

# Die Verdauung des Caseins durch Pepsin vom Kalb, Schwein und Rind.

Von  
**W. van Dam.**

---

Mit drei Kurvenzeichnungen im Text.

---

(Der Redaktion zugegangen am 11. Mai 1912.)

---

In einer vorhergehenden Arbeit <sup>1)</sup> habe ich gezeigt, daß beim Studium der Eigenschaften von Pepsin und Chymosin ein wichtiger Faktor außer Beachtung gelassen wurde, nämlich die öfters schnelle Schädigung des Enzyms während des Gerinnungsversuchs durch die Wirkung der Hydroxylionen der Milch. Daraus lassen sich die Eigenschaften des Parachymosins ganz einfach erklären. Der Unterschied in der Wirkung von Säure und Chlorcalcium auf die Gerinnungszeit und das Nichtbefolgen des Zeitgesetzes für Parachymosinlösungen finden in dieser Beobachtung eine einfache Erklärung. Die bekannten Versuche Hammarstens und Schmidt-Nielsens, durch die eine Trennung von Pepsin und Chymosin erreicht zu sein schien, hatten durch diese Beobachtung ihre beweisende Kraft verloren, denn es konnte gezeigt werden, daß die mit Salzsäure digerierten Lösungen nur scheinbar ihr koagulierendes Vermögen eingebüßt hatten. Damit fiel auch die damals kräftigste Stütze für die dualistische Auffassung der koagulierenden und verdauenden Enzyme und es war auf Grund dieser Überlegungen, daß ich als meine Meinung aussprach, die einfachere Vorstellung, nach Pawlow, Pekelharing, Gewin u. A. das Chymosin und Pepsin seien identisch, sei die am meisten begründete. Seitdem sind in dieser Zeitschrift wieder einige Ab-

---

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 64 (1910), S. 316.

handlungen erschienen, die zum Teil neue Tatsachen brachten, und ich erlaube mir also nochmals auf dieses interessante Problem zurückzukommen.

Hammarsten<sup>1)</sup> gibt in einer ausführlichen Arbeit eine Fortsetzung seiner Untersuchungen über den Unterschied in der Wirkung von Kalbsmageninfusionen einerseits und von Mageninfusionen vom Pferd, Huhn und Hecht andererseits. Diesmal wurden Kalbs- und Hundemagenextrakte verglichen mit durchaus demselben Resultate: es besteht gar keine Proportionalität zwischen Pepsin- und Labwirkung, und die Hundemageninfusion zeigte wieder die typischen Eigenschaften des Parachymosins (Pepsins). Durch besondere Versuche mit angesäuerter Milch hat dieser Forscher sich überzeugt, daß der Mangel an Parallelität bei der proteolytischen und koagulierenden Wirkung nicht der Schädigung des Enzyms durch die Hydroxylionen der Milch zuzuschreiben ist. Die Abweichung von dem Zeitgesetze bei der Verdünnung wurde aber durch das Hinzugeben von Säure zur Milch aufgehoben, d. h. die Schädigung des Enzyms findet dann nicht statt, ganz so wie beim Schweinsenzym. Die Unitarier erklären diesen beobachteten Mangel an Parallelität so, daß sie es für möglich halten, daß in einer Enzymlösung, namentlich in Kalbsmageninfusionen, Stoffe vorkommen, welche hemmend auf die Eiweißverdauung nach Mett wirken, während die Koagulation der Milch durch sie nicht beeinflußt wird. Hammarsten<sup>2)</sup> kommt aber eine solche Auffassung aus verschiedenen Gründen nicht stichhaltig vor. Er schreibt (S. 140): «Wenn die Labung, wie man nach der unitarischen Ansicht annimmt, nichts anderes als eine Pepsinverdauung ist, warum sollen dann die Verunreinigungen in den Kalbsinfusionen diese Pepsinverdauung (die Milchgerinnung) nicht oder jedenfalls nur in viel geringerem Grade als die andere Pepsinverdauung (vom Hühnereiweiß) hemmen? Warum soll dieselbe Menge Verunreinigungen, welche die Labwirkung einer Kalbsmageninfusion nicht stärker herabsetzt, als daß die letztere bezüglich dieser Wirkung einer Schweinsenzymlösung äquivalent

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 68 (1910), S. 119.

<sup>2)</sup> l. c.

ist, die Hühnereiweißverdauung viel stärker hemmen, trotzdem die letztere unter sonst offenbar günstigeren Verhältnissen als die erstere verläuft?»

Über diese Äußerung Hammarstens habe ich mich einigermassen gewundert, zumal weil er auf S. 143 schreibt: «Man darf nämlich nicht übersehen, daß die Versuchsanordnungen bei der Mettschen Probe einerseits und den Milchgerinnungsproben andererseits nicht miteinander vergleichbar sind. In dem einen Falle, bei der Mettschen Probe, arbeitet man mit ziemlich viel Enzym und verhältnismäßig hohen Säuregraden, meistens etwa 0,2% HCl; in dem andern, bei der Milchgerinnung, arbeitet man des öfteren mit wenig Enzym im Verhältnis zu dem Substrate und bei neutraler oder höchstens schwach saurer Reaktion».

Das ist nun eben der Standpunkt der Unitarier, die der Meinung sind, daß man ebenso sehr berechtigt ist, den Mangel an Parallelität den verschiedenen Einflüssen des Reaktionsmediums zuzuschreiben (denn die Systeme sind bei identischen Enzymen nicht identisch), als zur Annahme eines zweiten Enzyms. So muß man es für möglich halten, daß eine Enzymlösung bei geringer Wasserstoffionenkonzentration, wie in der Milch, ganz regelrecht wirkt, während das nicht der Fall ist in HCl 0,2% infolge der Anwesenheit von Spuren adsorbierter oder gebundener Stoffe, durch welche die Eigenschaften des Systems völlig geändert werden können, und die durch die bisher angewandten Methoden nicht von dem Enzym getrennt werden können. Die von den Dualisten beliebte Methode, nur durch Vermischen von Enzymlösungen mit solchen Lösungen, für die hemmende Stoffe vorausgesetzt werden können, die eine oder die andere Wirkung zurückzudrängen, scheint mir in Hinsicht auf die äußerst kleine Menge Verunreinigungen, welche die Eigenschaften vom Eiweiß zu ändern vermögen, eigentlich sehr roh. In diesem Verband sei an die Untersuchungen Pekelharings und Ringers<sup>1)</sup> erinnert über die elektrische Überführung des Pepsins, aus welcher hervorgeht, daß minimale Mengen Verun-

---

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 75, S. 282.

reinigungen das Verhalten des Pepsins sehr deutlich verändern können. Auch bei den Untersuchungen Hedins<sup>1)</sup> zeigt sich der Einfluß des Mediums, und die große Schwierigkeit, um Eiweiß frei von gebundenen oder adsorbierten Stoffen zu erhalten, ist überbekannt.

Dem letzten Zitat aus Hammarstens Arbeit geht eine Bemerkung voran, die noch erwähnt werden soll: «Erinnert man sich aber, wie außerordentlich stark man sowohl durch Säurezusatz wie durch Zusatz von  $\text{CaCl}_2$  die Labgerinnung durch Hundeeinfusion beschleunigen kann, so gewinnt man wohl unbedingt den Eindruck, daß die hemmenden Stoffe, wenn solche überhaupt vorhanden sind, eher auf die milchkoagulierende als auf die eiweißverdauende Wirkung der Magenenzyme einen Einfluß ausüben». Ich erlaube mir hinsichtlich dieses Punktes zu bemerken, daß ich in meiner letzten Arbeit für die starke Wirkung von Säure und Chlorcalcium auf die Labung durch Parachymosin (Pepsin) eine Erklärung gegeben habe, die von Hammarsten offenbar übersehen wurde. Daß die Labwirkung beim Hundeezym stärker beeinflußt wird durch H-Ion und  $\text{CaCl}_2$  als beim Kalbsenzym, kann seine Erklärung finden in dem Umstande, daß für ersteres nicht nur eine Beschleunigung durch die höhere Acidität eintritt, sondern auch dadurch, daß infolge des herabgesetzten Hydroxylionengehalts der Milch die Schädigung des Hundeezyms während des Gerinnungsversuchs vermindert oder aufgehoben wird. Die Wahrscheinlichkeit einer solchen Sachlage geht auch daraus hervor, daß gleichzeitig die Abweichungen vom Zeitgesetz aufgehoben werden, wie auch aus Hammarstens Untersuchungen an Hundemageninfusion deutlich zu ersehen ist.

Man darf doch nicht vergessen, daß in der Nähe des neutralen Punktes eine geringe Vermehrung der H-Ionen eine bedeutende relative Zunahme, auf die es hier ankommt, bedeutet. Und daß eine Chlorcalciumlösung auch die H-Ionen der Milch stark vermehrt, habe ich früher<sup>2)</sup> gezeigt. Durch

---

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 72, S. 187.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 58.

0,05%  $\text{CaCl}_2$  fand ich den reellen Säuregrad z. B. bedeutend mehr als anderthalbmal größer.

Aus den oben angegebenen Gründen kann ich also nicht einsehen, daß es gewiß keine Anhaltspunkte gibt für die Annahme, daß die Verunreinigungen in den Kalbsmageninfusionen die Mettsche Probe stärker als die Milchgerinnung hemmen. Hammarsten hat seine Untersuchungen ausgebreitet mit dem Studium der Wirkung von verschiedenen Enzymlösungen in einem und demselben Milieu, namentlich in Caseinnatriumlösungen. Ein Urteil über die befolgte Versuchsanordnung kann aber erst später ausgesprochen werden, wenn die weiteren Mitteilungen Hammarstens bekannt sind. Wie weiter unten sich zeigen wird, habe ich mit Verdauungsversuchen von Casein Zahlen erhalten, die mehr für die Identität der Enzyme sprechen.

Ich schreite nun zu der Besprechung einer zweiten Arbeit, und zwar von Rakoczy.<sup>1)</sup> Dieser Forscher findet für die Infusionen auf Rinds- und Kalbsmagen denselben Unterschied als für die vom Kalb im Vergleich mit anderen Tierarten, d. h. das Rindsenzym zeigt alle typischen Parachymosin-(Pepsin)-Eigenschaften. Während Hammarsten unterscheidet zwischen Chymosin- und Pepsingerinnung von Milch in dem Sinne, daß die letztere nur bei angesäuertem Milch stattfindet (so werden z. B. die Versuche Schmidt-Nielsens erklärt), geht Rakoczy noch weiter und sagt: «Die von der Kalbsinfusion hervorgerufene Milchgerinnung wird durch die Wirkung zweier Fermente — des Pepsins und des Chymosins — bedingt.» Das bedeutet also ein sich einander Nähern der beiden Enzyme in einer für den in Frage stehenden Punkt sehr wichtigen Eigenschaft. Weiter hat dieser Forscher durch Dialyse, unter genau angegebenen Bedingungen, eine Trennung herbeiführen können des koagulierend und des verdauend wirkenden Enzyms. Im Niederschlag setzt sich bei dieser Operation mehr oder weniger reines Pepsin ab, während die Chymosineigenschaften im Filtrat erhalten bleiben. Vom unitarischen Standpunkte heißt das also, daß es nicht ge-

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 68, S. 421.

lingt, durch einfache Dialyse alle Verunreinigungen wegzuschaffen, wie schon von Pekelharing und Gewin hervorgehoben wurde. Darüber braucht man sich nicht zu wundern, wenn man bedenkt, wie schwierig es z. B. ist, Eiweiß von Spuren Elektrolyten zu befreien. Am meisten interessant ist jedoch in der Arbeit Rakoczys, daß er Versuche mitteilt an natürlichem Kalbsmagensaft, der sich der Hauptsache nach als Kalbsmagenfusionen verhält. Es fällt aber zunächst auf bei diesen Versuchen, daß beim Erwärmen auf 40° C. die Chymosinwirkung sehr bedeutend langsamer abgeschwächt wird, als für die Kalbsmagenfusionen gefunden wurde, selbst bei viel größerer Verdünnung des natürlichen Magensaftes. So sieht man die Koagulationszeit durch 48 stündige Digestion von 26" auf 185" steigen (also 1 : 7) oder von 90" auf 480" (also 1 : 5,3), während für die Infusionen gefunden wurde: von < 7" auf 330" (also 1 : > 47) und < 5" auf 120" (also 1 : > 24). Ich habe für Schweinsenzym dasselbe gefunden; die Abschwächung durch Digerieren bei 40° C. geht bedeutend langsamer als bei Kalbsmageninfusionen. Bezüglich dieser Zahlen sagt Rakoczy: «Bei der graphischen Darstellung der Ergebnisse erhielt ich Kurven, die denen ähnlich waren, die für die Kalbsinfusionen erhalten worden waren, obwohl das Sinken der milchkoagulierenden Kraft im natürlichen Saft weniger scharf ausgeprägt war.»<sup>1)</sup>

Bedenkt man dabei, daß es keine Garantie gibt bei der Arbeitsweise Rakoczys, daß der Saft wirklich rein ist, wie es bei einem operierten Tiere bei Scheinfütterung erhalten wird, so kann ich auch diesen Versuch nicht als beweisend betrachten für die Existenz zweier verschiedener Enzyme im Kalbsmagensaft. Am Schlusse seiner Arbeit, die fast ganz beendet war, als meine vorhergehende Schrift über den Gegenstand veröffentlicht wurde, weist Rakoczy auf meine darin beschriebenen Befunde hin. Weil dieser Forscher für die von mir gefundenen Tatsachen eine andere Erklärung gibt, und zwar eine solche, daß, wäre sie richtig, die bekannten Tren-

<sup>1)</sup> Spatierung von mir.

nungsversuche Hammarstens und Schmidt-Nielsens ihre beweisende Kraft für die Dualität beibehalten würden, muß ich über diesen Punkt etwas weiter ausholen. Erstens wird darauf hingewiesen, daß die gefundene Parallelität für Verdauung von Paracaseinkalk bei  $\pm 10^{-5}$  norm. H-Ion und Milchgerinnung nicht im geringsten der dualitischen Auffassung widerspricht. Ich bemerke dazu, daß ich dem nirgends widersprochen habe. Ich schrieb damals: «Es ist ohne weiteres klar, daß meine Resultate sich vollkommen vereinbaren lassen mit der unitarischen Auffassung, sie lassen aber den Befund Hammarstens über die Abschwächung des Chymosins durch Erwärmen mit Salzsäure völlig unberührt. So lange nicht gezeigt worden ist, daß in der mit Salzsäure digerierten Lösung die Fähigkeit, Milch zur Gerinnung zu bringen, nur verdeckt, nicht aber verschwunden ist, etwa in derselben Weise, wie das für Pepsin der Fall zu sein scheint bei Alkalisierung, hat man nicht das Recht, Pepsin und Chymosin als identisch zu betrachten.»

Ich habe nur daraus geschlossen, daß es nicht das beigemengte Pepsin oder ein besonderes Ferment war, das die Verdauung bewirkte, sondern dasselbe Enzym, das die Milch koagulierte.

Weiter findet Rakoczy die Beobachtung der relativ schnelleren Gerinnung durch erwärmte Infusionen bei niedrigen Temperaturen bestätigt<sup>1)</sup> und er liefert noch einige Zahlen diesen Punkt betreffend. Er sagt dann: «Diese Erscheinung beweist durchaus nicht die Identität des Pepsins und Chymosins, sie betont im Gegenteil noch einmal die verschiedenen Eigenschaften dieser Fermente. Das Pepsin unterscheidet sich unter anderem dadurch vom Chymosin, daß es bei verhältnismäßig geringfügigen Verdünnungen vom Zeitgesetz abweicht; es folgt aber, was schon vor 2 Jahren Gerber gezeigt hat und jetzt von van Dam bestätigt wird, diesem Gesetz in großer Annäherung, wenn man die Gerinnungsversuche bei einer Tem-

---

<sup>1)</sup> Daß von Gerber (C. R. de la Soc. Biol., Bd. 63, S. 575) diese Beobachtung schon 1907 gemacht wurde, war mir damals nicht bekannt; er gibt aber keine Erklärung für die Erscheinung.

peratur von weniger als 30° C. ausführt. Daher kann das Pepsin der Kalbsinfusion, in der es in geringer Menge enthalten zu sein pflegt, nach Zerstörung des Chymosins seine milchkoagulierende Wirkung besser bei 25° entfalten als bei 40°, und die milchkoagulierende Kraft der erwärmten Portionen wird verhältnismäßig erhöht.»

Ich habe mich über diesen Passus gewundert. Warum kann das Pepsin seine milchkoagulierende Wirkung besser bei 25° als bei 40° C. entfalten? Das kann, so weit mir bekannt, nur so erklärt werden, daß bei höherer Temperatur das Enzym vernichtet wird, daß also das Optimum eine anderes ist. Wenn man findet, daß eine Schweinsenzymlösung bei 40° C. gar keine, bei 25° eine ganz regelrechte Milchkoagulation (in 5 Min. z. B.) verursacht, so kann man doch nicht sagen: «das kommt daher, daß das Pepsin bei 25° C. besser wirkt als bei 40° C.» Und warum findet man bei Verwendung konzentrierter Enzymlösungen das Umgekehrte? Und wenn die Milch ein wenig angesäuert wird, warum findet man dann eine ebenfalls viel stärkere Wirkung bei höherer Temperatur? Diese Fragen finden ihre Antwort in der früher von mir gegebenen Erklärung, daß nämlich unter Umständen die Versuchsergebnisse völlig entstellt werden können infolge der Schädigung des Enzyms durch die Hydroxylionen der Milch, während des Gerinnungsversuchs. Nimmt man die Ursache weg, so findet man den Einfluß der Verdünnung und Temperatur vollkommen gleich für Schweins- und Kalbsenzym. So sind wahrscheinlich auch die Zahlen Rakoczys zu erklären, aus denen hervorgehen soll, daß die Temperaturerniedrigung stärker auf Chymosin als auf Pepsin wirkt (S. 459). So fand ich für Schweinsenzym und Kalbsmageninfusion folgendes. Für den Gerinnungsversuch wurden 10 ccm  $\frac{1}{10}$ -n-HCl zu 100 ccm Milch gegeben.

Schwein	{	40,5° C.	25,6"	Kalb	{	40° C.	30"
		26,1° C.	119,7"			25,7° C.	135"

Nach alledem muß ich also, bis auf weiteres, bleiben bei der vorher gegebenen Erklärung der besonderen Eigenschaften des Pepsins.



Als dritte Arbeit über die Pepsin-Chymosinfrage will ich derjenigen von van Hasselt<sup>1)</sup> Erwähnung tun. Dieser Forscher hat Enzymlösungen, die aus getrockneten Mägen erhalten wurden, in verschiedener Weise zu reinigen versucht, ohne die bekannten Unterschiede zwischen Kalbsenzym und demjenigen der erwachsenen Tiere beseitigen zu können. Aus diesen Gründen kommt auch van Hasselt zum Schluß, man habe zu unterscheiden zwischen dem koagulierenden und verdauenden Enzym. Am Schluß seiner Arbeit weist er aber darauf hin, daß es möglich ist, «daß das Enzym vielleicht nur äußerst kleine Mengen Substanz chemisch gebunden oder adsorbiert enthält, wodurch seine Proteolyse aufgehoben wird.»

Schließlich nenne ich noch die Schrift von Miss Porter,<sup>2)</sup> die mit Handelspräparaten von Lab und Pepsin arbeitete, in deren Lösungen hemmende Stoffe gefunden wurden, die durch Dialyse weggeschafft werden konnten, wie übrigens schon bekannt war.

Gelegentlich der Ausarbeitung einer besseren Methode zur Bestimmung der Stärke von Handelslab hatte ich von neuem der Pepsin-Chymosinfrage näher zu treten. Nach derselben Methode wie früher<sup>3)</sup> die Verdauung des Paracaseins durch verschiedene Labpräparate gemessen wurde, habe ich die verdauende Wirkung auf Casein von Schweins-, Rinds- und Kalbspepsin verglichen. Es wurden also Lösungen dieser Enzyme mit Casein sehr langsam geschüttelt und nach Filtrieren durch einen Gooch-Tiegel die verdaute Menge nach Kjeldahl bestimmt. Die Besonderheiten werden bei jedem Versuch angegeben.

### Versuch 1.

Labpulver Hansen wurde in HCl 0,18% gelöst und während 2 Tagen gegen wiederholt erneute Salzsäure dialysiert. Die klare Lösung wurde auf dieselbe Konzentration gebracht (nach der Milchkoagulation) als eine Lösung von Pepsin (Pekelharing) in Salzsäure von derselben Stärke. Gerinnung

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 70, S. 171.

<sup>2)</sup> The Journal of Physiology, Bd. 42 (1911), S. 359.

<sup>3)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 61, S. 147.

bei 25° C., 1 : 25 Milch in 60" (Schwein) und 61" (Kalb). In 2 Röhren wurde 0,8 g Paracaseinkalk mit soviel Milchsäure vermischt, daß die Wasserstoffionenkonzentration  $\pm 1 \times 10^{-5}$  norm. war. Zu 40 ccm der erhaltenen Suspension wurde 1 ccm der beiden Enzymlösungen zugegeben und bei 20° C. während  $\pm 22$  Stunden langsam rotiert. Gleichzeitig wurde ein Blankoversuch mit den erhitzten Enzymlösungen gemacht. Die verdaute Menge wurde im Filtrat nach Kjeldahl bestimmt. Ich drücke sie immer in ccm  $\frac{1}{10}$ -n-Säure aus. Die Verdauung nach Mett wurde in gewöhnlicher Weise bei Bruttemperatur ausgeführt.

	ccm $\frac{1}{10}$ -n-Säure	Blanko	Verdaut	Gerinnungszeit	Verdaut nach Mett
Kalb	16,7	1,6	15,1	61"	0,6 mm
Schwein	17,9	1,3	16,6	60"	5,5 "

### Versuch 2.

Dieselben Enzymlösungen. Statt Paracaseinkalk und Milchsäure wurde reines Casein (Merck) und Salzsäure verwendet. 1 g Casein wurde mit 40 ccm Säure vermischt. Nach Zugabe von 1 ccm der sauren Enzymlösung war der Säuregrad 0,005 norm. (Die Adsorption am Casein nicht mitgerechnet.)

	ccm $\frac{1}{10}$ -n-Säure	Gerinnungszeit	Verdaut nach Mett
Kalb	24,5 <sup>1)</sup>	61"	0,6 mm
Schwein	23,5	60"	5,5 "

### Versuch 3.

Labpulver Hansen wurde nach Rakoczy<sup>2)</sup> dialysiert zur Trennung der Chymosin- und Pepsinwirkung. Die Lösung des Niederschlags und das Filtrat wurden auf 0,18% HCl gebracht und die Gerinnungszeiten ungefähr gleich gemacht. Gerinnung bei 35° C. 1 : 25 Milch, Niederschlag 29,5", Filtrat

<sup>1)</sup> Hier wurden leider die Blankoversuche unterlassen. Aus Versuch 1 geht aber hervor, daß die beiden Lösungen praktisch keine Differenz aufweisen.

<sup>2)</sup> l. c.

32,5". 1 g Casein + 35 ccm  $\frac{1}{10}$  norm.  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  + 1 ccm Enzymlösung. Bei 20° C. während 40 Stunden rotiert. H-Ionen  $\pm 0,8 \times 10^{-5}$  norm.

	ccm $\frac{1}{10}$ -n-Säure	Blanko	Verdaut	Gerinnungszeit	Verdaut nach Mett (16 Stunden)
Niederschlag	21,6	1,9	19,7	29,5"	8,0 mm
Filtrat	19,85	1,8	18,05	32,5"	3,8 "

Nimmt man an, daß Gerinnung und Verdauung des Caseins parallel gehen, so hätte man nach der Schützschenschen Regel (die auch hier gilt, wie weiter unten dargetan wird)<sup>1)</sup> für die Niederschlagslösung 19,0 ccm finden müssen.

#### Versuch 4.

Wie bei 3, aber nur 22 Stunden bei 35° C. geschüttelt.

	ccm $\frac{1}{10}$ -n-Säure	Blanko	Verdaut		Gerinnungszeit
			gef.	ber.	
Niederschlag	24,1	1,55	22,55	21,6	29,5"
Filtrat	22,6	2,05	20,55	20,55	32,5"

#### Versuch 5.

Hier wurde eine von mir selbst nach Hammarsten bereitete Kalbsmageninfusion mit einer Lösung von Pepsin (Pekelharing) verglichen. Die Verdauung des Caseins fand in einem Gemisch von Salzsäure und Natriumacetat statt; H-Ionenkonzentration  $2,35 \times 10^{-4}$  norm. Der Gerinnungsversuch wurde bei 32° C. ausgeführt, der Verdauungsversuch in allen folgenden Fällen bei 30° C.

	ccm $\frac{1}{10}$ -n-Säure	Blanko	Verdaut		Gerinnungszeit	Verdaut nach Mett
			gef.	ber.		
Kalb	26,5	2,2	24,3	24,3	35"	2,9 mm
Schwein	30,7	2,3	28,4	26,3	30"	5,0 "

<sup>1)</sup> Ich habe früher (diese Zeitschrift, Bd. 61, S. 147) in dem Versuch mit 3 Labpräparaten die Verdauung der Enzymkonzentration proportional angenommen, so lange der Einfluß der Reaktionsprodukte als verschwindend klein betrachtet werden konnte. Weil aber die Enzymkonzentrationen damals keine bedeutenden Differenzen aufwiesen, werden durch diesen Umstand die Resultate nur wenig geändert.

## Versuch 6.

Wie bei 5, aber länger geschüttelt.

	ccm $\frac{1}{10}$ -n- Säure	Blanko	Verdaut		Gerinnungs- zeit	Verdaut nach Mett
			gef.	ber.		
Kalb	34,0	2,2	31,8	31,8	75"	2,9 mm
Schwein	40,2	2,3	37,9	31,8	75"	5,0 "

## Versuch 7.

Wie bei 6, aber andere Lösungen.

	ccm $\frac{1}{10}$ -n- Säure	Blanko	Verdaut		Gerinnungs- zeit	Verdaut nach Mett
			gef.	ber.		
Kalb	24,6	2,2	22,4	22,4	81"	3,0 mm
Schwein	27,8	2,2	25,6	23,4	74"	5,8 "

Aus diesen Versuchen geht also hervor, daß, mit Ausnahme von Versuch 6, die Verdauung des Caseins unter verschiedenen Umständen der Gerinnung fast vollkommen parallel geht, während die Verdauung nach Mett für dieselben Lösungen sehr große Differenzen aufweist. Die geringen Unterschiede für die berechneten und gefundenen Werte für die Caseinverdauung sind wohl dem Umstande zuzuschreiben, daß das Schweinsenzym beim Gerinnungsversuch nicht vollkommen intakt bleibt, während das in der mehr sauren Verdauungsflüssigkeit wohl der Fall ist. Das zeigte sich noch bei den hier folgenden Versuchen.

## Versuch 8.

Vergleich von Kalbsmageninfusion mit einer Lösung von Pepsin (Pekelharing). Der Gerinnungsversuch wurde bei 28° C. ausgeführt, 1 : 25 Milch.

	ccm $\frac{1}{10}$ -n- Säure	Blanko	Verdaut		Gerinnungs- zeit
			gef.	ber.	
Kalb	26,85	3,4	23,45	23,45	90"
Schwein	35,7	3,4	32,3	23,45	90"

Hier ist die Differenz der gefundenen mit der berechneten Verdauung sehr bedeutend. Ich hatte nichts anderes erwartet. Beim Verdünnen der Lösung zeigte es sich, daß das Verdünnungsgesetz nicht befolgt wurde; daß also das Enzym noch ein

wenig geschädigt wurde und beim Gerinnungsversuch weniger Enzym gefunden, als der wirklichen Stärke entsprach. Das erklärt die stärkere Verdauung.

#### Versuch 9.

Dieselben Lösungen wie bei 8. Gerinnung bei 24,5° C. ausgeführt und überdies 2 ccm  $\frac{1}{10}$ -n-HCl pro 100 Milch zugegeben. Die Gerinnungszeiten waren dann 59'' für beide. Für die nicht angesäuerte Milch bei 28° C. 89'' (Kalb) und 110'' (Schwein).

	ccm $\frac{1}{10}$ -n-Säure	Blanko	Verdaut		Gerinnungszeit
			gef.	ber.	
Kalb	29,8	3,4	26,4	26,4	59''
Schwein	35,0	3,4	31,6	26,4	59''

Die Differenz des gefundenen und berechneten Wertes ist schon bedeutend kleiner in diesem Versuch; eine teilweise Vernichtung des Pepsins ist aber noch unverkennbar.

#### Versuch 10.

Hier wurden 6 ccm  $\frac{1}{10}$ -n-HCl zu 100 Milch gegeben für den Gerinnungsversuch. Übrigens wie bei Versuch 9.

	ccm $\frac{1}{10}$ -n-Säure	Blanko	Verdaut		Gerinnungszeit
			gef.	ber.	
Kalb	29,9	3,4	26,6	26,6	58''
Schwein	32,3	3,4	28,9	26,6	58''

Obgleich der Unterschied noch nicht ganz aufgehoben ist, sieht man doch, daß man schließlich völlige Parallelität erreicht, wenn nur dafür Sorge getragen wird, daß der Gerinnungsversuch den wirklichen Enzymgehalt liefert.

#### Versuch 11.

Sieben Kalbsmägen wurden am selben Tage, 3—4 Stunden nach dem Schlachten, nach Hammarsten mit Salzsäure digeriert bei niedriger Temperatur und die filtrierten Lösungen für Verdauungsversuche mit Casein verwendet. Gleichzeitig wurden zwei Parallelversuche mit Labpulver Hansen ausgeführt. Die Lösungen wurden ungefähr gleich stark gemacht (nach Koagulation gemessen) und dann in gewöhnlicher Weise so viel zu 100 ccm Acetatgemisch zugegeben, daß in den

Kölbchen genau die gleiche Enzymmenge sich befand. Nachdem während 24 Stunden bei 30° vorsichtig geschüttelt war, wurde in den Filtraten die verdaute Menge bestimmt.

	ccm $\frac{1}{10}$ -n-Säure	Blanko	Verdaut
Lab <sub>1</sub>	25,2	3,9(?)	21,3(?)
Lab <sub>2</sub>	25,55	3,4	22,15
1	25,5	3,3	22,3
2	26,0	3,3	22,7
3	25,5	3,5	22,0
4	26,0	3,4	22,6
5	25,85	3,4	22,45
6	25,8	3,3	22,5
7	24,85	3,4	21,45

### Versuch 12.

Vergleich einer Kalbsmageninfusion und Rindsmagenextrakt.

Für den Gerinnungsversuch 10 ccm  $\frac{1}{10}$ -n-HCl zu 100 Milch gegeben. Bei 26° C., 1 : 25 Milch, Kalb 29,0", Rind 34,3". Mit derselben Milch, ohne HCl, bei 38° C., Kalb 39", Rind 99". Für den Verdauungsversuch wurden gleiche Enzymmengen zu 100 ccm Acetatgemisch gegeben.  $C_H = 2,4 \times 10^{-5}$  norm.

	Gerinnungszeit	ccm Infusion zu 100 ccm	ccm $\frac{1}{10}$ -n-Säure	Blanko	Verdaut	Verdaut nach Mett (12 Stunden)
Kalb	29"	0,84	22,7	3,4	19,3	1,7 mm
Rind	34,3"	1,0	24,7	3,4	21,3	4,8 "

Auch hier findet man also nahezu Parallelität.

Wie schon oben bemerkt wurde, findet man für die Caseinverdauung wie für die von Hühnereiweiß, daß die verdaute Menge der Wurzel aus der Enzymkonzentration proportional ist, wie aus folgenden Zahlen ersichtlich ist.

### Versuch 13.

Enzymkonzentration C	$\sqrt{C}$	ccm $\frac{1}{10}$ -n-Säure	Blanko	Verdaut gef.	Verdaut ber.
1,0	1,0	39,0	6,0	33,0	33,0
0,75	0,87	34,25	6,0	28,25	28,7
0,5	0,71	28,0	6,0	22,0	23,4
0,25	0,5	20,5	6,0	14,5	14,5

## Versuch 14.

Enzym- konzentration C	$\sqrt{C}$	ccm $\frac{1}{10}$ -n- Säure	Blanko	Verdaut	
				gef.	ber.
1,0	1,0	27,1	3,4	23,7	23,7
0,75	0,87	24,0	3,4	20,6	20,6
0,5	0,71	19,7	3,4	16,3	16,8
0,25	0,5	14,3	3,4	10,9	11,8

Aus den oben beschriebenen Versuchen kann also der Schluß gezogen werden, daß unter sehr verschiedenen Umständen in schwach saurer Lösung die Verdauung des Caseins durch Infusionen auf Kalbs-, Rinds- und Schweinsmägen fast vollkommen parallel geht mit der Gerinnungsgeschwindigkeit, während die Verdauung von Hühnereiweiß in 0,2% HCl diese Parallelität bekanntlich gar nicht zeigt.

Diese Versuche, die also als eine Erweiterung meiner früheren Ausführungen zu betrachten sind, bilden, wie ich glaube, ein sehr starkes Argument für die Einenzymauffassung. Bei der Berücksichtigung meiner Befunde, daß die Verdauung des Paracaseins und die Milchgerinnung parallel gehen für verschiedene Labpräparate, schreibt Rakoczy:<sup>1)</sup> «Diese Tatsache, die unsere Kenntnis der Eigenschaften des Chymosins erweitert, widerspricht nicht im geringsten der dualistischen Anschauung; wenn das Chymosin imstande ist, spezifisch auf das Casein einzuwirken und es zur Gerinnung zu bringen, so ist es nicht unmöglich, daß diese spezifische Wirkung nicht auf das Stadium der Paracaseinbildung beschränkt bleibt, sondern weitergeht.»

Eine solche Anschauung konnte auch für die oben angeführten Versuche mit Enzymlösungen von verschiedenen Tieren geltend gemacht werden. Man könnte nämlich die gefundene Parallelität so erklären, daß es sich bei der Verdauung des Caseins nur um die Wirkung des Chymosins handelt. Dann wäre es selbstverständlich, daß Verdauung und Gerinnungsgeschwindigkeit parallel gehen. Um diesen Einwand von seiten der Dualisten zu widerlegen, hatte ich also nachzuweisen, daß

<sup>1)</sup> l. c. S. 458.

sich eine Enzymlösung, die keine Milchkoagulation hervorruft, nach Ansicht der Dualisten also chymosinfrei ist, noch deutlich Casein zu verdauen imstande ist. Schon in meiner letzten Arbeit über diesen Gegenstand wurde dies deutlich dargetan.<sup>1)</sup> So fand ich (S. 318) beim Vergleich der verdauenden Wirkung einer Schweinspepsinlösung, die kräftig koagulierend wirkte auf Milch, mit derselben Lösung, die aber vorher so lange erwärmt war, daß in 6<sup>1</sup>/<sub>2</sub> Stunden keine Gerinnung eintrat (bei 37° C.), nach Ansicht der Dualisten also praktisch chymosinfrei war, folgendes:

	$C_H \times 10^{-5}$	<sup>1</sup> / <sub>10</sub> -n-Säure	Blanko	Verdaut
Urspr. Lösung	0,58	34,5	2,3	32,2
Erw. »	0,58	12,6	2,3	10,3

Die chymosinfreie Lösung hatte also ein Drittel der von der nicht erwärmten Lösung verdauten Menge in Lösung gebracht.

Ich habe den Versuch wiederholt und gleichzeitig die Kalbsmageninfusion darin bezogen. Diese letztere wurde auf dieselbe Stärke gebracht (nach Koagulation von mit 10 ccm <sup>1</sup>/<sub>10</sub>-n-HCl pro 100 Milch angesäuerter Milch bei 26° C., 0,5 : 25 Milch) als eine Schweinspepsinlösung. Ein Teil der letzteren wurde dann so lange digeriert, daß bei 39° C. keine Gerinnung der nicht angesäuerten Milch eintrat. Dann wurde von diesen drei Enzymlösungen 1 ccm zu 100 ccm Caseinsuspension in Acetatgemisch ( $C_H = 2,38 \times 10^{-5}$  norm.) zugegeben und während + 20 Stunden bei 30° C. rotiert.

#### Versuch 15.

	Gerinnungs- zeit	ccm Enzymlösung pro 100 ccm	ccm <sup>1</sup> / <sub>10</sub> -n- Säure	Blanko	Ver- daut
Kalb	66,5	0,88	25,0	3,5	21,5
Schwein	75,7	1,0	26,5	3,5	23,0
Erw. Schw.	∞	1,0	12,0	3,5	8,5

#### Versuch 16.

Wie 15, andere erwärmte Lösung. Auch wurde die Verdauung nach Mett bestimmt.

<sup>1)</sup> Diese Zeitschr., Bd. 64, S. 316.



	Gerinnungszeit	ccm Enzymlösung pro 100 ccm	ccm $\frac{1}{10}$ -n-Säure	Blanko	Verdaut	Verdaut nach Mett
Kalb	29"	1,0	25,8	3,5	22,3	1,7mm
Schwein	28"	0,965	26,1	3,5	22,6	4,9 »
Erw. Schw.	$\infty$	0,965	15,0	3,5	11,5	3,7 »

Man sieht also, daß die nicht gerinnend wirkende Lösung noch sehr kräftig Casein verdaut und die Ansicht der Dualisten, man habe bei diesen Versuchen mit einer für das Chymosin spezifischen Wirkung auf Casein zu tun, wird also hinfällig. Chymosin und Pepsin wirken sowohl auf Milch als auf Casein in schwach saurer Lösung vollkommen gleich, wenn nur dafür gesorgt wird, daß während des Gerinnungsversuchs keine Schädigung des Enzyms stattfinden kann.

Von Hammarsten wurde bei der Diskussion der Identitätsfrage wiederholt in den Vordergrund geschoben, daß es für das Chymosin charakteristisch ist, daß es bei neutraler Reaktion wirkt, während das Pepsin nur in saurer Lösung arbeiten würde. Auch in seiner letzten Arbeit weist Hammarsten wieder darauf hin, bei der Berücksichtigung der Versuche von Sawitsch und Migay,<sup>1)</sup> die Proportionalität für Pepsin- und Chymosinwirkung herstellen konnten durch Hinzugeben von  $\text{CaCl}_2$  zur Milch. Hammarsten schreibt dies dem Umstande zu, daß durch  $\text{CaCl}_2$  die H-Ionenkonzentration steigt, durch die das Pepsin zur Wirkung kommt. Hammarsten übersieht hier aber, daß durch die Vermehrung der Wasserstoffionen nicht das Pepsin zu wirken anfängt, sondern besser wirken kann, weil es nicht oder weniger von den Hydroxylionen geschädigt wird. Daß die Ansicht Hammarstens, das Pepsin wirke nur in angesäuerter Milch gerinnend und nicht in neutraler, nicht wahrscheinlich ist, habe ich früher gezeigt.<sup>2)</sup> Eine Schweinspepsinlösung, deren koagulierende Wirkung durch Erwärmen so weit abgeschwächt war, daß in  $6\frac{1}{2}$  Stunden bei

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 63.

<sup>2)</sup> l. c. Diese Zeitschrift, Bd. 64, S. 316.

37° C. keine Gerinnung eintrat (1 : 20 Milch), gerann bei 30° C. in 8 Minuten ganz regelrecht. Man könnte hier noch einwenden, daß beim Hinzugeben von 1 ccm saurer (0,2%) Infusion zu 20 ccm Milch doch ein saures Medium entsteht. Bei 37° C. war das aber auch der Fall und wirkte das Enzym gar nicht gerinnend. Die Änderung der H-Ionenkonzentration ist aber durch eine solche geringe Säuremenge so unbedeutend, daß sie z. B. mit empfindlichem Lackmuspapier gar nicht zu beobachten ist, wie aus folgendem Versuch noch näher hervorgeht.

Die erwärmte Schweinspepsinlösung von Versuch 16, die also in der Stärke 1 : 25 Milch bei 39° C. keine Gerinnung verursachte, koagulierte bei 26° C. die Milch in 5½ Minuten. Die H-Ionenkonzentration dieser Milch und der mit 1 ccm 0,2%iger HCl angesäuerten wurde bestimmt durch Gaskettenmessung gegen 0,1 n-Calomelektrode.

	E.	C <sub>H</sub> .
Ohne HCl	0,725 V.	$0,187 \times 10^{-6}$
Mit HCl	0,719 V.	$0,243 \times 10^{-6}$ .

Es leuchtet ein, daß man hier nicht sagen kann, daß im einen Fall in neutraler, im anderen Fall in saurer Lösung gearbeitet wurde, und ich schließe aus diesen Versuchen, daß es keine Veranlassung gibt, um mit Hammarsten zu unterscheiden zwischen Pepsingerinnung einer- und Chymosingerinnung andererseits, eine Unterscheidung, zu der Hammarsten genötigt war, als ihm die Wirkung der Hydroxylionen der Milch auf nicht geschütztes Ferment unbekannt war. Gegen meine Versuche kann also, wie ich glaube, nicht eingewendet werden, daß die Parallelität bei saurer Reaktion studiert wurde, und deshalb nicht viel beweisen würde für die Identität. Ich habe nämlich öfters (Versuch 1—8) mit frischer, nicht angesäuertem Milch gearbeitet; der einzige Unterschied mit Hammarstens Arbeitsweise bestand darin, daß ich die Gerinnungsversuche unterhalb 30° C. ausführte.

Auch der Ansicht Hammarstens, man habe nicht das Hauptgewicht auf die wiederholt beobachtete Parallelität der zwei Enzymwirkungen zu legen, kann ich nicht beistimmen. Es ist natürlich sehr wünschenswert, daß die Fälle, in welchen

diese nicht gefunden wird, aufgeklärt werden, es muß doch aber logisch erscheinen, daß die Beobachtung der Parallelität unter verschiedenen Umständen als ein stärkeres Argument zugunsten, als das Nichtfinden einer solchen in ein paar Fällen als Beweis gegen die Identität gelten kann. Hätte man es mit übrigens zwei identischen Systemen zu tun, so könnte man bei Identität der Enzyme unter allen Umständen die gleiche Wirkung erwarten. Wenn aber keine identischen Systeme vorliegen, so kann doch eine Abweichung der Parallelität unter bestimmten Umständen nicht aufwiegen gegen das wiederholte Finden einer solchen bei sehr verschiedenen Versuchsanordnungen.

Eine solche Abweichung findet man nun beim Vergleich der Gerinnung und Verdauung nach Mett in HCl 0,2% für das Kalbsenzym einer- und die Enzyme vom Rind, Schwein, Hund und anderen erwachsenen Tieren andererseits. Diese unerklärte Tatsache bildet augenblicklich das Hauptargument zur Annahme zweier verschiedenen Enzyme in den Infusionen auf Tiermägen, namentlich in dem vom Kalb. Nachdem ich gefunden hatte, daß dieser Mangel an Parallelität nicht besteht bei Verwendung von Casein statt Hühnereiweiß, und in schwach saurer Lösung, war es interessant zu untersuchen, ob die Verdauung des Caseins in einem Medium, das reicher an H-Ionen ist, ebenfalls mit der Gerinnungsgeschwindigkeit parallel geht. Leider kann man nicht in 0,2% iger HCl arbeiten, weil das Casein sich darin reichlich als Chlorid löst. In 0,3-n-Salzsäure ist es aber praktisch unlöslich; ich habe somit bei dieser Konzentration einige Versuche ausgeführt.

### Versuch 17.

Die beiden Enzymlösungen von Versuch 1, Gerinnung in 60" und 61", wurden bei 20° C. rotiert während etwa 20 Stunden in 0,3 norm. Lösung.

	ccm $\frac{1}{10}$ -n-Säure	Blanko	Verdaut	Verdaut nach Mett
Kalb	6,9	3,0	3,9	0,6 mm
Schwein	29,7	3,0	26,7	5,5 "

## Versuch 18.

Dieselben Lösungen wie im vorigen Versuch.

	ccm $\frac{1}{10}$ -n-Säure	Blanko	Verdaut
Kalb	6,8	3,0	3,8
Schwein	32,0	3,0	29,0

## Versuch 19.

Mit den Enzymlösungen von Versuch 4, die durch Dialyse von Hansen-Labpulver nach Rakoczy erhalten waren, wurde auch in 0,3-n-HCl ein Verdauungsversuch mit Casein gemacht. Zum Vergleich gebe ich gleichzeitig die vorher mitgeteilten Zahlen, die bei der Verdauung in  $\frac{1}{3}$ -n- $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  gefunden wurden, noch einmal wieder. Die salzsaure Lösung wurde 42, die Phosphatlösung nur 22 Stunden geschüttelt.

	ccm $\frac{1}{10}$ -n-Säure	Blanko	Verdaut	Verdaut in der Phosphatlösung	Verdaut nach Mett
Niederschlag	13,5	5,1	8,4	22,55	8,0 mm
Filtrat	7,85	5,1	2,75	20,55	3,8 »

## Versuch 20.

Hier wurde die verdauende Wirkung einer Kalbsmageninfusion und einer Pepsinlösung verglichen in 0,3-n-HCl, aber gleichzeitig in derselben, aber vorher durch Natriumacetat abgestumpfter HCl-Lösung ( $C_H = 0,00235$  norm.).

	HCl			Acetat			Gerinnungszeit	Verdaut nach Mett
	ccm $\frac{1}{10}$ -n-Säure	Blanko	Verdaut	ccm $\frac{1}{10}$ -n-Säure	Blanko	Verdaut		
Kalb	10,4	3,2	7,2	24,5	2,2	22,4	81"	3,0mm
Schwein	38,2	3,2	35,0	27,8	2,2	25,5	74"	5,8 »

Es geht also aus diesen Versuchen hervor, daß auch für die Caseinverdauung die Proportionalität für Verdauung und Milchgerinnung nicht besteht, wenn der Versuch in einem stark sauren Medium ausgeführt wird, und überdies zeigt sich, daß das Kalbsenzym in der sehr sauren Lösung weit weniger Casein zu verdauen vermag in derselben Zeit als in der weniger sauren Flüssigkeit. Für das Schweinepräparat findet man eben das

Umgekehrte. Führt man, zur Vermeidung der Differenz der beiden Flüssigkeiten (Versuch 20) in bezug auf das Natriumacetat, den Versuch in 0,3 und 0,001-n-Salzsäure aus, so findet man dasselbe. Hier sind die Verhältnisse also denjenigen bei der Verdauung nach Mett ziemlich ähnlich und man kann also sagen, daß die Ursache dieser Erscheinung nicht in der Verschiedenheit der verwendeten Eiweißarten liegt, sondern in dem Unterschied der Wasserstoffionenkonzentration. Die Dualisten werden darin den Beweis sehen für die Existenz zweier Enzyme. Schon oben habe ich darauf hingewiesen, daß man sich mit gleicher Berechtigung vorstellen kann, daß in den Mägen von jungen Tieren mit dem Enzym regelmäßig Spuren von Stoffen abgeschieden werden, die das Enzym schützen sollen gegen den Einfluß der Hydroxylionen beim Milchgenuß und die hemmend wirken auf die Verdauung in stark saurer Lösung, etwa durch Kondensation von Enzymmolekülen, oder durch Beeinflussung von Dissoziationszuständen, oder elektrischen Ladungen, oder in einigerlei anderer Weise. Beim Älterwerden der Tiere, wenn sie nicht mehr mit Milch gefüttert werden, werden diese Stoffe in geringerer Menge ausgeschieden. Eine solche Vorstellung scheint mir wahrscheinlicher als die Annahme, daß die älteren Tiere ein anders konstituiertes Enzym absondern. Wie dem auch sei, ich glaube aus dem oben Mitgeteilten schließen zu dürfen, daß in bezug auf das Verhalten gegen Casein bei schwach saurer Reaktion und gegen Milch (was die Gerinnungsgeschwindigkeit betrifft) zwischen Chymosin und Pepsin nicht unterschieden werden kann.

Um der Frage über die Dualität oder Verunreinigungen noch etwas näher zu treten, sagte ich mir: wenn man in den Mageninfusionen zwei Enzyme annimmt, so ist es denkbar, daß die Verdauungsprodukte der einen Fermentwirkung nicht identisch sind mit denjenigen der andern. Es wäre also möglich, daß die Verdauungsprodukte, die bei niedriger H-Ionenkonzentration durch die Wirkung von Schweins- und Kalbsmageninfusion auf Casein erhalten werden, nicht identisch sind mit den in stark saurer Lösung gebildeten Abbauprodukten. Wenn dem so wäre, so hätte man einen ziemlich sicheren Beweis

für die Dualität. Um dies zu prüfen, wurde von folgendem Gedankengang ausgegangen. Die bei der Verdauung auftretenden Abbauprodukte wirken bekanntlich der Enzymwirkung entgegen. Nachdem das Maß dieser Gegenwirkung festgestellt wurde, konnte leicht geprüft werden, ob die Spaltungsprodukte der «stark sauren Verdauung» die Enzymwirkung in schwach saurer Lösung in gleicher Weise hemmen als die Abbauprodukte dieser letzten Wirkung selbst. Bei identischen Spaltungsprodukten könnte man natürlich *cet. par.* die gleiche Wirkung erwarten.

Zuerst wurden die Konzentrationen der Abbauprodukte gesucht, die eine sehr deutliche Hemmung der Enzymwirkung verursachten. 6 g Casein wurden mit 140 ccm HCl (10 ccm = 29,6  $\frac{1}{10}$ -n.), 16 ccm Natriumacetatlösung (5 ccm = 1,308 g) und 8 ccm Enzymlösung vermischt und bei 30° langsam geschüttelt. Nach bestimmten Zeiten wurde ein Teil des Gemisches durch einen Gooch-Tiegel filtriert und die verdaute Menge nach Kjeldahl bestimmt.

#### Versuch 21.

Nach Stunden	ccm $\frac{1}{10}$ -n	Blanko	Verdaut
7	21,75	1,6	20,15
19	38,4	1,6	36,8
43	47,75	—	$\pm$ 45,75
65 $\frac{1}{2}$	51,75	2,2	49,55
89 $\frac{1}{2}$	52,75	2,7	50,05

Man sieht hier deutlich die schnelle Abnahme der Enzymwirkung. Es war möglich, daß es sich hier aber mehr um Abschwächung des Enzyms als um den Einfluß der Reaktionsprodukte handelte. Darum wurde zu  $\pm$  20 ccm des Gemisches, das 65 $\frac{1}{2}$  Stunden geschüttelt war, noch 1 ccm der Enzymlösung zugegeben. 20 Stunden später fand ich dann 56,0 ccm. Die Hemmung war also hauptsächlich auf Rechnung der Abbauprodukte zu stellen.

In einem neuen Versuche wurde in folgender Weise verfahren, zuerst mit Schweinsenzym und nachher<sup>1)</sup> mit Kalbs-

<sup>1)</sup> Die beiden Versuche sind also nicht miteinander vergleichbar. Die unten aufgezeichneten Zahlen beziehen sich für die beiden Enzyme auf nicht genau identische Lösungen und auf verschiedene Quantitäten des Filtrats.

mageninfusionen. In zwei Kölbchen wurden wieder 6 g Casein mit Salzsäure 0,3 norm. gemischt und dem einen Gemisch sogleich die Enzymlösung zugegeben. Nachdem beide Kölbchen 24 Stunden geschüttelt waren, wurden beide Lösungen mit Natriumacetat vermischt und in das zweite Kölbchen dieselbe Enzymmenge gebracht. Dann wurde ein Teil des Gemisches des ersten Kölbchens sogleich filtriert und die Verdauung, die also in stark saurer Lösung stattgefunden hatte, bestimmt nach Kjeldahl. Gleichzeitig wurde die Drehung der Polarisations-ebene im Laurentschen Apparat bestimmt. Nach bestimmten Zeiten wurde der Gang der Verdauung in den beiden Kölbchen kontrolliert. Als Versuch 22 und 23 gebe ich die Zahlen, die mit Schweins- und Kalbsenzym erhalten wurden.

## Versuch 22.

Schweinsenzym.

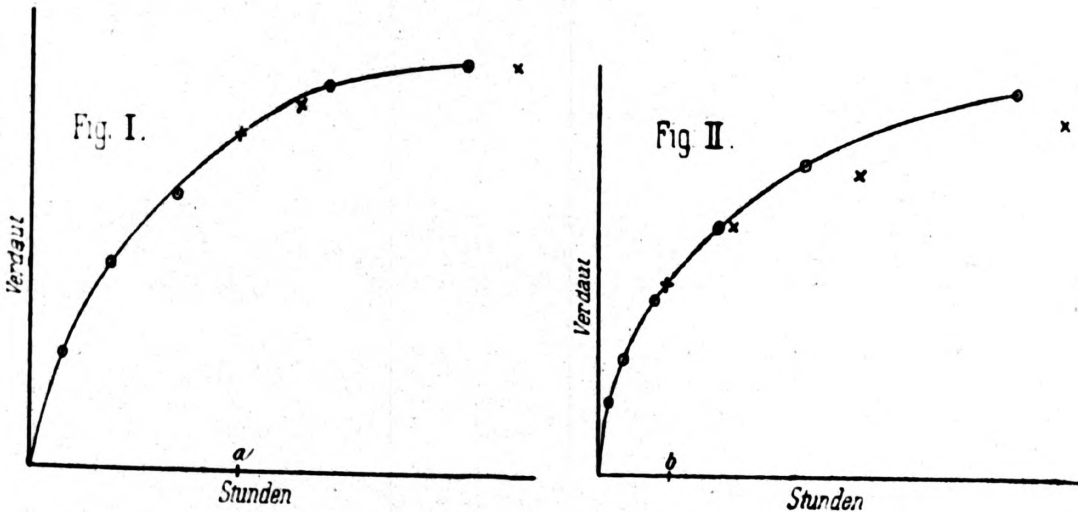
Verdauung ganz in Acetatlösung				Verdauung zum Teil in HCl-Lösung			
Nach Stunden	Verdaut	Pol. gef.	Pol. ber.	Nach Stunden	Verdaut	Pol. gef.	Pol. ber.
2 Std. 25 Min.	11,3	55'	56'	0	32,7	2° 38'	2° 42'
6 » 35 »	20,0	1° 42'	1° 39'	5	35,8	2° 55'	2° 57'
11 » 25 »	26,8	2° 14'	2° 13'	17	40,0	3° 15'	3° 18'
23 » 30 »	37,7	3° 9'	3° 7'				
34 » 30 »	40,0	3° 18'	3° 18'				

## Versuch 23.

Kalbsenzym.

Verdauung ganz in Acetatlösung				Verdauung zum Teil in HCl-Lösung			
Nach Stunden	Verdaut	Pol. gef.	Pol. ber.	Nach Stunden	Verdaut	Pol. gef.	Pol. ber.
1 Std.	7,0	0° 50'	52'	0	17,0	2° 10'	2° 7'
2 » 45 Min.	11,3	1° 22'	1° 24'	2 Std. 35 Min.	19,6	2° 33'	2° 26'
7 » 35 »	18,8	2° 27'	2° 20'	9 » 12 »	24,1	3° 4'	2° 59'
13 » 45 »	24,3	3° 7'	3° 0'	24 »	29,5	3° 45'	3° 39'
23 » 40 »	30,2	3° 45'	3° 44'	48 »	34,9	4° 24'	4° 19'
48 »	37,7	4° 40'	4° 40'				

Die berechneten Zahlen für die Polarisation wurden erhalten aus den Verdauungszahlen unter Annahme von Proportionalität der beiden Größen. Die fettgedruckten Ziffern dienten dabei als Grundzahlen.



In den Figuren I und II sind für die ganze Verdauung in Acetalösung die Stunden als Abszisse, die verdauten Mengen als Ordinate aufgezeichnet. Man sieht also, daß sich hier wieder die typischen Kurven für die Enzymwirkung ergeben, die sich nach der Abszisse krümmen. In diesen Kurven wurden dann die Punkte aufgesucht, die der Verdauung nach 0 Stunden (in stark saurer Lösung also) entsprechen, also 32,7 für das Schweinsenzym und 17,0 für das Kalbsenzym. Die weiteren Stunden, während welcher die Verdauung also in schwach saurer Lösung stattgefunden hat, wurden dann von der mit diesen Punkten korrespondierenden Stellen *a* und *b* auf der Abszisse abgerechnet. Die durch ein Kreuzchen angegebenen Stellen geben dann die im ganzen verdauten Mengen an.

Wie ersichtlich, kann für das Schweinsenzym angenommen werden, daß die Abbauprodukte der «stark sauren Verdauung» die Reaktion bei geringer H-Ionenkonzentration in ganz derselben Weise hemmen, wie die Spaltungsprodukte von dieser letzten Verdauung selbst; die Kreuzchen liegen nämlich innerhalb der Versuchsfehler in den Kurven. Betrachtet man weiter die Zahlen, die für die optische Drehung der Verdauungsprodukte erhalten wurden, so sieht man, daß diese ganz unab-



hängig davon sind, ob die Verdauung in stark oder schwach saurer Lösung stattfand.

Beim Kalbsenzym liegen die Kreuzchen ein wenig unterhalb der Kurve und zwar mehr, als dem Versuchsfehler entsprechen dürfte. Die Ursache dieser Erscheinung könnte nun diese sein, daß in der sehr sauren Lösung andere Abbauprodukte entstehen, die die Verdauung in der Acetatlösung stärker hemmen. Dies wird aber sehr unwahrscheinlich dadurch, daß die optische Drehung für Lösungen mit demselben N-Gehalt ganz dieselbe ist, unabhängig von dem Medium, in welchem die Verdauung vor sich geht. Viel wahrscheinlicher schien mir, daß das Kalbsenzym in der 0,3 norm. HCl-Lösung bei 30° C. nicht vollkommen intakt geblieben war. Wenn dem so wäre, so würde die Enzymmenge ein wenig geringer sein und dadurch die scheinbar stärker hemmende Wirkung der Abbauprodukte erklärt sein. Weil die Wirkung der Salzsäure auf das Enzym stärker ist, je nachdem die Konzentration des letzteren kleiner ist, habe ich den Versuch wiederholt bei geringeren Enzymkonzentrationen.

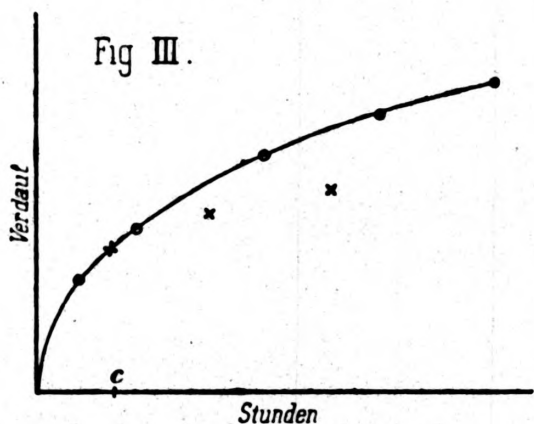
#### Versuch 24.

Der Versuch wurde in ganz derselben Weise ausgeführt. Die Enzymmenge war etwa 2<sup>1</sup>/<sub>2</sub> mal kleiner. Demzufolge mußte auch in der HCl-Lösung länger geschüttelt werden, und zwar 48 Stunden. Auch wurde eine andere Acetatlösung verwendet, die aber nur ganz wenig verschieden von der anderen war.

Verdauung ganz in Acetatlösung				Verdauung zum Teil in HCl-Lösung			
Nach Stunden	Verdaut	Pol. gef.	Pol. ber.	Nach Stunden	Verdaut	Pol. gef.	Pol. ber.
4 Std. 40 Min.	10,8	—	—	0	13,9	1° 49'	1° 46'
10 » 40 »	15,8	2° 4'	2° 1'	10 Std. 25 Min.	17,2	2° 16'	2° 11'
24 »	23,0	2° 58'	2° 56'	23 » 20 »	19,6	2° 36'	2° 30'
34 » 25 »	26,6	3° 23'	3° 23'	71 » 20 »	26,0	3° 21'	3° 19'
48 »	30,1	3° 50'	3° 50'				

Diese Zahlen, die in Fig. III graphisch dargestellt sind, bestätigen also die ausgesprochene Vermutung. Die Abweichungen

sind hier bedeutend größer und finden sehr wahrscheinlich in der Schädigung des Enzyms in der 0,3-n-HCl ihre Erklärung. Die optische Drehung geht nämlich auch hier mit dem Stickstoffgehalt parallel.



Auf Grund dieser Versuche glaube ich, daß die Annahme nicht zu gewagt ist, daß bei der Verdauung von Casein durch Schweinsenzym und Kalbsenzym in schwach und stark saurer Lösung vollkommen identische Abbauprodukte entstehen.

Man hätte dies dann so zu deuten, daß ein und dieselbe chemische Reaktion zwischen dem Casein und der Säure durch beide Enzyme katalytisch beschleunigt wird. In der stark sauren Lösung zeigt sich nur ein Unterschied in dem Maße dieser Beschleunigung durch Kalbsenzym einerseits und Schweinsenzym andererseits; in schwach saurer Lösung zeigte sich dieser Unterschied nicht.

Hätte man bei diesen Versuchen verschiedene Abbauprodukte gefunden beim Gebrauch der beiden Enzyme, so wäre dies ein ziemlich sicherer Beweis für die Dualität gewesen, wie schon oben betont wurde. Daß die Spaltungsprodukte identisch sind, ist umgekehrt noch kein Beweis für die Identität der Enzyme. So wird z. B. das Wasserstoffsperoxyd von sehr verschiedenen Enzymen zerlegt in Wasser und Sauerstoff. Man muß dabei aber bedenken, daß sich ein so kompliziertes Molekül wie das Caseinmolekül in sehr verschiedener Weise zerlegen kann, während das in dem erwähnten Beispiel des Wasserstoffsperoxyds nicht der Fall ist. So betrachtet, scheinen mir auch diese Resultate ein Argument zu bilden für die Identität von Chymosin und Pepsin.

Wenn ich nun schließlich das Für und Gegen in dieser Frage in die Wagschale stelle, so scheint mir auch auf Grund

Wenn ich nun schließlich das Für und Gegen in dieser Frage in die Wagschale stelle, so scheint mir auch auf Grund

der oben gefundenen Parallelität der Milchgerinnung und Caseinverdauung die Vorstellung der Identität noch immer die am meisten wahrscheinliche.

### Zusammenfassung.

Es wurden einige neulich erschienene Arbeiten über die Pepsin-Chymosinfrage besprochen. Es konnte gezeigt werden, daß die Verdauung von Casein durch das Magenenzym von Schwein, Kalb und Rind in Lösungen von Salzsäure, Natriumhydrophosphat, Gemischen von Salzsäure und auch Essigsäure mit Natriumacetat, kurz in Lösungen von solcher H-Ionenkonzentration, daß noch kein Casein darin löslich ist, der Gerinnungsgeschwindigkeit parallel geht. Läßt man die Verdauung des Caseins in 0,3 normaler HCl-Lösung vor sich gehen, so findet man die gleichen Unterschiede für Verdauung und Gerinnung wie bei dem Mettschen Versuch. Es wurde darauf hingewiesen, daß zur Erklärung dieser Erscheinung keineswegs ein anderes Enzym angenommen zu werden braucht in der Kalbsmageninfusion, und zwar auf Grund der Verschiedenheit der Systeme, die man vergleicht, welche bei identischen Enzymen nicht identisch sind. Die Unwahrscheinlichkeit dafür, daß man es mit zwei verschiedenen Enzymen zu tun hat, geht noch daraus hervor, daß die Verdauungsprodukte der Verdauung in stark saurer und in schwach saurer Lösung vollkommen identisch zu sein scheinen.

Reichslandw. Versuchsstation, Hoorn.

---