

Bemerkungen zu den Arbeiten A. Rakoczys über die Pepsin-Chymosinfrage.

Von
W. van Dam.

(Der Redaktion zugegangen am 23. Mai 1913.)

In einer neulich erschienenen Arbeit ¹⁾ wurden von Rakoczy meine in einer vorhergehenden Mitteilung ²⁾ veröffentlichten Befunde und Schlußfolgerungen einer Kritik unterzogen. Obschon ich im allgemeinen nicht zu einer Polemik geneigt bin, wenn diese nicht von neuen experimentellen Befunden gestützt werden kann, so muß ich für diesmal eine Ausnahme machen, weil es mir in den nächsten Jahren wahrscheinlich nicht möglich sein wird, weitere Experimente auf diesem Gebiete auszuführen.

In meiner letzten, obengenannten Arbeit habe ich gezeigt, daß für Infusionen vom Magen des Kalbes, Schweines und Rindes ein fast vollkommener Parallelismus gefunden wird bei der Verdauung von Casein (bei solchen H-Ionenkonzentrationen, daß noch kein Casein gelöst wird) einerseits und für die Milchkoagulation anderseits. Weiter konnte festgestellt werden, daß bei der Acidität 0,3 normal, etwa dieselben Unterschiede bei der Caseinverdauung gefunden werden als bei der Verdauung von Hühnereiweiß nach Mett in HCl 0,2%. Der Unterschied bezieht sich aber nur auf die Geschwindigkeit der Verdauung; die Verdauungsprodukte scheinen in ihrer qualitativen, sowie quantitativen Zusammensetzung unabhängig zu sein von der Acidität des Mediums, was mir ein Argument für die Identität der Wirkung beider Enzymlösungen zu sein scheint.

In seiner jüngsten Arbeit bestreitet Rakoczy meine Schlußfolgerungen; nachdem er auf die Resultate hingewiesen hat, die ich in 0,3 normaler Salzsäure bei der Caseinverdauung erhielt, schreibt er: «Ein vollkommener Parallelismus zwischen der milchkoagulierenden und caseinverdauenden Wirkung gelangt aber sogar bei niedriger Acidität nicht zur Beobachtung; in allen Versuchen von van Dam ergeben die mehr Pepsin enthaltenden Lösungen auch größere Werte für die Caseinverdauung; in

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 84, S. 329.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 79, S. 247.

einigen Versuchen (6 und 8) ist diese Divergenz sehr bedeutend, so z. B. in Versuch 8:

Kalb koaguliert bei 28° C. — 90 Sek., verdaut Eiweiß — 23,45
Schwein „ „ 28° „ — 90 „ „ „ — 32,3.

Das Fehlen der zu erwartenden Proportionalität erklärt van Dam damit, daß das Pepsin der Schweinsinfusion unter den gegebenen Versuchsbedingungen (Koagulation nicht angesäuertes Milch) seine Koagulationskraft nicht im vollen Umfange entfalten konnte; deshalb wiederholt der Autor denselben Versuch, wobei er die Infusionen jetzt nach ihrer Fähigkeit, angesäuerte Milch (6 ccm $\frac{n}{10}$ -HCl auf 100 ccm Milch) zu koagulieren, auf die gleiche Kraft bringt, und die Gerinnung selbst bei noch niedriger Temperatur (24,5° C.) vornimmt, wobei er in der Tat einander mehr angenäherte Werte für die Caseinverdauung erhält, obschon das Übergewicht doch noch auf seiten der Schweinsinfusion liegt (Kalb — 26,6, Schwein — 28,9). Somit schafft van Dam bei der Bestimmung der Koagulationskraft für das Pepsin günstige Bedingungen (niedrige Temp., angesäuerte Milch), während er die Bestimmung der caseinverdauenden Kraft bei für das Pepsin ungünstigen Bedingungen (niedrige Acidität) ausführt, um nun aus der Zusammenstellung der unter solchen Bedingungen erhaltenen Zahlen einen Parallelismus zu konstatieren. Ich habe bereits in meiner oben zitierten Arbeit über die logische Unzulänglichkeit einer derartigen Argumentation gesprochen — man kann ja für die aller verschiedensten Stoffe solche Bedingungen schaffen, bei denen sie ähnlich erscheinen werden, doch von einer solchen Ähnlichkeit bis zu vollkommener Identität führt noch ein sehr weiter Weg.»

Zu dieser Kritik erlaube ich mir zunächst noch einmal die von mir gefundenen und berechneten Zahlen für die Caseinverdauung zusammenzustellen. Bei meinen Versuchen wurde immer eine Kalbsmageninfusion (oder Lablösung) mit Schweins- oder Rindspepsin verglichen. Die unter »ber.« angegebenen Zahlen wurden gefunden nach der Gleichung:

$$\text{Ger. Schw.} : \text{Ger. Kalb} = \text{Verd.}^2 \text{ Kalb} : x^2$$

Versuch	Verdauung	
	Gef.	Ber.
1	16,6	15,4
2	23,5 ¹⁾	24,7
3	19,7	19,0
4	22,55	21,6
5	28,4	26,3
6	37,9	31,8
7	25,6	23,4
8	32,3	23,45

¹⁾ Ohne Kontrollrohr.

Weiter lieferten die Infusionen auf 7 verschiedenen Kalbsmagen, die also wohl nicht gleiche Pepsinmengen enthielten und eine Lablösung (Hansen), die alle auf der gleichen Koagulationskraft verdünnt waren, folgende Verdauungszahlen: 22,15 — 22,3 — 22,7 — 22,0 — 22,6 — 22,45 — 22,5 — 21,45.

Rakoczy hat also vollkommen recht, wenn er sagt, daß auch hier kein vollkommener Parallelismus beobachtet wird; nicht richtig ist die Bemerkung, daß bei Versuch 8 Proportionalität für Verdauung und Gerinnung zu erwarten war. Ich schrieb damals bei der Vermeldung von Versuch 8: «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», usw.

Ich zeigte dann weiter, daß man besser übereinstimmende Werte erlangt, wenn man dafür sorgt, daß der Gerinnungsversuch den wirklichen Enzymgehalt angibt und nicht den scheinbaren Gehalt.

Rakoczy meint, daß ein solches Vorgehen nicht statthaft ist; wenn man sich die Bedingungen so wählt, daß die stärkere Wirkung abgeschwächt, die schwächere verstärkt wird, so kann man immer diejenige Bedingung ausfindig machen, für die beide Wirkungen gleich sind. Diese Ansicht ist natürlich vollkommen richtig, gilt aber nur dann, wenn man bei dem genannten Vorgehen sozusagen einen wirklichen Kreuzpunkt findet, der bei fortgesetztem Ändern der Bedingungen in derselben Richtung, überschritten wird. In dem vorliegenden Fall ist das nun aber nicht der Fall; von dem Momente an, daß nach Rakoczy die günstigste Bedingung hergestellt ist, für welche also Parallelität für Gerinnung und Verdauung eintritt, bleibt diese Parallelität bestehen, unabhängig davon, ob man die Bedingungen in derselben Richtung noch weiter ändert, z. B. mehr Säure zur Milch gibt, oder bei niedriger Temperatur den Koagulationsversuch vornimmt. Vollkommen dieselbe Überlegung gilt für die Abweichungen vom Verdünnungsgesetz. Diese Abweichung kann aufgehoben werden durch Arbeiten mit höherer Enzymkonzentration, oder durch Vermehrung der H-Ionen oder durch Temperaturerniedrigung, nie aber gelingt es, die Differenzen im entgegengesetzten Sinne hervorzurufen, d. h. bei Verdünnung eine stärker koagulierende Wirkung zu erhalten, als der Verdünnung entspricht. Schon aus dieser einfachen Überlegung geht klar hervor, daß die Bemerkung Rakoczys in dieser Hinsicht nicht stichhaltig ist.

Wenn ich beim Versuch 8 ohne weiteres aus der gefundenen Differenz geschlossen hätte, daß die beiden Wirkungen nicht parallel gehen, so hätte ich denselben Fehler gemacht, durch den zahlreiche Versuche Rakoczys, und auch Hammarstens, Schmidt-Nielsens u. a. ihren Wert verloren haben. Diese Autoren haben versäumt, sich die Frage vorzulegen: geben meine Koagulations- sowie Verdauungsversuche den wirklichen Enzym-

gehalt an? Schon öfters habe ich betont, daß die Koagulationsversuche, die bei 37—40° C. ausgeführt werden, sehr oft ein völlig falsches Bild geben von der Menge des in der zu untersuchenden Flüssigkeit sich befindenden Enzyms. Die Eigenschaften des sogenannten Parachymosins, von Säuren und Chlorcalciumlösung stärker beeinflusst zu werden als das Chymosin, sowie das Nichtbefolgen des Verdünnungsgesetzes, sind alle auf den Umstand zurückzuführen, daß eine Lösung eines solchen «Parachymosins» den Hydroxylionen der Milch gegenüber äußerst empfindlich ist, was eine ganze oder teilweise Vernichtung des Enzyms während des Gerinnungsversuchs bei zu hoher Temperatur zur Folge hat. Will man daher relative Fermentmengen messen, so hat man dafür zu sorgen, daß die Umstände so sind, daß kein Enzym während der Versuche abgetötet werden kann.

Wie stellt sich nun Rakoczy diesen Tatsachen gegenüber und in wie weit berühren sie die Versuchsergebnisse dieses Autors? Rakoczy fand die Beobachtung der relativ schnelleren Gerinnung bei niedrigen Temperaturen bestätigt für die durch Erwärmen mit HCl von Chymosin befreiten Lösungen und «erklärt» dies so: ¹⁾ «Das Pepsin unterscheidet sich unter anderem dadurch vom Chymosin, daß es bei verhältnismäßig geringfügigen Verdünnungen vom Zeitgesetz abweicht; es folgt aber diesem Gesetz in großer Annäherung, wenn man die Gerinnungsversuche bei einer Temperatur 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°, ²⁾ und die milchkoagulierende Kraft der erwärmten Portionen wird verhältnismäßig erhöht.»

Über diese «Erklärung» habe ich bei einer vorigen Gelegenheit ³⁾ schon das meinige gesagt; weil die damals gestellten Fragen unbeantwortet geblieben sind, möchte ich sie hier noch einmal wiederholen. Warum kann das Pepsin seine milchkoagulierende Wirkung besser bei 25° als bei 40° entfalten, wenn es nicht dadurch ist, daß es bei 40° abgetötet wird in der Milch? Warum findet man bei Schweins- und Rindsenzymlösungen bei 25° öfters innerhalb 5 Minuten Gerinnung, während bei 40° gar keine Koagulation eintritt? Und warum findet man bei mehr konzentrierten Enzymlösungen das Umgekehrte: bessere Wirkung bei höherer Temperatur? Und wenn die Milch ein wenig angesäuert wird, warum findet man auch dann eine bessere Wirkung, je nachdem die Versuchstemperatur höher gewählt wird? Und wie soll man es erklären, daß eine Pepsinlösung, die bei 26° C. in z. B. 5 Minuten die Milch dicklegt, diese Fähigkeit völlig verliert, nachdem das Enzym-Milchgemisch

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 68, S. 459.

²⁾ Kursivierung von mir.

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 79, S. 254.

während 5 Minuten bei 40° gestanden hat, um dann bei 26° hingestellt zu werden?

Wenn Rakoczy die von mir gegebene Antwort auf diese Fragen bestreitet, so möge er doch eine andere, bessere Erklärung geben; die oben zitierte Äußerung ist meines Erachtens keine Erklärung zu nennen.

Ich will jetzt noch ein paar Worte darüber sagen, inwieweit obenstehende Erörterungen die Versuchsergebnisse Rakoczys berühren. In seiner ersten Mitteilung¹⁾ untersucht der Autor den Einfluß langdauernder Erwärmung bei 39—40° für Kalbs- und Rindsmageninfusionen. Die Koagulationsversuche zur Bestimmung der relativen Fermentmengen wurden alle bei 40° C. ausgeführt. Bedenkt man nun, daß es in erster Linie die erwärmten Kalbsmageninfusionen sind, die für Hydroxylionen außerordentlich empfindlich sind, so leuchtet es ein, daß die von Rakoczy in seinen Tabellen (Versuch VIII, IX, X und XI) angeführten relativen Fermentmengen absolut nicht den wirklich anwesenden Quantitäten entsprechen, und die konstruierten Kurven lehren darüber nichts. Ganz besonders instruktiv in dieser Hinsicht sind die erhaltenen Zahlen bei der Koagulation durch eine 36 Stunden lang bei 40° C. digerierte Kalbsmageninfusion, das eine Mal nach Neutralisation mit CaCO₃, das andere Mal ohne vorhergehende Neutralisation.

	Nicht erwärmt	Erwärmt
Nicht neutralisiert . . .	< 7 Sek.	270 Sek.
Neutralisiert	20 „	3600 „

Wie verhielten sich in den nicht und wohl erwärmten Infusionen nun eigentlich die Fermentmengen, als 270 : <7, oder als 3600 : 20? Rakoczy schreibt: «wenn man aber zur Bestimmung der milchkoagulierenden Kraft mit CaCO₃ neutralisierte Infusion verwendet, so erweist sich die letztere nach 2 tägiger Erwärmung als unwirksam». Damit kann man sich aber nicht begnügen, denn nach Mett findet der Autor 3 mm in 16 Stunden für die auf Milch unwirksame Lösung, während Rakoczy auch für das Pepsin das Vermögen annimmt, Milch zu koagulieren bei neutraler Reaktion (S. 433). Und in Tabelle IX sieht man, daß die Pepsinlösung (Rindsmageninfusion), die 144 Stunden erwärmt wurde, bei einer Verdauung von 4,0 mm nach Mett, die Milch in 5 Minuten zur Gerinnung bringt. Wie muß man das verstehen?

Weiter gibt Rakoczy als Resultat der Versuche VIII, IX, X und XI, folgendes: «Im Verlaufe der ersten Tage der Erwärmung wird das Chymosin zerstört und es bleibt nur das Pepsin allein übrig, dessen milchkoagulierende Kraft nun parallel der proteolytischen zu fallen beginnt. In der Rinderinfusion ist kein Chymosin oder nur sehr wenig davon vorhanden und hier ist die Milchgerinnung hauptsächlich durch

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 68, S. 421.

die Wirkung des Pepsins bedingt, weshalb beim Erwärmen beide Wirkungen fast parallel sinken.¹⁾

Ich erlaube mir die Zahlen aus Rakoczys Arbeit zu zitieren, die eine «fast parallele» Abschwächung der koagulierenden und verdauenden Wirkung beweisen sollen für die Pepsinlösungen (Rindsmageninfusionen).

Versuch VIII.

Dauer der Erwärmung Stunden	Relative Fermentmenge nach der Koagulation	Relative Fermentmenge nach der Proteolyse
0	4,4	1,44
24	3,66	1,6
48	2,72	1,3
72	1,0	1,0

Versuch IX.

0	8,5	7,9
24	3,0	6,9
48	3,7	5,6
72	2,0	5,9
96	1,7	3,1
144	1,0	1,0

Man vergleiche diese Zahlen mit denjenigen, welche ich für die Caseinverdauung gefunden habe; nach alledem bin ich der Meinung, daß Rakoczy zu der gemachten Bemerkung in dieser Beziehung nicht berechtigt war. Bei der Versuchsanordnung, wie sie in diesen Versuchen gewählt wurde, ist es rein unmöglich einen Parallelismus zu finden, weil bei den Koagulationsversuchen ein Teil des erwärmten Enzyms während des Versuchs vernichtet wird. Will Rakoczy hier eine strenge Parallelität nachweisen, so hat er sich von ganz denselben Vorsorgen zu bedienen, als ich es tat.

Im zweiten Teil dieser Arbeit gibt Rakoczy interessante Trennungen von den beiden Wirkungen, der Koagulation und der Eiweißverdauung; in seiner vor kurzem erschienenen Mitteilung²⁾ werden diese noch ergänzt durch andere Methoden, um ein solches Resultat zu erhalten. Es tut mir leid, daß der Autor sich durch meine diesbezügliche Äußerung³⁾ gekränkt fühlt; es ist absolut nicht meine Absicht gewesen, etwas Unan-

¹⁾ Kursivierung von mir.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 84, S. 329.

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 79, S. 251.

genehmes zu sagen über die Dialyserversuche Rakoczys. Ich bin nur der Meinung, daß man aus diesen Resultaten nicht schließen darf, daß man es mit zwei verschiedenenen Wirkungen zu tun hat, weil man zwei nicht identische *Systeme* vergleicht. Aus der Nichtidentität der Wirkung (was die Geschwindigkeit anbetrifft) solcher Systeme kann man nicht schließen auf Nichtidentität der Komponenten. Geht nicht aus der letzten Arbeit Rakoczys hervor, daß beim Vergleich von der Wirkung des Elastins auf schwach- und stärker salzsaure Chymosinlösung im ersten Fall das Chymosin ganz anders wirkt als im zweiten, und zwar als Pepsin, ganz so wie ich es bei der Caseinverdauung fand?

Was nun der tiefere Grund dieser Erscheinung ist, ist bisher nicht bekannt; vom physikalisch-chemischen Standpunkte scheint die Annahme nicht unwahrscheinlich, daß eine Pepsinlösung die Eigenschaften einer Chymosinlösung erhält durch Spuren von Stoffen, die sich mit dem Enzym vereinigen zu einem Gleichgewichte, das von den H-Ionen gestört werden kann. Die Dualisten haben sich öfters bemüht, die Gegenwart solcher «Verunreinigungen» zu zeigen durch Vermischen einer verunreinigten Lösung mit einer normal arbeitenden, um dann beim Nichtkonstatieren eines hemmenden Einflusses zu schließen, daß offenbar von Verunreinigungen nicht die Rede sein konnte. Dies ist nun aber ein Irrtum. Man könnte dies vielleicht illustrieren mit einem Vergleich von zwei Salzsäurelösungen, deren eine mit ein wenig Natriumacetat, sagen wir $\frac{1}{5}$ der äquivalenten Menge, verunreinigt ist. Die Säurewirkung letzterer zeigt sich dann bekanntlich stark abgeschwächt, beim Vermischen mit der reinen Lösung ist ein Einfluß auf dieser nur zu konstatieren, wenn man über feinere Mittel verfügt, als den Verdauungsversuchen mit Hühnerweiß oder Fibrin entsprechen. Ich führe dies nur als rohes Beispiel an, um zu zeigen, daß man in ähnlichen Fällen sehr vorsichtig sein muß in seinen Schlussfolgerungen, zumal weil es sich in dieser Frage um sehr verwickelte Systeme handelt, deren Komponente überdies zum Teil in verschwindend kleinen Quantitäten vorkommen.

Wenn ich also sagte: «Vom unitarischen Standpunkte heißt das also, daß es nicht gelingt, durch einfache Dialyse alle Verunreinigungen wegzuschaffen», so ist das zu deuten im oben erörterten Sinne; die Gesamtheit aller Untersuchungen über diesen Gegenstand bilden also die experimentellen Daten für diese Behauptung.

Schließlich möchte ich noch folgendes hervorheben. In seiner ersten Arbeit kommt Rakoczy zum Schluß, daß man dem Pepsin das Vermögen zuschreiben muß, Milch auch bei neutraler Reaktion zur Gerinnung zu bringen. Dadurch ist also ein wichtiger Unterschied von Chymosin und Pepsin, der von Hammarsten immer in den Vordergrund geschoben wurde, hinfällig geworden. — Nachdem ich gezeigt hatte, daß für verschiedene Labpräparate die Caseinverdauung der Gerinnungsgeschwindigkeit parallel geht, schrieb Rakoczy: «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. Als ich dann später zeigte, daß die Caseinverdauung vom Pepsin im selben Maße vollzogen wird, wie vom Chymosin, schrieb Rakoczy: «Die Frage nach der Natur des Chymosins ist noch offen. Nichts steht der Annahme im Wege, daß dasselbe eine eigenartige Protease darstellt, die auf das Casein ähnlich¹⁾ wie das Pepsin wirkt, sich jedoch vom letzteren usw. . . . unterscheidet.»

Also: das Chymosin wirkt verdauend auf das Casein und das Pepsin wirkt milchkoagulierend, auch bei neutraler Reaktion. Nach alledem kann man hoffen, innerhalb weniger Jahre auch Rakoczy zu den Unitariern übergesiedelt zu finden.

Reichslandw. Versuchsstation, Hoorn.

¹⁾ Kursivierung von mir.