion, hätte man sich nach dieser

Hypothese in der Weise vorzustellen, daß die labenden Seitenketten leichter und rascher als die peptisch wirkenden angegriffen werden, so daß man zuletzt nur Moleküle erhält, welche keine wirksamen, labenden Seitenketten mehr tragen. Das bei verschiedenen Tieren beobachtete gleichzeitige Vorkommen von labender und peptischer Enzymwirkung läßt sich natürlich sehr leicht mit einer solchen Hypothese in Einklang bringen.

Dieses, nicht nur in der Tier-, sondern auch in der Pflanzenwelt so häufig beobachtete gleichzeitige Vorkommen von Labwirkung und Proteolyse ist wohl auch der wichtigste Grund gewesen, warum man so eifrig die beiden Wirkungen von einem und demselben Enzym hat herleiten wollen. Da ich im Jahre 1872, wohl als erster, das gleichzeitige Auftreten von Lab- und Pepsinwirkung bei den verschiedensten Tieren und in den allermeisten Fällen unter Verhältnissen, wo von einer Milchverdauung nie die Rede sein konnte, beobachtet hatte, war auch mein erster Gedanke der, daß beide Wirkungen von demselben Enzym herrührten, oder daß das eine Enzym eine Modifikation oder Umwandlungsprodukt des anderen sei. Meine nach verschiedenen Richtungen ausgeführten und in verschiedener Weise modifizierten Versuche lieferten indessen keine Anhaltspunkte für eine solche Annahme und ich konnte, ohne den Tatsachen Gewalt anzutun, nur zu dem Schlusse kommen, daß es um zwei verschiedene Enzyme sich handelte.

Es ist mir auch fortwährend schwer, meine Versuchsergebnisse mit der Annahme nur eines Enzyms oder einer Enzymwirkung zu vereinbaren, und das sowohl, wenn ich an die Ansicht von Pawlow wie an die von Sawjalow und Gewinich halte.

Nach Pawlow gibt es kein besonderes Labferment und keine spezifische Labwirkung überhaupt. Die Labwirkung ist nach ihm nur die umgekehrte, also synthetische Wirkung des Pepsins. Einer solchen Ansicht ist es jedoch kaum möglich beizupflichten. Eine Rückbildung des Caseins aus seinen Verdauungsprodukten wäre allerdings die umgekehrte Wirkung des Pepsins: für die Annahme, daß das Paracasein durch eine Synthese aus dem Casein entstehe, hat man dagegen wohl

keine Anhaltspunkte. Gegenwärtig neigt man wohl auch am meisten zu der entgegengesetzten Annahme, daß die Paracaseinbildung das Resultat einer Proteolyse unter Abspaltung von einer Albumose (dem Molkeneiweiß) ist. Ich weiß auch nicht, ob diese Pawlowsche Ansicht allgemeinere Zustimmung gefunden hat.

Nach der anderen Ansicht, von Sawjalow und Gewin, ist die Milchgerinnung nichts anderes als eine Pepsinverdauung, eine maskierte Verdauung des Caseins oder der Anfang derselben. Gegen diese Ansicht spricht schon der Umstand, daß die Paracaseinbildung bei Abwesenheit von H-Ionen und sogar bei Gegenwart von HO-Ionen verlaufen kann, während das Pepsin, so weit bekannt, nur bei Gegenwart von freien H-Ionen wirkt. Daß das Pepsin gewissermaßen eine Ausnahme für das Casein machen sollte, indem es diesen Stoff auch bei Abwesenheit von H-Ionen verdauen würde, ist eine wenig zusagende Annahme. Lege ich nun hinzu, daß das Pepsin bei Gegenwart von einer kleineren Menge H-Ionen, wie meine Versuche zeigen, überhaupt nicht sichtbar auf das Casein in der Milch einwirkt, so kann ich nicht die Milchgerinnung als eine maskierte oder beginnende peptische Verdauung des Caseins auffassen.

Die Unwirksamkeit der sehr schwach sauren Pepsinlösungen auf die Milch dürfte man auch nicht durch die Anwesenheit von hemmenden Stoffen, welche während des langdauernden Erwärms der sauren Infusionen gebildet worden sind, erklären können. Wenn solche hypothetische Stoffe die Wirkung des Pepsins auf hartgekochtes Eiweiß nicht hemmen, ist es schwer einzusehen, warum sie seine Wirkung auf einen so leicht verdaulichen Eiweißstoff wie das Casein hemmen sollten. Man könnte zwar annehmen, daß sie die Wirkung des Pepsins nicht bei stark saurer Reaktion, sondern nur bei der in den Milchversuchen vorhandenen sehr schwach sauren Reaktion hemmen könnten; in dem Falle müßten sie aber wahrscheinlich noch besser bei neutraler Reaktion hemmend wirken. Dem ist aber nicht so, wie aus den Versuchen von Schmidt-Nielsen¹⁾ hervorgeht.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLVIII.

Daß die erwärmten, sauren Infusionen auch bei der schwachen, in den Milchversuchen vorhandenen Säuremengen nicht hemmend wirken, habe ich durch besondere Versuche kontrolliert, und als Beispiel führe ich hier das Resultat eines solchen Versuches an. Mit 1 Volumen einer sauren Kalbsmageninfusion wurden 19 Volumen derselben erwärmten, auf Milch unwirksamen, sauren Infusion gemischt und als Kontrolle vermische ich 19 Volumen Säure von demselben Säuregrade (0,2% HCl) mit 1 Volumen der nicht erwärmten Infusion. Dann werden beide mit je 2 Volumen Wasser verdünnt und also auf den Verdünnungsgrad $\frac{1}{60}$ gebracht. Beide wurden nun in dem gewöhnlichen Verhältnisse 1 : 10 mit Milch geprüft. Die Kontrollprobe koagulierte in 4 Minuten und die andere in 4 Minuten 5 Sekunden. Es fand also keine hemmende Wirkung statt.

Wenn ich also keine, infolge des Erwärmens gebildeten hemmenden Stoffe nachweisen konnte, so wäre es auf der anderen Seite denkbar, daß während des Erwärmens Substanzen vernichtet werden, welche für die Wirkung des Pepsins auf die Milch notwendig sind. Das Pepsin allein bewirkt keine Hydrolyse, diese kommt erst dann zustande, wenn eine genügende Menge freier H-Ionen vorhanden sind. Man könnte nun vielleicht annehmen, daß das Pepsin auch die Milchgerinnung erst bei Gegenwart einer zweiten, noch unbekanntem Substanz bewirken könne. Wenn das Pepsin bei Gegenwart von H-Ionen Eiweiß verdaut, nennt man dies eine Pepsinwirkung, und wenn es mit Hilfe einer anderen Substanz Milch koaguliert, wäre dies also, was man bisher eine Chymosinwirkung genannt hat. Nach dieser Hypothese könnten also beide Prozesse eine Wirkung desselben Enzyms sein. Das ungleiche Verhältnis zwischen den beiden Wirkungen bei verschiedenen Tieren könnte in diesem Falle von einem ungleichen Reichtum an der zweiten Substanz herrühren, und wenn man durch Erwärmen die Chymosinwirkung vernichtet, würde dies nicht durch die Zerstörung eines besonderen Enzymes, des Chymosins, sondern durch die Zerstörung der Hilfssubstanz zu erklären sein.

Gegen eine solche Hypothese kann man indessen sogleich einwenden, daß sie mit dem Vorkommen von Enzymlösungen,

welche Milch koagulieren, aber Eiweiß nicht verdauen, unvereinbar ist. Da ich aber aus oben (Absch. II) angeführten Gründen den mit solchen Lösungen ausgeführten Verdauungsversuchen keine völlig bindende Beweiskraft zuerkennen kann, ist ein solcher Einwand bis auf weiteres nicht ganz entscheidend. Die wenigen Versuche, die ich, von dieser Arbeitshypothese ausgehend, bisher ausgeführt habe, sprechen allerdings nicht zugunsten derselben; da aber solche Versuche nur in den Wintermonaten mit Vorteil auszuführen sind, habe ich diese Frage nicht weiter verfolgen können.

Es ist mir also gegenwärtig nicht möglich, meine Untersuchungsergebnisse mit der Ansicht von der Identität des Pepsins und Chymosins in Einklang zu bringen. Das wiederholt beobachtete gleichzeitige Vorkommen von labender und proteolytischer Wirkung im Tier- und Pflanzenreiche nötigt wohl übrigens nicht zu der Annahme, daß beide Prozesse identisch sind. Halten wir uns an das Pepsin, so ist es wohl nicht ganz ausgeschlossen, daß das Chymosin die Wirkung des ersteren begünstigt oder in irgend einer Weise beeinflußt, eine Möglichkeit, die man bisher, wo man nur mit gleichzeitig labend und proteolytisch wirkenden Pepsinlösungen gearbeitet hat, nicht hat prüfen können. Es wäre ja auch möglich, daß das sogenannte Chymosin eine bei dem Übergang der Zymogene in Enzyme beteiligte Substanz oder dabei entstandenes Nebenprodukt sei, welches aus dem Grunde die proteolytischen Enzyme regelmäßig begleitet. Es sind auch andere Möglichkeiten denkbar, und das Wichtigste, welches auch in erster Linie die Aufgabe dieser meiner Arbeit war, ist also, sachliches Material, welches als Grundlage einer fortgesetzten Diskussion dieser schwergelösten Enzymfrage dienen könnte, zu liefern.

Nachdem diese Untersuchungen abgeschlossen waren und das Manuskript fast ganz fertig war, ist eine neue Arbeit von N. P. Tichomirow über die Wirkung der Alkalien auf das Eiweißferment des Magensaftes erschienen. (Diese Zeitschr., Bd. LV, Hft. 2.) Da ich nicht mit alkalischen Infusionen gearbeitet habe, berührt diese Arbeit nur wenig die meinige. Tichomirow hat indessen in dieser Arbeit neue Beweise dafür

geliefert, daß man die eine Enzymwirkung viel stärker als die andere lähmen kann und daß beide auch gar nicht in gleichem Grade reaktiviert werden. Er hat auch bei passender Versuchsanordnung die ursprüngliche Relation beider Enzymwirkungen wiederherstellen können, ein Versuchsergebnis, welches, wie ich oben (S. 60) schon gesagt habe, vorausszusehen war und über dessen Beweiskraft ich mich ebenfalls dort geäußert habe. Die wenigen Milchgerinnungsversuche, die er mitgeteilt hat, sprechen auch nach meiner Auffassung eher gegen als für die Identität der beiden Enzymwirkungen. Da aber diese Versuche mit stark sauren Infusionen ausgeführt wurden, also nach einer Methode, welche keine sicheren Schlüsse, sei es in der einen oder anderen Richtung gestatten, so wage ich nicht, ein bestimmtes Urteil über dieselben auszusprechen.!
