

Studien über Chymosin- und Pepsinwirkung.

II. Mitteilung.

Ein neues Verfahren zur Aufhebung der Parallelität zwischen Chymosin- und Pepsinwirkung.

Von

Olof Hammarsten.

(Der Redaktion zugegangen am 24. April 1915.)

Während meiner Untersuchungen über die Pepsin- und Chymosinfrage habe ich wiederholt das Bedürfnis empfunden, statt der Infusionen, zu deren Bereitung man nicht immer und zu jeder Jahreszeit das nötige Material zur Hand hat, ein Rohenzym in fester Form vorrätig zu besitzen, aus dem man bei Bedürfnis leicht reinere, aber trotzdem kräftig wirkende Enzymlösungen bereiten könnte. Nun gibt es allerdings käufliche Pepsin- und Labpräparate in fester Form, aus welchen man leicht durch Auflösung in Verdauungssalzsäure, bezw. in Wasser, kräftig wirkende Enzymlösungen darstellen kann; aber leider kennt man am öftesten weder das Rohmaterial, aus dem sie dargestellt sind, noch die Darstellungsweise oder die etwaigen Zusätze, welche sie enthalten. Aus diesen Gründen können solche Präparate nur für gewisse Untersuchungen in Betracht kommen.

Ich versuchte deshalb ein Verfahren zur Darstellung von einem Rohenzym in fester Form, aus welchem Enzymlösungen leicht zu gewinnen sind, auszuarbeiten; und während dieser Arbeit fand ich bald, daß man aus Kalbsmägen leicht und ohne besondere Eingriffe Enzymlösungen mit stark aufgehobener Parallelität zwischen Pepsin- und Chymosinwirkung gewinnen kann.

Als Ausgangsmaterial benutzte ich die mit Kochsalz fein zerriebene und dann getrocknete Drüsenschicht der Schleim-

haut. Die, nach dem in einem vorigen Aufsätze¹⁾ beschriebenen Verfahren, abgeschabte Drüsenschicht des Labmagens wird mit der fünffachen Menge reinem (also calcium- und magnesiumfreiem) NaCl genau zerrieben und die völlig homogene Masse in so dünner Schicht auf Fensterglas oder ganz flache Schalen aufgestrichen, daß sie bei Zimmertemperatur im Laufe von etwa 12 Stunden trocken wird. Selbstverständlich kann man durch besondere Anordnungen das Eintrocknen beschleunigen, aber dies ist überflüssig, und selbst ein etwas langsames Eintrocknen ist ohne Nachteil, indem das NaCl die Zersetzung und Fäulnis verhindert. Die trockene, harte Masse wird zu einem feinen Pulver zerrieben und dann im Exsikkator noch weiter getrocknet. Dieses Drüsen-Kochsalzpulver scheint, in einer trockenen, geschlossenen Flasche aufbewahrt, sehr lange und jedenfalls monatelang haltbar zu sein.

Aus diesem Pulver kann man nun, in erster Linie durch Extraktion mit Wasser, Fraktionen mit ungleicher enzymatischer Wirksamkeit erhalten, und die Verarbeitung dieses Rohmaterials geschieht in folgender Weise. Das Drüsen-Kochsalzpulver wird in einem mit Glasstopfen verschließbaren Zylinder mit Wasser bei Zimmertemperatur behandelt. Wenn man auf rund 40 g Pulver 100 ccm Wasser zusetzt und das Kochsalz unter leisen Bewegungen ohne Schütteln sich darin auflösen läßt, so erhält man in der Flüssigkeit aufgeschlemmt einen feinen Drüsen Schlamm, welcher langsam zum Boden sinkt, während das ungelöste NaCl einen rasch sich absetzenden Bodensatz bildet. Der Bodensatz wird mehrmals im Laufe von einigen Stunden in die Flüssigkeit aufgerührt unter leisen Bewegungen des Zylinders (ohne Schütteln), bis kein NaCl sich mehr löst und man also sicher sein kann, daß die Lösung mit NaCl gesättigt ist. Dann läßt man das Gemenge bis zum folgenden Tage stehen, wo man stark zentrifugiert. Man erhält in dieser Weise eine kochsalzgesättigte Flüssigkeit A. und einen aus Drüsen Schlamm und etwas überschüssigem NaCl bestehenden Bodensatz B.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 56, S. 26.

Diesen Bodensatz extrahiere ich meistens noch einmal mit gesättigter NaCl-Lösung, und in einigen Fällen habe ich sogar noch eine zweite Extraktion mit NaCl-Saturation folgen lassen. Dies scheint jedoch überflüssig zu sein, und schon die erste Extraktion mit Wasser genügt regelmäßig, um Lösungen mit aufgehobener Parallelität der beiden Enzymwirkungen zu gewinnen.

Bei näherer Untersuchung sowohl der kochsalzgesättigten Flüssigkeit A wie des Bodensatzes B findet man nämlich, daß beide enzymhaltig sind, aber in verschiedenem Grade. Das Enzym aus A zeigt sowohl Chymosin- wie Pepsinwirkung, aber die letztere ist sehr stark im Vergleiche mit der Wirkung des aus B erhaltenen Enzymes, welches regelmäßig sehr schwach peptisch, aber dagegen stark labend wirkt.

Sowohl aus der Lösung A wie aus dem Bodensatze B kann man durch Dialyse, resp. durch Zusatz von Wasser und Dialyse Enzymlösungen direkt gewinnen. Infolge der großen NaCl-Mengen werden sie indessen hierbei stark verdünnt, sie sind unklar und mehr oder weniger schwer filtrierbar. Es ist deshalb besser, in beiden Fällen das Enzym in fester Form auszuscheiden, was leicht gelingt, wenn man die kochsalzgesättigte Lösung mit 0,2% HCl versetzt. Das Verfahren gestaltet sich ein wenig verschieden, je nachdem es um die Verarbeitung der Lösung A oder des Bodensatzes B sich handelt; und da der letztere die Hauptmenge der Enzyme enthält, will ich zuerst die Verarbeitung des Bodensatzes B beschreiben.

Dieser Bodensatz, mit dem ungelösten NaCl, wird in einem Glaszylinder mit Salzsäure von 0,2% HCl unter wiederholtem Umschwenken des Zylinders und unter Zusatz von NaCl bei Zimmertemperatur behandelt, bis die Salzsäure mit NaCl gesättigt worden ist. Man erhält so eine salzgesättigte Säure mit einer flockigen Fällung und einem Drüsenschlamm, welche beide man ziemlich leicht vom ungelösten NaCl trennen kann. Die Menge der angewandten Säure ist ziemlich gleichgültig; ich nehme aber gewöhnlich so viel, daß ihre Menge etwa der Hälfte des zur ersten Extraktion benutzten Wassers entspricht (also beim Verarbeiten von 160 g Pulver mit 400 ccm Wasser

etwa 200 ccm HCl von 0,2%). Nach einiger Zeit, in meinen Versuchen meistens nach ein paar Stunden, wird die Fällung mit dem Drüsenschlamm durch Leinwand abfiltriert und zwischen Papier ausgepreßt. Die ausgepreßte Masse ist braun; nach dem Trocknen im Exsikkator und Zerreiben stellt sie dagegen ein bräunlich blaßgelbes Pulver dar. Dieses Pulver, welches selbstverständlich immer etwas NaCl enthält, wird als Enzymfraktion B bezeichnet und sie enthält, wie oben bemerkt, die Hauptmenge der Rohenzyme. Die von dieser Fraktion abfiltrierte, salzgesättigte Säure enthält allerdings noch ein wenig Enzym, aber in so kleiner Menge, daß eine besondere Verarbeitung derselben nicht verlohrend ist.

Die mit Kochsalz gesättigte Extraktionsflüssigkeit A ist selbst nach wiederholtem, starkem Zentrifugieren nie klar, und selbst durch Filtration, welche übrigens langsam geht, kann man sie nicht ganz klar erhalten. Bei Zusatz von Salzsäure bis zu 0,2% HCl gibt sie eine grobflockige Fällung, die man abzentrifugieren kann. Diese Fällung ist indessen sehr klebrig und schwer zu verarbeiten. Sie haftet stark sowohl an Filtrierpapier wie an Leinwand an; man kann sie nicht gut auspressen und man kann sie nur mit großen Verlusten als eine von viel Kochsalzmutterlauge verunreinigte, schleimige oder klebrige Masse gewinnen. Aus dem Grunde ist es besser, statt der direkten Ausfällung mit 0,2% HCl in folgender Weise zu verfahren. Man läßt die kochsalzgesättigte Flüssigkeit A in großen flachen Schalen in möglichst dünner Schicht bei Zimmertemperatur eintrocknen, was leicht und ziemlich rasch geschieht. Die zurückgebliebene Masse, die zum allergrößten Teile aus Kochsalzkrystallen besteht, wird nun bei Zimmertemperatur mit Salzsäure von 0,2% HCl behandelt, bis die Säure gesättigt ist und nur wenig überschüssiges NaCl ungelöst bleibt. Man erhält so eine flockige Fällung, die allerdings fortwährend klebrig ist, die aber beim Zentrifugieren sich scharf absetzt und als zusammenhängender Klumpen leicht aus dem Rohre auf ein Filter von Leinwand gebracht werden kann. Diese Fällung kann man ebenfalls nicht stark auspressen; die Mutterlauge kann man aber durch leises Drücken zwischen Fließ-

papier zum größten Teil entfernen, und den Rückstand auf dem Leinwandfiltrum kann man ohne besondere Verluste mit einem Platinspatel auf ein Uhrglas bringen. Nach dem Trocknen im Exsikkator wird pulverisiert. Diese Fraktion, welche man immer in viel geringerer Menge als die Fraktion B erhält und welche relativ viel mehr NaCl enthält, wird als Enzymfraktion A bezeichnet.

Die von der Fraktion A abfiltrierte, salzgesättigte Säure enthält ein wenig Enzym, welches man nach beendeter Dialyse gegen Wasser nachweisen kann. Die Ausbeute ist indessen so klein, daß ich diese Filtrate nicht weiter verarbeitet habe.

In der nun beschriebenen Weise erhält man also 2 Fraktionen A und B, die nach dem Trocknen und Pulverisieren gut zur Darstellung von Enzymlösungen sich eignen. Zu dem Ende wird das Pulver in etwas Wasser aufgeschlemmt und gegen Wasser dialysiert. Die Dialyse verläuft rasch und gut, wenn man nicht zu viel Wasser zur Extraktion des Pulvers benutzt. Die Hauptmasse des Pulvers ist in Wasser unlöslich; die Menge der löslichen organischen Substanz ist verhältnismäßig klein und die Dialyse gilt hauptsächlich das NaCl. Auf je 1 g Rohenzym sind etwa 30 ccm Wasser völlig genügend, und man kann mit Vorteil als Dialysatoren abgesprengte, mit Pergamentpapier übergespannte und mit Stopfen zu schließende Glasflaschen benützen. Die Dialyse geschieht immer in dünner Schicht mit etwas Toluol, und bei 3 bis 4 maligem Wechsel des Außenwassers kann sie in etwa 12—18 Stunden fertig sein.

Nach beendeter Dialyse verdünnt man mit mehr Wasser, filtriert und wäscht mit Wasser nach, bis man eine Enzymlösung von passender Wirksamkeit erhält. Oft kann man mit 100 bis 150 ccm auf je 1 g Pulver kräftig wirkende Lösungen erhalten.

Nach dem Auslaugen und Auswaschen mit Wasser kann man den ungelösten Rückstand bei Zimmertemperatur mit Salzsäure von 0,1 % HCl stehen lassen; und man erhält so eine neue, saure, oft kräftig wirkende Enzymlösung, wenn man auf den Rest von je 1 g ursprünglichem Pulver etwa 100 ccm Säure einwirken läßt. Diese saure Enzymlösung ent-

hält sowohl Pepsin wie Chymosin; aber die Relation zwischen den zwei Enzymwirkungen ist hier wiederum eine andere als in der aus B mit Wasser erhaltenen und zu demselben Säuregrade gebrachten Lösung. Auch hier kann man also einen Mangel an Parallelität zwischen Pepsin- und Chymosinwirkung konstatieren.

Bei der nun beschriebenen Methode werden, wie man ersieht, alle Operationen bei Zimmertemperatur oder (die Dialyse) bei niedrigerer Temperatur ausgeführt. Die möglichst frische Drüsenschicht wird unmittelbar mit reinem Kochsalz zerrieben und konserviert, und es werden keine anderen Reagenzien als Wasser, NaCl und Salzsäure von 0,2% HCl verwendet. Unter solchen Umständen dürfte es wohl unzulässig sein, den tatsächlich bestehenden Mangel an Parallelität der Enzymwirkungen durch die Annahme von Schädigungen oder Modifikationen der Enzyme durch die chemischen Eingriffe erklären zu wollen. Zu dieser Frage werde ich jedoch später zurückkommen, nachdem ich erst einige Belege für die Brauchbarkeit der Methode und einige Beispiele der erhaltenen Resultate mitgeteilt habe. Daß ich hierbei ein paar Versuche recht ausführlich wiedergebe, dürfte wohl im Interesse der Sache sein, indem es erst hierdurch möglich wird, den Wert meiner Angaben zu kontrollieren.

Um Wiederholungen zu vermeiden, erlaube ich mir vorerst, einige Bemerkungen über gewisse Teile der Versuchsanordnung vorzuschicken. Bei den Gerinnungsversuchen, die regelmäßig bei verschiedenen Temperaturen ausgeführt wurden, kamen stets auf je 10 ccm Milch 1 ccm Enzymlösung. Die Pepsinprobe wurde in erster Linie nach Mett ausgeführt; da aber die Enzymlösungen aus B hierbei regelmäßig ein negatives Resultat ergaben, war es notwendig, auch die Pepsinprobe mit Karminfibrin bei Zimmertemperatur auszuführen. Bezüglich der Ausführung dieser Probe kann ich im wesentlichen auf einen früheren Aufsatz¹⁾ hinweisen. Besonders wichtig ist es, daß die zu vergleichenden Proben denselben Gehalt an festen Stoffen haben, und dies habe ich deshalb

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 74, S. 142.

immer berücksichtigt. Als Verdünnungsflüssigkeit der pepsinreicheren Lösung A wurde in den allermeisten Fällen die zur Zerstörung der Enzyme erhitzte, zu vergleichende, pepsinärmere Flüssigkeit B verwendet.

Man kann allerdings hier einwenden, daß bei dem Erhitzen der Enzymlösung vielleicht verdauungshemmende Stoffe gebildet oder zerstört werden. Wenn das erstere der Fall wäre, würde dies nur die Beweiskraft der Versuche erhöhen, indem nämlich die mit erhitzter Infusion stark verdünnte Lösung immer bedeutend kräftiger als die andere, B, wirkt. Wenn dagegen diese letztere, schwach peptisch wirkende Lösung ihre schwache Wirkung der Gegenwart von hemmenden, durch Erhitzen zerstörbaren Stoffen zu verdanken hätte, würde es wohl hinsichtlich der Hemmungswirkung ziemlich gleichgültig sein, ob man die erhitzte oder nicht erhitzte Lösung B als Verdünnungsflüssigkeit verwendete. Die nicht erhitzte Lösung könnte nämlich wohl nur in dem Falle hemmend wirken, wenn in ihr ein sozusagen von dem Pepsin nicht in Beschlag genommener Überschuß an Hemmungsstoffen vorhanden wäre. Etwas Derartiges hat man indessen keinen Grund anzunehmen. Die nicht erhitzte Lösung B zeigt immer eine, wenn auch schwache, Pepsinwirkung, und freies oder jedenfalls in seiner Wirkung nicht gehemmt Pepsin kommt also in ihr vor. Verdünnung mit der nicht erhitzten Lösung B wirkt auch in der Tat nicht hemmend. Sie wirkt im Gegenteil fördernd, sodaß die Verdauung etwas rascher als bei Verdünnung mit der erhitzten Lösung B verläuft. Dies darf man natürlich nicht so deuten, als ob bei dem Erhitzen hemmende Stoffe entstanden; die Erklärung liegt vielmehr darin, daß die Wirkung der kleinen Pepsinmengen in der nicht erhitzten Lösung B der Pepsinwirkung der Lösung A sich hinzuaddiert und die Verdauung ein wenig befördert. Da die Pepsinmengen in der Lösung B regelmäßig sehr klein sind, ist der Unterschied, wenn man mit erhitzter oder nicht erhitzter Lösung arbeitet, meistens so klein, daß er ohne Bedeutung ist. Da indessen die Verdauung mit erhitzter enzymfreier Lösung prinzipiell richtiger ist, habe ich, wie gesagt, in den allermeisten Fällen beim Vergleiche von A

und B die erhitzte Lösung B als Verdünnungsflüssigkeit verwendet.

Da es nicht darauf ankam, die Differenzen in dem Pepsin-gehalte beider Lösungen genau festzustellen, was übrigens bei der Karminfibrinprobe nicht gut gelingt, habe ich nur mit großen Verdünnungsdifferenzen wie $\frac{1}{25}$, $\frac{1}{50}$, $\frac{1}{100}$, $\frac{1}{150}$, $\frac{1}{200}$ usw. gearbeitet. Wenn also in einem Falle die pepsinschwache Lösung B etwas kräftiger als A $\frac{1}{500}$ aber schwächer als A $\frac{1}{150}$ wirkte, habe ich den Pepsingehalt in A als > 150 bezeichnet, wenn der Gehalt in B gleich 1 gesetzt wird.

Nach diesen Vorbemerkungen kann ich zu den Beispielen übergehen.

Versuch 1. 80 g Salz-Schleimhautpulver von Saugkalbmägen wurden mit 200 ccm Wasser bei Zimmertemperatur behandelt und nach 24 Stunden zentrifugiert. Der Bodensatz wurde mit neuen 150 ccm NaCl-Saturation extrahiert, am folgenden Tage zentrifugiert und das Ungelöste noch einmal mit gesättigter NaCl-Lösung (100 ccm) extrahiert. Die drei salz-gesättigten Extrakte wurden vereinigt und in sehr dünner Schicht bei Zimmertemperatur an der Luft eingetrocknet. Der Rückstand wurde mit 300 ccm Salzsäure von 0,2% HCl bei Zimmertemperatur behandelt, die flockige Fällung durch Zentrifugieren abgeschieden, auf Leinwand gesammelt, soweit wie möglich ausgepreßt, auf ein Uhrglas übergeführt und im Exsikkator getrocknet (Enzymfraktion A).

Der mit gesättigter NaCl-Lösung 3 mal extrahierte, ungelöste Rest wurde mit 200 ccm HCl von 0,2% behandelt und die Lösung mit NaCl gesättigt. Die flockige Fällung und der Drüsenschlamm wurden durch Leinwand abfiltriert, ausgepreßt und getrocknet (Enzymfraktion B).

Die Fraktion A (gegen 0,8 g) wurde in 25 ccm Wasser aufgeschlemmt und 18 Stunden dialysiert. Nach der Filtration und dem Nachwaschen betrug die Menge der Enzymlösung 80 ccm mit 0,096% festen Stoffen.

Von der Fraktion B, deren Menge mehr als 2 g betrug, wurden 1,25 g in 30 ccm Wasser aufgeschlemmt und ebenfalls 18 Stunden dialysiert. Die Menge des Filtrates nach wieder-

holtem Nachwaschen war 150 ccm mit 0,075% festen Stoffen (Enzymlösung B).

Die obige, aus der Fraktion A erhaltene Lösung wurde nun mit so viel Wasser verdünnt, daß sie ebenfalls 0,075% feste Stoffe enthielt (Enzymlösung A).

Der von Enzymlösung B abfiltrierte, mit Wasser ausgewaschene Rest wurde mit Salzsäure von 0,1% HCl 2 Tage bei Zimmertemperatur unter zeitweisem Umschütteln stehen gelassen. Die Menge des Filtrates, nach dem Nachwaschen mit Salzsäure von 0,1%, war 100 ccm mit 0,089% festen Stoffen. Es wurde mit so viel Salzsäure von 0,1% HCl verdünnt, daß es ebenfalls 0,075% feste Stoffe enthielt (Enzymlösung B₁).

In dieser Weise wurden also 3 Enzymlösungen, die alle 0,75% feste Stoffe enthielten, gewonnen. Von diesen enthielt B₁ 0,1% HCl. A und B waren neutrale.

Da die Enzymlösung B eine kräftigere Chymosin-, aber eine schwächere Pepsinwirkung als die Lösungen A und B₁ zeigte, während die zwei letzteren viel weniger von einander abwichen, wurde die Lösung B auf der einen Seite mit A und auf der anderen mit B₁ verglichen.

Vergleich der Lösungen A und B.

Auf Milch wirkte die Lösung B bei 39° C. in 40 Sek., Lösung A erst nach 5 Minuten. Es war deshalb erwünscht, den Versuch mit stärker verdünnten Enzymlösungen zu wiederholen; und es wurden dann von beiden Lösungen kleine Mengen mit je 2 und 8 Vol. Wasser verdünnt. Die verdünnten Lösungen, mit den Enzymmengen $\frac{1}{3}$ und $\frac{1}{9}$, wurden mit Milch bei 39° und 28 $\frac{1}{2}$ ° geprüft. Das Ergebnis war folgendes.

Bei 28 $\frac{1}{2}$ ° C.	Bei 39° C.
Lösung A ($\frac{1}{3}$) 28 Min.	17 Min.
› B ($\frac{1}{3}$) 7 $\frac{1}{2}$ ›	2 $\frac{1}{2}$ ›
Chymosinmenge A : B = 1 : 3,7	= 1 : 6,8
Lösung A ($\frac{1}{9}$) 74 Min.	58 Min.
› B ($\frac{1}{9}$) 13 ›	6 $\frac{1}{2}$ ›
A : B = 1 : 5,7	= 1 : 8,9.

Diese Versuchsreihe liefert also weitere Belege für die in meinem letzten Aufsatz¹⁾ geschilderte Tatsache, daß die Relation zwischen den labenden Wirkungen zweier Enzymlösungen bei verschiedenen Temperaturen eine ungleiche ist und daß die verschiedenen Gerinnungszeiten kein sicheres Maß für den relativen Enzymgehalt beider ist. Daß die Lösung B eine bedeutend stärkere Labwirkung als die Lösung A zeigte, ist jedenfalls ganz sicher.

Dieser Schluß wurde weiter durch einen Versuch mit Caseincalciumphosphatlösung erhärtet. 3,3 gm lufttrockenes Casein (entsprechend 3 gm reinem, trockenem Casein) wurden mit Hilfe von 12 ccm Natriumdiphosphatlösung (von 1,1% Na_2HPO_4) und Wasser bis zu 60 ccm gelöst. Nach vollständiger Lösung wurden 40 ccm CaCl_2 -Lösung von 0,3% unter Umrühren zugefügt. Diese stark opalisierende Lösung wurde bei 39° C. milchweiß, gerann aber nicht. Sie wurde nun mit den 2 Lösungen A und B in dem Verhältnisse 1 : 10 geprüft. Da die Gerinnung bei Körpertemperatur (37°) zu rasch (fast augenblicklich) stattfand, wurde der Versuch bei 27° C ausgeführt. Die Enzymlösung A koagulierte die Caseinlösung zu einer festen Masse nach 5 Minuten, die Lösung B in etwas weniger als 1 Minute. Die Relation der Gerinnungszeiten war also ungefähr 5 : 1.

Nun sind aus Gründen, die mir noch nicht ganz klar sind und auf die ich in diesem Aufsatz nicht eingehen kann, auch die Versuche mit Caseincalciumphosphatlösungen nicht ganz zuverlässig als Maß der relativen Fermentmengen; der Schluß aber, daß die Lösung B wesentlich kräftiger labend, als die Lösung A wirkte, wird auch durch diesen Versuch erhärtet.

Die bisherigen Versuche waren mit den neutralen Enzymlösungen ausgeführt worden, und man konnte nun die Einwendung machen, daß die beiden neutralen Lösungen neben freiem Enzym vielleicht auch etwas Zymogen enthielten und daß die Resultate folglich nicht ganz beweiskräftig waren. Aus dem Grunde, und da ich übrigens auch die Karminfibrin-

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 92.

probe ausführen mußte, wurde der größte, rückständige Teil von A und ein großer Teil von B mit je dem gleichen Volumen Salzsäure von 0,2% HCl versetzt, wodurch beide auf den Säuregrad 0,1% HCl und einen Gehalt von 0,0375% festen Stoffen gebracht wurden. Nach Verlauf von 24 Stunden, eine für die Aktivierung bei Zimmertemperatur völlig hinreichende Zeit, wurden beide mit Milch und Karminfibrin geprüft.

Da die sauren Enzymlösungen die Milch rascher als die neutralen koagulieren, kann eine etwaige Aktivierung erst nach neuer Neutralisation sicher konstatiert werden. Da es aber für mich nur darauf ankam zu konstatieren, ob eine Änderung in der relativen Wirkungskraft beider Lösungen durch eine etwaige stärkere Aktivierung der einen als der anderen stattgefunden hatte, war eine neue Neutralisation überflüssig und ich konnte mit den sauren Lösungen arbeiten. Der neue Versuch zeigte, daß durch die Säure keine veränderte Relation hervorgerufen war. Auch in den Milchversuchen mit den sauren Enzymlösungen war die Relation bei 30° C. oder niedrigeren Temperaturen $B : A = 6 \text{ à } 5 : 1$. Aus den verschiedenen Proben folgt also, daß die Lösung B mindestens 5mal so kräftig koagulierend wie A wirkte.

Die Pepsinprobe nach Mett, bei dem Säuregrade 0,2%, ergab als Resultat, daß die Lösung B vollständig unwirksam war, während die Lösung A im Laufe von 20, 44 und 68 Stunden bzw. 5, 11 und 16 mm verdaut hatte. Hieraus folgt natürlich nicht, daß die Lösung B kein Pepsin enthielt, denn die Mettsche Probe ist nicht besonders empfindlich, und die Karminfibrinprobe gab mit B ein positives Resultat.

Bei dieser Probe wurde in diesem Versuche als Verdünnungsflüssigkeit nicht die durch Erhitzen enzymfrei gemachte, sondern die ursprüngliche, wie oben erwähnt, auf den Säuregrad 0,1% HCl gebrachte Lösung B verwendet. Das Ergebnis war, daß die Lösung A bei Anwendung von sowohl ungekochtem wie gekochtem Fibrin (im letztgenannten Falle bei Körpertemperatur) in der Verdünnung $1/100$ viel rascher und in der Verdünnung $1/200$ fast so rasch wie B verdaute. Das Resultat ist infolge der Verdünnung mit nicht

erhitzter Lösung etwas unsicher, aber jedenfalls enthielt die Lösung A mehr als 100 mal so viel Pepsin wie B. Die Relation der beiden Enzymwirkungen war also, wenn man in beiden Fällen die schwächste Wirkung mit 1 bezeichnet, folgende.

	Chymosin	Pepsin
Lösung A	1	> 100
„ B	5	1

Vergleich der Lösungen B und B₁.

Dieser Vergleich betraf nur die sauren (0,1% HCl) Lösungen und geschah nach ganz demselben Prinzip wie für A und B. Auf Milch wirkten beide Lösungen bei Temperaturen zwischen 20° und 30° fast gleich kräftig. Bei der Karminfibrinprobe wirkte die Enzymlösung B₁ in der Verdünnung $1/150$ entschieden stärker und bei der Verdünnung $1/200$ etwa ebenso stark wie B, möglicherweise ein wenig schwächer. Die Verhältniszahlen waren also folgende:

	Chymosin	Pepsin
Lösung B	1	1
„ B ₁	1	> 150

und es bestand folglich ein großer Mangel an Parallelität sowohl zwischen den Enzymlösungen A und B wie zwischen B und B₁.

Versuch 2. In diesem Versuche wurde nicht 3 mal mit gesättigter NaCl-Lösung extrahiert, sondern es wurde nach Behandlung mit Wasser die salzgesättigte Lösung abdekantiert, zentrifugiert und dann genau wie im vorigen Versuche zur Gewinnung der Enzymfraktion A verarbeitet. Der nach einmaliger Extraktion erhaltene Rückstand wurde ebenfalls wie im vorigen Versuche mit Salzsäure von 0,2% HCl auf die Fraktion B verarbeitet.

Aus der Enzymfraktion A wurden im ganzen 60 ccm neutrale Enzymlösung von 0,052% festen Stoffen und aus der Fraktion B insgesamt 250 ccm Lösung mit 0,052% festen Stoffen gewonnen. Aus dem Rückstande von der mit Wasser ausgelaugten Fraktion B wurden durch Extraktion mit Salzsäure von 0,1% HCl und weitere Verdünnung mit Säure, bis der Säuregrad genau 0,1% und der Gehalt an festen Stoffen

0,052 % war, insgesamt 170 ccm Lösung B₁ gewonnen. Alle drei Enzymlösungen hatten also auch in diesem Falle denselben Gehalt an festen Stoffen, und der Vergleich ihrer Wirkungen geschah nach denselben Prinzipien wie im vorigen Versuche.

Bei der Pepsinprobe mit Fibrin diente als Verdünnungsflüssigkeit für A und B₁ nicht die ursprüngliche, sondern die, durch Erhitzen auf 85° während 20 Minuten, enzymfrei gemachte Enzymlösung B.

Die Chymosinwirkung wurde bei Anwendung von neutralen Enzymlösungen sowohl mit Milch wie mit Caseincalciumphosphatlösung, bei Anwendung von sauren Enzymlösungen dagegen nur mit Milch geprüft. In diesem Falle geschah die Prüfung nur bei 30° C., und es zeigte sich hierbei, daß, gleichgültig ob die Enzymlösungen neutral oder sauer reagierten, die Lösung B etwa 7 und die Lösung B₁ etwa 4 mal so rasch wie die Lösung A wirkte.

Bei der Mettschen Probe gaben sowohl A wie B₁ ein positives Resultat, während B wirkungslos war. Bei der Karminfibrinprobe verdaute Lösung A in der Verdünnung $\frac{1}{200}$ und die Lösung B₁ in der Verdünnung $\frac{1}{50}$ entschieden kräftiger als B. Die Relationen waren also:

	Chymosin	Pepsin
Lösung A	1	> 200
„ B	7	1
„ B ₁	4	> 50.

Auch in diesem Falle war also der Mangel an Parallelität der beiden Enzymwirkungen ein bedeutender.

Versuch 3. Extraktion des Salz-Schleimhautpulvers mit Wasser 1 mal und direkte Fällung des mit NaCl gesättigten Extraktes durch Zusatz von 0,2% HCl. Der, infolge seiner klebrigen Beschaffenheit, nach dem Abzentrifugieren nicht auspreßbare Niederschlag enthielt viel Kochsalzmutterlauge, wurde aber nach dem Trocknen, Pulverisieren und Aufschlemmen in Wasser dialysiert und lieferte gegen 80 ccm einer Lösung mit 0,072% festen Stoffen (Enzymlösung A). Der abfiltrierte, ausgewaschene Rest wurde mit Salzsäure von 0,1% HCl behandelt und so eine zweite Enzymlösung erhalten mit 0,092% festen

Stoffen. Sie wurde mit Salzsäure verdünnt, bis der Gehalt an festen Stoffen 0,072% betrug (Enzymlösung A₁).

Die Enzymfraktion B wurde, wie gewöhnlich, mit 0,2% HCl dargestellt und aus ihr durch Dialyse und Nachwaschen eine neutrale Enzymlösung mit 0,090% festen Stoffen erhalten. Nach der Verdünnung bis zu 0,072% festen Stoffen betrug ihre Menge 160 ccm (Enzymlösung B). Aus dem ausgewaschenen Reste wurde mit HCl von 0,1% eine neue Enzymlösung mit 0,108% festen Stoffen erhalten. Nach der Verdünnung mit Säure bis zu 0,072% festen Stoffen betrug ihre Menge 134 ccm (Enzymlösung B₁).

Es wurden also im ganzen vier verschiedene Enzymlösungen mit 0,072% festen Stoffen erhalten, von denen 2, nämlich A und B neutral und 2 andere, A₁ und B₁, sauer (resp. 0,100 und 0,099% HCl bei der Titrierung) waren.

Die 2 neutralen Enzymlösungen wirkten auf Milch wie folgt:

	Bei 20° C.	26° C.	39° C.
A	308 Min.	35 Min.	5 Min.
B	203 „	28 „	3 „
A : B	= 1 : 1,5	1 : 1,1	1 : 1,7.

Nun wurden beide mit Salzsäure (genau zu 0,1% HCl) versetzt und nach 48-stündigem Stehen sowohl mit Milch wie mit Karminfibrin und mit der Mettschen Probe geprüft.

Die Milchprobe ergab folgendes Resultat:

	Bei 20° C.	26° C.	39° C.
A	230 Min.	10 Min.	95 Sek.
B	120 „	7 „	50 „
A : B	= 1 : 1,9	1 : 1,4	1 : 1,9.

Die Gerinnung verlief hier, wie gewöhnlich bei Anwendung von sauren Enzymlösungen, rascher als bei Anwendung der neutralen Lösung. Die Relation zwischen der Wirkung von A und B war aber ziemlich genau dieselbe in beiden Fällen, und eine Aktivierung mit Änderung der Relation hatte also jedenfalls nicht stattgefunden.

Am folgenden Tage wurden nun alle 4 (sauer reagierende) Enzymlösungen mit einer anderen Milch geprüft. Da die Ge-

rinnung bei höherer Temperatur zu rasch verlief, wurde nur bei den folgenden, niedrigeren Temperaturen gearbeitet.

	Bei 20° C.	23° C.	26° C.	29° C.
A	136 Min.	17 Min.	8½ Min.	3 Min. 45 Sek.
B	92 „	11 „	6 „	2 „
A ₁	64 „	8½ „	4 „	70 Sek.
B ₁	44 „	5 „	2½ „	60 „

Die Enzymlösung A zeigte bei allen Temperaturen die schwächste labende Wirkung und die letztere wird deshalb gleich 1 gesetzt. Die Chymosinwirkungen waren dann die folgenden:

	A	B	A ₁	B ₁
Bei 20° C.	1	1,5	2,1	3,1
„ 23° C.	1	1,5	2,0	3,4
„ 26° C.	1	1,4	2,1	3,2
„ 29° C.	1	1,9	3,2	2,75
Mittel 1	:	1,6	:	2,35
				:
				3,4.

Bei der Mettschen Probe wurden folgende Zahlen nach 44 Stunden erhalten: A = 15 mm; B = 0,00 mm; A₁ = 8 mm; B₁ = 7 mm.

Da die Probe B negativ ausfiel, aber trotzdem nicht pepsinfrei war (vergl. die Fibrinprobe), muß diese Probe bei dem Vergleiche wegfallen. Unter den 3 übrigen wirkte B₁ am schwächsten und wird deshalb als Einheit gesetzt. Für die 3 Proben erhält man also folgende Pepsinrelationen: A : A₁ : B₁ = 225 : 64 : 49 oder = 4,6 : 1,3 : 1.

Da die Lösung B bei der Mettschen Probe unwirksam war, mußten also alle 4 Proben des Vergleiches halber mit der Karminfibrinprobe geprüft werden. Als Verdünnungsflüssigkeit diente hierbei die durch Erhitzen enzymfrei gemachte Lösung B.

Als Resultat ergab sich, daß die Lösung A mehr als 800mal so kräftig wie B wirkte. Die Lösung A₁ wirkte mehr als 200mal und B₁ zwischen 150 und 200 (fast nahe 200) mal kräftiger als B.

Für die beiden Enzymwirkungen erhielt ich also folgende Verhältniszahlen:

	Chymosin	Pepsin
Lösung A	1	> 800
» B	1,6	1
» A ₁	2,4	> 200
» B ₁	3,4	> 150

In allen 4 Lösungen war also die Parallelität der Enzymwirkungen aufgehoben. Hier wie in anderen von mir ausgeführten Bestimmungen ist der Mangel an Parallelität besonders stark hervortretend, wenn man die Enzymlösungen A und B mit einander vergleicht, während er dagegen bei einem Vergleich zwischen A₁ und B₁ verhältnismäßig unbedeutend ist. Aus dem Grunde habe ich auch, wenn es nur um die Herstellung von Lösungen mit stark aufgehobener Parallelität der Enzymwirkungen sich handelte, mich damit begnügt, nur die Enzymlösungen A und B darzustellen. Für andere Zwecke habe ich aber auch die Enzymlösung B₁, die man leicht in viel größerer Menge als A₁ erhält, dargestellt.

Da die Darstellung der Lösungen A und B der Hauptzweck der Methode ist, will ich nur noch einen Versuch, in welchem nur diese 2 Lösungen dargestellt wurden, als Beispiel anführen.

Versuch 4. Die Darstellung der Enzymlösungen geschah ganz wie im Versuche 2. Beide Lösungen A und B wurden auf denselben Gehalt an festen Stoffen 0,075% gebracht.

Milchgerinnung mit den neutralen Lösungen.

	Bei 26 $\frac{1}{2}$ ° C.	32 $\frac{1}{2}$ ° C.	39° C.
A	25 Min.	7 Min.	4 Min.
B	19 »	5 »	3 »
	1 : 1,3	1 : 1,4	1 : 1,3

Beide Lösungen, mit Salzsäure bis zu 0,1% versetzt und nach 24 Stunden geprüft, koagulierten Milch:

	Bei 20° C.	24° C.	28° C.	32° C.	35° C.
A	140 Min.	20 Min.	5 $\frac{1}{2}$ Min.	160 Sek.	140 Sek.
B	120 »	18 »	4 $\frac{1}{2}$ »	130 »	110 »
	1 : 1,16	1 : 1,1	1 : 1,2	1 : 1,23	1 : 1,27.

Metts Probe verhielt sich wie folgt. Lösung A in 22 Stunden 9 mm, Lösung B 0,000 mm in 72 Stunden. Bei der

Pepsinfibrinprobe diene als Verdünnungsflüssigkeit die durch Erhitzen² unwirksam gemachte Lösung B. Die Lösung A verdaute in der Verdünnung $1/600$ bedeutend rascher als Lösung B. Wegen Mangels an Material konnte A nicht bei noch größerer Verdünnung geprüft werden. Da die Chymosinwirkung in A und B fast ganz dieselbe war, wurden also folgende Vergleichszahlen erhalten.

	Chymosin	Pepsin
Lösung A	1	> 600
• B	1	1

Der Übersichtlichkeit halber stelle ich die für die Lösungen A und B in den 4 Versuchen erhaltenen Verhältniszahlen nebeneinander.

	Chymosin	Pepsin
Nr. 1 { A	1	> 100
{ B	5	1
Nr. 2 { A	1	> 200
{ B	7	1
Nr. 3 { A	1	> 800
{ B	1,6	1
Nr. 4 { A	1	> 600
{ B	1	1

Der Mangel an Parallelität ist so augenfällig, daß es überflüssig sein dürfte, auf denselben ausführlicher einzugehen.

Außer den nun als Beispiele mitgeteilten Versuchen habe ich auch mehrere andere mit ähnlichen Resultaten ausgeführt. Da ich aber hoffe, ein anderes Mal einige Untersuchungen über das Verhalten solcher Enzymlösungen zu Caseinlösungen veröffentlichen zu können, und da ich dabei Gelegenheit finden werde, noch mehrere Beispiele anzuführen, dürfte ich für diesmal mit den nun mitgeteilten mich begnügen können.

Wie man aus dem Obigen ersieht, ist diejenige Enzymfraktion oder Enzymlösung, die ich mit B bezeichnet habe, immer recht arm an Pepsin, jedenfalls so arm daran, daß sie die Mettsche Probe nicht gibt, während sie verhältnismäßig kräftig labend wirkt. Eine ähnlich sich verhaltende Enzymlösung kann man indessen in viel einfacherer Weise, nämlich durch Verdünnung einer Kalbsmageninfusion mit hinreichend

viel Wasser, erhalten. Infolge der, im Verhältnis zu der stark milchkoagulierenden, schwach eiweißverdauenden Wirkung der Kalbsmageninfusionen erhält man nämlich leicht eine verdünnte Kalbsmageninfusion, die bei der Mettschen Probe unwirksam ist, während sie die Milch bei Körpertemperatur rasch koaguliert.

Es schien mir deshalb nicht ohne Interesse zu sein, die Wirkung einer Enzymlösung B mit der einer verdünnten Kalbsmageninfusion zu vergleichen. und als Beispiel teile ich hier das Hauptresultat eines solchen Vergleiches mit. Beide Lösungen waren neutral, von derselben Konzentration und ohne Wirkung auf Hühnereiweiß bei der Mettschen Probe. Dagegen koagulierten sie Milch gut bei 38° C., nämlich B in etwa 70 und J (Infusion) in 30 Sekunden. Die Chymosinrelation war also $B : J = 1 : 2,3$. Bei 26° und 20° war dagegen die Relation bezw. $1 : 1,3$ und $1 : 1,2$. Die bis zu $0,1\%$ HCl angesäuerten Lösungen wirkten bei 20° C. in 22 resp. 20 und bei 26° in bezw. 11 und 10 Min. Die Relation also hier $B : J = 1 : 1,1$. Beide hatten also annähernd dieselbe Chymosinwirkung oder, wenn man zugunsten der Infusion nur die bei 38° C beobachteten Zeiten berücksichtigen will, die Relation $B : J = 1 : 2$.

Bei der Karminfibrinprobe verdaute aber die Infusion reichlich 50mal so rasch wie B, und die Verhältniszahlen waren also folgende:

	Chymosin	Pepsin
Infusion (J)	1 à 2	50
Lösung B	1	1

Die Enzymlösung B verhielt sich also nicht einfach wie die verdünnte Infusion. Die Parallelität der zwei Enzymwirkungen war auch hier aufgehoben.

Noch größer war aber der Unterschied bei einem Vergleiche einer Enzymlösung A mit derselben, aber etwas stärker verdünnten Infusion. Beide Lösungen enthielten $0,1\%$ HCl und $0,020\%$ feste Stoffe. Die Milchproben wurden bei 20° C., 26° C. und 31° C. ausgeführt und die Gerinnungszeiten waren bei der letztgenannten Temperatur für A und J resp. $5\frac{1}{2}$ und $2\frac{1}{2}$ Min. Die relativen Chymosinmengen waren für die 3 obengenannten Temperaturen: $A : J =$ bezw. $1 : 1,9$; $1 : 2,1$; $1 : 2,2$, also rund

1:2. Die Mettsche Probe war bei A positiv, bei B negativ. Die Karminfibrinprobe zeigte, daß die Lösung A in der Verdünnung $1/200$ recht bedeutend rascher als die Infusion verdaute, und die Verhältniszahlen waren also folgende:

	Chymosin	Pepsin
Infusion (J)	2	1
Lösung A	1	> 200

Es ist also außer Zweifel, daß man durch das oben beschriebene Verfahren die Parallelität zwischen Chymosin- und Pepsinwirkung derart aufheben kann, daß man 2 Fraktionen erhält, von denen die eine relativ viel kräftiger, die andere dagegen relativ viel schwächer verdauend als die ursprüngliche Infusion wirkt. Die Chymosinwirkung kann oft in beiden Fraktionen recht stark und bisweilen sogar fast dieselbe sein; aber das Wesentliche ist der äußerst große Unterschied in der Stärke der Pepsinwirkung. Hierdurch eignen sich diese 2 Enzymfraktionen sehr gut zum Studium der Einwirkung einer stark aufgehobenen Parallelität auf Caseinlösungen unter verschiedenen Versuchsbedingungen.

Da bei dem neuen Verfahren sämtliche Operationen bei Zimmerwärme oder (die Dialyse) bei niedrigerer Temperatur ausgeführt werden, und da man keine anderen Reagenzien als Kochsalz, Wasser und Salzsäure von 0,2% HCl benutzt, dürfte es wohl, wie oben hervorgehoben, unzulässig sein, die mangelnde Parallelität durch Schädigung der Enzyme infolge der chemischen Eingriffe erklären zu wollen. Das Zerreiben der Drüsenschicht mit NaCl und Trocknen an der Luft ist kein chemischer Eingriff, und ebensowenig kann man als einen solchen die Extraktion mit Wasser bezeichnen. Es würde also nur die kombinierte Einwirkung von NaCl und 0,2% HCl in Frage kommen können. Wenn man aber eine solche Annahme macht, bleibt es unverständlich, warum die zwei Fraktionen A und B, die beide mit NaCl und 0,2% HCl dargestellt werden, untereinander ein so verschiedenes Verhalten zeigen würden.

Glücklicherweise ist es nun aber leicht, die eventuell schädliche Wirkung von NaCl und 0,2% HCl experimentell zu prüfen. Man kann nämlich die Anwendung von HCl gänzlich

wegfallen lassen und das salzgesättigte Extrakt A direkt gegen Wasser dialysieren, um das Kochsalz zu entfernen; und in ähnlicher Weise kann man den Rückstand B, ohne Säurezusatz, nach dem Aufschlemmen in Wasser behandeln. Dies habe ich nun in der Tat in 3 Fällen gemacht und in allen habe ich Lösungen erhalten, welche den obigen Mangel an Parallelität der Enzymwirkungen zeigten. Dieses Verfahren ist nun allerdings aus anderen Gründen nicht zu empfehlen, denn man erhält unklare Lösungen, die selbst nach wiederholtem Filtrieren nicht klar werden und die zu weiteren Versuchen viel weniger geeignet sind als die nach dem oben geschilderten Verfahren aus den festen Rohenzympräparaten gewonnenen Enzymlösungen. Der Umstand aber, daß man durch Behandeln des Salz-Drüsenpulvers mit Wasser allein zwei Fraktionen mit verschiedenartigen Enzymwirkungen darstellen kann, spricht entschieden für das Vorkommen von zwei verschiedenen Enzymen in der Drüsenschicht.

Um Enzymlösungen mit aufgehobener Parallelität der zwei Enzymwirkungen zu gewinnen, ist also die kombinierte Wirkung von NaCl und HCl gar nicht notwendig; aber diese kombinierte Wirkung hat den Vorteil, daß sie in fester handlicher Form ein Rohenzym gibt, aus dem dann später reinere Enzymlösungen leicht erhältlich sind. Vielleicht hat diese Kombination auch eine andere günstige Wirkung, nämlich eine aktivierende Wirkung auf die Zymogene. Es ist nämlich so weit davon, daß die Kombination NaCl und HCl eine schädigende Wirkung ausübt, daß sie im Gegenteil sogar direkt günstig wirken kann. Ein Beispiel hiervon liefert folgende Beobachtung.

In dem einen der 3 eben angedeuteten Versuchen wurde ein Teil des kochsalzgesättigten Extraktes A direkt dialysiert und die übrige Hauptmasse desselben Extraktes wie gewöhnlich mit NaCl und HCl verarbeitet. In ähnlicher Weise wurde auch die mit gesättigter NaCl-Lösung 1 mal extrahierte feste Masse teils direkt in Wasser dialysiert und teils mit NaCl und HCl behandelt. Die ohne Säurewirkung dargestellten Lösungen A und B wirkten auf Milch wie folgt:

	Bei 20° C.	28° C.	39° C.
A	8 Stunden	190 Min.	145 Min.
B	136 Min.	13 „	6 „
Relation	1 : 3,5	1 : 14,6	1 : 24.

Von jeder Lösung war vorher ein Teil mit Salzsäure genau auf den Säuregrad 0,1% HCl gebracht und 48 Stunden bei Zimmertemperatur gelassen worden. Nach dieser Zeit wurde wieder neutralisiert und gleichzeitig mit den obigen Lösungen mit Milch geprüft. Das Ergebnis war folgendes:

	Bei 28° C.	39° C.
A	16 Min.	6½ Min.
B	5 „	1 „
Relation	1 : 3,2	1 : 6,5.

Die Säure hatte also offenbar eine kräftige Aktivierung, namentlich von A, bewirkt.

Die entsprechenden, durch Einwirkung von NaCl und HCl dargestellten Lösungen wirkten auf Milch wie folgt:

	Bei 28° C.	39° C.
A	11 Min.	5 Min.
B	9 „	3 „
Relation	1 : 1,22	1 : 1,66.

Die nun angeführten Milchgerinnungsversuche sind insofern nicht alle ganz vergleichbar, als zu dem letzten unter ihnen, den ich mehrere Tage später als die zwei anderen ausführte, eine andere Milch verwendet wurde. Die Unterschiede, namentlich bezüglich der Lösung A, sind indessen so höchst bedeutende, daß der Vergleich trotzdem völlig beweisend ist. Bei 28° C. war nämlich die Gerinnungszeit für die nicht mit Säure und Salz behandelte Probe A 179 Minuten und bei 39° C. 140 Minuten länger als für die durch kombinierte Salz- und Säurewirkung dargestellte, entsprechende Lösung, für welche die Gerinnungszeiten resp. 11 und 5 Minuten waren. Dieser Versuch scheint mir deshalb auch ein schlagender Beweis dafür zu sein, daß die nach dem neuen Verfahren aufgehobene Parallelität nicht durch einen schädigenden Einfluß der kombinierten NaCl-HCl-Wirkung zu erklären ist.

In dem nun erwähnten Falle wirkte das mit Wasser allein, ohne Säurewirkung, erhaltene Extrakt sehr langsam auf

Milch; aber in einem anderen Falle, wo ich von einem anderen Rohmaterial ausging, aber sonst in ganz derselben Weise arbeitete, wirkte das entsprechende, nicht mit Säure vorbehandelte Extrakt kräftig labend, und die Resultate können also bei Anwendung von verschiedenem Ausgangsmaterial etwas wechseln. Dies macht sich besonders merkbar, wenn man mit Mägen von Tieren verschiedenen Alters arbeitet. So erhielt ich z. B. bei dem gewöhnlichen Verfahren (kombinierte NaCl-HCl-Behandlung) aus dem Magen einer alten Kuh, die mehrere Male gekalbt hatte, eine Enzymfraktion A, die eine kräftige, sowohl Chymosin- wie Pepsinwirkung zeigte, während die Fraktion B eine fast unwirksame Lösung lieferte. Nach 48stündiger Einwirkung von 0,1% HCl war die Lösung fortwährend fast unwirksam, und sie enthielt also fast weder Zymogen noch Enzym, ein Verhalten, das ich nie bei Kälbern beobachtet habe. Die mit Wasser ausgewaschene Fraktion B gab dagegen nach Einwirkung von 0,1% HCl eine sowohl bezüglich der Chymosin- wie der Pepsinwirkung kräftige Lösung.

In einem anderen Falle, wo ich den Magen eines 13 Monate alten Stierkalbes nach der NaCl Methode verarbeitete, lieferten allerdings die zwei Fraktionen A und B kräftig wirkende Enzymlösungen, aber die Lösung A war, entgegen dem gewöhnlichen Verhalten, sowohl hinsichtlich der labenden wie der verdauenden Wirkung kräftiger als B. Die Relationszahlen waren nämlich:

	Chymosin	Pepsin
A	2,5	> 200
B	1	1

Auch in diesem Falle war aber, wie man ersieht, die Parallelität stark aufgehoben.

Die Zusammenstellung der 4 als Beispiele angeführten Versuche (S. 120) zeigt übrigens, daß auch bei jungen Kälbern die Relation zwischen Chymosin- und Pepsinwirkung recht bedeutend schwanken kann. In wieweit dies von einem verschiedenen Alter der Tiere, verschieden langer Zeit nach der Nahrungsaufnahme oder von anderen Verhältnissen abhängt, habe ich nicht zum Gegenstand einer besonderen Untersuchung

gemacht, und ich habe nur die Aufmerksamkeit auf diese Wechsélungen lenken wollen. Für das Hauptergebnis sind sie ohne Bedeutung; denn trotz solcher Wechsélungen habe ich noch in keinem Falle die durch mein neues Verfahren aufgehobene Parallelität vermißt.

Man kann, wie bekannt, die Parallelität zwischen Pepsin- und Chymosinwirkung in verschiedener Weise aufheben. Die zwei ältesten Methoden sind: 1. Fällung mit Magnesia, wobei die Pepsinwirkung verloren geht, und 2. Erwärmen der sauren Infusion während passender Zeit, wobei die Pepsinwirkung bei aufgehobener Chymosinwirkung erhalten bleiben kann. Gegen diese Methoden hat man eingewendet, daß sie eine Schädigung oder Veränderung der Enzyme bewirken oder vielleicht zu der Entstehung von unbekanntem, hemmenden Stoffen Veranlassung geben könnten, Einwendungen, deren Berechtigung experimentell noch nicht hinreichend geprüft worden ist. Ähnliche Einwendungen kann man dagegen nicht gegen die 3 neueren Methoden: die fraktionierte Dialyse nach Rakoczy,¹⁾ die von mir angewandte Ausfällung mit Casein²⁾ und mein in diesem Aufsätze geschildertes, neues Verfahren erheben. Nach der Caseinmethode kann man leicht eine sehr starke Aufhebung der Parallelität erreichen; aber es bleiben hier große Mengen von Caseinspaltungsprodukten in der Flüssigkeit gelöst, und dies erschwert in gewissen Fällen die weitere Anwendung der nach diesem Verfahren erhaltenen Enzymlösungen. Das Caseinverfahren hat also seinen wesentlichen Wert als einfaches Mittel die Parallelität aufzuheben, während das neue Verfahren nicht nur ein gutes derartiges Mittel ist, sondern auch Enzymlösungen liefert, die verhältnismäßig arm an festen Stoffen sind und dementsprechend zu verschiedenen Untersuchungen sich eignen. Das Verfahren von Rakoczy ist auch gut, aber ich habe nach ihm nie eine so starke Aufhebung der Parallelität wie mit meinem neuen Verfahren erreicht.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 68, S. 421.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 74, S. 142.

Bezüglich dieses Verfahrens will ich noch hinzufügen, daß das mit NaCl und HCl erhaltene, getrocknete und pulverisierte Rohenzym allem Anscheine nach während der Aufbewahrung schwerlöslicher wird und dementsprechend auch nicht so kräftig wirkende Enzymlösungen wie das frisch bereitete oder nur kurze Zeit aufbewahrte Rohenzym gibt. Für die Fraktion A habe ich allerdings in dieser Hinsicht keine direkte Erfahrung, denn die Mengen dieser Fraktion waren regelmäßig so klein, daß sie rasch verbraucht wurden. Bei Verarbeitung der Fraktion B habe ich dagegen aus einige Monate alten Präparaten nie so kräftig wirkende Enzymlösungen wie aus denselben frisch bereiteten Präparaten erhalten, und dies deutet nach meiner Ansicht darauf hin, daß die Präparate bei längerer Aufbewahrung an Wirksamkeit verlieren. Ich bereite auch regelmäßig meine Enzymlösungen nur wenige Tage oder eine Woche nach der Darstellung des Rohenzymes.

In dem nun beschriebenen Verfahren zur Aufhebung der Parallelität zwischen Chymosin- und Pepsinwirkung sehe ich einen neuen Grund für die Annahme, daß in dem Kalbsmagen zwei verschiedene wenn auch nahe verwandte Enzyme, Chymosin und Pepsin, vorhanden sind. Diese Enzyme wirken, wie besonderé, noch nicht veröffentlichte Versuche an Caseinlösungen gezeigt haben, beide proteolytisch, aber unter verschiedenen äußeren Bedingungen, indem nämlich ihre Wirksamkeit in erster Linie an eine verschiedene Reaktion, aber auch, wie es scheint, z. Teil an eine verschiedene Temperatur gebunden ist.
