

Studien über Chymosin- und Pepsinwirkung.

IV. Mitteilung.

Die Wirkung der Enzyme auf Natriumcaseinate.

Von

Olof Hammarsten.

(Der Redaktion zugegangen am 15. April 1918.)

Inhaltsübersicht.

I. Die Alkalicaseinatlösungen. II. Die Hydrolyseprodukte und ihre quantitative Bestimmung. III. Verhalten der Dialkalicaseinatlösungen als Maß der Enzymwirkung. IV. Wirkung der Enzymlösungen auf Caseinate von verschiedenem Alkaligehalt. V. Wirkung von Enzymlösungen verschiedener Konzentration auf Alkalicaseinatlösungen. VI. Wirkung von Enzymlösungen auf Alkalicaseinate bei aufgehobener Parallelität der Chymosin- und Pepsinwirkung.

In früheren Aufsätzen¹⁾ habe ich gezeigt, daß man nach verschiedenen Methoden die Parallelität zwischen Chymosin- und Pepsinwirkung in Kalbsmageninfusionen, bzw. in aus solchen dargestellten Enzymlösungen aufheben kann; und ein ähnliches Aufheben der Parallelität hat auch Rakoczy²⁾ nach einem anderen Verfahren, nämlich nach der Dialysemethode, bewirkt. Zur Vergleichung der Chymosinwirkung der verschiedenen Enzymlösungen dienten in diesen Untersuchungen regelmäßig Versuche mit Milch, während zum Vergleiche der Pepsinwirkung Versuche mit Fibrin oder geronnenem Hühnereiweiß dienten. Gegen dieses Verfahren, welches übrigens das allgemein übliche ist, kann man nun einwenden, daß man die beiden Enzymwirkungen nicht mit demselben Substrate prüft, und wenn auch diese Einwendung nicht besonders schwerwiegend ist, war es jedoch von Interesse, die beiden Enzym-

¹⁾ Upsala Läkareförenings Förhandl., Bd. 8, 1872/73 und diese Zeitschr., Bd. 56, 68, 74 und 94.

²⁾ Diese Zeitschr., Bd. 68 und 84.

wirkungen an demselben Eiweißstoffe, nämlich dem Casein, zu studieren.

Aus dem Grunde habe ich auch mehrere Versuche mit Lösungen von sowohl Alkali- wie Säureverbindungen des Caseins ausgeführt, und in diesem Aufsätze werde ich hauptsächlich über Versuche mit Alkalicaseinatlösungen berichten. Da in den Versuchen mit aufgehobener Parallelität der Enzymwirkungen die letzteren sowohl bei neutraler wie bei saurer Reaktion verglichen werden mußten, ist es jedoch ohne weiteres verständlich, daß ich in diesem Aufsätze auch einige Versuche mit sauren Caseinlösungen mitteilen muß.

I. Die Alkalicaseinatlösungen.

Das zu den Versuchen verwendete Casein rührte teils von Kahlbaum her und teils hatte ich es selbst aus Kuhmilch dargestellt. Das käufliche Casein, auch das reinste, enthält regelmäßig etwas Calcium, wahrscheinlich als Phosphat, was zur Folge hat, daß die Alkalicaseinatlösungen stets etwas opalisierend sind. Das von mir dargestellte Casein war, wenn auch nicht absolut kalkfrei, jedoch so arm an Calcium, daß es fast ganz klare, nicht opalisierende Alkalicaseinatlösungen gab. Durch zahlreiche Versuche habe ich mich aber davon überzeugt, daß es für die hier in Frage kommenden Versuche gleichgültig ist, ob man mit dem einen oder anderen Casein arbeitet, denn die etwa vorhandenen unbedeutenden Spuren oder die ein wenig größeren, immer nur kleinen Beimengungen von Kalk scheinen gar keinen Einfluß auszuüben. Aus dem Grunde habe ich in der Mehrzahl der Fälle mit dem Casein von Kahlbaum gearbeitet.

Das Casein wurde lufttrocken in Arbeit genommen, und bei dem Abwägen wurde die für den besonders bestimmten Wassergehalt des Präparates nötige Korrektur immer beachtet. Das abgewogene Casein wurde stets zuerst mit etwas Wasser durchgefuechtet, darauf mit etwas mehr Wasser fein zerrieben, mit der berechneten Menge $n/10$ -Natronlauge gelöst und nach erfolgter Lösung mit Wasser bis zu dem erwünschten Volumen nachgespült und verdünnt.

Da das Casein eine mehrbasische Säure ist, kann man je nach der Menge der zugesetzten $n/10$ -Natronlauge verschiedene Natriumcaseinate erhalten. Verwendet man zur Lösung von je 4 g Casein 23 ccm $n/10$ -Lauge (ich gehe meistens von 4-prozentigen Caseinlösungen aus), so erhält man eine auf Lackmuspapier neutral reagierende Caseinatlösung, die ein Natriumcaseinat mit 1,32 % Natrium enthält. Bei Anwendung von 24 ccm $n/10$ -Lauge reagiert die Lösung äußerst schwach alkalisch und enthält ein Natriumcaseinat mit 1,38 % Natrium. Nach L. v. Slyke und A. W. Bosworth¹⁾ enthält das Mononatriumcaseinat rund 0,26 % Natrium und die mit 23 ccm $n/10$ -Lauge auf je 4 g bereitete Lösung enthält also rund 5 mal so viel Natrium (1,32 %) wie das Mononatriumcaseinat. Legt man die von v. Slyke und Bosworth angegebene Zahl der Berechnung zugrunde, so würde man also das Natriumcaseinat mit 1,32 % Natrium als Pentacaseinat bezeichnen können. Die mit weniger Lauge als das Pentacaseinat bereiteten Caseinatlösungen reagieren mehr oder weniger stark sauer auf Lackmuspapier, und eine saure Reaktion zeigt dementsprechend die mit 18 ccm Natronlauge ($n/10$) auf je 4 g Casein bereitete Lösung, welche ein Natriumcaseinat mit 1,035 % Natrium, also ein Tetracaseinat (mit 1,04 % Natrium, berechnet nach den Zahlen von v. Slyke und Bosworth für Monocaseinat) enthält.

Lösungen von Penta- und Tetranatriumcaseinat in obigem Sinne erhält man leicht durch direkte Auflösung des Caseins in Wasser mit Hilfe von $n/10$ -Natronlauge. In derselben Weise kann man auch Caseinlösungen, die weniger Alkali enthalten, darstellen; aber in dem Maße, wie man weniger Lauge zusetzt, geht die Auflösung des Caseins schwieriger und langsamer von statten, und es kann bisweilen schwer sein, eine ganz vollständige Auflösung zu bewirken. Aus diesem Grunde habe ich zur Darstellung von Di- und oft auch von Trinatriumcaseinatlösungen ein anderes Verfahren gewählt, welches darin besteht, daß ich eine 4-prozentige Caseinlösung von bekanntem, passendem Alkaligehalte mit dem berechneten Volumen $n/100$ -HCl allmählich vermische. Wenn man die $n/100$ -HCl aus einer

¹⁾ The Journal of biol. Chemistry, Bd. 14.

Bürette der Alkalicaseinatlösung unter stetem Umrühren zusetzt, kann dies ohne Ausfällung des Caseins leicht geschehen. Wenn man z. B. 100 ccm einer mit 18 ccm $n/10$ -Natronlauge auf genau je 4 g Casein bereiteten Lösung (also eine Tetracaseinatlösung) mit 90 ccm $n/100$ -HCl und 10 ccm Wasser verdünnt, erhält man eine 2-prozentige Caseinlösung, die ein Caseinat mit rund 0,52% Natrium, also ein Dinatriumcaseinat, enthält. In ähnlicher Weise erhält man aus einer mit 23 ccm $n/10$ -Natronlauge auf je 4 g Casein bereiteten 4-prozentigen Pentacaseinatlösung durch Verdünnung mit 95 ccm $n/100$ -HCl und 5 ccm Wasser (auf je 100 ccm Caseinatlösung) eine 2-prozentige Lösung von Trinatriumcaseinat mit rund 0,78% Natrium usw. Nach diesem Prinzip habe ich immer meine Lösungen von Di- und oft auch von Tricaseinat dargestellt. Die bei Anwendung von diesem Verfahren entstehenden kleinen NaCl-Mengen waren für mehrere meiner Untersuchungen ohne Belang, und die zum Vergleiche dienende Caseinatlösung (in den Fällen, wo ein Vergleich zweier Lösungen vorkam) wurde natürlich mit der entsprechenden Menge einer $n/100$ -NaCl-Lösung verdünnt.

Die obigen Berechnungen basieren, wie gesagt, auf den Zahlen von v. Slyke und Bosworth für das Mononatriumcaseinat. Ein besonderes Eingehen auf die Frage, inwieweit diese Zahlen als genaue anzusehen sind, lag außerhalb des Planes meiner Arbeit, und die von mir benutzten Bezeichnungen Di-, Tri- usw. Caseinate haben nur den Zweck, den Alkaligehalt der in jedem Falle angewendeten Caseinatlösung in kurzer, einfacher und praktischer Weise anzugeben. Aus dem Grunde werden auch, der Übersichtlichkeit halber, die zur Lösung von je 1 g Casein verwendeten Mengen $n/10$ -Natronlauge wie auch der prozentische Natriumgehalt eines jeden Caseinates hier zusammengestellt.

	$n/10$ -Lauge	Natrium
Dinatriumcaseinat	2,25 ccm	0,52 %
Trinatriumcaseinat	3,375 „	0,78 %
Tetranatriumcaseinat	4,50 „	1,04 %
Pentanatriumcaseinat	5,75 „	1,32 %.

Mit Caseinatlösungen, die mit mehr als 6 ccm $n/10$ -Lauge auf je 1 g Casein bereitet waren, habe ich keine Versuche

ausgeführt. Nur in Ausnahmefällen kamen Lösungen von Caseinaten, die alkaliärmer als Dicaseinate waren, zur Verwendung.

II. Die Hydrolyseprodukte und ihre quantitative Bestimmung.

Versetzt man eine reine Natriumcaseinatlösung mit der zur möglichst vollständigen Ausfällung des Caseins genau erforderlichen Menge $n/10$ -Chlorwasserstoffsäure, so erhält man ein wasserhelles Filtrat, welches im Sieden, auch bei möglichst vorsichtigem Zusatz von stark verdünnter Säure, keine Spur von Fällung gibt. Nach dem Eintrocknen des Filtrates erhält man einen aus NaCl und nur äußerst kleinen Mengen organischer Substanz bestehenden Rückstand. Hat man dagegen eine neutrale Chymosinlösung einige Zeit auf eine Natriumcaseinatlösung bei Körpertemperatur einwirken lassen und setzt dann die berechnete Menge $n/10$ -HCl hinzu, so erhält man ebenfalls eine Fällung und ein ganz wasserhelles Filtrat, welches jedoch beim Eintrocknen einen je nach dem Alkaligehalt der Caseinatlösung und der Intensität der Enzymwirkung mehr oder weniger reichlichen Rückstand liefert. Dieser Rückstand enthält die in Wasser löslichen Verdauungs- oder Hydrolyseprodukte des Caseins, und da diese Produkte — wie das Casein selbst — als Säuren sich verhalten, löst sich der Rückstand in Wasser mit saurer Reaktion. Die durch Zusatz von $n/10$ -HCl erhaltene Fällung ist in diesem Falle kein einheitlicher Stoff, sondern besteht aus einem Gemenge von dem Paracasein mehr oder weniger nahestehenden Produkten, die unter einander eine etwas verschiedene Löslichkeit, resp. Fällbarkeit und einen etwas wechselnden Phosphorgehalt zeigen können. Dieses Gemenge, dessen Natur mit der Intensität der Enzymwirkung und der Dauer derselben wechselt, ist schon früher, wenigstens zum Teil, von E. Petry¹⁾ und M. van Herwerden²⁾ untersucht worden, und da es für meine jetzt vorliegende Aufgabe

¹⁾ Hofmeisters Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie, Bd. 8 (1906).

²⁾ Diese Zeitschr., Bd. 52 (1907).

von untergeordnetem Interesse war, habe ich dasselbe nicht weiter studiert.

Erhitzt man das von dem, durch Zusatz von $n/10$ -Chlorwasserstoffsäure, ausgefallten Gemenge getrennte, ganz wasserhelle Filtrat zum Sieden, so trübt es sich immer. Durch sehr vorsichtigen Zusatz von stark verdünnter Essigsäure zu der siedenden Flüssigkeit kann man, wenn auch nicht ganz ohne Schwierigkeit, eine so vollständige Entfernung aller fällbaren Substanz bewirken, daß das neue Filtrat in keiner Weise durch Zusatz von mehr Essigsäure oder von Alkali, sei es im Sieden oder bei Zimmertemperatur, gefällt oder getrübt werden kann. Dieses neue Filtrat verhält sich nun wie eine Lösung von Albumosen. Mit Chlornatrium gesättigt gibt es eine Fällung, die wie eine Fällung von primären Albumosen sich verhält, und das von ihr getrennte Filtrat gibt bei Zusatz von einer mit NaCl gesättigten Säure eine neue Albumosenfällung. Mit dem gleichen Volumen gesättigter Ammoniumsulfatlösung gibt das Filtrat ebenfalls eine Fällung von primären Albumosen und beim Sättigen des von ihr getrennten Filtrates mit dem Sulfate tritt eine zweite Fällung auf, die jedoch weniger reichlich als die erste ist. «Echtes Pepton» habe ich dagegen, wenigstens in meinen nur kurze Zeit — bis höchstens 4 Stunden — dauernden Versuchen nicht nachweisen können.

Die Entstehung von Albumosen bei der Einwirkung von Chymosin auf Alkalicaseinatlösungen ist eine schon seit meinen ersten Untersuchungen über die Caseingerinnung mit Lab bekannte Erscheinung, die in neuerer Zeit namentlich von Petry¹⁾ studiert worden ist. Diese Albumosenbildung findet immer statt, gleichgültig ob die Lösungen mit mehr oder weniger Alkali — innerhalb der angegebenen Grenzen — bereitet worden sind. Die Menge der gebildeten Albumosen hängt aber (wie ich unten des näheren zeigen werde) wesentlich von dem verschiedenen Alkaligehalte der Caseinate ab, und auch in anderer Hinsicht verhalten sich die Alkalicaseinatlösungen je

¹⁾ Vgl. Hammarsten, Upsala Läkareförenings Förhandl., Bd. 9, 1873/74; H. Köster, ebenda, Bd. 16, 1880/81 und E. Petry, l. c., Hofmeisters Beiträge.

nach dem verschiedenen Alkaligehalte etwas verschieden, was am schärfsten hervortritt, wenn man Lösungen von Di- und Pentacaseinaten mit einander vergleicht.

Wenn man eine auf Körpertemperatur vorerwärmte Lösung von Dinatriumcaseinat mit dem gleichen Volumen einer ebenfalls vorerwärmten Enzymlösung mischt, so tritt fast unmittelbar eine sichtbare Veränderung auf. Das Gemenge wird, im Vergleich zu der Kontrolleprobe, etwas opalisierend, und diese Opalescenz nimmt rasch zu. Nach einiger Zeit ist die Probe stark weiß, aber in dickerer Schicht noch durchsichtig. Darauf wird sie noch stärker weiß, mehr milchähnlich, in dickerer Schicht undurchsichtig, und nach einiger Zeit entsteht ein flockig sich ausscheidender Niederschlag, dessen Auftreten durch Umrühren oder Umschütteln beschleunigt werden kann.

Dieser Niederschlag entsteht auch in Versuchen bei Zimmertemperatur, aber natürlich langsamer als bei Körpertemperatur. Die Geschwindigkeit, mit welcher er auftritt, hängt auch von der Wirksamkeit der Enzymlösung ab, und bei Körpertemperatur und Anwendung von reineren Enzymlösungen — mit nur 0,02—0,04% festen Stoffen — trat er in den verschiedenen Fällen meistens im Laufe von 40—60—90 Minuten auf. Bei Anwendung von weniger reinen, aber kräftiger wirkenden Enzymlösungen kam er in 15 Minuten oder noch früher zum Vorschein. Die Menge der ausfallenden Substanz ist nicht konstant und sie betrug in verschiedenen Versuchen, von denen jedoch einige bei Zimmertemperatur ausgeführt wurden, zwischen rund 16 und 24% von dem Casein (über die Ursache dieser Schwankungen s. Abschnitt III).

Die ausfallende Substanz besteht nicht aus Paracasein, sondern aus einem Gemenge von Stoffen, welches in Alkali schwerlöslicher als das Paracasein ist. Der Grund seiner Ausfällung liegt auch darin, daß die in einer Dinatriumcaseinatlösung enthaltene Menge Alkali zwar zur Lösung des Caseins oder Paracaseins hinreichend, aber zur Lösung des Umwandlungsproduktes unzureichend ist. Daß dieses Produkt kein einheitlicher Stoff, sondern ein Gemenge ist, geht unter anderem daraus hervor, daß man in ihm Fraktionen mit ver-

schiedener Löslichkeit in stark verdünnter Chlorwasserstoffsäure nachweisen kann. Ein leicht zu konstatierender, auffälliger Unterschied von dem Casein und Paracasein liegt darin, daß man das Gemenge allerdings in Wasser mit Hilfe von CaCO_3 lösen kann, daß aber die Lösung wasserhell oder nur schwach opalisierend ist und beim Erwärmen nicht weiß wird.

Das von dem nun erwähnten Gemenge getrennte Filtrat enthält neben wasserlöslichen Produkten (Albumosen) noch einen Rest von fällbarer Substanz, die wenigstens in der Hauptsache wie das ausfallende Gemenge sich verhält. Durch Erhitzen zum Sieden und vorsichtigen Säurezusatz kann man auch diese fällbare Substanz so vollständig entfernen, daß man ein nicht weiter fällbares Filtrat erhält. Da eine mehr eingehende Untersuchung der bei Einwirkung von Chymosin auf Dibaseinatlösungen entstehenden fällbaren Produkte mich zu weit von der Hauptaufgabe meiner Arbeit hätte führen müssen, habe ich diese Produkte nicht näher untersucht.

Ganz anders als eine Dinatriumcaseinatlösung verhält sich eine Lösung von Natriumpentacaseinat nach Zusatz von einer neutralen Enzymlösung. Hier tritt viel langsamer eine schwache, nur allmählich zunehmende Opalescenz auf. Eine Bildung von Albumosen und eine Umwandlung des Paracaseins findet allerdings ebenfalls, wenn auch viel langsamer, statt, aber eine Fällung tritt nicht, jedenfalls nicht bei Anwendung von reineren Enzymlösungen, im Laufe von 24—48 Stunden auf.

Lösungen von Tetracaseinaten werden stärker und rascher als die der Pentacaseinate angegriffen, die Opalescenz wird viel stärker, aber es entsteht auch hier innerhalb der genannten Zeit keine Fällung. Die Menge des Alkalis scheint auch in diesen Lösungen hinreichend zu sein, um die schwerlöslicheren Umwandlungsprodukte des Paracaseins in Lösung zu halten.

In den Trinatriumcaseinatlösungen tritt dagegen regelmäßig, wenn auch langsamer als in den Dibaseinatlösungen, eine Fällung auf. Es kann sich jedoch auch ereignen, daß, wenn ein Gemenge von Tribaseinat- und Enzymlösung so milchweiß geworden ist, daß man das baldige Auftreten einer Fällung erwartet, eine solche ausbleibt und die Probe statt

dessen bei fortgesetzter Einwirkung des Enzymes sich eher wieder etwas aufhellt. Gleichgültig, ob man mit der einen oder anderen Natriumcaseinatlösung arbeitet, kann man jedoch immer nach Neutralisation des Alkalis mit der erforderlichen Menge Säure, Filtration und Entfernung des zurückgebliebenen fällbaren Eiweißes durch Sieden unter Säurezusatz ein Endfiltrat erhalten, welches kein koagulierbares Eiweiß mehr enthält und wie eine Lösung von primären und sekundären Albumosen sich verhält. Eine weitere Aufteilung des Albumosengemenges in verschiedene Albumosen lag außerhalb des Rahmens meiner Arbeit, denn ich beabsichtigte nur, das Verhalten der Alkalicaseinatlösungen als Ausgangspunkt für das Studium gewisser Seiten der Pepsin- und Chymosinwirkung zu benutzen.

In dieser Hinsicht wären zunächst die zwei folgenden Möglichkeiten ins Auge zu fassen. Einerseits könnte nämlich die in einer Dinatriumcaseinatlösung mit je nach der Intensität der Enzymwirkung wechselnder Geschwindigkeit auftretende Fällung vielleicht ebenso wie die Milchgerinnung als Maß der Enzymwirkung dienen. Auf der anderen Seite könnte man vielleicht auch die quantitative Bestimmung der Hydrolyseprodukte als Mittel zum Studium der Enzymwirkung unter verschiedenen Bedingungen benutzen. Diese zwei Möglichkeiten sind auch Gegenstand meiner Untersuchungen gewesen und sie sollen in dem Folgenden in besonderen Abschnitten besprochen werden. Bevor ich zu diesen Fragen übergehe, muß ich jedoch erst der zur quantitativen Bestimmung der Hydrolyseprodukte benutzten Methode einige Worte widmen.

Die quantitative Bestimmung der Hydrolyseprodukte ist schon von anderen Forschern, nämlich von Schmidt-Nielsen¹⁾ und E. Petry,²⁾ als Mittel zur Verfolgung der enzymatischen Vorgänge in Alkalicaseinatlösungen bei Einwirkung von Chymosin benutzt worden, und in beiden Fällen wurden nur die sekundären Albumosen berücksichtigt. Schmidt-Nielsen bestimmte die Menge des sogenannten Molkeneiweißes, welches

¹⁾ Hammarsten-Festschrift, XVI, II, Upsala-Wiesbaden 1906.

²⁾ l. c. Hofmeisters Beiträge.

wesentlich aus sekundärer Albumose besteht und beim Aus-salzen mit Kochsalz in Lösung bleibt. Er bestimmte nämlich nach verschieden langer Einwirkung des Chymosins auf Alkali-caseinatlösung den Stickstoffgehalt des nach Sättigung mit kalkhaltigem Kochsalz erhaltenen Filtrates, und er fand dabei, daß die Menge des Molkenstickstoffes nach 15 Minuten 3 und nach 6 Stunden nur 4,5% des Caseinstickstoffes betrug. Er deutete dies dahin, daß die Bildung des Molkeneiweißes im nächsten Zusammenhange mit der Paracaseinbildung steht und nicht das Resultat einer fortgesetzten Hydrolyse ist. Petry, welcher den Stickstoff in dem Filtrate nach Sättigung mit Magnesiumsulfat oder nach Halbsättigung mit Zinksulfat bestimmte, kam zu dem entgegengesetzten Resultate, daß nämlich die Molkeneiweißbildung nicht im Momente der Paracaseinbildung stehen bleibt, sondern über diesen hinaus kontinuierlich weiter schreitet. Zu bemerken ist jedoch, daß auch Petry eine mehr bedeutende Zunahme des Molkenstickstoffes erst nach langdauernder Einwirkung fand. In den zwei von ihm bei 40° C. ausgeführten Versuchen hatte in dem einen nach Verlauf von 1 Stunde und in dem anderen sogar nach 3 Stunden noch keine Vermehrung des Molkenstickstoffes stattgefunden, und es besteht also kein bedeutender Widerspruch zwischen den Beobachtungen der beiden Forscher.

Das Verfahren, die Intensität der Hydrolyse, d. h. in diesem Falle der Albumosenbildung, durch Bestimmung von nur einer besonderen Albumosenfraktion zu ermitteln, ist jedoch nur unter der Voraussetzung berechtigt, daß diese Fraktion stets in einer konstanten Relation zu der Gesamtmenge der Albumosen gebildet wird. Da nun nach den Untersuchungen von E. Zunz¹⁾ eine ähnliche Voraussetzung wenigstens für die Pepsinverdauung nicht zutreffend zu sein scheint, ist es nicht ausgeschlossen, daß auch bei der Hydrolyse des Caseins durch Lab die obige Voraussetzung nicht zutrifft, und ich fand es deshalb mehr zusagend, die Gesamtmenge der Albumosen zu bestimmen. Gegen ein solches Verfahren kann man allerdings einwenden, daß auch die Gesamtmenge der Albumosen viel-

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. 28, S. 132 (1899).

leicht nicht immer in einer konstanten Relation zu der Bildung anderer Hydrolyseprodukte steht und folglich kein zuverlässiges Maß der Hydrolyse ist, und diese Einwendung ist unzweifelhaft berechtigt. Da man aber durch Bestimmung von dem ganzen Bruchteil des Caseins, der unter bestimmten Verhältnissen in Albumosen umgewandelt worden ist, eine bessere Vorstellung von dem Umfange der Hydrolyse gewinnt als durch Bestimmung von nur einer besonderen Albumosenfraktion, deren Relation zu der gesamten Albumosenmenge unbekannt ist, schien es mir mehr angemessen zu sein, gerade die Frage zu prüfen, ob und inwieweit die Gesamtmenge der Albumosen als Maß der Enzymwirkung dienen könnte. Das hierzu benutzte Verfahren war folgendes.

Wenn in einem Versuche die Enzymwirkung die bestimmte Zeit bei Körpertemperatur stattgefunden hatte, wurden alle Proben durch Einstellen in kaltes Wasser rasch auf Zimmertemperatur abgekühlt. Dann wurde die berechnete Menge $n/10$ -Säure (bezw. in Versuchen mit sauren Lösungen $n/10$ -Lauge) zugesetzt und das ausgefällte Eiweiß (Casein, Paracasein und weiter umgewandeltes, bei Neutralisation fällbares Eiweiß) durch trockene Filter abfiltriert. Die Ausfällung des Eiweißes und die Gewinnung von ganz wasserhellen Filtraten gelang jedoch noch besser, wenn die Versuchsflüssigkeit einen sehr kleinen Säureüberschuß (0,1—0,2 ccm $n/10$ -Säure auf je 50 bis 60 ccm Flüssigkeit) enthielt. Von den wasserhellen Filtraten wurden gleich große Volumina genau abgemessen und in passenden Kolben durch Hitzeokoagulation unter Zusatz von einer stark verdünnten Essigsäure von nicht ausgefälltem, aber koagulablem Eiweiß befreit. Die vollständige Entfernung alles koagulablen Eiweißes — dessen Menge immer nur klein ist — ist nicht ganz leicht, und es ist am besten, in einem kleineren abgemessenen Teil des Filtrates die zur Ausfällung erforderlichen Mengen Essigsäure vorher zu bestimmen. Bei richtiger Arbeit erhält man ein neues, wasserhelles Filtrat, das ganz frei von fällbarem oder hitzeokoagulablem Eiweiß ist. Durch Zusatz von Essigsäure und Kaliumferrocyanid wird das Filtrat nicht direkt gefällt; es wird höchstens sehr schwach opali-

sierend und setzt erst nach mehreren Stunden eine sehr geringfügige Fällung ab. Diese Fällung rührt von einer in sehr kleiner Menge vorhandenen Albumose her, die man in den stärker konzentrierten Filtraten direkt ausfällen kann.

In einem vorigen Aufsätze¹⁾ habe ich über einige Versuche berichtet, in welchen die quantitative Albumosenbestimmung in der Weise geschah, daß die ersten Filtrate direkt, ohne Entfernung des fällbaren Eiweißes durch Hitzekoagulation, eingetrocknet wurden. Der nach dem Trocknen bei 105 bis 110° C. erhaltene Rückstand hinterließ immer einen in Wasser z. T. unlöslichen Rest, der abfiltriert und ausgewaschen wurde. Das Filtrat (mit dem Waschwasser) wurde eingetrocknet und der neue Rest nach dem Trocknen gewogen. Ich ließ es damals dahingestellt sein, ob der in Wasser unlösliche Teil aus einem nicht ausgefallten Rest des Paracaseins oder aus einer beim Eintrocknen gebildeten Dysalbumose bestand. Fortgesetzte Untersuchungen haben gezeigt, daß dieser in Wasser unlösliche Rest immer aus fällbarem koaguliertem Eiweiß besteht und daneben meistens auch eine während des Trocknens bei höherer Temperatur aus einer Albumose gebildete Dysalbumose enthält. Diejenige Albumose, welche während des Trocknens in Dysalbumose übergeht, wird bei verschiedener Versuchsanordnung in ein wenig verschiedener Menge gebildet, und bei einer Bestimmung der gesamten Albumosen ist es also nicht gestattet, die gebildete Dysalbumose zu entfernen.

Aus dem nun angeführten Grunde habe ich diese ältere Methode verlassen und alles koagulable, fällbare Eiweiß in der eben erwähnten Weise entfernt. Da dieses koagulierte Eiweiß in Wasser unlöslich ist, kann man es leicht auf einem kleinen Filtrum mit Wasser auswaschen. Das Filtrat (samt dem Waschwasser) wird in einer Platinschale eingetrocknet und der Rückstand, nach dem Trocknen zu konstantem Gewicht, gewogen. Da in jedem Versuche eine Kontrolleprobe mit derselben, unwirksam gemachten Enzymlösung unter im übrigen ganz denselben Bedingungen angestellt wurde, konnte der getrocknete und gewogene Rückstand der Kontrolleprobe von den Rück-

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. 94, S. 316 (1915).

ständen in den anderen Proben einfach abgezogen und der Rest in jeder Probe als Albumosen betrachtet werden.

Statt des Eintrocknens und Wägens kann man natürlich nach Entfernung des fällbaren Eiweißes den Stickstoff in dem auf das ursprüngliche Volumen gebrachten Filtrate nach Kjeldahl bestimmen. Das Wägungsverfahren gibt aber, wie Doppelbestimmungen zeigten, sehr genaue Resultate, es erfordert nicht mehr, eher weniger, Arbeit als die Stickstoffbestimmungen, und hierzu kommt noch, daß man während der Verdunstung der Flüssigkeit in der Platinschale noch weiter die gelungene Entfernung von allem koagulablen Eiweiß kontrollieren kann, was bei direkter Kjeldahl-Bestimmung nicht der Fall ist. Die einzige Schwierigkeit der ganzen Bestimmung ist die vollständige Entfernung des fällbaren Eiweißes aus dem Filtrate, und diesen Teil des Verfahrens kann man weder in dem einen noch in dem anderen Falle umgehen. Ob man in dem letzten Filtrate den Stickstoff oder die Menge der Albumosen bestimmt, dürfte dagegen gleichgültig sein.

III. Verhalten der Dialkalicaseinatlösungen als Maß der Enzymwirkung.

Dinatriumcaseinatlösungen geben, wie oben erwähnt, mit Chymosinlösungen nach einiger Zeit eine Fällung, die in verschiedenen Fällen mit verschiedener Geschwindigkeit auftritt. Bei Zimmertemperatur tritt die Fällung regelmäßig so langsam auf, daß nur Versuche bei Körpertemperatur zu einer vergleichenden Prüfung der Wirkung von Enzymlösungen verschiedener Stärke geeignet sind.

In solchen vergleichenden Versuchen kann man nun die stufenweise Veränderung der Dicalcaseinatlösungen von beginnender Opalescenz bis zum Milchweißwerden und beginnender Ausfällung gut verfolgen, und man kann direkt sehen, welche von zwei oder mehreren Enzymlösungen die wirksamste ist. Es war deshalb von Interesse zu sehen, ob zwischen dem Enzymgehalte und der zum Auftreten der Fällung nötigen Zeit eine solche Proportionalität besteht, daß die Fällung der Dicalcaseinatlösung ebenso wie die Gerinnung der Milch als Maß

der Enzymwirkung dienen könnte. Zahlreiche zu dem Zwecke ausgeführte Versuche haben gezeigt, daß dies nicht der Fall ist. Eine enzymreichere Lösung ruft allerdings in einer Dinatriumcaseinatlösung eine Fällung früher als eine enzymärmere hervor; aber die zur Hervorrufung der Fällung erforderlichen Zeiten stehen in keiner konstanten oder direkten Beziehung zu dem ungleichen Enzymgehalte. Die Abweichung rührt auch nicht daher, daß man den Zeitpunkt für das Auftreten der Fällung nicht so genau in einer Dicaseinatlösung wie den Zeitpunkt der Milchgerinnung bestimmen kann, denn die Abweichung von dem Zeitgesetze ist so bedeutend, daß selbst eine Fehlablesung von mehreren Minuten ohne Belang ist.

Die zu diesen Versuchen benutzten Enzymlösungen waren in den meisten Fällen nach der in meinem letzten Aufsatz²⁾ beschriebenen Methode, die ich hier und in dem Folgenden der Kürze halber die «Neutralisationsmethode» nenne, dargestellt worden. Diese Lösungen enthielten stets nur eine kleine Menge, 0,015—0,045 ‰, feste Stoffe. In mehreren Versuchen benutzte ich auch durch Dialyse gereinigte, neutral reagierende Lösungen von Hansens Labpulver. Als Verdünnungsflüssigkeit zur Darstellung von Enzymlösungen verschiedener Stärke diente teils Wasser und teils ein Teil derselben, durch Erhitzen auf 90—95 ° C. unwirksam gemachten Enzymlösung. Die nach dem oben angegebenen Verfahren dargestellten Dicaseinatlösungen enthielten immer 2 ‰ Casein und 0,0263 ‰ NaCl. Als Beispiele führe ich hier einige Versuche an.

Versuch 1. Eine durch Dialyse gereinigte Lösung von Hansens Labpulver mit 0,033 ‰ organischen Stoffen. Die Verdünnung geschah teils mit Wasser und teils mit der unwirksam gemachten Lablösung, so daß Lösungen von dem Enzymgehalte 1, $\frac{1}{3}$ und $\frac{1}{6}$ erhalten wurden. Die mit Wasser verdünnten Lösungen sind mit W und die mit unwirksam gemachter Enzym-(Lab)-Lösung verdünnten mit E bezeichnet worden. Die Zeiten bedeuten überall für die Milchversuche die Gerinnung und für die Caseinatversuche das erste, ganz deutliche Auftreten einer Fällung.

Enzymgehalt	Milchversuche (Temp. 38° C.)	Dicaseinatvers. (38—39° C.)
1	= 35 Sek.;	= 35 Sek. = 45 Min.; = 44 Min
$\frac{1}{3}$	W = 110 ; E = 112	W = 98 ; E = 97
$\frac{1}{6}$	W = 220 ; E = 222	W = 154 ; E = 152

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. 94, S. 298 (1915).

Die Relationszahlen waren also: für die Milchversuche = 1 : 3 : 6
 » » Dicaseinatversuche = 1 : 2,2 : 3,4.

Die Milchgerinnung folgte also sowohl bei Verdünnung mit Wasser wie mit Enzymlösung dem sogenannten Zeitgesetze. Die Versuche mit Dicaseinatlösung zeigten ein ganz abweichendes Verhalten.

Versuch 2. Enzymlösung, nach der Neutralisationsmethode dargestellt, mit 0,041% festen Stoffen. Die Verdünnung geschah in diesem Falle nur mit unwirksamer Enzymlösung und die Konzentrationen waren 1, $\frac{1}{3}$ und $\frac{1}{6}$.

Enzymgehalt	Milchversuche (Temp. 39° C.)	Dicaseinatvers. (39° C.)
1	30 Sek.	45 Min.
$\frac{1}{3}$	89 »	87 »
$\frac{1}{6}$	178 »	128 »

Die Relationszahlen also: in den Milchversuchen = 1 : 3 : 6
 » » Dicaseinatversuchen = 1 : 1,9 : 2,8.

Versuch 3. Dialysierte Lösung von Hansens Labpulver mit 0,022% organischen Stoffen und 0,028% NaCl. Verdünnungsflüssigkeit teils Wasser (W) und teils unwirksame Enzymlösung (E.) Enzymkonzentrationen: 1, $\frac{1}{4}$ und $\frac{1}{8}$.

Enzymgehalt	Milchversuche (Temp. 38,5°)	Dicaseinatversuche (38,5—39°)
1	37 Sek.; 37 Sek.	80 Min.
$\frac{1}{4}$	W 142 » ; E 140 »	187 »
$\frac{1}{8}$	W 270 » ; E 262 »	265 »

Die Milchgerinnung folgte in diesem Versuche nicht dem Zeitgesetze so genau, wie dies sonst bei höheren Temperaturen meistens der Fall ist; aber die Dicaseinatversuche zeigten, wie immer, eine weit größere Abweichung.

Die Relationszahlen waren nämlich:

in den Milchversuchen	W = 1 : 3,8 : 7,3
» » »	E = 1 : 3,8 : 7,1
» » Dicaseinatversuchen	E = 1 : 2,3 : 3,3.

Versuch 4. Enzymlösung nach der Neutralisationsmethode bereitet mit 0,026% festen Stoffen. Verdünnung mit unwirksam gemachter Enzymlösung.

Enzymgehalt	Milchversuche (Temp. 39° C.)	Dicaseinatversuche 39° C.
1	20—22 Sek.	68 Min.
$\frac{1}{4}$	85 »	156 »
$\frac{1}{8}$	170 »	248 »
$\frac{1}{16}$	335 »	

Die Relationszahlen waren also:

für die Milchversuche	= 1 : 4 : 8 : 16
» » Dicaseinatversuche	= 1 : 2,3 : 3,6.

Versuch 5. Eine dialysierte Lösung von Hansens Labpulver mit 0,067% organischen Stoffen und 0,059% NaCl. Die Lösung war

durch Alkalibehandlung (0,008 % NaOH während $3\frac{1}{2}$ Minuten bei Zimmertemperatur) soweit von Pepsin befreit worden, daß die Mettsche Probe vollständig negativ ausfiel. In einem Versuche mit feinkoagulierte, feuchtem Hühnereiweiß bei etwa 37° C. während 30 Stunden war die mit 0,2% HCl angesäuerte Lösung ebenso unwirksam wie die zu demselben Säuregrade angesäuerte, durch Erhitzen unwirksam gemachte Lösung. Die Verdünnung geschah sowohl mit Wasser (W) wie mit unwirksamer Enzymlösung (E). Die Temperatur war in den Milchversuchen mit W 38° C., in den mit E $36,5^{\circ}$ C. und in den Dicaseinatversuchen 39° C.

Enzymgehalt		Milchversuche	Dicaseinatversuche
1		12—15 Sek.; 15 Sek.	44 Min.
$\frac{1}{3}$	W	40 > ; E 45 >	E 94 >
$\frac{1}{9}$.W	120 > ; E 130 >	E 208 >

Die Relationszahlen waren also :

$$\begin{aligned} \text{für die Milchversuche} &= 1 : 3 : 9 \\ \text{» » Dicaseinatversuche} &= 1 : 2,15 : 4,7. \end{aligned}$$

Eine Kontrolleprobe mit käuflichem Pepsin, 1 : 100 000, verdaute leicht und vollständig dieselbe Menge koagulierte Hühnereiweiß, die von der angewandten Lablösung in 30 Stunden nicht merkbar angegriffen wurde, und die Lablösung, welche Milch in 15 Sekunden koagulierte, zeigte also keine in Betracht kommende Pepsinwirkung.

Andere, nach demselben Prinzip mit alkalisierten Enzymlösungen ausgeführte Versuche haben zu ganz ähnlichen Resultaten geführt, und aus sämtlichen Versuchen folgt also, daß es für das Versuchsergebnis ohne Belang ist, ob die Enzymlösungen als pepsinhaltig oder als fast pepsinfrei sich erweisen. Es handelt sich also offenbar nur um eine Chymosinwirkung.

Da sämtliche Versuche übereinstimmende Resultate ergeben haben, dürfte es überflüssig sein, noch weitere Beispiele anzuführen. Immer hat es sich gezeigt, daß die Zeit, welche zum Auftreten einer Fällung in einer Dinatriumcaseinatlösung erforderlich ist, nicht dem Enzymgehalte umgekehrt proportional ist; und dieser Vorgang kann also nicht, im Gegensatz zu der Milchgerinnung, als Maß der relativen Enzymmengen dienen. Die Abweichung von dem Zeitgesetze ist am größten bei großen Unterschieden in dem Enzymgehalte — wenigstens bei den von mir geprüften Verdünnungen, die nie stärker als $\frac{1}{9}$ der ursprünglichen Enzymmenge waren. In dem Maße, wie die Enzymmengen zweier Lösungen weniger von einander abweichen, tritt auch der Niederschlag in beiden mehr gleich-

zeitig auf, was aus anderen in dem Folgenden mitzuteilenden Versuchen ersichtlich werden soll.

Daß eine Enzymlösung, welche in Milchversuchen dem Zeitgesetze entsprechend wirkt, in einer Dinatriumcaseinatlösung ein ganz anderes Verhalten zeigt, hat wohl seinen Grund darin, daß die Milchgerinnung ein erstes Stadium der Chymosinwirkung darstellt, in welchem ein homogenes Produkt, das Paracasein, gebildet und durch Vermittelung der anwesenden Kalksalze sogleich ausgefällt wird. Bei der Einwirkung von Chymosin auf eine Dialkalicaseinatlösung wird ebenfalls in einem ersten Stadium Paracasein gebildet; aber dieses bleibt in Lösung, wird weiter umgewandelt und liefert neue Produkte, die eine ungleiche Löslichkeit, bzw. eine verschiedene Fällbarkeit haben. Nach v. Slyke und Bosworth¹⁾ soll die Milchgerinnung infolge der Chymosinwirkung dadurch bedingt sein, daß das Casein in 2 Moleküle Paracasein sich spaltet, und wenn diese Ansicht richtig ist, dürfte der eben gemachte Erklärungsversuch sehr an Wahrscheinlichkeit gewinnen.

Dieser Erklärungsversuch steht auch in gutem Einklang damit, daß einerseits die Fällung, wie oben angegeben, nicht einheitlicher Natur ist, und daß andererseits ihre Entstehung nicht, wie die Milchgerinnung, fast wie mit einem Schlage abgeschlossen und fertig ist, sondern einige Zeit fort dauert. Wenn man nämlich, unmittelbar nachdem in einem Gemenge von Dicaseinat- und Enzymlösung eine flockige Fällung sich gebildet hat, die Probe rasch abkühlt und zentrifugiert, erhält man einen weißen, festen Bodensatz und darüber eine mehr oder weniger stark weiße Flüssigkeit. Gießt man die letztere ab und läßt sie von neuem einige Zeit bei Körpertemperatur stehen, so trübt sie sich wieder und es wird eine neue Fällung gebildet, deren Menge zunimmt, bis man zuletzt eine klare oder fast klare Flüssigkeit, die keine weitere Fällung gibt, erhält.

Die Menge der Fällung ist also von dem Zeitpunkte, wo man den Versuch unterbricht, abhängig, und als Beleg hierfür möge folgendes Beispiel dienen. Ein Gemenge von Dicaseinat-

¹⁾ Journal of biol. Chemistry, Bd. 14, und Bosworth, ebenda, Bd. 15.
Hoppe-Seyler's Zeitschrift f. physiol. Chemie. CII.

und Enzymlösung wurde in zwei gleich große Portionen geteilt, die gleichzeitig ins Wasserbad (39° C.) eingestellt wurden. Nach 50 Minuten trat — gleichzeitig in beiden — die charakteristische Fällung auf. Die eine Portion wurde nun rasch abgekühlt, 5 Minuten stark zentrifugiert und dann die Menge der Fällung bestimmt. Die andere Portion blieb noch eine Stunde bei 39° C. stehen und dann genau wie die erstgenannte behandelt. Die Menge der Fällung betrug in der ersten Portion 10% und in der zweiten 20,4% von der Menge des Caseins.

Den Zeitpunkt, da die Bildung der obengenannten Fällung gerade aufhört, kann man nicht direkt bestimmen, denn das Aussehen der Proben gibt keine brauchbaren Anhaltspunkte dafür, und wenn man endlich eine Flüssigkeit erhalten hat, die keine weitere Fällung gibt, so ist immer die Möglichkeit vorhanden, daß ein Teil der zuerst aufgetretenen Fällung schon weiter hydrolysiert worden ist. In der Schwierigkeit, den Endpunkt der fraglichen Niederschlagsbildung zu fixieren, liegt wohl auch wahrscheinlich der wichtigste Grund, warum ich, wie oben S. 39 angegeben wurde, Schwankungen in der Menge des gebildeten Niederschlages von rund 16—24% gefunden habe. Möglicherweise kommen hier auch andere Faktoren, wie die Intensität der Enzymwirkung und die Temperatur, in Betracht, denn die höchsten Werte, 21,5 und 24,6%, erhielt ich in Versuchen bei Zimmertemperatur, die erst während der Nacht (beim Aufbewahren der Proben in einem kalten Zimmer) fertig wurden. Hier hatte die Fällung das Aussehen eines lockeren Gerinnsels mit ausgepreßter, wasserheller Flüssigkeit. Die Bildung der Fällung war vollständig beendet, und die Gelegenheit zur weiteren Hydrolyse der gebildeten Fällung war wohl bei dieser niedrigen Temperatur kleiner als bei Körpertemperatur.

Leichter als den Endpunkt des erwähnten Vorganges kann man bei einiger Übung den Anfangspunkt desselben, d. h. das erste Auftreten der Fällung bestimmen. Wenn man nämlich dem Fällungspunkte nahe gekommen ist, erkennt man das an dem veränderten Aussehen der milchweißen Versuchsflüssigkeit, indem sie nun in dünnerer Schicht ein eigentümlich

halbdurchsichtiges Aussehen annimmt. Wenn man nun das geschlossene Gefäß jede Minute oder alle zwei Minuten einige Male umdreht und die Flüssigkeit dadurch in leise Bewegungen versetzt, so tritt bald wie mit einmal eine, die ganze Flüssigkeit durchsetzende feine Fällung auf, die rasch mehr grobflockig wird und zum Boden sinkt. Verschiedene Versuche mit kleineren und größeren Mengen derselben Versuchsflüssigkeit haben gezeigt, daß die verschiedenen Proben entweder nach ganz derselben Zeit oder nur mit einem Unterschied von ein paar Minuten die charakteristische Fällung geben. Eine gewisse Übung ist allerdings bei solchen Versuchen erforderlich; aber auf der anderen Seite ist auch eine Fehlbestimmung von wenigen Minuten in diesen, immer über etwas längere Zeit sich erstreckenden Versuchen ohne Belang.

Da man also das Auftreten dieser Fällung hinreichend genau bestimmen kann, war es von Interesse zu erfahren, ob zwischen dem Auftreten dieser Fällung und der Bildung der anderen Hydrolysenprodukte eine solche Beziehung besteht, daß die Fällung der Dicaseinatlösungen immer ein bestimmtes Stadium in der Hydrolyse solcher Lösungen repräsentiert. Da die Menge der Fällung weniger gut bestimmbar ist, läßt sich ein Vergleich zwischen ihr und der Albumosenmenge nicht mit Vorteil ausführen. Da man aber die Gesamtmenge der Albumosen in jedem beliebigen Momente der Hydrolyse bestimmen kann, ist es leicht zu prüfen, ob die Albumosen in diesem Stadium der Hydrolyse (also beim ersten Auftreten der Fällung) immer denselben Bruchteil des Caseins darstellen, gleichgültig ob die Fällung früher (bei kräftigerer Enzymwirkung) oder später (bei schwächerer Enzymwirkung) auftritt. Um diese Frage zu beleuchten, führe ich hier als Beispiele die folgenden Versuche mit Dicaseinatlösungen an.

Versuch 6. Durch Dialyse gereinigte Lösung von Hansens Labpulver, dieselbe Lösung wie in Vers. 3. Verdünnungsflüssigkeit dieselbe, erhitzte Lablösung. Es wurden drei Proben mit je 30 ccm Dicaseinat- und 30 ccm Lablösung angeordnet: K mit erhitzter unwirksamer Lablösung, A mit unverdünnter und B mit zu $\frac{1}{4}$ verdünnter Lablösung. Temp. 38,5–39° C. In A trat die Fällung nach 80, in B nach 185 Minuten auf. Zur Neutralisation des Caseinalkalis waren laut der Berech-

nung rund 1,4 ccm $n/10$ -Säure erforderlich und es wurden 1,5 ccm zugesetzt. Rasche Filtration, wasserhelle Filtrate, von denen je 50 ccm zur Entfernung des fällbaren und koagulablen Eiweißes verarbeitet wurden. Nach Abzug der festen Stoffe in der Kontrollprobe K (0,053 g) waren die Albumosenmengen in A 0,256 und in B 0,162 g. Berechnet man die Albumosenmengen auf die Gesamtmenge Versuchsflüssigkeit (60 ccm vor der Neutralisation), was wohl nicht ganz exakt ist, aber jedenfalls einen guten Vergleich von den Albumosenmengen in beiden Proben, in Prozenten von dem Casein, gestattet, so erhält man die Zahlen, resp. 0,307 und 0,194 g. Die Menge des Caseins in jeder Probe war 0,600 g, und bei dem Enzymgehalte 1 waren also nach 80 Minuten 51% und bei dem Enzymgehalte $\frac{1}{4}$ nach 185 Minuten 32,3% von dem Casein in Albumosen umgewandelt worden.

Versuch 7. Dieselbe Enzymlösung wie in Vers. 4 und dieselbe Versuchsanordnung wie in dem vorigen Versuche (Nr. 6) mit je 30 ccm Enzym- und 30 ccm Dicaseinatlösung (von 2%). A. Enzymkonzentration 1 und B. $\frac{1}{4}$. Temp. 39° C. In A trat die Fällung nach 68 Minuten und in B nach 158 Minuten auf. Albumosenmengen in 50 ccm Filtrat in A = 0,256 und in B = 0,178 g. Auf 60 ccm berechnet waren in A 0,307 und in B 0,214 g, bzw. 51,1 und 35,7% von dem Casein, gebildet worden.

Versuch 8. Dieselbe dialysierte und durch Alkalieinwirkung von Pepsin befreite Lablösung wie in Vers. 5. Dieselbe Versuchsanordnung wie in den zwei vorigen Versuchen, aber die Enzymmengen in A und B waren 1 und $\frac{1}{6}$. Temp. 39°. A gab Fällung nach 41 und B nach 132 Minuten. Die Albumosenmengen, auf 60 ccm berechnet, waren in A 0,226 g und in B 0,170 g, bzw. 37,6 und 28,3% von dem Casein.

Der Übersichtlichkeit halber sind die wichtigsten Versuchsdata in der folgenden Tabelle zusammengestellt worden. Der Kürze halber wird die Zeit für das Auftreten der Fällung als Gerinnungszeit bezeichnet.

Tabelle I.

Enzymgehalt	Gerinnungszeit Min.	Caseinmenge in g	Albumosen in g	Albumosen in % von dem Casein
Versuch 6	1	0,600	0,307	51,1
	$\frac{1}{4}$	0,600	0,194	32,3
, 7	1	0,600	0,307	51,1
	$\frac{1}{4}$	0,600	0,214	35,7
, 8	1	0,600	0,226	37,6
	$\frac{1}{6}$	0,600	0,170	28,3

Die drei Versuche führten also zu demselben Resultate, nämlich daß in dem Zeitpunkte, da in einer Dinatriumcaseinatlösung durch Labwirkung eine Fällung auftritt, die gebildeten Albumosenmengen nicht einen konstanten Bruchteil des Caseins darstellen, sondern bedeutend von einander abweichen können. Daß in den Versuchen 6 und 7 bei dem Enzymgehalte 1 die Albumosenmengen genau dieselben waren, ist offenbar ein Zufall, denn die beiden Enzymlösungen waren nicht gleich kräftig wirksam. Das Wesentliche ist, daß bei Anwendung von einer und derselben Enzymlösung in verschiedener Verdünnung die Albumosenmengen in allen drei Versuchen in — nach dem Aussehen zu urteilen — demselben Momente der Hydrolyse wesentlich verschieden waren. In der enzymreicheren Probe war immer eine größere Albumosenmenge als in den enzymärmeren bei dem entsprechenden Zeitpunkte gebildet worden. Das Auftreten der Fällung bezeichnet also nicht ein bestimmtes Stadium der Hydrolyse, in welchem die Albumosen in einem konstanten Verhältnis zu den anderen Hydrolyseprodukten stehen, und dieses Resultat steht in guter Übereinstimmung mit der aus den obigen, qualitativen Versuchen hervorgegangenen Tatsache, daß das Auftreten der Fällung nicht als Maß der Enzymmenge dienen kann.

IV. Wirkung der Enzymlösungen auf Caseinate von verschiedenem Alkaligehalte.

Wie in dem Vorigen erwähnt wurde, hatten die qualitativen Versuche gezeigt, daß, nach dem Aussehen zu urteilen, die alkalireicheren Caseinatlösungen bei der Einwirkung von Chymosin langsamer als die alkaliärmeren angegriffen werden, und dies machte es wahrscheinlich, daß auch die Albumosenbildung mit ungleicher Geschwindigkeit in den verschiedenen Caseinatlösungen bei demselben Enzymgehalte verlaufen würde. Um dies zu prüfen, habe ich die Albumosenbildung in Di- und Tetracaseinatlösungen auf der einen Seite und in Tri- und Pentacaseinatlösungen auf der anderen miteinander verglichen.

Die Caseinatlösungen waren immer 2%ig und ich ging bei ihrer Darstellung stets von 4%igen Lösungen aus. Die

Lösungen von Dialkalicaseinat wurden in oben (S. 36) angegebener Weise aus Tetracaseinatlösungen durch Verdünnung mit $n/100$ -HCl und Wasser bereitet, und die zu vergleichenden Tetracaseinatlösungen wurden durch entsprechende Verdünnung mit $n/100$ -NaCl und Wasser auf den Gehalt von 2% Casein gebracht. In analoger Weise wurden aus 4%igen Pentacaseinatlösungen durch Verdünnung mit $n/100$ -HCl 2%ige Tricaseinatlösungen und durch entsprechende Verdünnung mit $n/100$ -NaCl 2%ige Pentacaseinatlösungen dargestellt. Da Alkalicaseinatlösungen, welche, auch bei Gegenwart von Toluol, längere Zeit auf Körpertemperatur erwärmt werden, z. T. sich verändern und eine kleine Menge nicht fällbare Substanz geben, habe ich aus diesen und anderen Gründen in sowohl diesen wie in allen anderen Versuchen mit Caseinatlösungen die Enzymlösungen nur 1—3, höchstens 4 Stunden, einwirken lassen. Durch besondere Versuche habe ich mich davon überzeugt, daß Natriumcaseinatlösungen, auch die mit dem höchsten Alkaligehalte (die Pentacaseinatlösungen), innerhalb dieser Zeit oder im Laufe von 5—6 Stunden bei Abwesenheit von Enzym nicht nachweisbar verändert werden. Zu den Versuchen wurden nach der Neutralisationsmethode dargestellte, bzw. durch Dialyse gereinigte, an festen Stoffen arme Enzymlösungen verwendet.

Da die Enzymlösungen regelmäßig wesentlich schwächer als die neutralisierten Kalbsmageninfusionen wirken, könnte es vielleicht vorteilhaft erscheinen, mit solchen Infusionen zu arbeiten, um eine kräftigere Albumosenbildung zu erreichen. Die neutralisierten Infusionen sind indessen nicht hierzu geeignet, indem sie, wenn man sie nicht hinreichend verdünnt — was ihre Wirkung herabsetzt —, mit Alkalicaseinatlösungen direkt mehr oder weniger reichliche Fällungen geben. Die Natur dieser, bei passenden Mengenverhältnissen auftretenden und bei anderen Mengenverhältnissen sich mehr oder weniger vollständig wieder lösenden Fällungen habe ich noch nicht Gelegenheit gehabt, eingehender zu untersuchen. Das Auftreten solcher Fällungen ist indessen einer der Gründe, warum ich nur mit gereinigten, stoffarmen Enzymlösungen gearbeitet habe.

Die Albumosenbestimmung geschah in oben angegebener Weise, und da sämtliche in diesem Abschnitte angeführten Versuche nach demselben Prinzip ausgeführt worden sind, dürfte es wohl genügend sein, nur einen Versuch als Beispiel etwas ausführlicher anzuführen. Für die übrigen werden nur die wichtigsten Data mitgeteilt.

Versuch 9. Die nach der Neutralisationsmethode dargestellte Enzymlösung enthielt nur 0,010% feste Stoffe. Sie koagulierte Milch in etwa 1 Minute und reagierte neutral. Ein Teil, auf 95° C. erhitzt, wurde zu der Kontrollprobe K verwendet. Diese Probe enthielt 15 ccm Di- + 15 ccm Tetracaseinatlösung und 30 ccm unwirksame Enzymlösung. Die Probe A enthielt 30 ccm Dicaseinat- und 30 ccm Enzymlösung, die Probe B 30 ccm Tetracaseinat- und 30 ccm Enzymlösung. Temp. 39° C. Nach 90 Minuten Fällung in A und der Versuch wurde unterbrochen. B war nun ziemlich stark weiß und K unverändert. Alle Proben wurden nach dem Abkühlen mit den berechneten Säuremengen und Wasser (K 2,1 ccm $n/10$ -HCl + 0,7 ccm Wasser, A 1,45 ccm Säure + 1,35 ccm Wasser und B 2,8 ccm Säure) versetzt und durch trockene Filter filtriert. Von den wasserhellen Filtraten wurden je 50 ccm verarbeitet. Nach Abzug von den festen Stoffen in K (0,046 g) lieferte A 0,205 und B 0,121 g Albumosen. Auf die ursprüngliche Versuchsflüssigkeit, 60 ccm, berechnet, entspricht dies bezw. A 0,246 g und B 0,145 g Albumosen, d. h. in Prozenten von dem Casein (0,600 g) 41 bzw. 24,16%.

Versuch 10. Enzymlösung mit 0,41% festen Stoffen. Pepsinwirkung durch Alkalieinwirkung aufgehoben. Di- und Tetracaseinatlösungen 30 ccm; Enzymlösung ebenso. Temp. 39° C. Versuchsdauer 50 Minuten. Nach dieser Zeit Fällung in A. Albumosenmengen in je 50 ccm Filtrat in A 0,284 und in B 0,160 g, d. h. auf 60 ccm bezw. 0,340 und 0,192 g oder in Prozenten von dem Casein (0,600 g) in A 56,7 und in B 32,0%.

Versuch 11. Enzymlösung mit 0,033% festen Stoffen. Di- und Tetracaseinatlösungen. Versuchsanordnung wie in den zwei vorigen Versuchen. Temp. 37,5—38° C. Versuchsdauer 90 Minuten, Fällung in A. Albumosenmengen in 50 ccm Filtrat in A 0,258 und in B 0,125 g. Auf 60 ccm berechnet: A = 0,308 und B = 0,150 g, d. h. bezw. 51,3 und 25% von dem Casein.

Versuch 12. Eine dialysierte, durch Alkalieinwirkung fast pepsinfrei gemachte Lösung von Hansens Labpulver mit 0,050% festen Stoffen. Die Lösung wirkte etwas schwach, indem sie die Milch erst in 75—80 Sekunden bei 38° C. koagulierte. Die Caseinatlösung A war eine Tri- und die Lösung B eine Pentacaseinatlösung. Jede Probe enthielt nur 20 ccm 2% ige Caseinatlösung und 20 ccm Enzymlösung. Versuchsdauer 60 Minuten bei 38—39° C. Nach Abzug der festen Stoffe in K war die Albumosenmenge in je 30 ccm Filtrat in A 0,089 und in B 0,057 g.

Auf das ursprüngliche Volumen, 40 ccm, ist dies: A 0,119 und B 0,076 g oder in Prozenten von dem Casein (0,400 g) bezw. 29,75 und 19,0%.

Versuch 13. Enzymlösung mit 0,0235% festen Stoffen. Caseinatlösung A eine Tri- und B eine Pentacaseinatlösung. Versuchsanordnung wie im Vers. 12 mit 20 ccm Enzym- und 20 ccm Caseinatlösung in jeder Probe. Versuchsdauer 60 Minuten bei 38,5–39° C. Die Albumosenmengen in 30 ccm Filtrat waren in A 0,126 und in B 0,068 g. Auf das ursprüngliche Flüssigkeitsvolumen (40 ccm) berechnet, ist dies also: A = 0,168 und B = 0,090 g oder in Prozenten von dem Casein (0,400 g) bezw. 42 und 22,5%.

Versuch 14. Enzymlösung mit 0,027% festen Stoffen. Caseinlösung A eine Tri- und B eine Pentacaseinatlösung. Versuchsanordnung (wie in allen Versuchen) mit drei Proben K, A und B, aber mit je 30 ccm Enzym- und 30 ccm Caseinatlösung in jeder Probe. Versuchsdauer 2 Stunden bei 38,5 - 39° C. Albumosen in je 50 ccm Filtrat in A 0,217 g und in B 0,129 g. Auf 60 ccm berechnet waren die Mengen 0,260 und 0,155 g bezw. 43,3 und 25,8% von dem Casein (0,600 g).

Der Übersichtlichkeit halber lasse ich hier eine tabellarische Zusammenstellung der 6 letzten Versuche folgen.

Tabelle II.

Nr. des Vers.	Dauer der Enzymwirkung Min.	Menge des Caseins g	Albumosen aus Dicaseinat		Albumosen aus Tricaseinat		Albumosen aus Tetracaseinat		Albumosen aus Pentacaseinat	
			g	%	g	%	g	%	g	%
10	50	600	0,340	= 56,7			0,192	= 32,0		
9	90	600	0,246	= 41,0			0,145	= 24,2		
11	90	600	0,308	= 51,3			0,150	= 25,0		
12	60	400			0,119	= 29,7			0,076	= 19
13	60	400			0,168	= 42			0,090	= 22,5
14	120	600			0,260	= 43,3			0,155	= 25,8

Das Hauptresultat ist also überall dasselbe und besteht darin, daß eine und dieselbe Enzymlösung eine reichlichere Albumosenbildung in den Lösungen der mehr sauren als in denen der mehr basischen Natriumcaseinatlösungen bewirkt. Dies geht bei einem Vergleiche von den Versuchen mit Di- und Tetracaseinaten auf der einen und mit Tri- und Pentacaseinaten auf der anderen Seite deutlich hervor. Daß eine kräftiger wirkende Enzymlösung eine reichlichere Albumosen-

bildung in einer alkalreicheren Caseinatlösung als eine schwach wirkende Enzymlösung in einer alkaliärmeren hervorrufen kann, ist im voraus zu erwarten, und es ist also gar nicht auffallend, daß die schwach wirkende Lösung im Versuche 12 weniger Albumose aus einer Tricaseinatlösung als die kräftiger wirkenden Lösungen in den 3 obigen Versuchen aus Tetracaseinatlösungen gebildet hat. Die ungleiche Dauer der Enzymwirkung in den verschiedenen Versuchen erschwert auch einen Vergleich zwischen ihnen. Die Versuche zeigen übrigens, daß Alkalicaseinatlösungen schon in verhältnismäßig kurzer Zeit, 1—2 Stunden, recht stark hydrolysiert werden können. Die prozentischen Werte sind allerdings wenig belehrend, da nämlich die absolute Menge des verarbeiteten Caseins, welche hier von maßgebender Bedeutung ist, nicht in allen Versuchen dieselbe war; aber die Bildung von mehr als 0,3 g Albumosen im Laufe von 50—90 Minuten bei Gegenwart von 0,6 g Casein muß doch als eine recht kräftige Hydrolyse betrachtet werden.

V. Wirkung von Enzymlösungen verschiedener Konzentration auf Alkalicaseinatlösungen.

Bezüglich dieser Frage liegt schon eine Untersuchung von E. Petry¹⁾ vor. Er bestimmte die Menge des Albumosenstickstoffes im Filtrate nach Fällung durch Halbsättigung mit Zinksulfat bei dem Enzymgehalte 1 und $\frac{1}{4}$ und er fand, daß im letzteren Falle die Zunahme des Stickstoffes nach $24\frac{1}{2}$ Stunden etwa dieselbe wie bei dem Enzymgehalte 1 nach 12 Stunden und 14 Minuten war. Er folgert aus diesem Resultate, daß die Albumosenabspaltung dem Wirkungsgesetze von Schütz und Borissow, wonach die Wirkung der Quadratwurzel aus der Konzentration proportional ist, folgt. Er hat indessen nur einen Versuch mitgeteilt, der wenig überzeugend ist. Er arbeitete nämlich mit einer käuflichen Lablösung von nicht näher angegebener Beschaffenheit, die aber offenbar von stickstoffhaltigen Substanzen sehr stark verunreinigt war. Dies geht ohne weiteres daraus hervor, daß ein Gemenge von Caseinat- und Lablösung in dem Verhältnisse 6 : 9 unmittelbar nach dem Zusammen-

¹⁾ l. c., Hofmeisters Beiträge, Bd. 8.

mischen der Lösungen und Fällung mit Zinksulfat ein Filtrat mit 0,2152% N lieferte. Die Zunahme des Stickstoffes nach 12 Stunden 14 Minuten war aber nur 0,0186%, und eine so kleine Zunahme des Verdauungsstickstoffes — nur etwa $\frac{1}{12}$ von der Stickstoffmenge der Verunreinigungen — ist wenig vertrauenerweckend, wenn man damit ein anderes, auffallendes Verhalten zusammenstellt. Während nämlich die Versuchsprobe mit der unverdünnten Lablösung, wie oben erwähnt, ein Filtrat mit 0,215% N gab, lieferte dagegen die in ganz derselben Weise behandelte Probe mit der zu $\frac{1}{4}$ verdünnten Lablösung unmittelbar am Beginne des Versuches ein Filtrat mit 0,085 statt der zu erwartenden Menge von rund 0,054% N. Da ich also diesem einzigen Versuche keine Beweiskraft zuerkennen kann, habe ich ein paar derartige Versuche (mit Bestimmung der gesamten Albumosenmenge) ausgeführt und teile hier dieselben mit.

Versuch 15. Von einer durch Dialyse gereinigten Lösung von Hansens Labpulver, welche 0,028% NaCl und 0,022% organische Substanz enthielt, wurde ein Teil zur Zerstörung des Enzymes auf 95° C. erhitzt und als Kontroll- bzw. Verdünnungsflüssigkeit benutzt. Die Verdünnung war eine solche, daß die Enzymmengen beider Lösungen 1 und $\frac{1}{4}$ waren. Die Caseinatlösung war eine 2% ige Lösung von Dicaseinat, und jede Versuchsprobe enthielt 30 ccm Caseinat- und 30 ccm Enzymlösung. Die Kontrollprobe K enthielt unwirksame Lösung; Probe A enthielt die unverdünnte und B die zu $\frac{1}{4}$ verdünnte Enzymlösung. Temp. 38°. Einwirkungsdauer in K und B 2 Stunden und in A 1 Stunde. Es wurden wie in den meisten anderen Versuchen 50 ccm klare Filtrate auf Albumosen verarbeitet. Nach Abzug der festen Stoffe in K = 0,043 g wurden erhalten in A 0,194 und in B 0,125 g. Auf das ursprüngliche Volumen, 60 ccm, berechnet, ist dies bzw. 0,233 und 0,150 g Albumosen. Gleichgültig ob man die Zahlen auf 50 oder auf 60 ccm berechnet, findet man, daß die bei Gegenwart von der Enzymmenge $\frac{1}{4}$ in der doppelten Zeit (2 Std.) gebildete Albumosenmenge gar nicht dieselbe wie die bei dem Enzymgehalte 1 in der halben Zeit (1 Std.) gebildete ist.

Versuch 16. Enzymlösung nach der Neutralisationsmethode dargestellt mit 0,033% festen Stoffen. Versuchsanordnung dieselbe wie in dem vorigen Versuche; also auch hier die Enzymkonzentrationen 1 und $\frac{1}{4}$ und in jeder Probe je 30 ccm Enzym- und Caseinatlösung. Die letztere war aber eine Lösung von Trinatriumcaseinat von 2%. Versuchstemperatur 39° C. Versuchsdauer bei dem Enzymgehalte 1 = 1 Stunde und bei dem Gehalte $\frac{1}{4}$ = 2 Stunden. Kontrollprobe = K. Probe A mit

der Enzymkonzentration 1 und B mit Konzentration $\frac{1}{4}$. 50 ccm klare Filtrate zur Albumosenbestimmung. Nach Abzug von $K = 0,042$ g wurden erhalten: in A 0,313 und in B 0,214 g Albumosen. Auf 60 ccm Versuchsflüssigkeit ist dies 0,376 bzw. 0,257 g oder in Prozenten von dem Casein (0,600 g) bzw. 62,66 und 49,5 %.

Das von Petry angegebene Verhalten wurde also in keinem der beiden Versuche bestätigt. Die von dem Viertel der Enzymmenge gebildete Albumosenmenge war nämlich nie dieselbe oder fast dieselbe wie die von der Enzymmenge I in der halben Zeit gebildete. Die Albumosenmengen verhielten sich nie wie 1 : 1, sondern in dem Versuche mit Dicaseinat wie 1 : 1,46 und in dem mit Tricaseinat wie 1 : 1,55. Da beide Versuche übereinstimmende Resultate ergaben, habe ich keine Veranlassung gehabt, weitere Versuche dieser Art anzustellen.

In meinen, in einem folgenden Abschnitte zu erwähnenden, vergleichenden Versuchen mit Enzymlösungen, in welchen die Parallelität der Pepsin- und Chymosinwirkung aufgehoben war, galt es, die von zwei solchen Enzymlösungen in derselben Zeit gebildeten Albumosenmengen mit einander zu vergleichen. Als Vorarbeit für solche vergleichende Untersuchungen war es von Interesse zu prüfen, wie die in gleicher Zeit' und bei sonst gleichen Versuchsbedingungen, aber bei ungleichem Chymosingehalte gebildeten Albumosenmengen zu einander sich verhielten, d. h. inwieweit sie als Maß der relativen Chymosinmengen dienen könnten. Die zu dem Zwecke ausgeführten Versuche sind im wesentlichen nach demselben Plane wie die oben mitgeteilten quantitativen Versuche ausgeführt worden, und ich dürfte wohl also ohne weiteres direkt zu den Versuchen übergehen können.

Versuch 17. Enzymlösung nach der Neutralisationsmethode bereitet mit 0,024 % festen Stoffen. Reaktion, wie immer, neutral. Dicaseinatlösung mit 2 % Casein. Verdünnungsflüssigkeit: die durch Erhitzen auf 95° C. unwirksam gemachte Enzymlösung. Enzymkonzentrationen 1 und $\frac{1}{4}$. In jeder der drei Proben 30 ccm Enzym- und 30 ccm Caseinatlösung. Hier wie in den folgenden Versuchen bedeutet K Kontrollprobe mit unwirksamer Enzymlösung, A Probe mit Enzymkonzentration 1 und B mit der schwächeren Enzymlösung, hier $\frac{1}{4}$. Temp. 39° C. Versuchsdauer 110 Minuten. A enthielt nun eine Fällung, B war fast milchweiß, aber durchsichtig. Albumosen in 50 ccm Filtrat (nach Abzug für K) in A 0,280

und in B 0,115 g, also in 60 ccm resp. 0,336 und 0,138 g. Die Quadrate der Albumosenmengen verhalten sich wie 5,87 : 1.

Versuch 18. Dialysierte Lösung von Hansens Labpulver mit 0,022% organischer Substanz und 0,028% NaCl. Enzymkonzentrationen $A = 1$ und $B = \frac{1}{5}$. Temp. 39°. In jeder der 3 Proben 25 ccm 2% ige Dicaseinat- und 25 ccm Enzymlösung. Versuchsdauer 75 Minuten, zu welcher Zeit A eine Fällung enthielt, während B fast milchweiß, aber in dünnerer Schicht durchsichtig war. Albumosen in 40 ccm Filtrat (nach Abzug der festen Stoffe in K) in A 0,172 und in B 0,069, d. h. auf 50 ccm Versuchsflüssigkeit, bzw. 0,215 und 0,086 g. Die Quadrate der Albumosenmengen verhalten sich wie 6,2 : 1.

Versuch 19. 2% ige Dicaseinatlösung und eine nach der Neutralisationsmethode bereitete Enzymlösung mit 0,035% festen Stoffen. Enzymkonzentrationen $A = 1$ und $B = \frac{1}{5}$. Je 20 ccm Caseinat- und Enzymlösung in jeder der 3 Proben. Temp. 39° C. Einwirkungsdauer 2 Stunden. Albumosenmengen, auf 40 ccm Versuchsflüssigkeit berechnet, in A 0,222 und in B 0,170 g. Die Quadrate der Albumosenmengen verhalten sich wie 1,8 : 1.

Versuch 20. 2% ige Tricaseinatlösung. Enzymlösung mit 0,041% festen Stoffen. Enzymkonzentrationen $A = 1$ und $B = \frac{1}{4}$. Je 30 ccm Caseinat- und Enzymlösung in jeder der 3 Proben. Temp. ungefähr 39° C. Einwirkungsdauer 2 Stunden. Nach Abzug von den festen Stoffen in K wurden folgende Albumosenmengen, auf 60 ccm Versuchsflüssigkeit berechnet, erhalten, nämlich A 0,443 und B 0,260 g. Die Quadrate der Albumosenmengen verhalten sich wie 2,9 : 1.

Versuch 21. Enzymlösung mit 0,030% festen Stoffen. Enzymkonzentrationen $A = 1$ und $B = \frac{1}{5}$. 2% ige Lösung von Tricaseinat. Je 20 ccm Caseinat- und Enzymlösung in jeder Probe. Temp. 38,5° C. Einwirkungsdauer 1 $\frac{1}{2}$ Stunde. Albumosenmengen, auf 40 ccm Versuchsflüssigkeit berechnet, waren in A 0,213 und in B 0,160 g. Die Quadrate der Albumosenmengen verhalten sich wie 1,8 : 1.

Versuch 22. Enzymlösung mit 0,027% festen Stoffen. Enzymkonzentrationen $A = 1$ und $B = \frac{1}{4}$. Eine 2% ige Lösung von Tetracaseinat. Je 30 ccm Caseinat und 30 ccm Enzymlösung in jeder Probe. Temp. 39° C. und Einwirkungsdauer 3 Stunden. Die Albumosenmengen auf 60 ccm Versuchsflüssigkeit berechnet, waren in A 0,247 und in B 0,116 g. Die Quadrate der Albumosenmengen verhalten sich wie 4,5 : 1.

Versuch 23. Die enzymhaltige Flüssigkeit war in diesem Falle eine Kalbsmageninfusion. Die bei der Neutralisation entstandene Fällung wurde abzentrifugiert und die ganz wasserhelle, neutrale Flüssigkeit wurde mit Chlorwasserstoffsäure bis zu 0,15% HCl versetzt. Sie wurde dann 3mal 24 Stunden gegen Wasser mit demselben Gehalte an Chlorwasserstoffsäure und darauf 24 Stunden gegen mehrmals gewechseltes destilliertes Wasser dialysiert. Die Flüssigkeit war sehr schwach sauer;

bei der Neutralisation wurde sie schwach trübe und setzte allmählich eine geringe Fällung ab. Das wasserhelle, neutrale Filtrat enthielt 0,118% feste Stoffe. Ein Teil wurde wie gewöhnlich durch Erhitzen unwirksam gemacht und zur Kontrolle K, bezw. als Verdünnungsflüssigkeit verwendet. Enzymkonzentrationen: A = 1 und B = $\frac{1}{8}$. Eine 2%ige Lösung von Tetracaseinat. Je 30 ccm der Caseinat- und der Enzymlösung in jeder Probe. Temp. 39° C. und Einwirkungsdauer 2 Stunden. Die Albumosenmengen, auf 60 ccm Versuchsflüssigkeit berechnet, waren in A 0,184 und in B 0,094 g. Die Quadrate der Albumosenmengen verhalten sich wie 3,84 : 1.

Versuch 24. Enzymlösung mit 0,013% festen Stoffen. Enzymkonzentrationen : A = 1 und B = $\frac{1}{8}$. Eine 4%ige Lösung von Tetracaseinat. Dieser Versuch wurde bei Zimmertemperatur, 16° während des Tages und wahrscheinlich etwas weniger als 15° in der Nacht, ausgeführt. Versuchsdauer 22 Stunden. Nach Verlauf von dieser Zeit war A fast milchweiß, aber in dünnerer Schicht ganz durchsichtig, B war stärker opalisierend als K, die nicht sichtbar verändert war. Jede Versuchsprobe enthielt 30 ccm Caseinat- und 30 ccm Enzymlösung. Die Albumosenmengen, auf 60 ccm Versuchsflüssigkeit berechnet, waren in A 0,263 und in B 0,099 g. Die Quadrate der Albumosenmengen verhalten sich wie 6,6 : 1.

Versuch 25. Enzymlösung mit 0,024% festen Stoffen. Enzymkonzentrationen : A = 1 und B = $\frac{1}{4}$. Eine 2%ige Lösung von Pentacaseinat. 30 ccm Caseinat- und 30 ccm Enzymlösung in jeder Probe. Temp. 39° C. Einwirkungsdauer 3 Stunden. Albumosenmengen, auf 60 ccm Versuchsflüssigkeit berechnet, in A 0,154 und in B 0,082 g. Die Quadrate der Albumosenmengen verhalten sich wie 3,5 : 1.

Versuch 26. Die Enzymflüssigkeit war in diesem Falle eine Kalbsmageninfusion, die nach demselben Prinzip wie die im Versuche 23 erwähnte gereinigt worden war. Die Enzymkonzentrationen waren A = 1 und B = $\frac{1}{8}$. Eine 2%ige Pentacaseinatlösung. 30 ccm Caseinat, und 30 ccm Infusion in jeder Probe. Die Infusion enthielt 0,059% feste Stoffe. Temp. 39° C. und Einwirkungsdauer 3 Stunden. Albumosenmengen, auf 60 ccm Versuchsflüssigkeit berechnet, waren in A 0,128 und in B 0,066 g. Die Quadrate der Albumosenmengen verhalten sich wie 3,8 : 1.

Der Übersichtlichkeit halber habe ich die Ergebnisse dieser 10 Versuche tabellarisch zusammengestellt. Die erste Tabelle III enthält die absoluten Albumosenmengen, auf das Volumen der in Arbeit genommenen gesamten Versuchsflüssigkeit berechnet, und daneben auch dieselben Mengen in Prozenten von dem Casein. Da die Temperatur mit Ausnahme für den Versuch 24, welcher bei Zimmertemperatur geschah, stets 38,5—39 war, ist dieselbe nicht in der Tabelle angegeben. Die zweite Tabelle, Nr. IV, enthält die Relationen zwischen

den gefundenen Albumosenmengen, zwischen den Quadraten derselben wie auch zwischen den Enzymkonzentrationen.

Tabelle III.

Nr.	Enzymkonzentration	Dauer der Einwirkung	Caseinatlösung	Menge des Caseins g	Albumosen in g	Albumosen in % vom Casein
17	A = 1 B = $\frac{1}{6}$	1 Std. 50 Min.	Dicaseinat	0,600	0,336 0,138	56 23
18	A = 1 B = $\frac{1}{5}$	1 „ 15 „	„	0,500	0,215 0,086	43 17,2
19	A = 1 B = $\frac{1}{2}$	2 Std.	„	0,400	0,222 0,170	55,5 42,5
20	A = 1 B = $\frac{1}{4}$	2 „	Tricas.	0,600	0,443 0,260	73,8 43,4
21	A = 1 B = $\frac{1}{3}$	1 Std. 30 Min.	„	0,400	0,213 0,160	53,2 40,0
22	A = 1 B = $\frac{1}{4}$	3 Std.	Tetracas.	0,600	0,247 0,116	41,1 19,3
23	A = 1 B = $\frac{1}{6}$	2 „	„	0,600	0,184 0,094	30,6 15,6
24	A = 1 B = $\frac{1}{8}$	22 „	„	1,200	0,263 0,099	21,9 8,25
25	A = 1 B = $\frac{1}{4}$	3 „	Pentacas.	0,600	0,154 0,082	25,7 13,7
26	A = 1 B = $\frac{1}{8}$	3 „	„	0,600	0,128 0,066	21,3 11,0

Tabelle IV.

Nr.	Relation der Albumosenmengen	Relation der Quadrate d. Mengen	Relation der Enzymkonzentrat.
17	2,42 : 1	5,86 : 1	6 : 1
18	2,49 : 1	6,2 : 1	5 : 1
19	1,31 : 1	1,7 : 1	2 : 1
20	1,71 : 1	2,9 : 1	4 : 1
21	1,33 : 1	1,8 : 1	2 : 1
22	2,13 : 1	4,5 : 1	4 : 1
23	1,96 : 1	3,84 : 1	6 : 1
24	2,66 : 1	7,1 : 1	8 : 1
25	1,88 : 1	3,5 : 1	4 : 1
26	1,94 : 1	3,8 : 1	6 : 1

Die Tabelle III zeigt, daß in allen 10 Versuchen die gebildete Albumosenmenge bei größerem Enzymgehalte größer als bei Gegenwart von weniger Enzym war. Untereinander sind die Versuche natürlich nicht direkt vergleichbar, da die Enzymlösung nie dieselbe in zwei verschiedenen Versuchen war. Hierdurch wird es auch verständlich, warum, wie in den Versuchen 20 und 17, bei derselben Temperatur und fast derselben Einwirkungsdauer eine Tricaseinatlösung bedeutend mehr Albumosen als eine Dicaseinatlösung liefern kann. Die Enzymlösung in Versuch 20 wirkte nämlich besonders kräftig, was wohl daraus ersichtlich ist, daß in diesem Falle im Laufe von 2 Stunden aus 0,600 g Casein 0,443 g Albumosen, also 73,8%, gebildet wurden.

Die Zusammenstellung in der Tabelle IV zeigt, daß die bei verschiedenem Enzymgehalte gebildeten Albumosenmengen in keinem Falle den verschiedenen Enzymkonzentrationen proportional sind. Vergleicht man dagegen die Quadrate der Albumosenmengen mit den entsprechenden Enzymkonzentrationen, so findet man in einzelnen Fällen eine ziemlich gute Proportionalität; während in anderen Fällen bedeutende Abweichungen vorkommen. Die größten Abweichungen findet man in den Versuchen 23 und 26, und es ist bemerkenswert, daß in diesen 2 Versuchen keine nach der Neutralisationsmethode bereiteten Enzymlösungen, sondern zwei durch anhaltende Dialyse gereinigte Kalbsmageninfusionen zur Verwendung kamen. Dies kann vielleicht nur ein Zufall sein, aber es ist auch denkbar, daß die verschiedene Darstellungsweise der enzymhaltigen Flüssigkeiten eine Rolle spielen kann.

Als hauptsächliches Resultat sämtlicher Versuche ergibt sich jedenfalls, daß die in einer bestimmten Zeit gebildeten Albumosenmengen zwar mit steigendem Enzymreichtum der Lösungen, aber nicht in regelmäßiger Proportion zu demselben, zunehmen. Die Albumosenmengen können also ebenso wenig wie das spontane Auftreten einer Fällung in Dicaseinatlösungen durch Chymosineinwirkung als sicheres Maß der Chymosinmenge dienen, und ich konnte also zur Ermittlung derselben nicht die Versuche mit Milch entbehren. Dagegen kann man

durch Albumosebestimmungen sicher entscheiden, welche von zwei Enzymlösungen die chymosinreichste ist. Dies gelingt auch bei verhältnismäßig kleinen Unterschieden in dem Enzymgehalte, und hierdurch wird auch der Vergleich von zwei Enzymlösungen bei aufgehobener Parallelität der beiden Enzymwirkungen möglich. Ich gehe nun zu diesen Untersuchungen über.

VI. Wirkung von Enzymlösungen auf Alkalicaseinate bei aufgehobener Parallelität der Chymosin- und Pepsinwirkung.

Wenn man Versuche mit aufgehobener Parallelität der Enzymwirkungen ausführen will, hat man immer die prinzipielle Einwendung zu erwarten, daß man die fehlende Parallelität nur durch Versuche mit einem verschiedenen Substrate, nämlich in dem einen Falle mit Casein oder Milch und in dem anderen mit koaguliertem Hühnereiweiß oder Fibrin konstatiert hat. Diese Schwierigkeit ist indessen nicht zu vermeiden, solange man keinen anderen Eiweißstoff als das Casein kennt, auf welchen die neutralen Enzymlösungen wirken, und solange man keine andere, mehr zuverlässige Pepsinprobe als die mit koaguliertem Eiweiß oder Fibrin hat. Besonders das Casein eignet sich nämlich, gerade aus dem Grunde, daß das Pepsin nicht mit dem Chymosin identisch ist, nicht ohne weiteres als Substrat für die Pepsinprobe.

Das Chymosin ist nach meiner Erfahrung ganz unwirksam bei der Pepsinprobe mit geronnenem Eiweiß, und aus dem Grunde ist die Mettsche Probe eine reine Pepsinprobe, die zu dem Vergleiche der Pepsinmengen in zwei Lösungen völlig brauchbar ist, gleichgültig wie es mit der milchkoagulierenden Wirkung der beiden Lösungen sich verhält. Anders liegen aber die Verhältnisse, wenn man zu der Pepsinprobe Casein verwendet. Das Chymosin ist nämlich nicht unwirksam auf Casein in saurer Lösung. Es wirkt im Gegenteil, wie ich schon in einem früheren Aufsätze¹⁾ gezeigt und dann durch fortgesetzte Untersuchungen immer bestätigt gefunden habe, sogar

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. 94, S. 316.

kräftiger auf das Casein in saurer Lösung als auf eine Alkalicaseinatlösung. Bei der Pepsinprobe mit Casein erhält man deshalb, wenigstens bei niedrigen Säuregraden, keine reine Pepsinwirkung, sondern eine kombinierte Wirkung von Pepsin und Chymosin. Die Folge hiervon ist auch, daß zwei Enzymlösungen, die bei der Mettschen Probe gleich stark wirken, aber bei der Prüfung mit Milch eine ungleich starke Chymosinwirkung zeigen, bei der Prüfung mit Casein in saurer Lösung nicht länger gleichwertig sind. Die auf Milch kräftiger wirkende Lösung bildet aus dem Casein eine größere Albumosenmenge als die schwächer milchkoagulierende, trotzdem beide bei der Mettschen Probe gleich stark wirkten, und man kann also, kurz gesagt, eine ganz andere Relation zwischen den Pepsinmengen erhalten, je nachdem man die Pepsinprobe nach Mett oder mit Casein als Substrat ausführt. Das Resultat hängt jedoch wesentlich von dem Säuregrade ab, indem mehrere Beobachtungen¹⁾ darauf hindeuten, daß höhere Säuregrade, welche für die Pepsinwirkung günstig sind, auf die Chymosinwirkung einen hemmenden Einfluß ausüben.

Ob man nun die eine oder andere Stellung zu der obigen prinzipiellen Einwendung einnimmt, so hat man wohl jedoch zu erwarten, daß, wenn das Pepsin mit dem Chymosin identisch ist, zwei Enzymlösungen, die gleich kräftig auf Casein bei neutraler Reaktion einwirken, auch gleich kräftig auf dasselbe Casein bei saurer Reaktion unter ganz denselben Versuchsbedingungen für beide Proben wirken werden. Wirkt die eine Lösung viel stärker auf Casein in neutraler Lösung als die andere, so hat man wohl ebenfalls eine kräftigere Wirkung derselben Lösung auf dasselbe Casein in saurer Lösung zu erwarten, und jedenfalls hat man nicht zu erwarten, daß sie in saurer Lösung wesentlich schwächer als die andere wirken wird. Von diesem Gedankengange geleitet, fand ich es von Interesse, dieselbe Caseinlösung teils als Alkalicaseinat und teils in

¹⁾ Infolge der während des Krieges immer wachsenden Schwierigkeiten, brauchbares, käufliches Casein oder die zur Darstellung von größeren Caseinmengen erforderlichen Milchquantitäten zu erhalten, habe ich meine Caseinversuche bis auf weiteres unterbrechen müssen.

saurer Lösung mit zwei verschiedenen Enzymlösungen zu prüfen, um zu sehen, inwieweit die Resultate in Übereinstimmung oder im Widerspruche mit der nach den üblichen Methoden beobachteten fehlenden Parallelität der Enzymwirkungen sich befanden. Da die Versuchsanordnung aus den Versuchen ohne weiteres hervorgeht, gehe ich direkt zu den letzteren über.

Versuch 27. Von einer Enzymlösung, welche 0,025 % feste Stoffe enthielt, wurde ein Teil — zur Herabsetzung der Pepsinmenge — bei Zimmertemperatur mit 2 ccm n_{10} -Natronlauge auf je 100 ccm versetzt und nach $2\frac{1}{2}$ Minuten mit 2 ccm n_{10} -Chlorwasserstoffsäure neutralisiert. Ein anderer Teil wurde erst mit 2 ccm n_{10} -HCl auf je 100 ccm versetzt und dann mit 2 ccm n_{10} -NaOH-Lösung neutralisiert. Die mit Alkali behandelte, pepsinschwächere Lösung wird mit A und die nichtalkalisierte Lösung mit E bezeichnet. Ein Gemenge von beiden wurde, zur Vernichtung der Enzyme, auf 95° C. erhitzt und teils zu der Kontrollprobe K und teils als Verdünnungsflüssigkeit verwendet.

Da die nicht alkalisierte Lösung E kräftiger auf Milch als die Lösung A wirkte, wurde sie mit der erhitzten Lösung verdünnt, bis beide Lösungen so weit möglich dieselbe milchkoagulierende Wirkung zeigten. Die Milchversuche gaben folgende Resultate:

	Temp. $26\frac{1}{2}^{\circ}$ C.	39° C.
A	4 Min. 10 Sek.	50 Sek.
E	4 „ 15 „	50 „

Es wurde auch ein Versuch mit Dialkalicaseinatlösung gemacht, und da eine Fällung ganz gleichzeitig, nach 90 Minuten, in beiden Proben auftrat, lag hierin ein weiterer Beweis dafür, daß beide Lösungen gleich chymosinreich waren.

Zu dem Vergleiche der Pepsinmengen diene in erster Linie die Mettsche Probe, bei welcher indessen die A-Lösung, wie gewöhnlich, ganz unwirksam war, während die Lösung E in 20 Stunden etwa 2 mm verdaut hatte. Auch diese Lösung war also verhältnismäßig pepsinschwach. Bei der Karminfibrinprobe war E in der Verdünnung $\frac{1}{40}$ etwa gleichwertig mit A, und bei gleich starker Chymosinwirkung beider Lösungen war also die Pepsinrelation $E : A = 40 : 1$.

Zu der quantitativen Probe mit Alkalicaseinat wurde eine Dicaseinatlösung verwendet, und auf je 20 ccm solcher Lösung kamen je 20 ccm der drei Lösungen A, E und K. Temp. $38-39^{\circ}$. Schon nach 30 Minuten waren A und E fast milchweiß, und nach $1\frac{1}{2}$ Stunde trat gleichzeitig in beiden Fällung auf. K war unverändert. Nach Abzug (wie in allen Versuchen) von den festen Stoffen in K lieferten A und E, auf 40 ccm Verdauungsflüssigkeit berechnet, resp.: A 0,1753 und E 0,176 g Albumosen, also genau dieselbe Menge.

Die Proben mit freier Chlorwasserstoffsäure wurden in folgender Weise angeordnet. In jeder Probe wurden erst 20 ccm einer 4-prozentigen Tetraalkalicaseinatlösung mit 10 ccm $n/10$ -Chlorwasserstoffsäure versetzt, wobei das ausgefällte Casein sich leicht wieder in der überschüssigen Säure auflöste, und dann je 20 ccm der 3 Enzymlösungen zugesetzt. Da die Caseinatlösung in je 20 ccm 3,6 ccm $n/10$ -Natronlauge enthielt, blieben nach der Bindung des Alkalis 0,023 g HCl übrig, und das Gemenge (50 ccm) enthielt also 0,046% HCl, von der jedoch ein Teil von dem Casein gebunden war. Temperatur 38—39° C. Versuchsdauer 1 Stunde. Zur Neutralisation dienten 6,4 ccm $n/10$ -Natronlauge, und das Flüssigkeitsvolumen nach der Neutralisation betrug rund 56 ccm. Gesamtmenge der Albumosen in A 0,271 und in E 0,349 g.

Die Ergebnisse dieses Versuches waren also folgende. Die Zahlen in den zwei letzten Kolonnen bedeuten die Albumosenmengen und zwar teils in den Gemengen von Alkalicaseinat- und neutraler Enzymlösung und teils in den Gemengen mit Caseinlösung und freier Säure.

	Pepsin	Chymosin	Caseinatlösung	Saure Caseinlösung	
A	1	1	0,1753	0,271	} 0,047% HCl.
E	40	1	0,176	0,349	

Bei Anwendung von neutraler Enzymlösung war also die Albumosenmenge in beiden Proben ganz dieselbe, und die größere Pepsinmenge in E hatte nicht den geringsten Einfluß ausgeübt. Ganz anders verhielten sich die Lösungen bei Gegenwart von freier Chlorwasserstoffsäure, indem hier die pepsinreichere Probe E eine größere Albumosenmenge lieferte. Man hätte, in Anbetracht des großen Unterschiedes in dem Pepsingehalte, vielleicht einen noch größeren Unterschied erwarten können, aber der absolute Pepsingehalt war, wie die Mettsche Probe und ebenso die Karminfibrinprobe zeigten, auch in E eine verhältnismäßig kleine. In dem folgenden Versuche, in welchem die absolute Pepsinmenge größer, aber der relative Unterschied kleiner war, ist der Unterschied in den Albumosenmengen bei saurer Reaktion größer.

Versuch 28. Zu diesem Versuche dienten 2 Kalbsmageninfusionen, die von Anfang an einen Mangel an Parallelität der Enzymwirkungen zeigten. Die eine, die pepsinärmere, welche als A bezeichnet wird, stammte von dem Magen eines neugeborenen und die andere, die pepsinreichere E, von dem Magen eines 8 Wochen alten Kalbes her. Beide Infusionen wurden mit so viel Wasser verdünnt, daß der Gehalt an festen

Stoffen 0,080% betrug. Der Säuregrad wurde ferner durch Zusatz von Säure zu der weniger sauren Probe so korrigiert, daß er in beiden 0,016% HCl betrug und also etwas schwächer als eine $n/200$ -HCl war. Da die Infusion A etwa 4 mal so kräftig auf Milch wirkte wie die Infusion E, wurde sie mit der durch Erhitzen auf 95° C. unwirksam gemachten Infusion so weit verdünnt, daß beide Infusionen bei 26 und 32° C. mit Milch geprüft gleich stark milchkoagulierend wirkten. Bei der Mettschen Probe verdaute A in 20 Stunden 2 und E 7 mm. Bei gleich starker Chymosinwirkung war also die Pepsinrelation E : A = 12 : 1.

Die zu dem quantitativen Versuche benutzte Caseinlösung war eine 3-prozentige, die mit 6 ccm $n/10$ -Lauge auf je 1 g Casein bereitet worden war. Sie enthielt also ein wenig mehr Alkali als eine Pentacaseinatlösung und insgesamt 41,4 mg Na in 100 ccm. Da die Infusionen 0,016% HCl, entsprechend 0,010 Na, enthielten, waren, nach dem Zusammenmischen von dem gleichen Volumen Infusion und Caseinatlösung, in 200 ccm des Gemenges noch 31,4 mg Na übrig, d. h. 10,4 mg Na auf je 1 g Casein. Da das Tetracaseinat 1,04% Na enthält, kann also dieser Versuch als ein Versuch mit Tetracaseinatlösung bezeichnet werden.

Das Zusammenmischen von Caseinatlösung und saurer Infusion gelang leicht und ohne Auftreten einer Fällung. Es wurden 3 Proben mit je 20 ccm Caseinatlösung und je 20 ccm der Infusionen A, E und K (durch Erhitzen unwirksames Gemenge von A und E) angeordnet. Versuchsdauer $2\frac{1}{2}$ Stunden bei 38—39° C. Die Gesamtmenge der Albumosen war in A 0,070 und in B 0,071 g.

Die Versuche bei Gegenwart von freier Chlorwasserstoffsäure wurden mit derselben 3-prozentigen Caseinatlösung und den 3 Enzymlösungen ausgeführt. Jede Probe enthielt 20 ccm Caseinatlösung, 10 ccm $n/10$ -HCl und 20 ccm Infusion. Der rückständige Säuregrad nach Neutralisation von dem Alkali des Caseinates war in jedem Gemenge 0,053% HCl, von der ein Teil an das Casein gebunden war. Versuchsdauer $1\frac{1}{2}$ Stunde bei etwa 38° C. Die Gesamtmenge der Albumosen war in A 0,188 und in E 0,365 g.

Das Ergebnis dieses Versuches war, nach demselben Prinzipie wie das des vorigen Versuches zusammengestellt, folgendes:

	Pepsin	Chymosin	Caseinatlösung	Saure Caseinlösung	
A	1	1	0,070	0,188	} 0,053% HCl.
E	12	1	0,071	0,365	

Auch in diesem Falle war also das Pepsin ohne nachweisbare Einwirkung auf die Alkalicaseinatlösung, während es in saurer Lösung seine Wirkung recht kräftig entfaltete. Trotz des ungleichen Pepsingehaltes bildeten nämlich die beiden neutralen Enzymlösungen dieselben Albumosenmengen. Diese

waren verhältnismäßig klein, was daher rührt, daß teils die Infusionen nicht stark labend wirkten und teils eine Tetraalkalicaseinatlösung zur Anwendung kam. Dieser Versuch hat aber ein besonderes Interesse dadurch, daß der Mangel an Parallelität der Enzymwirkungen nicht künstlich hergestellt, sondern von der Natur selbst hervorgebracht war. Die Infusion von dem Magen des neugeborenen Kalbes war nämlich von Anfang an reicher an Chymosin und ärmer an Pepsin als die Infusion von dem Magen des 8 Wochen alten Kalbes, und es war also in diesem Falle kein besonderer Eingriff zur Aufhebung der Parallelität notwendig.

Versuch 29. Die eine Enzymlösung war nach der Salzmethode aus der Fraktion A¹⁾ durch Dialyse erst gegen angesäuertes und dann gegen destilliertes Wasser bereitet worden. Sie war verhältnismäßig arm an Chymosin, enthielt 0,031 % feste Stoffe und reagierte neutral. Die andere war eine durch Dialyse erst gegen angesäuertes und dann gegen destilliertes Wasser gereinigte Kalbsmageninfusion. Sie reagierte ebenfalls neutral und enthielt 0,082 % feste Stoffe. Da diese Infusion wesentlich chymosinreicher als die erstgenannte Lösung war, wurden gleiche Volumina beider gemischt und dieses Gemenge dann mit so viel Wasser verdünnt, daß es 0,046 % feste Stoffe enthielt, nach welcher Verdünnung es etwa gleich stark labend wie die mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnte Infusion (0,041 % feste Stoffe) wirkte. Die Milchprobe ergab nämlich folgendes Resultat:

	26,5° C.	30,5° C.	39° C.
Enzymlösung	3 Min. 30 Sek.	2 Min.	65 Sek.
Infusion	3 > 15 >	1 > 53 Sek.	59 >
	1 : 1,04	1 : 1,06	1 : 1,1, Mittel 1 : 1,06.

Bei der Mettschen Probe war die Relation: Enzymlösung: Infusion = 3 : 1. In Übereinstimmung mit der in den zwei vorigen Versuchen benutzten Bezeichnungsweise wird auch in diesem Falle die pepsinreichere Lösung mit E und die pepsinärmere mit A bezeichnet. Bei der Chymosinrelation E : A = 1 : 1,06 war also die Pepsinrelation = 3 : 1.

In dem Versuche mit einer 2-prozentigen Dinatriumcaseinatlösung und neutralen Enzymlösungen enthielt jede der 3 Proben 30 ccm Caseinat- und 30 ccm Enzymlösung. Temperatur 38,5—39,5° C. Versuchsdauer 1 Stunde 45 Minuten. Gesamtmenge der Albumosen in E 0,273 und in A 0,282 g.

In den Versuchen mit saurer Caseinlösung enthielt jede Probe 30 ccm Dibaseinatlösung, 4 ccm HCl von 1,62 % und 30 ccm Enzym-

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. 94, S. 108.

lösung. Säuregrad, nach Abzug von der zur Neutralisation des Caseinat-alkalis verbrauchten Menge, gegen 0,1 (0,093) % HCl. Temp. 38—39° C. Einwirkungsdauer 1 Stunde. Gesamtmenge der Albumosen in E 0,371 und in A 0,314 g.

Das Resultat dieses Versuches war also folgendes:

	Pepsin	Chymosin	Caseinatlösung	Saure Caseinlösung	
A	1	1,06	0,282	0,314	} 0,09 % HCl.
E	3	1,0	0,273	0,371	

Die Lösung A war in diesem Falle ein wenig chymosinreicher als E, und dementsprechend war auch die Menge der mit neutraler Enzymlösung erhaltenen Albumosen auch ein wenig (0,009 g) größer. Bei Gegenwart von freier Säure war umgekehrt die Albumosenmenge größer in der pepsinreicheren Probe. Da die Einwirkungsdauer bei saurer Reaktion nur 1 Stunde war, sind die gebildeten Albumosenmengen bezw. 52,3 und 61,8 % von dem Casein (0,600 g) recht bedeutend.

Versuch 30. Auch zu diesem Versuche diente einerseits eine durch Dialyse gereinigte, neutrale Lösung einer Salzfraktion A und andererseits eine dialysierte, neutrale Kalbsmageninfusion, die mit Wasser so stark verdünnt war, daß beide Lösungen 0,031 % feste Stoffe enthielten. Infolge der vorangegangenen Dialyse und der starken Verdünnung wirkte die Infusion nur schwach labend. Sie koagulierte die Milch in der gewöhnlichen Relation 1 : 10 erst im Laufe von 9—10 Minuten. Diese verdünnte Infusion, als A bezeichnet, war jedoch chymosinreicher als die pepsinreichere Enzymlösung E, indem sie doppelt so rasch wie E wirkte. Bei der Mettschen Probe war A unwirksam, E verdaute dagegen in 20 Stunden 2 mm. Bei der Karminfibrinprobe wirkte A ungefähr gleich stark wie E $\frac{1}{15}$. Bei der Chymosinrelation E : A = 1 : 2 war also die Pepsinrelation = 15 : 1. Eine 2-prozentige Dialkalicaseinatlösung wurde zu allen Proben benutzt und überall kamen je 30 ccm Caseinat- auf 30 ccm Enzymlösung. In den Versuchen mit freier Säure kamen hierzu 4 ccm HCl von 1,62 % in jeder Probe, entsprechend einem Gehalte von gegen 0,1 (0,093) % freier Säure in dem Gemenge. Temperatur 39° C. Versuchsdauer: Mit neutraler Enzymlösung 2 Stunden, bei Gegenwart von freier Säure 1 Stunde. Gesamtmenge der Albumosen: in den Versuchen mit neutraler Enzymlösung A 0,070 und E 0,045 g, bei Gegenwart von freier Säure bezw. 0,095 und 0,238 g.

Das Ergebnis dieses Versuches war also folgendes.

	Pepsin	Chymosin	Caseinatlösung	Saure Caseinlösung.	
A	1	2	0,070	0,095	} 0,09 % HCl.
E	15	1	0,045	0,238	

Da die Chymosinmenge, wie die Milchversuche zeigten, in beiden Lösungen nur eine geringe war, ist auch die Menge der während 2 Stunden in den Natriumcaseinatlösungen bei Einwirkung von neutraler Enzymlösung gebildeten Albumosen nur eine kleine. In der chymosinreicheren Probe wurde indessen mehr Albumose als in der chymosinärmeren gebildet. Bei saurer Reaktion war dagegen das Verhalten ein umgekehrtes, indem hier die pepsinreichere Lösung viel mehr Albumosen als die andere gebildet hatte.

Versuch 31. Die zwei zu vergleichenden Lösungen waren: A eine nach der Neutralisationsmethode bereitete Enzymlösung mit 0,020 % festen Stoffen und E eine Kalbsmageninfusion von einem nicht neugeborenen, aber sehr jungen Kalbe nicht sicher bekannten Alters. Diese (saure) Infusion war erst 20 Stunden bei 36—37° C. der Selbstverdauung überlassen worden und dann 3 mal 24 Stunden gegen saures Wasser (0,125 % HCl) dialysiert. Sie konnte nach der Neutralisation gekocht werden, ohne sich zu trüben, enthielt aber 0,128 % feste Stoffe. Von der erhitzten Infusion wurde ein Teil mit dem gleichen Volumen von nicht erhitzter A-Lösung und ebenso ein Teil der nicht erhitzten Infusion mit dem gleichen Volumen der erhitzten Lösung A gemischt. Es wurden in dieser Weise 2 wirksame Lösungen A₁ und E₁ mit demselben Gehalte an festen Stoffen (0,074 %) erhalten. Bei der Mettschen Probe verdaute E₁ in 24 Stunden 4 mm und A₁ etwa 1,3 mm (jedoch nicht ganz sicher ablesbar). Nach 48 Stunden E₁ = 9 mm und A₁ = 3 mm. Die Pepsinrelation E₁ : A₁ wurde deshalb gleich 9 : 1 gesetzt.

Das Chymosin der Kalbsmageninfusion war entweder infolge der 20stündigen Selbstverdauung etwas geschädigt worden oder es war, wie bei älteren Tieren, nicht identisch mit dem echten Chymosin, denn die Gerinnungsversuche mit gewöhnlicher Milch gaben keine brauchbaren Resultate. Die Gerinnungszeiten waren nämlich folgende:

	Bei 16° C.	25,5° C.	38° C.
A ₁	190 Min.	15 Min.	2 Min.
E ₁	490 "	62 "	38 "
	1 : 2,6	1 : 4,1	1 : 19

Es wurden deshalb Versuche mit Milch angestellt, die zur Verminderung der Anzahl der Hydroxylionen mit 6 ccm n/10-HCl auf je 100 ccm Milch versetzt war. Mit solcher Milch wurden sowohl bei 25,5 wie bei 35° C. die Relationen 1 : 4,5 bis 1 : 4,7 oder als Mittel 1 : 4,6 erhalten. Die Relation A₁ : E₁ war also für Pepsin = 1 : 9 und für Chymosin = 4,6 : 1.

Zu den Versuchen sowohl mit neutraler Enzymlösung wie bei Gegenwart von freier Säure wurden je 30 ccm einer 2prozentigen Tri-

natriumcaseinatlösung und je 30 ccm Enzymlösung K, A₁ und E₁ verwendet. Hierzu kamen in den Versuchen mit saurer Caseinlösung je 5 ccm HCl von 1,62 ‰, wobei der (nach Neutralisation des Alkalis zurückgebliebene) Säuregehalt des Gemenges 0,113 ‰ HCl betrug. Die Temperatur in beiden Versuchsreihen 38—39 ° C. Versuchsdauer bei Anwendung von Alkali-caseinatlösung 1 1/2 Stunde und bei Anwendung von saurer Caseinlösung 1 1/4 Stunde. Gesamtmenge der Albumosen in der ersten Reihe in A₁ = 0,206 und in E₁ 0,060; in der zweiten in A₁ 0,317 und in E₁ 0,393 g.

Das Ergebnis dieses Versuches war also folgendes:

	Pepsin	Chymosin	Caseinatlösung	Saure Caseinlösung	
A ₁	1	4,6	0,206	0,317	} 0,113 ‰ HCl.
E ₁	9	1	0,060	0,393	

Das Resultat war also auch hier dasselbe wie in den vorigen Versuchen: eine Umkehrung des enzymatischen Vorganges mit geänderter Reaktion. Bei Gegenwart von freier Chlorwasserstoffsäure bildete die pepsinreichere Lösung die größte Albumosenmenge, in den Versuchen mit Alkalicaseinatlösung entfaltete dagegen die chymosinreichere Lösung die kräftigste Wirkung. Die Relation zwischen der Chymosinmenge in A₁ und E₁ ist indessen etwas unsicher, indem die Lösung E₁ (die Infusion) ein nicht ganz typisches Kalbschymosin enthielt, und dementsprechend ein ganz zuverlässiger Vergleich der Chymosinwirkung beider Lösungen nicht möglich war. Ob nun dieses, nicht ganz typische Verhalten des Chymosins in E₁ daher rührte, daß eine Schädigung des Chymosins während der 20 Stunden dauernden Selbstverdauung der sauren Infusion stattgefunden hatte, oder daher, daß die Infusion nicht von dem Magen eines neugeborenen, sondern von dem eines etwas älteren Kalbes stammte, mag dahingestellt sein. Für die Beweiskraft des Versuches ist dieser Umstand jedenfalls ohne Belang.

Stelle ich die zu dieser Gruppe gehörenden Versuche tabellarisch zusammen, so erhält man folgende Übersicht der Versuchsergebnisse.

Tabelle V.

Nr.	Enzym- lösung	Pepsin	Chymosin	Caseinat- lösung	Saure Caseinatlösg.	Säuregrad
27	A	1	1	0,175	0,271	0,046% HCl
	E	40	1	0,176	0,349	
28	A	1	1	0,070	0,188	0,053% HCl
	E	12	1	0,071	0,365	
29	A	1	1,06	0,282	0,314	0,093% HCl
	E	3	1	0,273	0,371	
30	A	1	2	0,070	0,095	0,093% HCl
	E	15	1	0,045	0,238	
31	A	1	4,6	0,206	0,317	0,113% HCl
	E	9	1	0,060	0,393	

Da das Ergebnis eines jeden Versuches schon in dem Vorigen diskutiert worden ist, dürfte diese Zusammenstellung ohne weiteres verständlich sein. Die Zahlen zeigen nämlich deutlich, wie die aufgehobene Parallelität der Enzymwirkungen bei Abwesenheit von freier Säure (Alkalicaseinatlösungen) und bei Gegenwart von solcher (Casein in Chlorwasserstoffsäure gelöst) auch in den Albumosenmengen ihren Ausdruck findet.

Zu den in der Tabelle zusammengestellten Versuchen sind ausschließlich Kalbsmagenenzyme verwendet worden, und zwar teils Enzymlösungen und teils Infusionen. Ich habe aber auch einen ähnlichen Versuch mit durch Dialyse gereinigten Lösungen von käuflichem Labpulver (Hansen) und käuflichem Pepsin (Merck) ausgeführt. Die Lablösung verhielt sich zu Milch wie typisches Kalbsmagenchymosin, die Pepsinlösung dagegen wie das käufliche Pepsin erwachsener Tiere, und dies erschwerte wie gewöhnlich den Vergleich der labenden Wirkung beider Lösungen. Die unten angegebene Zahl 1 : 6,1 ist das Mittel von mehreren, in Versuchen mit angesäuerter Milch bei verschiedenen Temperaturen erhaltenen Zahlen, die zwischen 1 : 4 und 1 : 7,4 schwankten. Da dieser Versuch nach demselben Prinzip wie die oben mitgeteilten ausgeführt wurde, dürfte es wohl genügend sein, nur das Resultat anzuführen. Das Ergebnis war folgendes:

	Pepsin	Chymosin	Alkalicaseinat	Saure Caseinlösung	
A	1	6,1	0,375	0,315	} 0,096% HCl.
E	40	1	0,186	0,504	

Das Ergebnis war also von ganz derselben Art wie in den Versuchen mit Kalbsmagenenzymen. Es fand auch hier eine Umkehrung des enzymatischen Vorganges statt, indem in dem Versuche mit Alkalicaseinatlösung (Trialkalicaseinat) die chymosinreichere, in dem Versuche mit in Säure gelöstem Casein dagegen die pepsinreichere Lösung die größte Menge Albumosen bildete. Beim ersten Anblick kann es unzweifelhaft etwas auffallend erscheinen, daß die in A gebildete Albumosenmenge bei saurer Reaktion kleiner als bei neutraler war, trotzdem das Chymosin kräftiger bei saurer als bei neutraler Reaktion wirkt. Die Erklärung kann jedoch darin liegen, daß die Einwirkungsdauer im ersteren Falle (bei Gegenwart von freier Säure) nur $1\frac{1}{2}$ Stunde, im zweiten (bei Abwesenheit von freier Säure) 3 Stunden bei derselben Temperatur, 38 bis 39° C., war. Hätte ich die Enzymwirkung auch in der sauren Caseinlösung 3 Stunden andauern lassen, so würde wahrscheinlich eine viel größere Albumosenmenge sich gebildet haben. Der Grund, warum die Versuche mit Casein in saurer Lösung regelmäßig kürzere Zeit als die Versuche mit Alkalicaseinatlösungen und denselben Enzymlösungen dauerten, war folgender. Die Albumosenbildung geschieht immer rascher in den sauren Caseinlösungen als in den Lösungen von Alkalicaseinat, und ich fürchtete deshalb, daß sie bei saurer Reaktion und zu langer Versuchsdauer auch in den pepsinärmeren Proben so weit gehen könnte, daß der Unterschied in den Lösungen mit ungleichem Pepsingehalt nicht genügend scharf hervortreten würde. Diese Befürchtung scheint indessen unbegründet zu sein.

Da das Chymosin das Casein kräftiger in saurer als in neutraler Lösung hydrolysiert, könnte man a priori erwarten, daß, wenn man eine kräftig labend wirkende Enzymlösung mit einer allerdings relativ pepsinreicheren, aber dennoch nicht besonders kräftig peptisch wirkenden Lösung vergleicht, die in den vorigen Versuchen beschriebene Umkehrung des enzymatischen Vorganges in saurer Lösung nicht besonders stark zum Vorschein kommen würde. Dies kann nun in der Tat auch eintreffen, und ich kann ein solches Beispiel anführen.

Die Versuchsanordnung war dieselbe wie in den oben ausführlicher beschriebenen Versuchen; die Versuchsdauer war aber sowohl bei Ab- wie bei Anwesenheit von freier Chlorwasserstoffsäure nur 1 Stunde bei 38° C. Das Versuchsergebnis war folgendes.

	Pepsin	Chymosin	Caseinatlösung	Saure Caseinlösung	
A	1	5	0,124	0,312	} 0,05 % HCl.
E	9	1	0,064	0,291	

In diesem Falle war, wie man ersieht, die absolute Albumosenmenge in der sauren Lösung ein wenig (0,021 g) kleiner in der pepsinreicheren als in der chymosinreicheren, pepsinärmeren Probe, und eine Umkehrung des enzymatischen Vorganges fand also nicht in derselben augenfälligen Weise wie in den früheren Versuchen statt. Eine Änderung zugunsten der Pepsinwirkung in der sauren Lösung ist indessen auch in diesem Falle unverkennbar. Die absolute Vermehrung der Albumosenmenge bei Gegenwart von freier Säure war nämlich in der pepsinärmeren Lösung 0,188 und in der pepsinreicheren 0,227 g. Die Veränderung ging also auch hier in dieselbe Richtung wie in den anderen Versuchen, wenn auch die Pepsinwirkung in E nicht so stark war, daß sie die stärkere Chymosinwirkung in A während der kurzen Versuchszeit hatte einholen können. Wenn ich nicht den Versuch so früh (nach nur 1 Stunde) unterbrochen hatte, würde allem Anscheine nach die Albumosenmenge in E größer als in A geworden sein, und ich teile diesen Versuch eigentlich nur aus dem Grunde mit, daß er ein weniger schlagendes Resultat gegeben hat.

Wie man aus diesem und den ausführlicher beschriebenen Versuchen ersieht, ist die Versuchsdauer immer eine kurze, 1—3 bis höchstens 4 Stunden bei Bruttemperatur gewesen. Die Gründe hierzu sind folgende. Wenn man mit Infusionen auf Magenschleimhäute oder mit aus solchen Infusionen dargestellten Enzymlösungen arbeitet, hat man immer daran zu denken, daß außer den eigentlichen Sekretenzymen auch Gewebsenzyme — wie z. B. das Pseudopepsin, wenn ein solches Enzym überhaupt existiert — in kleinen Mengen in den Versuchsflüssigkeiten enthalten sein können. Die Wirkungen solcher,

etwa vorhandenen anderen Enzyme können nun vielleicht in langdauernden Versuchen sich geltend machen und zu unreinen Resultaten führen, während man hoffen kann, daß sie in kurzdauernden, nur ein paar Stunden dauernden Versuchen gegenüber den raschen und kräftigen Wirkungen des Chymosins und Pepsins bedeutungslos sein sollen. In langdauernden Versuchen, bei Gegenwart von Antiseptics, hat man ferner zu befürchten, daß die Enzyme bei Körpertemperatur geschädigt werden, und zwar um so eher, als die beiden Enzyme, Chymosin und Pepsin, bei verschiedener Reaktion eine verschiedene Widerstandsfähigkeit zeigen. In Anbetracht der sehr kräftigen Wirkung sowohl des Chymosins wie des Pepsins auf gelöstes Casein sind übrigens langdauernde Versuche mit diesen Enzymen überflüssig, und sie entsprechen nicht den Verhältnissen bei der natürlichen Verdauung.

Die jetzt vorliegende Arbeit hatte zur Aufgabe, zu prüfen, ob der Mangel an Parallelität der beiden Enzymwirkungen, den man in Milchversuchen auf der einen Seite und bei der Mettschen Probe oder bei der Fibrinprobe auf der anderen leicht konstatieren kann, auch in Versuchen mit nur einem Substrate, dem Casein, sich geltend macht. Die oben mitgeteilten Versuche haben gezeigt, daß dies in der Tat der Fall ist. Zwei Lösungen, welche gleich kräftig auf Milch wirken, während die eine in saurer Lösung koaguliertes Eiweiß oder Fibrin viel kräftiger als die andere verdaut, wirken gleich kräftig auf Alkalicaseinat, während die mit kräftiger Pepsinwirkung auch kräftiger auf Casein in saurer Lösung wirkt. Wenn die eine Lösung kräftiger milchkoagulierend, aber schwächer eiweißverdauend wirkt, so hat erstere Lösung auch eine kräftigere Wirkung auf Alkalicaseinat, aber eine schwächere auf Casein in saurer Lösung als die andere. Für das Resultat war es gleichgültig, ob man die Parallelität durch Alkalieinwirkung oder durch fraktionierte NaCl-Extraktion aufgehoben hatte. Dasselbe Resultat wurde ebenfalls erhalten, wenn man mit einander zwei Infusionen verglich, in welchen

die Parallelität ohne irgend welche Eingriffe, nur weil die Infusionen von Tieren verschiedenen Alters stammten, von vornherein aufgehoben war, und ferner auch, wenn man käufliche Lab- und Pepsinpräparate mit einander verglich. Es ist mir nicht möglich, diese Resultate ohne gekünstelte, unbegründete Hypothesen mit der unitarischen Ansicht zu vereinbaren, während sie mit der dualistischen Auffassung in der allerbesten Übereinstimmung sind. Bisher sind mir auch keine Untersuchungen bekannt, deren Resultate nicht mit der letzteren Ansicht sich vereinbaren lassen.

Da indessen das Pepsin auf die verschiedensten Eiweißstoffe einwirkt, während man keine andere Chymosinwirkung als die auf Milch, resp. Casein kennt, dürfte es wohl für ein mehr allseitiges Studium der Pepsin-Chymosinfrage notwendig sein, den Vergleich der beiden Enzymwirkungen auch auf andere Eiweißstoffe als das Casein auszudehnen. Dies habe ich auch getan, und in meinem nächsten Aufsätze in dieser Enzymfrage werde ich die Resultate meiner Untersuchungen über die Wirkung der beiden Enzyme auf Erbsenlegumin mitteilen.

Upsala, Mai 1916.
