

# Studien über Chymosin- und Pepsinwirkung.

## III. Mitteilung.

### Über die verschiedene Empfindlichkeit des Pepsins und des Chymosins gegen Alkali.

Von

Olof Hammarsten.

(Der Redaktion zugegangen am 18. Mai 1915.)

Die Empfindlichkeit der Magenenzyme gegen Alkali ist schon seit längerer Zeit bekannt, und für das Chymosin habe ich<sup>1)</sup> dieselbe schon im Jahre 1872 gezeigt. Ich hatte gefunden, daß die Geschwindigkeit, mit welcher das Chymosin durch Alkali zerstört wurde, von mehreren Umständen, wie von der Temperatur, der Dauer der Einwirkung und der Konzentration der Enzymlösung abhängig war; aber ich hatte keine mehr eingehenden Untersuchungen hierüber gemacht. Viele Jahre später (1898) hat Lörcher<sup>2)</sup> diese Frage etwas mehr eingehend untersucht. Er vermischte gleiche Volumina von einem Säurelabextrakt (Kalb) mit gleichen Volumina Natronlauge von bekannter Konzentration, neutralisierte nach verschieden langer Zeit und prüfte dann mit Milch bei 37° C. Er fand hierbei, daß in einem Falle ein Zusatz von  $n/100$ -NaOH eine kaum merkbar schädigende Wirkung im Laufe von 60 Minuten ausübte, während das Vermischen mit  $n/10$ -Lauge schon nach 5 Minuten so stark schädigend gewirkt hatte, daß die Gerinnungszeit 41 Minuten gegen 7 Minuten in der nicht alkali-behandelten Probe betrug. In einem anderen Falle war schon nach Beimengung von  $n/500$ -Lauge eine beträchtliche Schädigung zu bemerken. In diesem Falle war aber das Labextrakt schon

<sup>1)</sup> Upsala Läkareförenings Förhandlingar. Bd. 8, S. 63, 1872—73.

<sup>2)</sup> Pflüger, Arch. f. d. ges. Physiol., Bd. 69, S. 141.

von Anfang an so schwach, daß die Kontrollprobe erst nach 60 Minuten labend wirkte.

Seine Untersuchungen führten ihn zu dem Schlusse, daß Alkali das Lab zerstört, und zwar um so rascher und vollständiger, je schwächer die Lablösung ist, je höher die Konzentration des Alkalis ist und je länger das Alkali einwirkt, und ferner: daß ein Labextrakt von mittlerer Wirksamkeit durch Zusatz eines gleichen Volumens NaOH von  $\frac{1}{10}$  bis  $\frac{1}{5}$  im Verlauf von Minuten fast ganz, nach Stunden vollständig zerstört wird. Dies ist ein bedeutender Alkaligehalt der Lösung und viel größer als der von mir früher benutzte, 0,025% Na<sub>2</sub>O, durch welchen selbst kräftig wirkende Lablösungen im Laufe von 24 Stunden unwirksam wurden. Was man unter mittlerer Wirksamkeit der Lablösungen zu verstehen hat, ist etwas zweifelhaft; es ist aber jedenfalls von Interesse, daß eine Lösung, die so schwach wirkte, daß sie Milch erst nach 7 Minuten bei 37° C. koagulierte, in einer Stunde bei einem Gehalte von 0,020% NaOH nicht wesentlich geschädigt wurde. Dies zeigt, daß das Chymosin, wenigstens unter Umständen, lange nicht so empfindlich gegen Alkali ist, wie einige Forscher behauptet haben.

Einen weiteren Beweis hierfür findet man in der Arbeit von Bang<sup>1)</sup> über Parachymosin. Er hat nämlich einen Versuch (XIII) als Beispiel von der verschiedenen Resistenz des Chymosins und Parachymosins gegen Alkali mitgeteilt, in welchem beide Proben der Einwirkung von 0,01% Alkali ausgesetzt wurden. Die Probe mit Chymosin koagulierte nach halbstündiger Einwirkung des Alkalis in 5 Minuten, wie vor dem Alkalizusatz, und nach 1 stündiger Einwirkung war die Koagulationszeit 6½ Minuten. Ein Gehalt von 0,01% Alkali hatte also im Laufe von einer Stunde keine wesentlich schädigende Wirkung auf das Chymosin ausgeübt.

In schroffem Widerspruch zu diesen Beobachtungen von einer relativ nicht unbedeutenden Resistenz des Chymosins gegen Alkali stehen die Angaben von Pawlow und Parastschuk<sup>2)</sup> über die große Empfindlichkeit des Enzymes gegen

<sup>1)</sup> Pflüger, Arch. f. d. ges. Physiol., Bd. 79.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschr., Bd. 42, S. 415.

Alkali. Nach ihnen hatte sogar sehr vorsichtige Neutralisation mit  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , welche nie über die neutrale Reaktion herausging, stets Zersetzung des Fermentes zur Folge, und nur bei Neutralisation mit  $\text{NaHCO}_3$  konnte das Ferment unversehrt erhalten werden. Da nun ferner (nach Pawlows Vermutung) die meisten Forscher nicht nur nicht für ideale Neutralisation sorgten, sondern vielmehr ein Überwiegen der alkalischen Reaktion zuließen, in der Absicht, die Koagulation infolge der Fermentwirkung von derjenigen infolge von Säureeinwirkung streng zu trennen, so mußte nach ihm unbedingt weitgehende Zerstörung des Fermentes stattfinden (S. 434). Dies soll auch eine der beiden Ursachen sein, warum ich in meinen Versuchen mit im Brutschrank längere Zeit erwärmten, sauren Infusionen die proteolytische Wirkung unversehrt fand, während die milchkoagulierende verschwunden war.

Wenn dem nun so ist und wenn auch viele andere Forscher keine ideale Neutralisation ausführen können, sondern ein Überwiegen der alkalischen Reaktion zulassen, wie soll man dann nach Pawlow erklären, daß die so fehlerhaft neutralisierten Kalbsmageninfusionen trotzdem monatelang mit anscheinend unverminderter Kraft auf Milch koagulierend wirken?

Die Erklärung habe ich in einem früheren Aufsätze gegeben.<sup>1)</sup> Ich habe nämlich dort gezeigt, daß die Enzyme beim Kalb und sich beim Hunde ganz verschieden verhalten, und daß das typische Chymosin des Kalbes nicht beim Hunde vorkommt. Die Beobachtungen von Pawlow und Parastschuk können also für die Frage von der Empfindlichkeit des typischen Chymosins (vom Kalb) gegen Alkali nicht in Betracht kommen. Ich will hier nur noch einmal hervorheben, daß die mit Alkali ( $\text{NaOH}$ ) bis auf Neutralität gegen rotes, violettes und blaues Lackmuspapier versetzten Kalbsmageninfusionen monatelang bei Zimmertemperatur unter Toluol aufbewahrt werden können, ohne wesentlich an Wirksamkeit einzubüßen. Neutralisiert man mit  $\text{CaCO}_3$ , so reagiert das Filtrat regelmäßig sehr schwach alkalisch; aber trotzdem sind auch solche Lösungen sehr halt-

<sup>1)</sup> Vergleichende Untersuchungen über Pepsin- und Chymosinwirkung bei Hund und Kalb. Diese Zeitschr., Bd. 68.

bar und ich habe eine solche, unter Toluol aufbewahrte Infusion, die seit September 1913, also mehr als 20 Monate im Laboratoriumszimmer, sogar während der heißen Sommermonate des vorigen Jahres, gestanden hat und die noch die Milch bei 38° C. in 20—30 Sekunden koaguliert.

Man kann allerdings, wie oben gesagt, auch das Kalbschymosin mit Alkali zerstören, aber die Empfindlichkeit desselben gegen Alkali bei Zimmertemperatur ist, wenigstens solange es sich um Infusionen handelt, bei weitem nicht so groß, wie einige Forscher annehmen.

Daß die Verhältnisse bei höherer Temperatur anders liegen ist offenbar und allgemein bekannt. Nach v. Dam<sup>1)</sup> soll die Empfindlichkeit des Chymosins gegen Alkali bei etwas höherer Temperatur eine so große sein, daß er sogar eine Zerstörung desselben durch die Hydroxylionen der Milch annimmt. Auf diese, gewiß recht zusagende aber nicht bewiesene Annahme brauche ich nicht hier des Näheren einzugehen, da meine unten zu besprechenden Versuche nur für das Verhalten des Chymosins zu Alkali bei Zimmertemperatur gelten.

Besondere Untersuchungen über das Verhalten des Pepsins zu Alkalien sind mir nicht bekannt, indem man bei den Alkaliversuchen meistens Pepsin und Chymosin als dasselbe Enzym betrachtet hat. Einige hierher gehörenden Beobachtungen findet man indessen bei Pawlow und Parastschuk und bei Gewin.

Pawlow und Parastschuk<sup>2)</sup> haben die erste Phase meiner Methode zur Trennung der beiden Enzyme mit MgCO<sub>3</sub> nachgeprüft und eine Abschwächung beider Wirkungen, welche sie als eine Alkaliwirkung des Magnesiumsalzes deuteten, gefunden. Hierbei fanden sie regelmäßig eine viel stärkere Abschwächung der proteolytischen als der milchkoagulierenden Wirkung; sie konnten aber durch ein besonderes Verfahren eine Reaktivierung der proteolytischen Wirkung hervorbringen. Dieses Verfahren bestand darin, daß sie das nach Schütteln

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

<sup>2)</sup> l. c., S. 439—443.

mit  $\text{MgCO}_3$  erhaltene, alkalisch reagierende Filtrat nicht unmittelbar ansäuerten, sondern erst neutralisierten und dann einige Stunden später mit Säure versetzten. Ich erwähne dies schon hier, weil ich bei Besprechung meiner eigenen Versuche zu dieser Art von Ansäuerung zurückkommen muß. Pawlow und Parastschuk teilen nun leider nur einen, nach diesem Verfahren ausgeführten Versuch (Tabelle XVI) mit, und in diesem findet man, daß die milchkoagulierende Wirkung stärker als die proteolytische durch die Behandlung mit  $\text{MgCO}_3$  abgeschwächt war. Die proteolytische Wirkung war nämlich  $\frac{1}{13}$  und die milchkoagulierende  $\frac{1}{48}$  von der des ursprünglichen, mit  $\text{NaHCO}_3$  neutralisierten Magensaftes. Das Resultat war also das Gegenteil von dem, was sie in den nicht reaktivierten Filtraten von dem  $\text{MgCO}_3$ -Niederschlage beobachtet hatten. Dieser Versuch hat übrigens nur ein untergeordnetes Interesse für die hier vorliegende Frage, indem nämlich der Hundemagensaft kein typisches Chymosin enthält.

Ein größeres Interesse haben die Versuche von Gewin,<sup>1)</sup> indem zu ihnen ein gereinigtes Kalbsmagenenzym diente. Die Stärke des Alkalis und die Dauer der Einwirkung sind allerdings für die nun zu erwähnenden Versuche nicht speziell angegeben, allem Anscheine nach war aber, wie in mehreren anderen, die erstere 0,01% NaOH und die Einwirkungsdauer  $\frac{1}{2}$  Stunde. In einem Versuche, in welchem die ursprüngliche Gerinnungszeit  $3\frac{1}{2}$  Minuten und die verdaute Eiweißmenge in 20 Stunden 15,20 mm war, hatte das Alkali beide Enzymwirkungen vernichtet. Ein ähnliches Resultat findet man auch in einem zweiten Versuche. In einem dritten, in welchem das Enzym, wie es schien, stärker verunreinigt war, wurde dagegen die proteolytische Wirkung stärker als die milchkoagulierende herabgesetzt. Die ursprüngliche Gerinnungszeit war nämlich  $3\frac{1}{2}$  Minuten, die nach Alkalibehandlung dagegen  $6\frac{1}{2}$  Minuten. Die verdaute Eiweißmenge in mm in 5 Stunden war aber vor der Alkalibehandlung 2,25 und nach derselben 0,81. In abgerundeten Zahlen war also die Relation zwischen Chymosinwirkung = 1 : 1,9 und zwischen Pepsinwirkung = 1 : 8.

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 54, S. 32.

Außer den nun referierten kenne ich keine Versuche, welche die gesonderte Einwirkung von Alkali auf Chymosin und Pepsin einigermaßen berühren, und die nun erwähnten Resultate sind nur wenig belehrend. Aus dem Grunde finde ich es angemessen, die Resultate meiner Untersuchungen über diese Frage mitzuteilen.

Die Veranlassung zu denselben war ein Versuch mit 2 Infusionen; die eine war eine Kalbsmageninfusion und die andere eine Infusion auf den Magen einer alten Kuh. Jene enthielt 0,147% HCl und 0,723% organische Substanz, die letztere, die Kuhmageninfusion, enthielt 0,144% HCl und 0,702% organische Stoffe. Beide wurden mit  $\text{CaCO}_3$  neutralisiert, filtriert, mit Toluol versetzt und bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Bei 38—39° C. koagulierte die Kalbsinfusion Milch in etwa 20 Sekunden oder richtiger in nicht genau bestimmbarer Zeit. Die Kuhinfusion koagulierte dieselbe Milch in 8 Minuten. Es wurden nun diese beiden Infusionen bei 40° C. erwärmt und teils nach 30 Minuten und teils nach 1 1/2 Stunden mit derselben Milch geprüft. Das Resultat war folgendes.

Nach 1/2 Stunde:	Kalb etwa 20 Sek.	Kuh 31 Minuten.
„ 1 1/2 „	Kalb 40—45 „	Kuh 3 Stunden 27 Min.

Das Enzym der Kuhinfusion war also viel empfindlicher als das Kalbsenzym, welches nur sehr wenig abgeschwächt worden war. Ganz anders war aber das Resultat bei Prüfung der Pepsinwirkung. Um die hemmende Wirkung des  $\text{CaCl}_2$  zu vermindern, wurde von jeder Probe 1 ccm mit je 5 ccm HCl von 0,1% verdünnt und, der Kontrolle halber, in derselben Weise mit den nicht erwärmten entsprechenden,  $\text{CaCl}_2$ -haltigen Infusionen verfahren. Dann wurde mit Karminfibrin geprüft. In den Kontrollproben fing die Verdauung nach 1—2 Minuten an, während in den beiden auf 40° erwärmten Proben erst nach gegen 1 Stunde eine beginnende Verdauung zu sehen war. In der Kuhinfusion war also sowohl die milchkoagulierende wie die proteolytische Wirkung sehr stark abgeschwächt worden, während in der Kalbsinfusion zwar die proteolytische Wirkung sehr stark herabgesetzt, die milchkoagulierende dagegen nur auf gegen die Hälfte vermindert war. Beide Infusionen reagierten

nach der Neutralisation mit  $\text{CaCO}_3$  und nach dem Entfernen der  $\text{CO}_2$  alkalisch, und die Annahme lag also nahe zur Hand, daß das Pepsin und Chymosin eine verschiedene Widerstandsfähigkeit gegen Alkali zeigen.

Diese Annahme gewann an Wahrscheinlichkeit durch einige weitere Versuche mit Kalbsmageninfusionen, die mit  $\text{CaCO}_3$  neutralisiert wurden, wenn auch sowohl die Stärke der alkalischen Reaktion wie die Resultate etwas wechselten. Da indessen die Gegenwart von  $\text{CaCl}_2$  die Versuchsergebnisse kompliziert und störend wirkt, schien mir die obige Versuchsanordnung zur Erforschung dieser Frage recht ungeeignet zu sein und darum entschloß ich mich, zu Versuchen mit  $\text{NaOH}$  statt mit  $\text{CaCO}_3$  zu übergehen.

Die wechselnden Resultate, die man bei der Einwirkung von Alkali auf Lösungen von Verdauungsenzymen erhalten hat, stehen unzweifelhaft in naher Beziehung zu der mehr oder weniger starken Verunreinigung der Enzyme mit anderen Stoffen und besonders mit Eiweiß, welches bekanntlich sowohl Säuren wie Alkalien bindet und hierdurch schützend wirken kann. Es ist deshalb zu bedauern, daß man fortwährend im allgemeinen es überflüssig findet, Angaben über den Gehalt der Enzymlösungen an Eiweiß, oder, was hier beinahe dasselbe bedeutet, an festen organischen Stoffen mitzuteilen. Dies erschwert nämlich sehr die Beurteilung der Resultate; und man kann in gewissen Fällen die Vermutung nicht zurückweisen, daß, was man als hemmende oder schützende Stoffe angenommen hat, nichts anderes als Eiweiß gewesen sei. Es ist deshalb bei Enzymuntersuchungen überhaupt (in vielen Fällen) und ganz besonders bei Untersuchungen über die Einwirkung von Säuren und Alkalien von Wichtigkeit, mit eiweiß- oder stoffarmen Enzymlösungen arbeiten zu können. Aus dem Grunde habe ich auch, bevor ich zu den Untersuchungen über die Alkalieinwirkung überging, mich bemüht, eine Methode zur Gewinnung von solchen Lösungen auszuarbeiten. Dieser Aufsatz enthält dementsprechend zwei Abschnitte. Der erste betrifft die Darstellung der Enzymlösungen und der zweite die Einwirkung von Alkali auf dieselben.

### A. Darstellung von eiweißarmen aber kräftig wirkenden Enzymlösungen.

Ein wichtiges Mittel zur Entfernung eines großen Teiles der festen Stoffe ist bekanntlich die Dialyse, und dieses Mittel habe ich auch selbstverständlich in erster Linie versucht. Ich muß jedoch zugestehen, daß ich mit diesem Verfahren nicht ganz zufrieden bin, denn es hat sich mehrmals ereignet, daß die Wirksamkeit einer Infusion während oder infolge der Dialyse recht bedeutend abnahm. Die Dialyse fand in diesen Fällen in Pergamentpapierschläuchen unter Toluolzusatz gegen destilliertes Wasser statt. Es ist schwer, ganz gute Pergamentpapierschläuche zu erhalten, und der Grund meiner weniger guten Resultate liegt vielleicht darin, daß die von mir benutzten Schläuche auch den Durchgang eines Teiles der Fermente gestatteten. Es war leichter ein gutes Pergamentpapier zu erhalten, und aus dem Grunde verfähre ich lieber bei der Dialyse nach dem in meinem vorigen Aufsätze angegebenen Verfahren. Dieses Verfahren konnte ich aber bei den hier in Frage kommenden großen Flüssigkeitsmengen nicht brauchen. Durch die Dialysemethode konnte ich übrigens den Gehalt an festen Stoffen nicht unter gegen 0,05% herabbringen, während ich nach der unten zu beschreibenden Methode Lösungen mit sogar nur 0,012% festen Stoffen gewinnen konnte.

Die großen Mengen destillierten Wassers, die zu der Dialyse nötig waren, und ebenso das notwendige Wechseln des Wassers veranlaßten mich, auch die Dialyse gegen fließendes Wasser zu versuchen. Von diesem Verfahren mußte ich aber aus mehreren Gründen bald Abstand nehmen. Die nach diesem Verfahren dialysierten Infusionen (die, wie auch bei der Dialyse gegen destilliertes Wasser, von Anfang an sauer waren) enthielten nämlich immer mehr feste Stoffe als die gegen destilliertes Wasser dialysierten; sie reagierten ferner immer sehr schwach alkalisch und hatten Kalksalz aus dem Leitungswasser<sup>1)</sup> aufgenommen. Hierzu kommt ferner, daß die Relation

<sup>1)</sup> Das hiesige Leitungswasser enthält nach einer Analyse im Jahre 1895 in 100 000 Teilen 10,1 CaO und 2,0 MgO.

zwischen Pepsin- und Chymosinwirkung eine andere bei Dialyse gegen Leitungswasser als gegen destilliertes Wasser war und daß die Parallelität also während der Dialyse aufgehoben wurde. Um dies zu beleuchten, erlaube ich mir, als Beispiel die Resultate eines der von mir ausgeführten Versuche hier ganz kurz anzuführen.

Eine saure Kalbsmageninfusion wurde in zwei Hälften geteilt und beide Hälften 3 Tage (d. h. 3 mal 24 Stunden) dialysiert, die eine, D, gegen destilliertes und die andere, L, gegen fließendes Leitungswasser. In beiden entstand ein Niederschlag, der abfiltriert wurde. Die Filtrate verhielten sich folgendermaßen: D reagierte neutral und enthielt 0,050% feste Stoffe, während L äußerst schwach alkalisch reagierte und 0,186% feste Stoffe enthielt. Mit Ammoniumoxalat gab D keine Reaktion, während L eine ziemlich starke Trübung von Calciumoxalat gab. Die Milchgerinnungsprobe sowohl mit den neutralen wie mit den angesäuerten Lösungen (0,1% HCl) gab bei verschiedenen Temperaturen für die Chymosinmengen die Relation  $D : L = 9 - 13 : 1$ . Die Pepsinprobe, teils nach Mett und teils mit Karminfibrin ausgeführt, gab für die Pepsinmenge rund folgende Relation:  $D : L = 1 : 4$ . Die Relationszahlen waren also folgende:

	Chymosin	Pepsin
D	9—13	1
L	1	4

In den übrigen 5 Versuchen war ebenfalls die Parallelität aufgehoben, wenn auch nicht so stark wie in dem nun angeführten Beispiele. Die Dialyse gegen fließendes Wasser ist eine sehr gewöhnliche Operation, die man wohl als ganz indifferent bezeichnet; die Beschaffenheit und namentlich der Kalkgehalt des Leitungswassers dürften jedoch in gewissen Fällen nicht ganz bedeutungslos sein, und nach meiner Erfahrung sollte man dieses Verfahren nicht ohne gebührende Kritik und ohne Vorsicht gebrauchen. Für meine Untersuchungen war es jedenfalls unbrauchbar.

Das von Pekelharing<sup>1)</sup> ausgearbeitete Verfahren zur Darstellung eines reinen Pepsins basiert ebenfalls zum Teil auf

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 22, S. 233 und Bd. 35, S. 8.

der Dialyse; aber es ist verhältnismäßig beschwerlich und zeitraubend und paßt besser für die Verarbeitung von Schweinsals von Kalbsmägen. Es liefert zweifelsohne ein kräftig wirkendes Enzympräparat, aber dieses ist, wie sowohl Pikelharing selbst wie Gewin<sup>1)</sup> hervorgehoben haben, von wechselnder Reinheit. Es ist nicht farblos, es enthält das eine Mal mehr, das andere Mal weniger oder keinen Phosphor, und außerdem hat Gewin gefunden, daß es nicht dem Zeitgesetze gemäß wirkt. Da das Schweinsenzym kein typisches Chymosin enthält, und da die Anwendung der Methode bei Verarbeitung von Kalbsmägen weniger geeignet ist, war aus mehreren Gründen auch dieses Verfahren nicht empfehlenswert.

Ich schlug deshalb einen ganz anderen Weg ein, und der Ausgangspunkt meines Verfahrens war die folgende Beobachtung.

Wenn man eine saure Kalbsmageninfusion genau neutralisiert, so entsteht immer ein Niederschlag, von dem die sehr kräftig wirkende neutrale Flüssigkeit klar abfiltriert werden kann. Ich versuchte den auf dem Filtrum gesammelten Niederschlag mit Wasser auszuwaschen, um ihn dann hinsichtlich seiner labenden und proteolytischen Wirkung untersuchen zu können, fand aber hierbei, daß er nicht in Wasser ganz unlöslich, sondern wenigstens zum Teil löslich war. Gleichzeitig fand ich, daß das Washwasser kräftig milchkoagulierend wirkte, und ich entschloß mich deshalb, den Niederschlag, seine Wirkung und sein Verhalten zu Wasser etwas mehr eingehend zu studieren.

Das Ergebnis dieser vorbereitenden Untersuchungen war, daß der fragliche Niederschlag, in Wasser aufgeschlemmt, sehr kräftig milchkoagulierend und gleichzeitig auch proteolytisch wirkte. Ähnlich, wenn auch nicht ganz so kräftig wirkte auch die von dem aufgeschlemmten Niederschlage abfiltrierte Flüssigkeit. Sie koagulierte die Milch bei Brutwärme innerhalb einer nicht genau bestimmbaren Zeit. Da der Niederschlag von allen bei der Neutralisation nicht fällbaren Bestandteilen der Infusionen frei und nur zum Teil in Wasser löslich ist, schien mir diese Fällung ein sehr geeignetes Material zur Darstellung

<sup>1)</sup> I. c. S. 36.

von kräftig wirkenden, an festen Stoffen armen Enzymlösungen zu sein. Dies wurde durch die fortgesetzten Untersuchungen vollauf bestätigt, und das Prinzip des neuen Darstellungsverfahrens gestaltet sich demnach außerordentlich einfach. Die Methode besteht nur darin, daß man die Infusion genau neutralisiert, die Fällung abzentrifugiert, den Bodensatz mit Wasser vorsichtig abspült, in Wasser fein zerreibt und in einer größeren Menge Wasser aufschlemmt. Die nach einiger Zeit abfiltrierte Flüssigkeit, deren Gehalt an festen Stoffen in verschiedenen Versuchen zwischen 0,012 und 0,040% schwankte, stellt die fertige Enzymlösung dar.

Um das Verfahren etwas näher zu beleuchten führe ich hier ein Beispiel an.

Die, wie gewöhnlich bereitete, saure Kalbsmageninfusion hatte den Säuregrad 0,1% HCl und enthielt 0,542% feste Stoffe. Es wurden 300 ccm abgemessen, mit ein paar Tropfen Lackmoidtinktur versetzt und dann mit Natronlauge von etwa 1% größtenteils neutralisiert. Die vollständige Neutralisation geschah darauf durch Zusatz von Lauge, bis die Reaktion mit blauem, rotem und neutralem Lackmuspapier als völlig neutral sich erwies. Die von einer feinen Fällung stark getrübe Flüssigkeit blieb etwa 20 Stunden stehen und wurde dann zentrifugiert. Der Bodensatz, dessen Menge, wie eine spätere Untersuchung zeigte, etwas mehr als 0,2 g betrug, bildete eine feste, blaugefärbte Masse, von der die Flüssigkeit leicht und vollständig getrennt werden konnte, und die übrigens so fest war, daß man sie ohne Verluste mit Wasser vorsichtig abspülen konnte. Die Masse wurde nun mit Wasser fein zerrieben und in 400 ccm Wasser aufgeschlemmt.

Die Flüssigkeit ähnelte einer homogenen, sehr dünnen Emulsion und hatte, abgesehen von der bläulichen Farbe, das Aussehen einer mit Wasser sehr stark verdünnten Milch. Die Menge der festen Stoffe in dieser Emulsion war 0,050%, und hieraus wurde die obige Menge von ungefähr 0,2 g Bodensatz berechnet. Diese trübe Flüssigkeit, welche kräftig milchkoagulierend wirkte, wurde nun filtriert. Sie ging anfänglich etwas opalisierend durch das Filtrum, nach wiederholtem Zurück-

gießen des Filtrates auf das letztere erhielt ich jedoch zuletzt ein vollständig wasserhelles, ungefärbtes Filtrat, das in einer Flasche unter Toluol aufbewahrt wurde.

Diese filtrierte Enzymlösung enthielt 0,013% feste Stoffe. Sie koagulierte Milch in dem Verhältnisse 1 : 10 in etwa 45 bis 50 Sekunden bei 37° C. und nach 2 Minuten 15 Sekunden bei 27½° C. Trotz des sehr geringen Gehaltes an festen Stoffen zeigte sie also eine kräftige Chymosinwirkung. Die Pepsinwirkung war, wie überhaupt beim Verarbeiten der Mägen von neugeborenen Kälbern, schwächer, indem bei der Mettschen Probe im Laufe von 20 Stunden bei etwa 36° C. nur 2 mm verdaut wurden.

Die obengenannte, neutralisierte, von dem Bodensatze nach dem Zentrifugieren getrennte, klar filtrierte Infusion wirkte fast noch etwas stärker labend als die Enzymlösung, und die Fällung enthielt also nur einen Teil der in der ursprünglichen Infusion erhaltenen Enzyme.

Nach diesem Verfahren habe ich nun wiederholt Enzymlösungen dargestellt und stets mit gutem Erfolge. Immer wirkten die Lösungen sehr kräftig milchkoagulierend, regelmäßig in weniger als 20 Sek. bis zu 60 Sek. bei Körpertemperatur, und meistens wirkten sie auch kräftiger proteolytisch als in dem als Beispiel angeführten Versuche. Der Gehalt an festen Stoffen ist etwas schwankend, je nach der Menge des Wassers. Beim Aufschlemmen des Niederschlages in Wasser von dem Volumen der in Arbeit genommenen Infusion, also z. B. in 300 ccm Wasser beim Neutralisieren von 300 ccm Infusion, ist die Menge der festen Stoffe etwas größer und bei Anwendung von mehr Wasser, z. B. 400 ccm auf 300 ccm Infusion, etwas kleiner. Im ersteren Falle habe ich höchstens 0,040% feste Stoffe in der filtrierten Enzymlösung gefunden und einige Male 0,025—0,035%; im letzteren Falle schwankte die Menge zwischen 0,012—0,020% und war oft 0,013 oder 0,014%.

Nun kann man bekanntlich Kalbsmageninfusionen sehr stark mit Wasser verdünnen und trotzdem eine kräftig labende Wirkung derselben beobachten. Es fragt sich deshalb, ob es

nicht vielleicht noch einfacher wäre, die Infusionen nur so stark mit Wasser zu verdünnen, daß man Lösungen von dem erwünschten niedrigen Gehalte an festen Stoffen erhielt. Eine solche Verdünnung gibt indessen nicht dasselbe Resultat, wie ich durch vergleichende Versuche mit einer Enzymlösung und der zu ihrer Darstellung benutzten, mit Wasser verdünnten Infusion gefunden habe.

Als Beispiel mag die obige Enzymlösung und die ihr entsprechende Infusion dienen. Von der letzteren wurde ein Teil genau neutralisiert und mit so viel Wasser verdünnt, daß ihr Gehalt an organischer Substanz 0,013% betrug. Auf der anderen Seite wurde in der Enzymlösung ein wenig NaCl gelöst, so daß beide genau denselben Gehalt an NaCl hatten. Die Milchgerinnungsproben bei 26° und 36° C. zeigten, daß die Enzymlösung 3 (bei 26° C.) bis 4,8 (bei 36° C.) Mal stärker als die verdünnte Infusion wirkte. Bei der Mettschen Probe war die Infusion unwirksam und bei der Karminfibrinprobe verdaute die Enzymlösung 6mal stärker als die Infusion. Die Relationszahlen waren also:

	Chymosin	Pepsin
Infusion	1	1
Enzymlösung	3 bis 4,8	6

In einem anderen Versuche mit einer Enzymlösung von 0,025% festen Stoffen wirkte die entsprechend verdünnte Infusion positiv bei der Mettschen Probe; die Enzymlösung wirkte aber viel stärker, und die Pepsinmengen in E und I verhielten sich wie 9 : 1. Die neutrale Enzymlösung wirkte in diesem Falle so kräftig, daß sie bei 29° C. die Milch in 35 Sekunden koagulierte. Es wurden deshalb die Milchproben nur bei den 3 Temperaturen 20°, 26° und 29° C. angestellt. Die Relationszahlen für E und I waren bei diesen Temperaturen resp. 2,5 : 1; 3 : 1 und 3,6 : 1. Auch in diesem Falle wirkte also die Enzymlösung wesentlich kräftiger als die entsprechend verdünnte Infusion, und die Parallelität zwischen Pepsin- und Chymosinwirkung war auch hier, wenn auch nicht besonders stark, aufgehoben. Ein in der Hauptsache ähnliches Resultat gab auch ein dritter vergleichender Versuch mit einer Enzymlösung und der entsprechend verdünnten Infusion.

Es ist selbstverständlich, daß die nach diesem Verfahren dargestellten Enzymlösungen nicht die reinen Enzyme enthalten; sie sind aber jedenfalls frei von allen denjenigen Bestandteilen einer Infusion, welche bei der Neutralisation nicht ausfallen. Die bei der Neutralisation auftretende Fällung, welche Eiweißreaktionen gibt, ist wohl auch als eine von Enzym verunreinigte Eiweißfällung zu betrachten. Man kann die Menge dieser Fällung infolge ihrer teilweisen Löslichkeit in Wasser nicht direkt bestimmen; da man sie aber nach dem Zentrifugieren ohne Verluste aufsammeln und in Wasser fein und homogen verteilen kann, läßt sich ihre Menge trotzdem, wie oben angedeutet, recht gut bestimmen. In meinen Versuchen hat sie 9—12% der organischen Stoffe der verarbeiteten Infusionen betragen. Nun ist diese Fällung nur zum Teil in Wasser löslich, und die fertigen Enzymlösungen (die Filtrate) enthalten also nur einen sehr kleinen Bruchteil der gelösten organischen Bestandteile der Infusionen.

Die fertigen Enzymlösungen enthalten auch unzweifelhaft Eiweiß, wenn auch nur winzige Mengen davon. Diese Lösungen werden beim Sieden nicht verändert, nicht einmal nach möglichst vorsichtigem Zusatz von Säure oder Alkali. Die Lösungen mit dem höchsten Gehalte an festen Stoffen können jedoch beim Sieden und sehr vorsichtigem Säurezusatz etwas bläulich-weiß opalisierend werden. Gegen Eiweißreagenzien verhalten sich übrigens die stoffärmsten Lösungen fast ganz negativ, während die stoffreichsten schwache positive Ausschläge geben. Eine Lösung von mittlerer Konzentration, 0,022% festen Stoffen, verhielt sich wie folgt. Beim Sieden keine Veränderung, selbst nach vorsichtigem Zusatz von sehr kleinen Säuremengen. Die Xanthoproteinsäureprobe gab erst nach Alkalizusatz eine sehr schwach gelbliche Farbe. Biuretprobe nach Zusatz von Lauge und darauffolgendem Zusatz von sehr wenig Kupfersalz negativ; nach Zusatz von Kupfersalz und darauffolgendem Zusatz von Lauge sehr schwach positiv. Die Hellersche Probe nach einigen Minuten schwache Reaktion. Essigsäure und Kaliumferrocyanid negativ; Gerbsäure recht starke Opalescenz ohne Fällung; Phosphorwolframsäure starke Opalescenz ohne Fällung.

Man kann also sagen, daß diese Enzymlösung fast nur Spuren von Eiweiß enthielt.

Die von dem durch Zentrifugieren erhaltenen Niederschlage getrennte, klare, nötigenfalls filtrierte Infusion wirkt noch kräftig auf Milch; und infolge der Eigenschaft der Enzyme, von anderen Stoffen bei deren Ausfällung mit niedergerissen zu werden, kann man aus ihr neue Enzymmengen gewinnen. Wenn man nämlich dieses Filtrat mit Salzsäure bis zu etwa 0,1% HCl ansäuert und mit einer Lösung von Casein oder Acidalbuminat in Salzsäure in passender Menge versetzt, erhält man bei der Neutralisation mit Alkali (NaOH) eine neue Fällung, die man abzentrifugieren kann. Wird nun diese Fällung in Wasser zerrieben und suspendiert, so kann man durch Filtration eine zweite, klare, mehr oder weniger kräftig wirkende Enzymlösung gewinnen. Namentlich bei Anwendung von Casein ist mir dies gut gelungen, während ich bei Anwendung von Acidalbuminat aus Blutserum und besonders aus Fischfleisch nicht so gute Resultate erhielt. Die mittels Casein erhaltenen Enzymlösungen koagulierten Milch in 45—60 Sekunden und verdauten nach Mett 4—5 mm in 20 Stunden. Sie enthielten jedoch gegen 0,1% feste Stoffe.

Ich habe bisher weder Zeit noch besondere Veranlassung gehabt, die Frage von der Ausfällung der Enzyme durch verschiedene Eiweißstoffe weiter zu verfolgen. Da aber auch andere Eiweißstoffe als die in den Infusionen von Anfang an vorhandenen bei ihrer Ausfällung durch Neutralisation die Enzyme mit niederreißen können, glaube ich mich zu der oben ausgesprochenen Annahme berechtigt, daß die bei der Neutralisation einer Infusion auftretende Fällung zum größten Teile aus Eiweiß, welches durch niedergerissenes Enzym verunreinigt ist, besteht. Dies ist um so mehr wahrscheinlich, als keine direkte Beziehung zwischen dem Reichtume einer Infusion an Enzym und der Menge des Neutralisationsniederschlages zu bestehen scheint. Man kann auch Infusionen erhalten, die bei der Neutralisation nur eine spärliche Fällung geben und trotzdem reich an Enzym sind.

Ein solches Verhalten kann man beim Verarbeiten von

Infusionen auf Mägen von etwas älteren Kälbern beobachten. So habe ich z. B. beim Verarbeiten der Mägen von 5—6 Wochen alten Kälbern Infusionen erhalten, die bei der Neutralisation eine viel geringere Fällung als die Infusionen auf Mägen neugeborener Kälber gaben. In einem solchen Falle betrug die Menge des Niederschlages nur 1,6% von der Gesamtmenge der organischen festen Stoffe, während sie in den Infusionen auf Mägen von neugeborenen Tieren zwischen 9 bis 12% schwankte. Der Niederschlag hatte auch ein anderes Aussehen, er war mehr flockig, ließ sich nicht so fein in der Flüssigkeit verteilen und setzte sich als eine mehr grobflockige Fällung leichter zum Boden. In Wasser aufgeschlemmt wirkte er milchkoagulierend in 2 Minuten bei 38°, die klar abfiltrierte Flüssigkeit, welche 0,025% feste Stoffe enthielt, wirkte aber erst nach 11 Minuten. Hier war also meine Methode nicht gut brauchbar; und ich will ausdrücklich hervorheben, daß meine Methode nur für die Mägen neugeborener Kälber ausgearbeitet ist, und daß meine in diesem Aufsätze mitgeteilten Beobachtungen, wenn nichts anderes besonders angegeben wird, nur für Infusionen auf Mägen neugeborener (1—2 Tage alten) Kälber Geltung haben.

Die nun beschriebene Methode ist, wie man ersieht, außerordentlich einfach. Das Verfahren ist dasselbe wie bei der Darstellung einer neutralisierten Kalbsmageninfusion, nur mit der Abweichung, daß man die bei der Neutralisation auftretende Fällung nicht abfiltriert und wegwirft, sondern durch Zentrifugieren aufsammelt und in Wasser fein verteilt. Man erhält also auf der einen Seite eine neutralisierte, kräftig wirkende Infusion und auf der anderen daneben, gleichsam als Nebenprodukt, eine sehr kräftig labend wirkende, eiweißarme Enzymlösung. Die Neutralisation bietet keine Schwierigkeiten, und es ist gar nicht nötig, mit einer stark verdünnten Natronlauge, z. B. einer  $n/10$ -Lauge, zu neutralisieren. Man kann ebenso gut eine stärkere Lauge anwenden, wenn man nur gegen Ende der Neutralisation mit genügender Vorsicht arbeitet. Das Auftreten einer beginnenden Trübung kann als Indikator dienen, und man kann dann nötigenfalls die Neu-

tralisation mittels einer  $\frac{n}{10}$ -Lauge zu Ende führen. Die Endreaktion bestimme ich immer mit blauem, neutralem und rotem Lackmuspapier.

Da der Niederschlag zum Teil in Wasser sich wieder löst, könnte man befürchten, daß ein Teil der Enzyme wieder in Lösung gehen würde, wenn man nicht unmittelbar nach der Neutralisation zentrifugiert, sondern die Flüssigkeit mit der Fällung einige Zeit stehen läßt. Es ist möglich, daß eine solche teilweise Lösung stattfindet, aber sie dürfte jedenfalls nicht bedeutend sein. Ich habe nämlich, selbst wenn ich das Zentrifugieren erst 48 Stunden nach der Neutralisation unternahm, immer aus dem Niederschlage kräftige Enzymlösungen erhalten, und ich trenne nunmehr regelmäßig die Flüssigkeit von dem Niederschlage durch Zentrifugieren erst nach Verlauf von 20—24 Stunden ab.

Wenn man überhaupt nur eine kräftig wirkende, saure Enzymlösung haben will, kann man natürlich den Neutralisationsniederschlag direkt in Verdauungssalzsäure auflösen. Da es aber für mich sehr wichtig war, neutral reagierende, eiweißarme, klare Enzymlösungen zu gewinnen, habe ich stets die in Wasser aufgeschlemmte Fällung, nach gewöhnlich 24 Stunden, abfiltriert. Das Filtrat ist meistens anfangs nicht ganz klar; durch wiederholtes Zurückgießen auf das Filtrum bekommt man es aber zuletzt ganz wasserhell. Noch rascher gelingt dies, wenn man von Anfang an ein doppeltes Filtrum benutzt. Die Enzymlösungen sind immer vollständig ungefärbt und wasserhell. Sie werden unter Toluol aufbewahrt. Wie lange man sie in dieser Weise aufbewahren kann, weiß ich nicht, indem ich sie meistens im Laufe von einigen Tagen oder einer Woche verbraucht habe. Eine Lösung, welche 0,013% feste Stoffe enthielt und 3 Wochen unter Toluol an einem kühlen Orte aufbewahrt worden war, hatte ihre Wirksamkeit nicht merkbar verändert. Neubereitet koagulierte sie Milch bei 38° C. in 70 Sekunden, 14 Tage später in 75 Sekunden und nach 3 Wochen ebenfalls in 75 Sekunden.

Ich glaube also, dieses sehr einfache Verfahren zur Darstellung von eiweißarmen Enzymlösungen, die namentlich sehr

kräftig milchkoagulierend wirken, empfehlen zu können. Infolge ihrer Armut an Eiweiß sind sie zu vielen Untersuchungen sehr geeignet und sie haben mir bei den folgenden Untersuchungen über die Wirkung des Alkalis auf die Enzyme gute Dienste geleistet.

## B. Über die Wirkung von Alkali auf Chymosin und Pepsin.

Zu allen Versuchen sind ausschließlich nach dem obigen Verfahren dargestellte, eiweißarme Enzymlösungen verwendet worden. Das Alkali war immer  $n_{10}$ -NaOH und alle Versuche wurden bei Zimmertemperatur ausgeführt.

Schon der erste Versuch zeigte, daß das Pepsin so überaus empfindlich gegen die Einwirkung von Alkali ist, daß es schon nach wenigen Minuten von einer Alkalimenge unterhalb 0,01 % NaOH zum größten Teile zerstört werden kann, und daß man folglich nur kurzdauernde Versuche anstellen darf. Das Chymosin wird nämlich ebenfalls allmählich angegriffen, aber in viel geringerem Grade, und der Unterschied in dem Verhalten beider kommt deshalb vor allem in den kurzdauernden Versuchen zum Vorschein.

Als Beispiel führe ich den folgenden, orientierenden Versuch an. Die Enzymlösung enthielt 0,040 % feste Stoffe, und von ihr wurden 2 Proben von je 25 ccm abgemessen. Die eine, A, wurde mit 0,5 ccm  $n_{10}$ -Natronlauge versetzt und blieb dann gegen 4 Minuten bei Zimmertemperatur stehen. Dann wurde sie mit 0,5 ccm  $n_{10}$ -HCl neutralisiert. Die andere Probe, die Kontrollprobe K, wurde erst mit 0,5 ccm  $n_{10}$ -HCl versetzt und unmittelbar darauf mit 0,5 ccm  $n_{10}$ -Natronlauge neutralisiert. Die Milchgerinnungsproben wurden in diesem Falle nur bei 39° C. ausgeführt.

A koagulierte die Milch in 30—35 Sekunden, K in etwa 15 Sekunden, und der relative Chymosingehalt war also  $K:A = 2,3 : 1$ .

Beide Proben wurden nun mit Salzsäure bis zu 0,2 % HCl versetzt und nach Mett geprüft. K hatte im Laufe von

20 Stunden 6 mm und nach 44 Stunden 13—14 mm verdaut. A erwies sich dagegen als vollständig unwirksam, und sie wirkte nur außerordentlich schwach auf Karminfibrin. Die Gegenwart von 0,008% NaOH hatte also in etwa 4 Minuten die Pepsinwirkung so stark herabgesetzt, daß die Mettsche Probe negativ ausfiel, während die Chymosinwirkung fortwährend so stark war, daß die Lösung die Milch bei 39° C. in 30—35 Sekunden koagulierte. Die Parallelität zwischen Chymosin- und Pepsinwirkung war also stark aufgehoben.

Außer diesem orientierenden Versuche erlaube ich mir noch 6 andere als Beispiele mitzuteilen. Die Alkalimenge war immer 1 ccm  $n_{10}$ -NaOH auf 50 ccm, bzw. 2 ccm auf je 100 ccm Enzymlösung, also 0,008% NaOH. Die Kontrollprobe, welche überall mit K bezeichnet wird, wurde immer erst mit 1 bzw. 2 ccm  $n_{10}$ -HCl und unmittelbar darauf mit  $n_{10}$ -Natronlauge versetzt. Die der Alkalieinwirkung ausgesetzte Probe wird immer mit A bezeichnet, und wenn in demselben Versuche 2 Proben mit Alkali behandelt wurden, bedeutet A<sub>1</sub> die, einer kurzdauernden und A<sub>2</sub> die, einer mehr langdauernden Einwirkung ausgesetzte Probe. Hinsichtlich der Ausführung der Pepsinproben wird auf meine früheren Aufsätze hingewiesen.

Da die Möglichkeit einer Reaktivierung des Pepsins nach der Alkalieinwirkung nicht ausgeschlossen war, und da Pawlow<sup>1)</sup> in seinen Versuchen an Hundemagensaft mit MgCO<sub>3</sub> eine Reaktivierung nur in dem Falle beobachtete, wenn er die Probe nach der Neutralisation einige Zeit (einige Stunden) stehen ließ, bevor er wieder ansäuerte, habe ich die neutralisierte Probe immer 20—24 Stunden stehen lassen, bevor ich sie für die Pepsinprobe mit Salzsäure versetzte. Dies ist nun allerdings überflüssig, denn die von Pawlow am Hundemagensafte nach Einwirkung von MgCO<sub>3</sub> gemachte Beobachtung trifft für die Kalbsmageninfusionen und für die Kalbsenzymlösungen bei meiner Versuchsanordnung nicht zu. Für die Resultate der Pepsinproben war es nämlich gleichgültig, ob ich bald nach der Neutralisation oder einige Stunden später oder erst am folgenden Tage ansäuerte. Der Sicherheit halber habe ich in-

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 42, S. 415.

dessen immer die neutralisierte Probe erst nach 20—24 Stunden auf den erwünschten Säuregrad (0,1% HCl) gebracht. Um der Säure die zur Reaktivierung nötige Zeit zu geben, habe ich, obwohl auch dies überflüssig zu sein scheint, die angesäuerten Proben immer mindestens 24 Stunden bei Zimmer-temperatur stehen lassen, bevor ich die Pepsinprobe versuchte. Die Kontrollproben K verdauten immer mehr oder weniger gut bei der Mettschen Probe, während die alkalibehandelten Proben A hierbei immer ein negatives Resultat gaben. Aus diesem Grunde referieren sich sämtliche Angaben über Pepsinwirkung zu der Karminfibrinprobe. Nach diesen Vorbemerkungen dürfte es wohl genug sein, in dem Folgenden nur die Hauptresultate der Versuche anzuführen.

Versuch I. Die Enzymlösung enthielt 0,035% feste Stoffe. Dauer der Alkalieinwirkung in A 7 Minuten.

Die Milchgerinnungsprobe gab folgendes Resultat:

	Bei 20° C.	24° C.	29° C.	38° C.
K	22 Min.	3 Min.	60 Sek.	25 Sek. (ungefähr)
A	28 „	5 „	110 „	55 „
Relation K : A	1,3 : 1	1,7 : 1	1,8 : 1	2,2 : 1

Da hier, wie im allgemeinen wenn der Unterschied im Enzymgehalte nicht groß ist, die Verhältniszahlen bei verschiedenen Temperaturen ziemlich nahe aneinander liegen, dürfte es erlaubt sein, mit der Mittelzahl, hier rund 1,8 : 1, zu rechnen.

Die Pepsinprobe mit Karminfibrin ergab, daß K  $\frac{1}{200}$  ein wenig schwächer, aber K  $\frac{1}{150}$  entschieden stärker als A verdaute. Die Verhältniszahlen waren also:

	Chymosin	Pepsin
K	1,8 (Mittel)	> 150
A	1	1

Durch die Alkalieinwirkung war also die Chymosinwirkung auf etwa  $\frac{1}{2}$  und die Pepsinwirkung auf reichlich  $\frac{1}{150}$  herabgesetzt worden.

Versuch 2. Die Enzymlösung enthielt 0,040% feste Stoffe. In diesem Versuche war die Alkalieinwirkung in A<sub>1</sub> 1 Minute und in A<sub>2</sub> 7 Minuten.

Die Milchgerinnungsversuche gaben folgende Resultate:

	Bei 20° C.	27 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> ° C.	30° C.
K	62 Min.	2 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> Min.	55 Sek.
A <sub>1</sub>	70 „	4 „	80 „
A <sub>2</sub>	126 „	6 „	140 „

Die Relation K : A<sub>1</sub> war bei den 3 verschiedenen Temperaturen resp. 1,1 : 1; 1,6 : 1 und 1,5 : 1 oder als Mittel 1,4 : 1. Die Relation zwischen den Enzymmengen in K und A<sub>2</sub> waren resp. 2,1 : 1; 2,4 : 1 und 2,5 : 1 oder als Mittel = 2,3 : 1.

Die Verdünnungsflüssigkeit bei der Pepsinprobe war wie in allen Versuchen ein Gemenge von gleichen Volumina der verschiedenen Proben, welches Gemenge einige Zeit auf mehr als 90° C. erhitzt worden war, um die Enzyme zu zerstören. Das Ergebnis der Pepsinprobe war, daß K<sup>1</sup>/<sub>50</sub> etwas besser als A<sub>1</sub> und K<sup>1</sup>/<sub>200</sub> stärker als A<sub>2</sub> verdaute. Die Verhältniszahlen für K und A<sub>1</sub> waren also:

	Chymosin	Pepsin
K	1,4 (Mittel)	> 50
A <sub>1</sub>	1	1 und für K und A <sub>2</sub>
K	2,3 (Mittel)	> 200
A <sub>2</sub>	1	1

Eine Alkalieinwirkung von 1 Minute hatte also die Chymosinwirkung nur wenig, aber die Pepsinwirkung auf <sup>1</sup>/<sub>50</sub> der ursprünglichen herabgesetzt. Dieselbe Alkalimenge hatte bei einer Einwirkungsdauer von 7 Minuten die Chymosinwirkung um etwas mehr als die Hälfte vermindert, während die Pepsinwirkung auf mehr als <sup>1</sup>/<sub>200</sub> herabgesetzt worden war. Die starke Aufhebung der Parallelität zwischen Chymosin- und Pepsinwirkung ist so auffallend, daß sie keiner besonderen Besprechung bedürftig ist.

Versuch 3. Die Enzymlösung enthielt 0,014% feste Stoffe. Dauer der Alkalieinwirkung in A<sub>1</sub> 80 Sekunden und in A<sub>2</sub> 10 Minuten.

#### Milchgerinnungsproben:

	Bei 26° C.	30° C.	34° C.
K	4 Min.	95 Sek.	50 Sek.
A <sub>1</sub>	5 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> „	160 „	65 „
A <sub>2</sub>	18 „	13 Min.	8 Min.

Nach der Gerinnungszeit gemessen verhielten sich die Chymosinmengen in K und A<sub>1</sub> bei den 3 genannten Temperaturen wie 1,38 : 1, resp. 1,4 : 1 und 1,3 : 1. Die Wirkung war also, wie gewöhnlich bei nur geringem Unterschied in dem Enzymgehalte, nur sehr wenig abhängig von der Temperatur. Anders ist es, wenn man K und A<sub>2</sub> vergleicht. Hier verhalten sich die Chymosinmengen bei 26° wie 4,5 : 1, bei 30° wie 7,8 : 1 und bei 34° C. wie 9,6 : 1. In diesem Falle kann man also nicht gut von einem Mittelwerte der Gerinnungszeiten sprechen.

Bei der Pepsinprobe wurde K in den Verdünnungen  $\frac{1}{25}$ ,  $\frac{1}{50}$ ,  $\frac{1}{100}$ ,  $\frac{1}{200}$  und  $\frac{1}{500}$  mit A<sub>1</sub> und A<sub>2</sub> verglichen. K  $\frac{1}{50}$  wirkte viel stärker, aber K  $\frac{1}{100}$  ein wenig schwächer als A<sub>1</sub>. Die Relationszahlen zwischen K und A<sub>1</sub> waren also:

	Chymosin	Pepsin
K	1,4 (Mittel)	> 50
A <sub>1</sub>	1	1

Durch eine Alkalieinwirkung von 80 Sekunden war also die Chymosinwirkung nicht wesentlich, die Pepsinwirkung dagegen auf mehr als  $\frac{1}{50}$  herabgesetzt worden.

Die Lösung K  $\frac{1}{500}$  wirkte bedeutend stärker als A<sub>2</sub>. Infolge Mangels an Material konnte aber leider eine noch stärkere Verdünnung nicht geprüft werden. Die Lösung A<sub>2</sub> enthielt offenbar nur Spuren von Pepsin, und der Unterschied zwischen dieser Probe und der Kontrollprobe mit Säure und Fibrin allein war nur sehr gering. Die Relationszahlen für K und A<sub>2</sub> waren folgende

	Chymosin	Pepsin
K	9,6—4,5	> 500
A <sub>2</sub>	1	1

Eine Alkalieinwirkung während 10 Minuten hatte also den Chymosin Gehalt auf gegen  $\frac{1}{10}$  (wenn man von dem Gerinnungsversuche bei 34° C. ausgeht), den Pepsin Gehalt dagegen auf mehr als  $\frac{1}{500}$  herabgesetzt. Die Aufhebung der Parallelität der 2 Enzymwirkungen tritt auch hier stark hervor.

Versuch 4. Enzymlösung von 0,013% festen Stoffen. Alkalieinwirkung während 90 Sekunden.

## Milchgerinnungsproben:

	Bei 27° C.	31° C.	38° C.
K	9 Min.	3 Min.	70 Sek.
A	14 „	5 „	145 „
	1,6:1	1,7:1	2,1:1

K  $\frac{1}{200}$  verdaute ein wenig stärker als A und die Relationszahlen waren also folgende:

	Chymosin	Pepsin
K	1,8 (Mittel)	200
A	1	1

Versuch 5. Die Enzymlösung enthielt 0,016% feste Stoffe. Dauer der Alkalieinwirkung 2 Minuten.

## Milchgerinnungsproben:

	Bei 25 $\frac{1}{2}$ ° C.	30 $\frac{1}{2}$ ° C.	38 $\frac{1}{2}$ ° C.
K	14 Min.	120 Sek.	55 Sek.
A	19 „	250 „	120 „
K:A =	1,4:1	2,1:1	2,2:1

Die Pepsinproben ergaben, daß K  $\frac{1}{200}$  etwas rascher als A verdaute, und die Relationszahlen waren also:

	Chymosin	Pepsin
K	2 (Mittel)	> 200
A	1	1

Versuch 6. Enzymlösung mit 0,022% festen Stoffen. Dauer der Alkalieinwirkung 4 Minuten.

## Milchgerinnungsproben:

	Bei 20° C.	25° C.	30° C.	38 $\frac{1}{2}$ ° C.
K	24 Min.	3 $\frac{1}{2}$ Min.	90 Sek.	35 Sek.
A	36 „	6 $\frac{1}{4}$ „	165 „	75 „
K:A =	1,5:1	1,7:1	1,8:1	2,14:1

Die Pepsinprobe wurde in diesem Falle bei Körpertemperatur mit gekochtem Karminfibrin ausgeführt. Die höchste Verdünnung war K  $\frac{1}{400}$ , und diese Lösung verdaute Fibrin, wenn auch ziemlich langsam. Die Lösung A war dagegen unwirksam, und selbst nach 48 Stunden war kein sicherer Unterschied zwischen ihr und der Kontrollprobe mit Säure allein zu sehen. Die Verhältniszahlen waren also

	Chymosin	Pepsin
K	1,8 (Mittel)	> 400
A	1	1

Die nun mitgeteilten, wie auch die übrigen nach demselben Plane von mir ausgeführten Versuche zeigen also, daß bei Anwendung von stoffarmen, verhältnismäßig reinen Enzymlösungen, wo die schützende Wirkung des Eiweißes und vielleicht auch anderer Stoffe aufgehoben oder stark herabgesetzt ist, sowohl das Chymosin wie das Pepsin sehr empfindlich gegen die Wirkung des Alkalis ist. Bei Gegenwart von nur sehr wenig festen Stoffen in der Enzymlösung (0,013%) war schon eine Einwirkungsdauer von  $1\frac{1}{2}$  Minute bei einem Alkaligehalt von 0,008% NaOH hinreichend, um die Chymosinwirkung auf gegen  $\frac{1}{2}$  und die Pepsinwirkung auf  $\frac{1}{200}$  herabzusetzen. In allen Versuchen zeigte sich auch die Pepsinwirkung viel empfindlicher gegen Alkali als die Chymosinwirkung.

Hieraus darf man jedoch nicht ohne weiteres den bestimmten Schluß ziehen, daß das Pepsin empfindlicher gegen Alkali als das Chymosin ist, denn ebenso wie die Infusionen auf Mägen neugeborener Kälber zeigen auch die aus solchen Infusionen bereiteten Enzymlösungen eine sehr starke Chymosin- und eine verhältnismäßig schwache Pepsinwirkung. Es ist deshalb auch nicht ausgeschlossen, daß eine Enzymlösung, die von Anfang an ein umgekehrtes Verhalten der zwei Enzymwirkungen gezeigt hatte, auch gegen die Alkalieinwirkung ein etwas anderes Verhalten zeigen würde. Solche Lösungen habe ich bisher nicht in den Händen gehabt, und nur in einem Falle habe ich eine Lösung untersucht, die im Verhältnis zu der Pepsinwirkung eine relativ schwache Chymosinwirkung zeigte. Diese Enzymlösung war in obiger Weise aus einer Infusion auf Mägen von etwas älteren (5—6 Wochen alten) Kälbern dargestellt worden. Sie verdaute in 20 Stunden nach Mett 3 mm und koagulierte Milch bei Körpertemperatur erst nach 10—11 Minuten, also eine schwache Chymosinwirkung. Durch Alkalieinwirkung während 2 Minuten wurde in diesem Falle die Chymosinwirkung auf  $\frac{1}{4}$  und die Pepsinwirkung auf  $\frac{1}{40}$ — $\frac{1}{50}$  herabgesetzt. Das Pepsin wurde also auch in diesem Falle stärker als das Chymosin geschädigt; und da hierzu kommt, daß ich in vielen Fällen durch die Alkalieinwirkung eine Herabsetzung der Pepsinwirkung auf  $\frac{1}{200}$ — $\frac{1}{400}$  und der Chymosin-

wirkung nur auf etwa  $\frac{1}{2}$  erzeugen konnte, spricht dies entschieden dafür, daß das Pepsin viel empfindlicher gegen Alkali als das Chymosin ist. Dies gilt natürlich bis auf weiteres nur für die Enzyme von neugeborenen Kälbern, denn bei anderen Tieren habe ich keine entsprechenden Untersuchungen gemacht.

Unter allen Umständen ist es von Interesse, daß man durch schwache Alkalieinwirkung auf die Enzyme des Kalbsmagens Lösungen erhalten kann, in welchen die Parallelität der beiden Enzymwirkungen so stark aufgehoben ist, daß man (praktisch) fast pepsinfreie Enzymlösungen erhält, die noch eine kräftige Chymosinwirkung zeigen.

Wenn man dieses Verhalten mit der unitarischen Ansicht von der Identität des Pepsins und Chymosins in Einklang bringen will, so bleibt, soweit ich ersehen kann, nur die Annahme übrig, daß während oder infolge der Alkalieinwirkung eine hemmende Substanz gebildet worden ist, welche nicht in einem neutralen, sondern nur in einem sauren Medium wirksam ist. Diese hemmende Substanz würde also nicht die Milchgerinnung, sondern nur die bei saurer Reaktion stattfindende Proteolyse (die Pepsinverdauung) verhindern können.

Diese, an und für sich wenig wahrscheinliche Annahme ist nun einer direkten experimentellen Prüfung mit Caseinlösungen zugänglich. Wenn man Lösungen von Alkalicaseinat mit Hilfe von  $\frac{n}{10}$ -NaOH und Wasser bereitet, kann man zeigen, daß solche Lösungen durch neutrale Infusionen oder Enzymlösungen unter Albumosebildung hydrolysiert werden. Zu solchen Untersuchungen sind die oben erwähnten, eiweißarmen Enzymlösungen besonders geeignet, und man findet dabei, daß diese Enzymlösungen bei saurer Reaktion kräftiger als bei neutraler proteolytisch wirken. Wenn nun die obigen, der Alkalieinwirkung ausgesetzten Enzymlösungen die äußerst starke Herabsetzung ihrer Pepsinwirkung der Anwesenheit einer hemmenden, nur bei saurer Reaktion wirksamen Substanz zu verdanken hätten, würden sie natürlich auf Caseinlösungen eine schwächere Wirkung bei saurer als bei neutraler Reaktion ausüben. Dies ist aber nicht der Fall. Sie wirken umgekehrt

kräftiger proteolytisch bei An- als bei Abwesenheit von freier Säure, was ich durch ein Beispiel zeigen werde.

Als Maß der verschiedenen Stärke der Proteolyse kann man die Menge der gebildeten Albumosen benutzen. Wenn man die mit Enzymlösung bei Körpertemperatur behandelten, neutralen resp. sauren Caseinlösungen mit der zur Ausfällung des Paracaseins oder anderer fällbaren Verdauungsprodukte gerade erforderlichen Menge Säure, resp. Alkali versetzt, kann man bei richtiger Arbeit ganz wasserhelle Filtrate erhalten, die weder von Säure noch von Alkali bei möglichst vorsichtigem Zusatz gefällt werden. Beim Sieden geben sie ebenfalls keine Fällung, wohl aber, wie die Lösungen gewisser Caseinalbumosen, eine weißliche Trübung, die beim Abkühlen sich wieder klärt. Wird das Filtrat eingetrocknet und bis gegen  $110^{\circ}$  C. erhitzt, so löst sich dann der Rückstand in Wasser bis auf einen kleinen Rest, der entweder aus einem nicht ausgefällten Teil des Paracaseins oder aus bei dem Eintrocknen gebildeter Dysalbumose besteht. Dieser Rest wird abfiltriert, und das klare Filtrat gibt nun alle typischen Albumosereaktionen. Bei quantitativen Bestimmungen wird dieses Filtrat mit dem Waschwasser in einer Platinschale zur Trockne verdunstet, der Rückstand bei  $105-110^{\circ}$  C. zu konstantem Gewicht getrocknet und gewogen und nach Abzug der Mineralstoffe (NaCl) als Albumose berechnet. In dieser Weise ist die Stärke der Proteolyse in den hierhergehörenden Versuchen bestimmt worden, und nach dieser Vorbemerkung kann ich zu einem Beispiele übergehen.

Versuch 7. Von reinem Casein (das ich selbst dargestellt hatte) wurden 3,15 g (entsprechend 3 g wasserfreiem Casein) mit Hilfe von 15 ccm  $n/10$ -NaOH in Wasser bis zu 100 ccm klar gelöst. Die Lösung reagierte nicht ganz neutral, sondern sehr schwach sauer auf Lackmuspapier und enthielt also zum Teil auch saures Alkalicaseinat.

Die Enzymlösung war die im Versuche 6 erwähnte, während 4 Minuten mit Alkali behandelte Lösung, welche bei  $38\frac{1}{2}^{\circ}$  C. die Milch in 75 Sekunden koagulierte und deren Pepsingehalt auf mehr als  $\frac{1}{400}$  der ursprünglichen herabgesetzt worden war. Auf gekochtes Fibrin war sie in 48 Stunden bei

Körpertemperatur ohne sichtbare Wirkung. Von dieser neutralen Enzymlösung wurde ein Teil der Kontrolle halber auf  $95^{\circ}\text{C}$ . einige Zeit erhitzt, um die Enzyme zu vernichten. Diese Lösung diente zu der Kontrollprobe 3. Es wurden nun folgende 3 Proben angeordnet.

Nr. 1. Es wurden 10 ccm neutrale Enzymlösung mit 6 ccm  $n_{/10}$  HCl gemischt und zu dieser sauren Lösung 20 ccm Caseinlösung unter Umrühren zugesetzt. Die Säuremenge war mehr als hinreichend, um das ausfallende Casein rasch wieder zu lösen. 20 ccm Caseinlösung enthielten 0,600 g Casein und eine Alkalimenge, die 3 ccm  $n_{/10}$ -NaOH entspricht. Von den 6 ccm  $n_{/10}$ -HCl waren also 3 ccm übrig, entsprechend 0,01095 g HCl; und das Gemenge von 36 ccm enthielt also 0,030% freie HCl. Die Menge des gebildeten NaCl entsprach 3 ccm  $n_{/10}$ -NaCl.

Nr. 2. 10 ccm neutrale Enzymlösung + 3 ccm  $n_{/10}$ -NaCl + 3 ccm Wasser + 20 ccm Caseinlösung.

Nr. 3. 10 ccm neutrale (erhitzte) Enzymlösung + 3 ccm  $n_{/10}$ -NaCl + 3 ccm Wasser + 20 ccm Caseinlösung.

Alle 3 Proben hatten also genau denselben Gehalt an Casein und NaCl; der Unterschied war nur, daß die Probe 1 einen Gehalt von 0,030% freier HCl und die Kontrollprobe 3 die unwirksam gemachte Enzymlösung enthielt. In allen 3 Proben wurde die Caseinlösung zu der Enzymlösung gesetzt und zwar in der Reihenfolge der Proben 3, 2 und 1. Die Temperatur war  $38^{\circ}\text{C}$ . Nach 45 Minuten wurden gleichzeitig alle 3 Proben herausgenommen, rasch abgekühlt, mit Alkali bzw. Säure versetzt und der Niederschlag abfiltriert. Hierbei war die Reihenfolge der Proben die umgekehrte 1, 2 und 3, so daß die Probe 1 die kürzeste Zeit der Enzymwirkung ausgesetzt gewesen war. Diese Probe wurde mit 3 ccm  $n_{/10}$ -Natronlauge und die beiden anderen mit je 3 ccm  $n_{/10}$ -Salzsäure gefällt. Die Filtration ging in allen sehr rasch; alle 3 Filtrate waren wasserhell, und es wurden von jeder Probe 30 ccm Filtrat eingetrocknet und wie oben angegeben behandelt. Die Menge der Albumosen (natürlich nach Abzug des NaCl) war in 30 ccm Filtrat.

in Probe 1 = 0,126 g

• 2 = 0,068 •

• 3 = 0,009 •

Die Proteolyse war also bei Gegenwart von freier Salzsäure fast doppelt so stark wie bei Abwesenheit von solcher.

Zwei andere, nach demselben Prinzipie ausgeführten Versuche mit einem Gehalte von bezw. 0,036 und 0,090% freier HCl führten zu ähnlichen Resultaten. Die Proteolyse war immer stärker in der Probe, welche freie Säure enthielt. Da die Enzymwirkung in jedem dieser Versuche in demselben Milieu, nur bei verschiedener Reaktion, stattfand, ist es unmöglich, die durch Alkalieinwirkung stark herabgesetzte oder fast aufgehobene Pepsinwirkung der Enzymlösungen durch die Annahme einer in ihnen vorhandenen, nur bei saurer Reaktion hemmend wirkenden Substanz zu erklären.

In diesem Zusammenhange will ich bemerken, daß ähnliche Versuche mit den in dem nächstvorigen Aufsätze<sup>1)</sup> erwähnten, nach der Salzmethode erhaltenen Enzymfraktionen B, die ebenfalls stark milchkoagulierend aber nur sehr schwach peptisch wirkten, gezeigt haben, daß auch in diesen Lösungen die schwache Pepsinwirkung nicht durch die Annahme einer bei Anwesenheit von freier Säure hemmend wirkenden Substanz erklärt werden kann.

Zur Erklärung der durch Alkalieinwirkung stark herabgesetzten Pepsinverdauung bei erhaltener, starker Chymosinwirkung bleibt wohl also nach dem Obigen nur die Annahme übrig, daß das Alkali stärker schädigend auf die Pepsin- als auf die Chymosinwirkung eingewirkt hat. Diese Erklärung läßt sich allerdings nicht mit der unitarischen Ansicht von der Identität des Pepsins und Chymosins vereinbaren: da man aber die nach verschiedenen Methoden bewirkte Aufhebung der Parallelität zwischen den beiden Enzymwirkungen nie nach der unitarischen Anschauungsweise hat erklären können, zeigt dies nach meiner Ansicht nur, daß die unitarische Hypothese ganz unhaltbar ist.

Dies gilt natürlich zunächst nur für die Enzyme des Kalbsmagens. Bei den Kälbern ist man aber genötigt, zwischen zwei nicht identischen Enzymwirkungen, der Chymosin- und der

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 94.

Pepsinwirkung, bestimmt zu unterscheiden. Wenn man nun hier zwei verschiedene Enzyme, Pepsin und Chymosin, oder ein Riesenmolekül mit Seitenketten von ungleicher Enzymwirkung annehmen will, scheint mir ziemlich gleichgültig zu sein. Die größere Leichtigkeit, mit welcher die Chymosinwirkung durch Säure und die Pepsinwirkung umgekehrt durch Alkali vernichtet werden kann, läßt sich natürlich ebenso gut nach der einen wie nach der anderen dieser Annahmen erklären. Die Möglichkeit aber, durch Dialyse nach Rakoczy, durch Fällung mit Casein oder durch die Salzmethode verschiedene Fraktionen darzustellen, von denen die eine stärkere Pepsin-, die andere dagegen stärkere Chymosinwirkung zeigt, ist natürlich viel leichter durch die Annahme von zwei verschiedenen Enzymen als durch die Annahme eines Riesenmoleküles mit Seitenketten zu erklären. Wenn ich unter solchen Umständen die einfachere Erklärung wähle und von zwei verschiedenen Enzymen spreche, dürfte dies wohl bis auf weiteres erlaubt sein, denn hierin liegt nicht das wesentliche. Das wichtigste ist, die Bedingungen, unter welchen die eine oder andere Wirkung zur Geltung kommt, und die Unterschiede, welche zwischen beiden bestehen, zu erforschen.

Ein solcher Unterschied ist das ungleiche Verhalten beider Enzyme zu in der Hitze denaturiertem Eiweiß, wie gekochtem Hühnereiweiß oder Fibrin. In meinen früheren Aufsätzen und auch bei der Besprechung meiner Versuche über die Alkalieinwirkung auf die zwei Enzyme habe ich wiederholt von Enzymlösungen berichtet, welche kräftig milchkoagulierend wirkten, während sie bei der Mettschen Probe ganz und bei der Karminfibrinprobe (mit ungekochtem Fibrin) fast unwirksam waren.

Dies spricht nun entschieden dafür, daß Pepsin und Chymosin in saurer Lösung gegen geronnenes Eiweiß verschieden sich verhalten, und weitere Beweise hierfür kann man leicht mit Enzymlösungen, in welchen die Parallelität durch Alkalieinwirkung aufgehoben worden ist, liefern. Da man durch Alkalibehandlung Lösungen, welche bei äußerst schwacher Pepsinwirkung die Milch bei Körperwärme in weniger als 1 Minute und bei 29 und 30° C. in 1½—5 Minuten koagulieren

und demnach unbedingt als chymosinreich angesehen werden müssen, erhalten kann, eignen sich nämlich solche Lösungen sehr gut, um diesen Unterschied zwischen Chymosin- und Pepsinwirkung zu demonstrieren.

Es ist hierbei am besten, solche Lösungen mit einander zu vergleichen, welche entweder gleich kräftig Milch koagulieren, oder in welchen die pepsinreichere Probe etwas weniger kräftig labend als die andere wirkt. Zu dem Ende muß man die von Anfang an etwas chymosinreichere Kontrollprobe K entsprechend verdünnen, und als Verdünnungsflüssigkeit benutzt man am besten ein durch Erhitzen enzymfrei gemachtes Gemenge von den beiden sauren (0,1% HCl) Lösungen K und A. Ich erlaube mir, ein paar solche Beispiele anzuführen.

In dem einen Falle, in welchem die Enzymlösung 0,014% feste Stoffe enthielt und die Alkalienwirkung  $1\frac{1}{2}$  Minute gedauert hatte, wirkten die beiden sauren Lösungen (0,1% HCl) nach der Verdünnung von K fast gleich stark auf Milch bei 20 und 28° C., nämlich bei 20° C. A in 6 und K in gegen 7 Minuten und bei 28° C. A in etwa 75 und K in etwa 76 Sekunden. Beide Lösungen zeigten also kräftige Chymosinwirkung. Es wurden nun beide Proben mit hartgekochtem Eiweiß in Scheibchen mit scharfen Rändern beschickt und bei etwa 36° C. stehen gelassen. In K war nach 2 Stunden eine beginnende Verdauung sicher zu sehen, und im Laufe von 6—7 Stunden war das Eiweiß völlig verdaut. In A dagegen war nach 48 Stunden das Eiweiß zwar, wie nach Säureeinwirkung allein, etwas weniger undurchsichtig geworden, die Scheibchen hatten aber fortwährend scharfe Ränder, und eine merkbare Verdauung hatte noch nicht stattgefunden. Gekochtes Fibrin, welches verhältnismäßig rasch von K verdaut wurde, war ebenfalls von A nach 48 Stunden anscheinend nicht stärker als von Säure allein angegriffen worden.

In einem anderen Falle mit einer Enzymlösung, welche 0,015% feste Stoffe enthielt und während  $1\frac{1}{2}$  Minuten der Alkalienwirkung ausgesetzt gewesen war, wirkte die Lösung K (nach der Verdünnung) etwas schwächer milchkoagulierend als die Lösung A. Die Relationen zwischen den Chymosin-

mengen in A und K waren bei 26°, 30° und 34° C.: A : K = 1,22 : 1; 1,25 : 1 und 1,7 : 1. Bei der letztgenannten Temperatur wirkte A in 70 und K in 120 Sekunden. Bei Anwendung von gekochtem Karminfibrin bei Körpertemperatur war in der chymosinärmeren, pepsinhaltigen Probe K die beginnende Verdauung nach 5 Minuten merkbar und nach 7 Minuten recht deutlich und sicher. Nach Verlauf von 1 Stunde war die Hauptmasse und nach 2 Stunden war alles gelöst. Nun wurde in dieser Probe ein Zylinder aus gekochtem Eiweiß eingelegt. Nach 2 Stunden war eine beginnende Verdauung sicher zu sehen, und im Laufe der Nacht war das Eiweiß vollständig gelöst worden. Nach 48 Stunden hatte dagegen das Fibrin in A ganz dasselbe Aussehen wie in einer Kontrollprobe mit Säure allein, und eine sichtbare Verdauung hatte also nicht stattgefunden. Auf gekochtes Hühnereiweiß war die Lösung A in derselben Zeit ohne Wirkung.

Saure Enzymlösungen, die im Laufe von 48 Stunden bei Körpertemperatur gekochtes Fibrin nicht merkbar verdauen, können wohl als praktisch pepsinfrei angesehen werden, wenn sie auch nicht ganz ohne Wirkung auf ungekochtes Fibrin sind, eine Wirkung, die jedoch wenigstens zum Teil von der Verunreinigung des ungekochten Fibrins mit Enzymen kompliziert wird. Da nun solche Enzymlösungen trotzdem sehr kräftig milchkoagulierend wirken und demnach reich an Chymosin sind, dürften wohl solche Versuche wie die zuletzt besprochenen zeigen, nicht nur, daß Pepsin und Chymosin nicht identische Enzyme sein können, sondern auch, daß das Chymosin zum Unterschied von dem Pepsin in saurer Lösung gekochtes Fibrin oder Hühnereiweiß nicht verdaut. Lehrreich in dieser Hinsicht ist auch der oben (S. 313) angeführte Versuch 6, in welchem die Lösung A auf gekochtes Fibrin in 48 Stunden unwirksam war, während die Lösung K noch in der Verdünnung  $1/400$  das Fibrin verdaute. Die Chymosinwirkung in K war aber in diesem Falle nur etwa doppelt so stark wie in A.

Ein anderer Unterschied zwischen Pepsin und Chymosin ist die zuerst von mir beobachtete und dann von vielen anderen konstatierte größere Empfindlichkeit des Chymosins als des

Pepsins gegen die Einwirkung von verdünnter Salzsäure bei etwa 40° C. oder einer etwas höheren Temperatur.

Ein weiterer Unterschied ist das entgegengesetzte Verhalten der beiden Enzyme zu sehr verdünntem Alkali bei Zimmertemperatur, indem, wie oben gezeigt worden ist, das Pepsin viel weniger resistent gegen Alkalieinwirkung als das Chymosin ist.

Ein besonders wichtiger Unterschied liegt auch in der Bedeutung einer verschiedenen Reaktion für die proteolytische Wirkung beider Enzyme.

Es haben bekanntlich mehrere Forscher die Annahme gemacht, daß das Chymosin, wie das Pepsin, ein proteolytisches Enzym sei. So lange man aber mit Enzymlösungen, die auch Pepsin enthielten, gearbeitet hat, konnte eine solche Annahme nur in indirekter Weise wahrscheinlich gemacht werden. Direkt und in exakter Weise kann man sie natürlich nur durch Versuche mit pepsinfreien Enzymlösungen prüfen. Wenn man nun auch absolut pepsinfreie Chymosinlösungen noch nicht dargestellt hat, so kann man indessen sowohl nach der Kochsalzmethode wie durch die oben beschriebene Alkalibehandlung Enzymlösungen darstellen, die in mehreren Fällen so arm an Pepsin sind, daß sie praktisch als pepsinfrei zu betrachten sind. Wenn man nun mit solchen Enzymlösungen und Lösungen von reinem Casein arbeitet, kann man zeigen, daß das Chymosin sowohl bei Abwesenheit wie bei Gegenwart von freier Säure proteolytisch wirken kann, und zwar — wenigstens bis zu einem gewissen Grade — besser in einem sauren Medium.

Wenn man mit sauren Caseinlösungen arbeitet, kann man ferner ohne Schwierigkeit zeigen, daß das Optimum des Säuregrades für die beiden Enzyme ein verschiedenes ist. Prüft man solche Caseinlösungen (mit steigendem Säuregehalt in den verschiedenen Proben) mit zwei Enzymlösungen, von denen die eine relativ reich an Chymosin und die andere an Pepsin ist, so wird man finden, daß bei den niedrigsten Säuregraden die chymosinreichere Lösung kräftiger als die pepsinreichere wirkt. Bei etwas höherem Säuregrade wirken beide ungefähr gleich kräftig und bei noch höherem Säuregrade wirkt die pepsinreichere Lösung viel kräftiger als die chymosinreichere.

Ich kann hier nicht des näheren auf diese Caseinversuche eingehen, denn sie müssen Gegenstand eines besonderen Aufsatzes werden. Ich habe das Hauptresultat derselben nur deshalb hier angeführt, weil diese Versuche einen weiteren Unterschied zwischen den beiden Enzymen anzeigen.

Besonders wichtig ist ferner die Frage, inwieweit auch ein Unterschied in der Wirkung beider Enzyme bei neutraler Reaktion besteht. In dieser Hinsicht ist man seit lange allgemein der Ansicht gewesen, daß zwar das Chymosin, nicht aber das Pepsin bei neutraler Reaktion milchkoagulierend wirkt. In neuerer Zeit hat aber Rakoczy<sup>1)</sup> behauptet, daß die vom künstlichen oder natürlichen Kalbsmagensaft bewirkte Milchkoagulation als eine komplizierte Erscheinung, als die Summe der Wirkungen der beiden Enzyme — des Pepsins und des Chymosins — anzusehen ist, und daß also beide Enzyme bei neutraler Reaktion milchkoagulierend wirken sollen.

Es ist offenbar, daß man diese Behauptung, wie überhaupt die Frage von der Wirkung des Pepsins sowohl auf Milch wie auf Caseinlösungen, nur durch Versuche mit chymosin-freien oder möglichst chymosinarmen Pepsinlösungen in exakter Weise prüfen kann, und man muß deshalb mit einem Urteil über diese Angabe Rakoczys warten, bis neue solche Untersuchungen vorliegen. Die gewöhnliche Ansicht basiert nämlich wesentlich auf Versuchen mit Infusionen, in welchen das Chymosin durch andauerndes Erhitzen der sauren Infusion bei etwa 40° C. vollständig oder fast vollständig vernichtet worden war, während die Pepsinwirkung erhalten blieb; aber diese Methode hat man als nicht zuverlässig bezeichnet. Unter solchen Umständen muß es eine wichtige Aufgabe der Forschung sein, diese Methode weiter zu prüfen, zu verbessern oder, wenn nötig, durch ein anderes, mehr zuverlässiges Verfahren zu ersetzen. Auf diese Aufgabe habe ich auch in erster Linie meine fortgesetzte Arbeit eingerichtet.

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