

Studien über Chymosin- und Pepsinwirkung.

V. Mitteilung.

Wirkung der Enzyme auf Erbsenlegumine.

Von

Olof Hammarsten.

(Der Redaktion zugegangen am 14. April 1918.)

Einer der Gründe, die man gegen die dualistische Auffassung der Magenenzyme ins Feld geführt hat, ist der, daß Pepsin- und Chymosinwirkung wohl immer in der Natur zusammen vorkommen, und daß man also nach der dualistischen Auffassung genötigt ist, überall, wo eine Pepsinsekretion vorkommt, auch die Sekretion eines besonderen, milchkoagulierenden Enzyms anzunehmen. Der physiologische Sinn einer Sekretion von labendem Enzym wird unter solchen Verhältnissen schwer verständlich, und man kann fragen, wozu die Sekretion eines spezifischen, milchkoagulierenden Enzyms in den Darmkanal solcher Tiere, wie z. B. Fische und Vögel, die während keiner Periode des Lebens Milch als Nahrung zu sich nehmen, dienen soll. Diese Frage ist zweifelsohne völlig berechtigt unter der Voraussetzung, daß man das Labferment als ein auf Milchcasein spezifisch wirkendes Enzym, als eine «Casease», auffaßt. Hier kann man indessen eine Gegenfrage aufstellen. Wie weiß man, daß das Labenzym ein spezifisches Enzym in dem Sinne ist, daß es nur auf Milch, bzw. Casein, und nicht auch auf anderes Eiweiß wirkt? Ist es nicht denkbar, daß es auch eine andere Aufgabe haben kann, die bisher nicht Gegenstand der Forschung gewesen ist und die man deshalb noch nicht kennt? Infolge der allbekannten großen wirtschaftlichen Bedeutung des Labmagens für die Käsebereitung hat man sich seit altersher daran gewöhnt, die Käsebildung als das Resultat einer spezifischen Einwirkung des Labs auf Milch zu betrachten, und diese Anschauung hat auch ihr Gepräge auf

die wissenschaftliche Forschung gedruckt. Man hat nämlich seit lange die Milch als das spezifische Reagens auf Lab betrachtet, und gegenwärtig ist wohl auch kein anderes Labreagens bekannt. Hieraus folgt aber natürlich nicht, daß das Labenzym — in der Folge als Chymosin bezeichnet — ein nur auf Casein wirkendes Enzym, also eine Casease, ist. Fragt man, ob es überhaupt irgendwelche überzeugende Beweise für die spezifische Wirkung des Chymosins auf Casein gibt, so muß man, nach meiner Ansicht, diese Frage verneinend beantworten.

Zur Begründung der Ansicht, daß das Chymosin nur auf Casein und nicht auf anderes Eiweiß wirkt, hat E. Petry¹⁾ besondere Versuche ausgeführt. Er studierte die Einwirkung von käuflichem Labextrakt bei neutraler Reaktion teils auf geronnene Eiweißstoffe, wie gekochtes Hühnereiweiß oder Fibrin und koaguliertes Serum, und teils auf ungeronnene Protein-
stoffe, wie gelöstes, krystallisiertes Serumalbumin und erstarrte Gelatine. Die Resultate waren negativ. Bei Anwendung von saurer Lösung, bei Gegenwart von 0,21 % HCl, fiel im Laufe von 24 Stunden bei 38° C. die Mettsche Probe vollständig negativ aus, während nur eine schwache, wie er annimmt, von den vorhandenen kleinen Pepsinmengen herrührende Einwirkung auf gekochtes Serumalbumin stattgefunden hatte. Auf erstarrte Gelatine war die angesäuerte Lablösung bei Zimmertemperatur unwirksam.

Die Beweiskraft der von Petry ausgeführten Versuche mit nicht angesäuertem Labextrakt dürfte man wohl kaum berechtigt sein zu bezweifeln. Man könnte allerdings einwenden, daß er mit einem käuflichen, unreinen Extrakt, welches vielleicht die Labwirkung hemmende Stoffe enthielt, gearbeitet hat; in Anbetracht der kräftigen Wirkung des Extraktes auf Milch ist aber diese Einwendung kein hinreichender Grund, die Beweiskraft dieser Versuche zu leugnen. Nun ist aber die Chymosinwirkung, wenn eine solche bei den höheren Tieren regelmäßig vorkommt, gewiß nicht auf in der Siedehitze ko-

¹⁾ Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie (Fr. Hofmeister), Bd. 8 (1906), S. 339—365.

gulierte Eiweißstoffe eingestellt, und aus dem Grunde sind unzweifelhaft Versuche mit nicht koagulierten Eiweißstoffen von größerem Interesse. Ein solcher Versuch ist der mit krystallisiertem, löslichem Serumalbumin; und da man schwerlich annehmen kann, daß sein krystallisiertes Serumalbumin von einem Antichymosin verunreinigt war, scheint mir dieser Versuch für die Unwirksamkeit des Chymosins auf Serumalbumin bei Abwesenheit von Säure sehr zu sprechen.

Als weniger beweisend betrachte ich dagegen seine negativen Versuche mit salzsäurehaltigem Labextrakt. Käufliche Labpräparate oder auf Milch kräftig wirkende Enzymlösungen zeigen nämlich nach meiner Erfahrung immer gleichzeitig Pepsinwirkung, wenn man nicht die letztere durch besondere Eingriffe, wie z. B. Alkalieinwirkung, vernichtet hat. Dementsprechend wirkt auch käufliches Lab bei Gegenwart von Chlorwasserstoffsäure verdauend sowohl auf gekochtes Hühnereiweiß wie Fibrin, wenn nicht Salze oder andere hemmend wirkende Stoffe gleichzeitig zugegen sind. Nun hat aber Petry zu seinen Versuchen ein mit dem gleichen Volumen Chlorwasserstoffsäure von 0,42% verdünntes Labextrakt verwendet, und wenn er hierbei keine Pepsinverdauung erhielt, lag dies gewiß daran, daß diese saure Lablösung eine zu große Menge von Kochsalz oder anderen hemmenden Stoffen enthielt. Daß er unter diesen Versuchsbedingungen keine eiweißverdauende Wirkung des Chymosins beobachten konnte, selbst wenn dieses Enzym unter anderen Verhältnissen einer solchen Wirkung mächtig ist, kann man nicht befremdend finden.

Im Gegensatz zu Petry haben auch R. O. Herzog und M. Margolis¹⁾ in zwei Versuchen mit einer stärker verdünnten Lablösung bei Gegenwart von freier Salzsäure eine Verdauung von Ovalbumin beobachtet. Sie betrachten diese Verdauung, wenn ich die Verfasser nicht mißverstanden habe, als eine Labwirkung; aber es ist viel wahrscheinlicher, daß in diesen Versuchen, in welchen nach 4 Tagen bei 30° C. nur 34–47,7% von dem Ovalbumin verdaut waren, die Wirkung von dem Pepsin des Labpräparates herrührte. Man kann jedenfalls nicht

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. 60 (1909), S. 298–305.

diese Versuche als Beweise für eine eiweißverdauende Wirkung des Chymosins bei Gegenwart von freier Chlorwasserstoffsäure anführen.

Man könnte eher geneigt sein, eine andere, sehr auffallende Beobachtung der genannten zwei Forscher als Stütze für die Annahme einer Wirkung des Chymosins auf Ovalbumin bei Abwesenheit von Säure anzunehmen. Herzog und Margolis berichteten über zwei Versuchsreihen, in welchen Ovalbuminlösungen der Einwirkung von Pepsin (Grübler) ohne Salzsäurezusatz ausgesetzt wurden. In der ersten Reihe war der Ovalbumingehalt bei steigenden Pepsinmengen konstant. In der zweiten war umgekehrt bei steigenden Ovalbuminmengen der Pepsingehalt überall derselbe, und in beiden Reihen nahm die Menge des koagulablen Ovalbumins ab. So waren z. B. in der ersten Reihe bei der größten Pepsinkonzentration, 1 : 400, nach 15 Minuten bei der Temperatur 0° nur 74,1% von dem ursprünglichen Ovalbumin noch koagulierbar.

Diese Versuchsreihen führten also zu sehr auffallenden Resultaten, die man als Beweise für eine verdauende Wirkung des Pepsins bei Abwesenheit von Säure aufgefaßt hat, trotzdem dies der gang und gäbe Vorstellung von den Bedingungen für eine Pepsinwirkung gänzlich widerspricht. Da man wohl fortwährend allgemein der Ansicht ist, daß das Pepsin nur in einem sauren Medium wirkt, während man sicher weiß, daß die Chymosinwirkung auch bei Abwesenheit von Säure kräftig sein kann, könnte man deshalb auch leicht zu der Annahme verleitet werden, daß es in diesen Versuchen nicht um eine Pepsinwirkung, sondern um die nie fehlende Chymosinwirkung des käuflichen Pepsins sich gehandelt hat. Natürlich will ich dies nicht behaupten, denn die Versuche liefern keine genügenden Anhaltspunkte hierfür; da aber diese interessanten Versuche jedenfalls nicht der Annahme einer Chymosinwirkung widersprechen, habe ich dieselben in dieser kurzen Übersicht nicht unerwähnt lassen können.

Eine andere Untersuchung, die man ebenfalls als eine Pepsinwirkung bei Abwesenheit von Säure betrachtet hat, und die also vielleicht als eine Chymosinwirkung gedeutet werden

könnte, rührt von E. Zunz¹⁾ her. Er hat sowohl gelöstes als koaguliertes, krystallisiertes Serumalbumin unter Toluolzusatz der Einwirkung von Pepsinlösungen (Grüblers Pepsinum purissimum), welche auf Zufügung von Na_2HPO_4 schwach alkalisch gegen Lackmus oder schwach sauer gegen Phenolphthalein reagierten, bei 38°C . während 1,3 oder 6 Tagen unterworfen und dabei schon nach 24-stündigem Stehen eine Bildung von Albumosen und Peptonen beobachtet. Das koagulierte Serumalbumin wurde langsamer angegriffen. Auch in diesem Falle könnte man ebensogut eine Chymosin- wie eine Pepsinwirkung annehmen, aber hier kommt noch die Möglichkeit in Betracht, daß während der längeren Versuchsdauer bei Körpertemperatur vielleicht ein anderes, das Pepsin verunreinigendes Gewebez enzym die Wirkung hervorgerufen hat. Zunz selbst hat diese Möglichkeit hervorgehoben, indem er auf das etwaige Vorkommen von sog. Pseudopepsin in dem käuflichen Pepsin hinweist, und auch aus diesem Versuche kann man also keine bestimmten Schlüsse ziehen.

Wie eingangs angedeutet wurde, habe ich in der Literatur überhaupt keine überzeugenden Beweise für die spezifische Natur des Chymosins, also für seine Wirkung nur auf Casein und nicht auf anderes Eiweiß, finden können. Die Frage, wie es mit dieser Wirkung sich verhält, ist indessen von der allergrößten Bedeutung, nicht so sehr für die strittige Pepsin-Chymosinfrage wie für eine tiefere Kenntnis der Verdauungsvorgänge im Magen, und aus dem Grunde bin ich seit ein paar Jahren mit Untersuchungen dieser Art beschäftigt gewesen.

Wenn man sich vergegenwärtigt, daß die Chymosinwirkung, wenn eine solche überhaupt bei Tieren, die einen sauren Magensaft absondern, vorkommt, stets in einem sauren Medium verläuft, so ist es ohne weiteres klar, daß man für die Erforschung der physiologischen Bedeutung einer etwaigen Chymosinwirkung in erster Linie die Enzymwirkung bei saurer Reaktion studieren muß. Hier stößt man indessen auf die

¹⁾ Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie (Fr. Hofmeister), Bd. 2 (1902), S. 435—480.

große Schwierigkeit, daß das Pepsin ebenfalls in einem sauren Medium wirkt. Es könnte deshalb auch vielleicht als ein fast aussichtsloses Unternehmen erscheinen, wollte man die beiden Enzymwirkungen gesondert in einem sauren Milieu studieren, bevor man noch enig darüber ist, ob überhaupt zwei verschiedene Enzymwirkungen existieren, und so lange man jedenfalls nicht die etwaigen Träger derselben hat isolieren können. Eine Aussicht hat sich jedoch dadurch eröffnet, daß man nach verschiedenen Methoden die Parallelität der beiden Enzymwirkungen aufheben kann. Wenn man nämlich auch über die Ursache der aufgehobenen Parallelität streitet und dieselbe durch verschiedenartige Hypothesen mit der unitarischen Auffassung zu vereinbaren sucht, so steht immerhin die Tatsache fest, daß man Lösungen darstellen kann, welche fast nur die eine und nicht die andere Wirkung zeigen. Seitdem es mir gelungen war, Enzymlösungen darzustellen, welche kräftig labend auf Milch wirkten, während sie fast pepsinfrei waren oder jedenfalls weniger kräftig als Lösungen, die 1 Teil Pepsin in 1—5 Millionen Teilen Verdauungssalzsäure enthielten, wirkten, schien es mir jedenfalls der Mühe wert zu sein, die Frage einer experimentellen Prüfung zu unterwerfen.

Meine Hauptaufgabe war also, die Wirkung des Chymosins auf anderes Eiweiß als Casein bei saurer Reaktion zu prüfen; aber selbstverständlich konnte ich dabei nicht die Wirkung bei neutraler Reaktion ganz außer acht lassen. Die hierüber ausgeführten älteren Versuche können nämlich — selbst wenn sie einwandfrei wären — nicht für die Frage von einer Wirkung des Chymosins auf anderes Eiweiß bei neutraler Reaktion entscheidend sein, denn sie betreffen nur eine sehr kleine Anzahl von Eiweißstoffen, und alles Eiweiß ist nicht bei neutraler Reaktion gleich leicht hydrolysierbar. Man könnte nämlich recht wohl sich vorstellen, daß das Casein, den anderen, mit negativem Resultate geprüften Eiweißstoffen gegenüber, eine besonders leicht angreifbare Proteinsubstanz sei, und daß hierin der Grund läge, warum man bisher eine Chymosinwirkung nur auf Casein hat beobachten können. Eine solche Vorstellung könnte auch eine Stütze in dem Verhalten

des Erepsins finden, welches ebenfalls auf Casein, aber nicht auf genuines Eiweiß im allgemeinen wirkt, und trotzdem kein für Casein spezifisches Enzym, keine Casease, ist.

Bei meinen Untersuchungen über die Wirkung des Chymosins auf andere Eiweißstoffe richtete ich in erster Linie meine Aufmerksamkeit auf einen vegetabilischen Eiweißstoff, das Erbsenlegumin, dessen leichte Hydrolysierbarkeit mir seit früheren Untersuchungen wohlbekannt war. Von diesem Eiweißstoff kann man, ebenso wie von dem Casein, leicht lösliche Alkaliverbindungen darstellen, die zu Chymosinversuchen bei Abwesenheit von Säure sich gut eignen. Man kann auch leicht Verbindungen mit Chlorwasserstoffsäure und, was für meine Untersuchungen besonders wichtig war, solche lösliche Säureverbindungen darstellen, die so wenig Säure enthalten, daß sie zwar stark sauer auf Lackmus-, aber dagegen nicht auf Kongopapier reagieren.

Außer dem Erbsenlegumin habe ich auch einige andere Eiweißstoffe mit Chymosin geprüft, aber leider noch nicht Ovalbumin und Serumalbumin, weil die oben zitierten, diese Eiweißstoffe betreffenden Arbeiten erst während der Vorbereitung dieses Manuskripts mir bekannt wurden. Bisher sind indessen nur die Untersuchungen über Legumin einigermaßen zum Abschluß gekommen, und diese Untersuchungen gelten die Chymosinwirkung sowohl bei neutraler wie bei saurer Reaktion.

Die Versuche sind sowohl mit a- wie mit b-Leguminlösungen ausgeführt worden. Bezüglich der Darstellung dieser Lösungen verweise ich in der Hauptsache auf den nächst vorhergehenden Aufsatz: «Einige Bemerkungen über das Erbsenlegumin» und werde in den angeführten Versuchen das darüber etwa Notwendige hinzufügen. Auch bezüglich der in verschiedener Weise dargestellten Enzymlösungen muß ich auf die einzelnen Versuche hinweisen. Aus den, in dem Aufsatze IV (S. 43) angeführten Gründen habe ich in den Versuchen bei Körpertemperatur die Enzymlösungen mit nur einer Ausnahme nur verhältnismäßig kurze Zeit, 1 bis höchstens 4 Stunden einwirken lassen.

Wirkung des Chymosins auf Alkalileguminate.

Die meisten Versuche sind mit α -Leguminat ausgeführt worden. Das frisch bereitete, noch feuchte α -Legumin löst sich, in Wasser fein verteilt, sehr leicht in ein wenig Alkali auf, und durch vorsichtigen Zusatz von $n/10$ -Natronlauge kann man leicht auf Lackmus neutral oder sogar schwach sauer reagierende Alkalileguminatlösungen darstellen. Das α -Legumin ist vielleicht selbst eine Säure und es bildet ferner Säure-Leguminverbindungen, die je nach der Darstellungsmethode mehr oder weniger stark sauer auf Lackmus reagieren und folglich auch etwas verschiedene Mengen $n/10$ -Alkali zur Lösung und Bildung von neutral reagierenden Alkalileguminatlösungen erfordern. Da ich nun in den verschiedenen Versuchen mit Legumin von etwas ungleicher Acidität gearbeitet habe, wechselte folglich auch die erforderliche Menge $n/10$ -Lauge ein wenig. Die Lösungen waren leicht filtrierbar, klar, mit nur sehr schwach bläulich-weißer Opalescenz. Unter Toluol aufbewahrt wurden sie aber regelmäßig allmählich mehr oder weniger stark opalisierend, zuletzt weißlich, klärten sich aber beim Erwärmen wieder auf.

Wenn man nun eine solche, frisch bereitete Leguminatlösung mit neutraler Enzymlösung versetzt und bei $38-39^{\circ}$ C. stehen läßt, so kann man schon aus dem allmählich sich verändernden Aussehen des Gemenges ersehen, daß das Enzym auch auf Alkalileguminat einwirkt. Während die Kontrollprobe mit Alkalileguminatlösung und gekochter Enzymlösung nicht merkbar oder jedenfalls nicht wesentlich sich verändert, wird dagegen die enzymhaltige Probe, je nach der Stärke der Enzymwirkung, mehr oder weniger opalisierend, dann mehr weißlich oder weiß und zuletzt milchweiß, in dickerer Schicht undurchsichtig, in dünnerer dagegen durchsichtig wie eine Calcium-caseinatlösung, aber ohne Fällung. Diese Veränderung hat, wenn die Enzymlösung nicht besonders schwach wirkte, regelmäßig innerhalb 3—4 Stunden stattgefunden, und es ist hierbei gleichgültig, ob das Pepsin an- oder abwesend ist. Eine durch Alkalieinwirkung von Pepsin befreite Enzymlösung zeigt nämlich dieselbe Wirkung, und eine neutrale, mit Wasser so stark

verdünnte Pepsinlösung, daß sie auf Milch nur schwach labend wirkt, während sie bei der Mettschen Probe wirksam ist, hat nicht die obige Wirkung auf Alkalileguminat.

Fällt man die durch Einwirkung von Chymosinlösung veränderte Leguminatlösung mit der genau erforderlichen Menge $\eta/10$ -HCl und filtriert den Niederschlag ab, so erhält man ein wasserhelles Filtrat, welches bei richtiger Arbeit kein koagulables Eiweiß enthält. Prüft man mit Gerbsäure, so gibt das Filtrat der Kontrollprobe eine sehr unbedeutende Fällung, welche etwa der Eiweißmenge der unwirksamen Enzymlösung entspricht. Das Filtrat der mit Enzym behandelten Lösung gibt dagegen eine reichlichere, grobflockige Fällung, welche zeigt, daß in dieser Probe eine Einwirkung auf das Leguminat stattgefunden hat. Das Eiweiß in diesem Filtrate verhält sich wie Albumose; die Menge ist aber nur eine kleine und beträgt nur wenige Prozente von dem angewandten Legumin. Im Verhältnis zu der aus Alkalicaseinat unter ähnlichen Bedingungen erhältlichen Albumosenmenge ist die Albumosenmenge aus Leguminat immer eine unbedeutende.

Anders liegen aber die Verhältnisse, wenn man die Alkali-leguminatlösung vorher genügend erwärmt hat. Um sicher zu sein, daß kein von dem Erbsenmehle herrührendes, vegetabilisches Enzym, welches von dem Legumin mit niedergerissen war, das Versuchsergebnis stören würde, habe ich auch mit Leguminatlösungen gearbeitet, die ich im siedenden Wasserbade auf $92-94^{\circ}$ C. erhitzte und dann langsam erkalten ließ. Bei diesem Erhitzen trübt sich die Leguminatlösung nicht; im Gegenteil klärt sie sich etwas auf, wenn sie vorher nicht klar, sondern opalisierend oder etwas weißlich war. Die erwärmte Leguminatlösung wird ebenfalls bei Bruttemperatur durch das Chymosin umgewandelt; aber hier tritt nach einiger Zeit — in meinen Versuchen meistens binnen $1\frac{1}{2}-3$ Stunden — regelmäßig eine reichliche, flockige Fällung auf, während die Kontrollprobe nicht merkbar oder nicht wesentlich verändert worden ist.

Zentrifugiert man die Fällung ab und läßt die Flüssigkeit längere Zeit bei Körpertemperatur stehen, so wird die Probe

nicht wesentlich weiter verändert, und es tritt keine neue Fällung auf. Wird die abzentrifugierte Flüssigkeit dagegen vorsichtig mit Säure versetzt, so erhält man eine neue, aber viel geringere Fällung, und durch Sieden und sehr vorsichtigen Säurezusatz kann man alles fällbare Eiweiß entfernen. Die Lösung gibt nun die Reaktionen der primären Albumosen. Sie wird durch Sättigung mit Chlornatrium oder durch Halbsättigung mit Ammoniumsulfat reichlich gefällt, gibt aber mit Kaliumferrocyanid und Essigsäure nur eine unbedeutende Fällung. Die Menge der Albumosen ist in diesem Falle auch größer als in den Versuchen mit ungekochter Alkalileguminatlösung.

Die in einer erhitzten Alkalileguminatlösung durch Chymosinwirkung direkt erzeugte Fällung ist mehr grobflockig als eine Fällung von a-Legumin. Sie ist ferner schwerlöslicher in Alkali, wird von Kochsalzlösung nicht oder nur wenig gelöst und ähnelt mehr dem b-Legumin. Diese Fällung kann man leicht und scharf abzentrifugieren, und nach dem Auswaschen mit Wasser und Alkohol kann man also ihre Menge leicht direkt bestimmen. Sie kann auch indirekt als Differenz zwischen der Menge von festen Stoffen in der ursprünglichen Versuchslösung und in der abzentrifugierten Lösung bestimmt werden. Ich habe Bestimmungen nach beiden Methoden ausgeführt und in verschiedenen Versuchen Zahlen, die zwischen 61,7 und 69,5% von dem Legumin sich bewegten, gefunden. Die in verschiedenen Versuchen erhaltenen, etwas wechselnden Zahlen können vielleicht von der mehr oder weniger kräftigen Enzymwirkung abhängig sein, denn die niedrigste Zahl 61,7% erhielt ich nach einer Einwirkungsdauer von 65—70 Minuten und die höchsten, 68,6 und 69,5%, nach einer Einwirkungsdauer von gegen 3 Stunden. Besondere Untersuchungen zur Prüfung dieser Frage habe ich indessen nicht ausgeführt.

Eine gekochte Alkalileguminatlösung verhält sich nach dem Obigen in gewisser Hinsicht zu dem Chymosin wie eine Dialkalicaseinatlösung, indem nämlich auch die letztere (vgl. Aufsatz IV) unter Albumosebildung und Abscheidung von einer Fällung hydrolysiert wird. Ein augenfälliger Unterschied liegt aber darin, daß in der Dialkalicaseinatlösung die Fällung einen

kleinen Teil — höchstens gegen 25% — von dem Casein beträgt, während in den Alkalileguminatlösungen die Fällung einen viel größeren Teil — bis gegen 70% — von dem vorhandenen α -Legumin ausmacht. Die Menge der nicht spontan, sondern erst nach Säurezusatz ausfallenden Proteinsubstanz habe ich nur in einem Falle bestimmt. Sie betrug rund 17% von dem Legumin, während die Menge der direkt ausfallenden Substanz und der Albumosen bezw. 64 und 19% waren.

Die gekochten und die ungekochten Alkalileguminatlösungen verhalten sich also, dem Chymosin gegenüber, wesentlich verschieden. Die ungekochten werden zwar — nach dem Aussehen zu urteilen — wesentlich verändert, aber nie unter Abscheidung von einer Fällung zersetzt — wenigstens ist das Gegenteil mir niemals begegnet. Das Legumin bleibt hierbei auch recht lange in der Hinsicht unverändert, daß es fortwährend in verdünnter Kochsalzlösung leicht löslich ist, und die Menge der gebildeten Albumose ist eine so kleine, daß man, trotz dem veränderten Aussehen der Versuchsfüssigkeit, höchstens von einer schwachen Wirkung des Chymosins auf das Alkalileguminat reden kann. Die gekochten werden dagegen regelmäßig unter Auftreten von einer in verdünnter Kochsalzlösung nicht oder nur schwer löslichen Fällung zersetzt, und die Albumosebildung ist reichlicher. Ich habe indessen auch einen Ausnahmefall beobachtet, in dem eine gekochte Alkalileguminatlösung selbst nach 4-stündiger Einwirkung der Enzymlösung bei 38° C. und darauffolgender Einwirkung bei 35 bis 36° C. während 24 Stunden keine Fällung zeigte. Den Grund des abweichenden Verhaltens in diesem Falle kann ich nicht angeben. Daß bei Anwendung von schwächer wirkenden Enzymlösungen die Fällung in einer gekochten Leguminatlösung später als bei Anwendung von kräftigeren Enzymlösungen, z. B. erst nach 5, 6 oder mehreren Stunden, auftritt, ist leicht verständlich, und auch solche Fälle habe ich natürlich beobachtet. In dem nun vorliegenden Falle war aber die Enzymlösung nicht besonders schwach, denn sie koagulierte Milch (1 : 10) in etwa 1 Minute, und die Leguminatlösung reagierte nicht alkalisch, sondern neutral auf Lackmus. Da sowohl die Enzym- wie die Legu-

minatlösung zu dem Versuche verbraucht war, konnte ich leider nicht Kontrollversuche mit anderen Lösungen ausführen, habe aber diesen Ausnahmefall nicht unerwähnt lassen können.

Je kräftiger die Enzymlösung wirkt, um so früher tritt die Fällung in der gekochten Leguminatlösung auf; und da die neutralisierten Kalbsmageninfusionen oder die unreineren Lösungen kräftiger als meine gereinigten, verhältnismäßig stoffarmen Enzymlösungen wirkten, war die Möglichkeit nicht ausgeschlossen, daß man mit besonders kräftig wirkenden Enzymlösungen auch in einer nicht gekochten Leguminatlösung eine Fällung erzeugen könnte. Dies ist mir indessen nicht gelungen, und so entstand z. B. in einem Falle bei 38° C. in der gekochten Lösung die Fällung schon nach knapp 5 Minuten, während in der ungekochten nach 90 Minuten keine Fällung gebildet war. Diese letztere Probe, die schon nach 6—7 Minuten milchweiß geworden war, enthielt nach 90 Minuten ein scheinbar nicht verändertes Legumin, denn nach Ausfällung mit Säure löste es sich vollständig in verdünnter Kochsalzlösung auf.

Die Chymosinlösungen sind also viel weniger wirksam auf ungekochte als auf gekochte Leguminatlösungen. Unter dem Eindrucke der modernen Ansichten von Hemmungsstoffen der Enzymwirkungen könnte man vielleicht geneigt sein, den Grund dieser ungleichen Wirkung in der Annahme von besonderen, in der Hitze zerstörbaren Hemmungsstoffen in den Leguminatlösungen zu suchen. Eine solche Annahme dürfte indessen jedenfalls nicht notwendig sein. Man kann sich nämlich leicht davon überzeugen, daß das α -Legumin infolge des Erhitzens seiner Lösung derart verändert wird, daß es seine Globulinatur einbüßt, und diese Veränderung des Substrates dürfte wohl die wahrscheinlichste Ursache des obengenannten Unterschiedes sein.

Um einige Belege für die oben behauptete Wirkung der Magenenzyme oder — wie ich aus später anzuführenden Gründen sage — des Chymosins auf Alkalileguminat zu liefern, führe ich hier zuerst einige Versuche mit α -Legumin an, aber nur solche, die gleichzeitig die Wirkung auf gekochte und nicht gekochte Lösungen zeigen. In diesen Versuchen habe ich die

Menge der gebildeten Albumosen nach demselben Prinzipie wie in den Caseinatversuchen (vgl. Aufsatz IV) bestimmt. Die vollständige Entfernung aller koagulablen Eiweißsubstanz aus den Filtraten von der spontan auftretenden, bezw. durch Säurezusatz erzeugten Fällung war in den Leguminatversuchen viel leichter ausführbar als in den Caseinatversuchen.

Versuch 1. Die Leguminatlösung enthielt 2,56% Legumin und reagierte neutral, oder eher äußerst schwach sauer. Die Enzymlösung war durch kräftige Dialyse einer Lösung von Hansens Labpulver gegen Wasser dargestellt worden. Sie enthielt 0,046% feste Stoffe und war durch Alkalieinwirkung (0,008% NaOH) während zwei Minuten bei Zimmertemperatur fast pepsinfrei gemacht worden. Sie koagulierte Milch (1:10) bei 38° C. in etwa 30 Sekunden. Ein Teil der Enzymlösung wurde mit Chlorwasserstoffsäure zu 0,3% versetzt. Diese säurehaltige Lösung war unwirksam bei der Mettschen Probe während mehrerer Tage und sie war (ebenfalls bei Körpertemperatur) während 24 Stunden vollständig ohne Wirkung auf fein verteiltes, koaguliertes, feuchtes Hühnereiweiß. Sie löste nämlich nicht mehr als die zur Kontrolle verwendete gleich starke Säure allein und sie war also als praktisch pepsinfrei anzusehen. Von der nicht angesäuerten Enzymlösung wurde ein Teil zur Vernichtung der Enzymwirkung bis auf 94° C. erhitzt und als Kontrollösung verwendet. Diese Lösung wird mit K und der übrige, nicht erhitzte Teil als E bezeichnet.

a) Wirkung auf nicht gekochte Leguminatlösung.

Probe 1 = 25 ccm Leguminatlösung und 25 ccm K. Probe 2 = 25 ccm Leguminatlösung und 25 ccm E. Temp. 38,5–39° C. Nach 1 Stunde war 2 ziemlich stark opalisierend, nach 2 Stunden stark weißlich wie mit Wasser verdünnte Magermilch; Probe 1 war nicht merkbar verändert. Nach 3 Stunden wurde der Versuch unterbrochen. Probe 1 war fortwährend nicht sichtbar verändert. Probe 2 war aber milchweiß, ungefähr von dem Aussehen einer etwas verdünnten Calciumcaseinatlösung. In dickerer Schicht war sie undurchsichtig, in dünnerer dagegen durchsichtig ohne Fällung. Ausfällung mit $\frac{n}{10}$ -HCl. Die Menge der festen Stoffe in je 40 ccm der von koaguablen, fällbarem Eiweiß freien Filtrate war in 1 = 0,031 und in 2 = 0,072 g; d. h. auf 50 ccm Versuchsflüssigkeit berechnet resp. 0,039 und 0,090 g. Zieht man die Menge der festen Stoffe in 1 von denen in 2 ab, so erhält man 0,051 g gelöste Eiweißsubstanz; d. h. in Prozenten von dem Legumin (0,640 g) = 7,94%.

b) Wirkung auf dieselbe gekochte Leguminatlösung.

Probe 1 = 25 ccm Leguminatlösung und 25 ccm K. Probe 2 = 25 ccm Leguminatlösung und 25 ccm E. Temp. 39° C. Nach 2 Stunden war 2 fast milchweiß, in dickerer Schicht undurchsichtig. Nach 2 Stunden

45 Minuten reichliche, flockige Fällung in 2; keine sichere Veränderung in 1. Zusatz von Säure und Behandlung wie in a. Menge der festen Stoffe in 40 ccm: in 1 = 0,037 und in 2 = 0,121 g; d. h. auf 50 ccm Versuchsflüssigkeit resp. 0,046 und 0,151 g. Probe 2 enthielt also 0,105 g gelöstes Eiweiß oder in Prozenten von dem Legumin 16,56%. Dieses getrocknete und gewogene Eiweiß löste sich vollständig und klar in Wasser und gab die Reaktionen der primären Albumosen.

Das Versuchsergebnis war also folgendes. Eine neutral reagierende Enzymlösung, die Milch in 30 Sekunden bei Körpertemperatur koagulierte, während sie, bei Gegenwart von 0,3% HCl, im Laufe von 24 Stunden frisch koaguliertes, feuchtes Ovalbumin nicht im geringsten verdaute, wirkte sowohl auf die ungekochte wie auf die gekochte Leguminatlösung. Im ersteren Falle wurden während 3 Stunden 7,94% und im letzteren während 2 Stunden 45 Minuten 16,56% Albumose gebildet. Im ersteren Falle wurde die Versuchsflüssigkeit nur milchweiß ohne Fällung; im letzteren trat eine reichliche flockige Fällung auf.

Versuch 2. Die Leguminatlösung enthielt genau 2% Legumin. Die Enzymlösung war nach demselben Prinzip wie in dem vorigen Versuche dargestellt worden, mit dem Unterschiede jedoch, daß eine Alkalisierung zur Vernichtung der Pepsinwirkung nicht stattgefunden hatte. Ihr Gehalt an festen Stoffen war 0,031%. Ein Teil, behufs der Kontrolle auf 94° C. erhitzt, wird als K, und der nicht erhitzte, wirksame Teil als E bezeichnet.

a) Wirkung auf nicht gekochte Leguminatlösung.

Probe 1 = 25 ccm Leguminatlösung + 25 ccm K. Probe 2 = 25 ccm Leguminatlösung + 25 ccm E. Temp. 39° C. Nach 3 Stunden wurde der Versuch unterbrochen. Probe 1 war nun etwas opalisierend; Probe 2 war milchweiß, ohne Fällung. Menge der festen Stoffe in 40 ccm, von fällbarem, koagulablem Eiweiß freiem Filtrat war in 1 = 0,023 und in 2 = 0,065 g. Auf 50 ccm Versuchsflüssigkeit berechnet also resp. 0,029 und 0,081 g. Der Mehrgehalt an gelöstem Eiweiß in 2 war also 0,052 g oder in Prozenten von dem Legumin (0,500 g) = 10,4%.

b) Wirkung auf dieselbe gekochte Leguminatlösung.

Probe 1 = 20 ccm Leguminatlösung + 20 ccm K. Probe 2 = 20 ccm Leguminatlösung + 20 ccm E. Temp. 39°. Nach 3 Stunden wurde der Versuch unterbrochen. Probe 1 war nur etwas bläulich weiß opalisierend. Probe 2, die nach 2 Stunden fast milchweiß war und nach 2 Stunden 45 Minuten eine deutliche Fällung zeigte, enthielt nach 3 Stunden eine

reichliche grobflockige Fällung, die sich gut abgesetzt hatte. Menge der festen Stoffe in 30 ccm, von fällbarem, koagulablem Eiweiß freiem Filtrat war: in 1 = 0,039 und in 2 = 0,123 g. Auf 40 ccm berechnet also resp. 0,052 und 0,164 g. Der Mehrgehalt an gelöstem Eiweiß war also in 2 = 0,112 g oder in Prozenten von dem Legumin (0,400 g) = 28 %.

Das Versuchsergebnis war also dem im vorigen Versuche erhaltenen ganz analog. Der etwas größere Gehalt an festen Stoffen in dem Filtrate der Kontrollprobe mit gekochter Leguminatlösung deutet darauf hin, daß diese Lösung hier durch Erwärmen etwas stärker verändert worden war.

Versuch 3. Dieselbe Enzymlösung wie in dem vorigen Versuche, aber eine andere Alkalileguminatlösung, die 2,5 % Legumin enthielt und fast ganz neutral, nur äußerst schwach sauer reagierte. Diese Lösung, welche einige Tage in der Kälte unter Toluol aufbewahrt worden war, zeigte in ungekochtem Zustande eine ziemlich starke weißliche Opalescenz. Der auf 94° C. erwärmte Teil der Lösung klärte sich indessen während des Erwärmens und war nach dem Erkalten klar. Die erhitzte unwirksame und die nicht erhitzte wirksame Enzymlösung wie gewöhnlich mit K, resp. E bezeichnet.

Die Versuchsanordnung war insofern eine andere in diesem Versuche als in den anderen, als in ihm drei verschiedene Proben in folgender Weise angeordnet wurden. Probe 1 = 30 ccm ungekochte Leguminatlösung + 30 ccm K. Probe 2 = 30 ccm ungekochte Leguminatlösung + 30 ccm E und Probe 3 = 30 ccm gekochte Leguminatlösung + 30 ccm E. Temp. gegen 39° C. Nach 3 Stunden 15 Minuten trat in Probe 3 reichliche Fällung auf und der Versuch wurde unterbrochen. Die Proben 1 und 2, die schon von Anfang an opalisierend waren (vgl. oben), hatten sich nicht merkbar verändert. Die von koagulablem Eiweiß vollständig freien Filtrate enthielten in 50 ccm resp. 0,043, 0,083 und 0,190 g oder auf 60 ccm Versuchslüssigkeit berechnet bezw. 0,052, 0,100 und 0,226 g. Der Überschuß an gelöstem Eiweiß nach Abzug von 1 war also in 2 = 0,048 und in 3 = 0,174 g. In der Probe 3 mit gekochter Leguminatlösung waren also 0,126 g mehr Albumosen als in der entsprechenden Probe 2 mit ungekochter Lösung gebildet worden. In Prozenten von dem Legumin (0,750 g) beträgt der Überschuß 16,8 %.

Der Kontrolle halber war auch eine 4. kleinere Probe wie Nr. 2 mit ungekochter Leguminat- und wirksamer Enzymlösung angeordnet worden. Diese Probe blieb 24 Stunden bei Körpertemperatur stehen, es trat aber keine Fällung auf.

Dieser Versuch zeigt wiederum den großen Unterschied in dem Verhalten einer gekochten und einer nicht gekochten Leguminatlösung. In der gekochten trat nach 3 Stunden 15 Minuten die Fällung auf, während in der ungekochten mit der-

selben Enzymlösung nach 24 Stunden noch keine Fällung sich gebildet hatte. Nach 3 Stunden 15 Minuten waren in der gekochten Lösung 0,126 g Albumosen mehr als in der ungekochten gebildet worden.

Versuch 4. Zu diesem Versuche diente eine neutral oder vielleicht eine Spur alkalisch reagierende Alkalileguminatlösung von genau 2% und eine nach der Neutralisationsmethode¹⁾ (vgl. Aufsatz IV, S. 14) dargestellte Enzymlösung, die mehr als 1 Jahr unter Toluol aufbewahrt worden war. Diese Lösung, welche 0,024% feste Stoffe enthielt, war trotz der langdauernden Aufbewahrung noch wasserklar. Sie wirkte labend auf Milch in 80 Sekunden, war aber fast ganz ohne Pepsinwirkung. Der auf 94° C. erhitzte Teil wird mit K, der wirksame Teil mit E bezeichnet.

Wie in dem nächst vorhergehenden Versuche wurden auch in diesem 3 Proben angeordnet, nämlich: Probe 1 = 30 ccm ungekochte Leguminatlösung + 30 ccm K, Probe 2 = 30 ccm ungekochte Leguminatlösung + 30 ccm E und Probe 3 = 30 ccm gekochte Leguminatlösung und 30 ccm E. Temp. gegen 39° C. Nach 4 Stunden wurde der Versuch unterbrochen, trotzdem in keiner Probe eine Fällung aufgetreten war. Die Mengen der festen Stoffe in 50 ccm der Filtrate waren resp. 0,033, 0,071 und 0,180 g oder auf 60 ccm Versuchsflüssigkeit berechnet, resp. 0,040, 0,085 und 0,216 g. In der Probe 3 mit gekochter Leguminatlösung sind also 0,131 g mehr Albumose als in 2 mit ungekochter Lösung gebildet worden. In Prozenten von dem Legumin (0,600 g) ist dies also ein Überschuss von 21,8%.

Da in diesem Versuche im Laufe von 4 Stunden keine Fällung aufgetreten war, wurden zwei andere, kleinere Proben 2 und 3 angeordnet, die über Nacht im Brutofen bei 35–36° stehen blieben. Am folgenden Morgen enthielt Probe 2 noch keine Fällung, während Probe 3 eine halb-feste Masse unter einer wasserklaren Flüssigkeit enthielt. Die Menge dieser Fällung betrug gegen 64% von dem Legumin. Das Auftreten einer Fällung war in diesem Falle also nur verzögert worden.

Dieser Versuch zeigt also, daß, selbst wenn das Auftreten einer Fällung in der gekochten Lösung verzögert wird, sodaß die Albumosenbestimmung vor dem Entstehen der Fällung unternommen wird, die kräftigere Albumosenbildung in der gekochten Lösung trotzdem sehr deutlich ist. So waren in diesem Falle nach 4 Stunden in der gekochten Lösung 0,131 g mehr Albumose als in der ungekochten gebildet worden. Daß in diesem Falle die Fällung erst nach mehr als 4 Stunden auftrat, hatte wohl seinen Grund teils in der etwas schwachen Wirkung der

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

alten Enzymlösung und teils darin, daß die Alkalileguminatlösung eher äußerst schwach alkalisch als genau neutral reagierte. Bemerkenswert ist, daß die mehr als ein Jahr (unter Toluol) aufbewahrte Enzymlösung fortwährend wasserhell war und Milch in 80 Sekunden koagulierte.

Die bisher mitgeteilten Versuche beziehen sich nur auf das a-Legumin. Entsprechende Versuche mit b-Legumin sind, infolge der Schwierigkeit, neutral reagierende und im übrigen zu den Versuchen geeignete Lösungen darzustellen, viel schwerer auszuführen. Versucht man das b-Legumin mit Hilfe von Alkali in Wasser zu lösen, so erhält man eine dickflüssige, schleimige Masse, die, bevor noch das b-Legumin gelöst ist, ziemlich stark alkalisch reagiert. Läßt man diese schleimige, mit etwas Wasser verdünnte Masse bei Zimmertemperatur stehen, so wird sie dünnflüssiger und zuletzt filtrierbar, ist aber mißfarbig opalisierend und reagiert alkalisch. Viel rascher erhält man eine derartige Lösung, wenn man die dickflüssige, schleimige Masse allmählich auf höhere Temperatur erhitzt. Nach dem Erkalten kann man sie nun durch sehr vorsichtigen Zusatz von $n/100$ -HCl neutralisieren und in dieser Weise bin ich auch in meinen Versuchen verfahren. Ich habe deshalb auch nur mit gekochter b-Leguminatlösung gearbeitet und überhaupt nur die zwei folgenden, quantitativen Versuche ausgeführt.

Versuch 5. Das b-Legumin war aus der Lösung der Säureverbindung in Wasser durch Zusatz von Ammoniak ausgefällt und nach weiterer Reinigung (s. den Aufsatz über Legumin), wie oben erwähnt, mit Alkali unter Erwärmen gelöst worden. Nach dem Erkalten wurden 75 ccm der Lösung vorsichtig und unter stetem Umrühren mit 25 ccm $n/100$ -HCl verdünnt, wobei jedoch zuletzt eine unbedeutende Fällung auftrat, die abfiltriert wurde. Die opalisierende, etwas gelblich mißfarbige Lösung enthielt rund 2% b-Legumin (1,96%) und reagierte nun gar nicht alkalisch, sondern neutral (auf Lackmus). Die nach der Neutralisationsmethode dargestellte Lösung von Kalbsmagenenzymen enthielt 0,027% feste Stoffe. Ein Teil wurde durch Erhitzen unwirksam gemacht und als K, der wirksame Teil dagegen als E bezeichnet.

Probe 1 = 20 ccm Leguminatlösung + 20 ccm K. Probe 2 = 20 ccm Leguminatlösung + 20 ccm E. Temp. 39° C. Nach 2 Stunden trat in Probe 2 eine grobflockige, reichliche Fällung auf, während die Probe 1 nicht stärker opalisierend als anfangs war. Die Mengen der nichtkoagulablen festen Stoffe in 30 ccm Filtrat waren in 1 = 0,023 und in 2 = 0,058 bzw. in 40 ccm

Versuchsflüssigkeit 0,030 und 0,077 g. Der Überschuss an gelöstem Eiweiß in 2 war also 0,047 g oder in Prozenten von dem Legumin (0,392 g) rund 12 %.

Versuch 6. Die Lösung von b-Leguminat war nach demselben Prinzip wie in dem vorigen Versuche dargestellt worden und enthielt 3 % Legumin. Die nach der Neutralisationsmethode dargestellte Enzymlösung enthielt 0,024 % feste Stoffe und war neutral. Der durch Erhitzen unwirksame Teil wird mit K, der wirksame mit E bezeichnet. Probe 1 = 25 ccm Leguminatlösung + 25 ccm K; Probe 2 = 25 ccm Leguminatlösung + 25 ccm E. Temp. 39° C. Nach 4 Stunden war Probe 2 weiß, in dickerer Schicht undurchsichtig; Probe 1 war nicht merkbar verändert. Erst nach etwas mehr als 6 Stunden trat in Probe 2 Fällung auf; keine wesentliche Veränderung in 1. Der Versuch wurde unterbrochen. Menge der nicht koagulablen festen Stoffe in je 40 ccm Filtrat: in 1 = 0,043 und in 2 = 0,133 g oder auf 50 ccm Versuchsflüssigkeit berechnet = resp. 0,056 und 0,166. Der Überschuss in 2 ist also = 0,110 g oder in Prozent von dem Legumin (0,750 g) = 14,7 %. Das nicht koagulable Eiweiß gab die Reaktionen der primären Albumosen.

Diese zwei Versuche gaben also übereinstimmende Resultate und zeigen, daß auch die gekochten Lösungen von b-Leguminat durch neutrale Enzymlösungen unter Abspaltung von einer mehr schwerlöslichen Substanz, die ausfällt, und unter Bildung von nicht koagulablem Eiweiß, welches wie Albumose sich verhält, zerlegt werden. Wie die nicht erwärmten b-Leguminatlösungen sich verhalten, konnte infolge der oben erwähnten Schwierigkeiten nicht geprüft werden. Die Hauptsache ist aber, daß auch dieses Legumin von den neutralen Enzymlösungen zerlegt werden kann. Diese Versuche mit b-Leguminat sind übrigens von untergeordneter Bedeutung gegenüber den viel zahlreicheren Versuchen mit a-Leguminat.

Die mitgeteilten Versuche haben wohl, soweit ich ersehen kann, in unzweideutiger Weise gezeigt, daß sowohl das käufliche gereinigte Labenzym wie die gereinigten Lösungen von Kalbsmagenenzym auf das a-Legumin bei Abwesenheit von Säure hydrolysierend wirken, und zwar kräftiger auf gekochte als auf nicht gekochte Leguminatlösungen. Ich habe in mehreren Fällen diese Wirkung der Kürze halber eine Chymosinwirkung genannt, und dies aus mehreren Gründen. So habe ich z. B. wiederholt in qualitativen Versuchen gesehen, daß, je kräftiger eine Enzymlösung wirkt auf Milch, um so kräftiger wirkt sie

auch auf eine gekochte Alkalileguminatlösung. Dies ist nun eigentlich eine selbstverständliche, nichts beweisende Sache, wenn man laut der unitarischen Ansicht nur eine Enzymwirkung annimmt und folglich die Milchgerinnung nicht als eine besondere Chymosin-, sondern nur als eine Pepsinwirkung auffaßt. Zu bemerken ist indessen, daß diese parallel gehende Wirkung auf Milch und Leguminatlösung auch in den Fällen zum Vorschein kommt, in welchen man Lösungen mit aufgehobener Parallelität der beiden Enzymwirkungen mit einander vergleicht. Eine Lösung, welche besser labend auf Milch, aber viel schwächer verdauend auf Eiweiß wirkt, zeigt auch eine kräftigere Wirkung auf Leguminat als eine andere Lösung, welche umgekehrt viel kräftiger eiweißverdauend, aber schwächer labend wirkt.

Als einen wichtigen Grund für die Auffassung der Enzymwirkung auf Alkalileguminat als eine Chymosinwirkung betrachte ich den Umstand, daß auch solche neutrale Enzymlösungen, deren Pepsinwirkung man durch Alkalieinwirkung so stark herabgesetzt hat, daß sie in einem sauren Medium ganz oder fast ganz peptisch unwirksam sind, während sie Milch kräftig koagulieren, die obige Wirkung auf gekochte Leguminatlösung zeigen. Ich habe dies sowohl in qualitativen wie in quantitativen Versuchen wiederholt gesehen, und ich will in dieser Hinsicht nur auf den oben mitgeteilten Versuch I hinweisen. In diesem Falle war die Pepsinwirkung durch kurzdauernde schwache Alkalieinwirkung allerdings nicht ganz vollständig vernichtet (die Lösung war nämlich nicht ganz unwirksam auf rohes Fibrin), aber jedenfalls so stark herabgesetzt, daß die saure Lösung nicht nur bei der Mettschen Probe vollständig unwirksam war, sondern auch bei der empfindlicheren Probe mit feinverteiltem koaguliertem Hühnereiweiß in 24 Stunden nicht mehr als die entsprechende Kontrollsäure (0,3% HCl) gelöst hatte. Diese alkalisierte, neutrale Enzymlösung koagulierte Milch in 30 Sekunden und hatte nach 2 Stunden 45 Minuten die Leguminatlösung unter Abscheidung einer reichlichen Fällung und Bildung von rund 16,6% Albumosen hydrolysiert.

Nun weiß ich sehr wohl, daß die Unitarier auch solchen Versuchen keine Beweiskraft zuerkennen, indem sie das Aus-

bleiben der Verdauung in saurer Lösung nicht durch Mangel an Pepsin, sondern durch die Annahme von besonderen Hemmungsstoffen erklären wollen. Wenn die fehlende Parallelität der beiden Enzymwirkungen darin besteht, daß die Eiweißverdauung kräftig, die Labwirkung dagegen schwach ist, so erklärt man nämlich dies durch die Annahme von Hemmungsstoffen, die nur bei neutraler Reaktion wirken, während man, wenn die Labwirkung stark und die Pepsinwirkung schwach ist, umgekehrt Hemmungsstoffe, die nur in einem sauren Medium wirksam sind, annimmt. Ich bezweifle deshalb nicht, daß man die letztere Argumentation gegen meine Versuche anwenden werde, und ich komme deshalb in dem Abschnitte über die Enzymwirkung auf Acidleguminat zu diesen Einwendungen zurück.

Als einen weiteren Grund für die Auffassung von der Enzymwirkung auf Alkalileguminat als eine Chymosinwirkung will ich — ohne im übrigen der folgenden Darstellung vorzugreifen — schon hier mitteilen, daß die Wirkung des Pepsins auf Acidleguminat mit abnehmendem Säuregrade abnimmt, so daß das Pepsin bei niedrigen Säuregraden auf das Legumin unwirksam ist. Ich kann nicht annehmen, daß ein Enzym, dessen Wirkung mit abnehmendem Säuregrade abnimmt und bei den niedrigsten Säuregraden aufhört, bei neutraler Reaktion wieder besonders wirksam sein würde, und ich kann deshalb nicht glauben, daß die Wirkung der neutralen Enzymlösungen auf Alkalileguminat eine Pepsinwirkung ist.

Wenn man aber eine Pepsinwirkung ausschließen kann, so bleibt nur die Wahl übrig zwischen einer von Chymosin oder von einem anderen, unbekanntem Enzyme herrührenden Wirkung. Das Vorkommen von einem anderen Enzym, einem Pseudopepsin — wenn ein solches überhaupt existiert — oder einem anderen, bisher unbekanntem Gewebsenzym ist natürlich nicht ausgeschlossen, wenn auch ein solches Enzym als Ursache der oben geschilderten Wirkung auf Alkalileguminat wenig wahrscheinlich ist. Der sicherste Weg zur Vermeidung einer Verunreinigung mit solchen Enzymen, nämlich die Verarbeitung von reinem Magensaft, stand mir nicht offen, da ich keinen

natürlichen Kalbsmagensaft habe erhalten können. Ich war also nur auf Enzyme aus Kalbsmageninfusionen hingewiesen.

Eine Verunreinigung mit Gewebsenzymen hat man natürlich am meisten zu befürchten, wenn man zur Gewinnung von enzymreichen Lösungen die Schleimhaut einer Selbstverdauung in Brutwärme unterwirft. Aus dem Grunde habe ich immer eine solche vermieden und nur die leise abgeschabte Drüsen-schicht in der Kälte mit säurehaltigem Wasser behandelt. Ferner habe ich nicht mit Infusionen direkt, sondern nur mit aus solchen erhaltenen Enzymlösungen gearbeitet. Meistens habe ich die Neutralisationsmethode¹⁾ verwendet, bei welcher die bei der Neutralisation erhaltene Fällung als Ausgangsmaterial dient. Schon bei dieser ersten Fällung wird die Hauptmasse der gelösten Bestandteile der Infusionen entfernt, und die zuletzt erhaltenen Enzymlösungen sind regelmäßig arm an festen Stoffen. In anderen Fällen habe ich überhaupt keine Infusion mit säurehaltigem Wasser gemacht, indem ich nur das trockene Kochsalz-Schleimhautgemenge²⁾ mit Wasser extrahierte. Ob ich die eine oder andere dieser Methoden verwendete, war gleichgültig. Das Resultat war immer, ebenso wie bei der Anwendung von gereinigtem käuflichem Labpulver, dasselbe.

Eine weitere Vorsichtsmaßregel bestand darin, daß ich die Versuche nur kurze Zeit andauern ließ, damit die etwa beigemengten fremden Enzyme weniger leicht und ausgiebig ihre Wirkungen entfalten könnten.

Wenn man nun, trotz diesen Vorsichtsmaßregeln, annehmen will, daß die obige Wirkung auf Alkalileguminat weder von dem Pepsin noch von dem Chymosin, sondern von einem dritten Enzym herrührt, so ist es doch auffallend, daß die Menge dieses Enzyms mit der Menge des Chymosins gleichen Schritt hält. Je kräftiger eine Enzymlösung labend wirkt, um so kräftiger wirkt sie auch auf Alkalileguminat, was unzweifelhaft zugunsten der Identität von Chymosin und dem auf Leguminat wirkenden Enzym spricht.

So lange man nicht das Gegenteil bewiesen hat, darf ich

¹⁾ Vgl. Aufsatz IV. S. 37 und Diese Zeitschr., Bd. 94, S. 300 ff.

²⁾ Diese Zeitschr., Bd. 94, S. 104 (1915).

wohl auch berechtigt sein zu behaupten, daß die Wirkung der Enzymlösungen auf Alkalileguminat nicht durch ein neues, bisher unbekanntes Enzym, sondern durch eines der bisher bekannten Magenenzyme bedingt ist. Da ich nun ferner eine Pepsinwirkung habe ausschließen können, muß ich die Wirkung als von dem Chymosin herrührend bezeichnen. Wenn diese meine Auffassung richtig ist, so ist das Casein nicht der einzige Eiweißstoff, auf welchen das Chymosin wirkt, und dieses Enzym kann also nicht als eine «Casease» angesehen werden.

Wirkung der beiden Enzyme auf Acidleguminat.

Das Chymosin wirkt auf Casein in saurer Lösung wesentlich kräftiger als auf Alkalicaseinat, und da es, wie oben gezeigt, auch auf Alkalileguminat wirkt, war zu erwarten, daß es das Legumin ebenso wie das Casein kräftiger in einem sauren als in einem neutralen Medium hydrolysieren würde. Da nun aber das Pepsin das Legumin in saurer Lösung kräftig verdaut, erwächst natürlich hieraus eine gewisse Schwierigkeit, wenn man die beiden Enzymwirkungen auf Legumin bei saurer Reaktion gesondert studieren will. Nun wirkt aber das Pepsin besser bei höheren als bei niedrigen Säuregraden, und seine Wirkung nimmt mit abnehmender Säuremenge ab, sodaß es nach der allgemeinen Ansicht bei neutraler Reaktion unwirksam ist. Das Chymosin ist dagegen unzweifelhaft bei neutraler Reaktion wirksam und es wirkt, nach meinen Erfahrungen an Casein zu urteilen, schon bei Gegenwart von nur sehr wenig Säure entschieden kräftiger als bei neutraler Reaktion. Wenn man also eine kräftigere Chymosinwirkung auf Legumin in saurer als in neutraler Lösung zu erwarten hätte, war es nicht ausgeschlossen, daß bei so niedrigen Säuregraden, daß das Pepsin fast unwirksam war, eine recht kräftige Chymosinwirkung noch zur Geltung kommen würde. Wenn man überhaupt versuchen wollte, eine besondere Chymosinwirkung bei saurer Reaktion nachzuweisen, schien es folglich geboten zu sein, bei schwach saurer Reaktion zu arbeiten.

Es war ferner nicht ausgeschlossen, daß diejenige «Pepsinverdauung», die man bei «Salzsäuredefizit» — also bei Ab-

wesenheit von freier Salzsäure und bei einem Gehalte an Säure, der unterhalb des «Sättigungspunktes» liegt — beobachtet hat, nicht von dem Pepsin, jedenfalls nicht von dem Pepsin allein, sondern auch von dem Chymosin herrührt, eine Möglichkeit, deren Prüfung mit Rücksicht auf die unter Umständen bei Abwesenheit von freier Salzsäure verlaufende Magenverdauung von großem Interesse sein mußte. Auf Grund dieser Erwägungen bestimmte ich mich dafür, saure Leguminatlösungen, die keine mit Kongopapier nachweisbare freie Säure enthielten, teils mit peptisch unwirksamen oder nur äußerst schwach eiweißverdauend wirkenden Chymosinlösungen und teils mit Enzymlösungen mit stark aufgehobener Parallelität zu prüfen.

Zu dem Ende habe ich durch Auflösung von teils a- und teils b-Legumin in Wasser unter Zusatz von $n/10$ -HCl-Leguminlösungen bereitet, die zwar auf Lackmuspapier stark sauer reagierten, auf Kongopapier dagegen keine oder eine nur äußerst schwache, kaum sichtbare Wirkung zeigten. Solche Lösungen können nun allerdings ein wenig freie Salzsäure enthalten, denn die Empfindlichkeit des Kongopapieres ist keine unbegrenzte, und das von mir benutzte Kongopapier reagierte nicht gut für eine schwächere Chlorwasserstoffsäure als eine $n/300$. Für meine Versuchsergebnisse war dies indessen ganz ohne Belang, denn das Wesentliche ist, daß meine Lösungen keine mit Kongopapier nachweisbare freie Säure enthielten. Diese sauren Leguminatlösungen habe ich der Kürze halber als Acidleguminate bezeichnet.

Da meine Untersuchungen mit solchen sauren Lösungen nur den Zweck hatten, eine etwaige Wirkung des Chymosins auf Acidleguminat wie auch eine etwa bestehende Differenz in dem Verhalten des Pepsins und Chymosins überhaupt zu konstatieren, habe ich nicht die Wasserstoffionenkonzentration in den verschiedenen Versuchen bestimmt. Solche Untersuchungen werden nämlich erst dann von bestehendem oder wesentlichem Wert, wenn man, einerseits, darüber einig ist, ob man hier nur mit einem oder mit zwei verschiedenen Enzymen zu tun hat, und wenn man, auf der anderen Seite, bessere Garantien für die Reinheit der Enzymlösungen hat.

Die Lösungen der beiden Acidleguminate haben etwas abweichende Eigenschaften.

Mit einer genügenden Menge $n/10$ -HCl löst sich das a-Legumin leicht in Wasser zu einer fast klaren Lösung, die auf Kongo deutlich und ziemlich stark sauer reagiert. Mit so kleinen Säuremengen, daß die Reaktion auf Kongo negativ ausfällt, habe ich dagegen regelmäßig unklare, weißliche, mehr oder weniger milchähnliche Lösungen erhalten, die mit unverändertem Aussehen durch das Filtrum gehen. In einem Falle, da ich zu wenig Säure zugesetzt hatte, war die Flüssigkeit milchweiß und unfiltrierbar, indem sie ein wasserhelles, fast eiweißfreies Filtrat lieferte. Die Flüssigkeit verhielt sich also in diesem Falle wie die in dem vorigen Aufsätze beschriebenen Emulsionen von Säure-Leguminverbindungen. Mit dieser einzigen Ausnahme wurden zu den Versuchen nur filtrierbare Lösungen von Acidleguminat verwendet.

Anders als das a-Legumin verhält sich, wie in dem vorigen Aufsätze erwähnt wurde, das b-Legumin. Versucht man dasselbe in Wasser unter Zusatz von $n/10$ -HCl zu lösen, so quillt es stark auf und man erhält eine kleisterähnliche oder schleimige Masse, die selbst bei starker Verdünnung nicht filtrierbar ist. Beim Erwärmen auf Körpertemperatur klärt sie sich indessen auf, wird mehr dünnflüssig und filtrierbar, besonders wenn sie auf höhere Temperatur erwärmt wird. In dieser Weise habe ich ziemlich konzentrierte (3—4 prozentige) Lösungen von Acid-b-Leguminat erhalten können. Die Lösungen sind jedoch nie klar, sondern immer etwas opalisierend und gelblich mißfarbig; sie eignen sich aber ebensogut wie die Lösungen von a-Legumin zu den Versuchen.

Die Menge der von dem a-Legumin gebundenen HCl bestimmte ich in einigen Fällen in der Weise, daß das Legumin in Wasser zu einer homogenen Emulsion suspendiert wurde, deren Gehalt an Legumin ich bestimmte, mit einer abgemessenen Menge $n/10$ -HCl löste und mit Wasser auf ein bestimmtes Volumen brachte. In anderen Fällen bestimmte ich die zur genauen Neutralisation der Chlorwasserstoffsäure und Ausfällung des Legumins aus einem bekannten Volumen der Lösung

erforderliche Menge $n/10$ -NaOH. Für die Lösungen von Acid-b-Leguminat konnte nur das letztgenannte Verfahren zur Anwendung kommen. Der Gehalt der verschiedenen Lösungen an Chlorwasserstoffsäure war in den verschiedenen Versuchen ein etwas wechselnder, wie aus den Versuchen ersichtlich wird.

Die Enzymlösungen waren in verschiedener Weise dargestellt worden, wie aus den mitzuteilenden Versuchen näher hervorgeht.

Das milchkoagulierende Enzym von erwachsenen Tieren scheint bekanntlich nicht mit dem typischen Kalbschymosin identisch zu sein, und wahrscheinlich infolge hiervon verhält sich das käufliche Pepsin, welches wohl meistens von Schweinen oder anderen erwachsenen Tieren stammt, etwas anders zu Milch als das Kalbschymosin, bzw. die käuflichen (wenigstens die von mir untersuchten) Labpräparate. Das Pepsin koaguliert bekanntlich gewöhnliche Milch sehr gut auch bei $37-40^{\circ}$ C., wenn nur die Pepsinwirkung nicht zu verdünnt ist. In dem letzteren Falle kann sie nämlich bei Bruttemperatur unwirksam sein, während sie bei etwas niedrigerer Temperatur, z. B. 30° C., noch wirkt, ein Verhalten, welches Van Dam¹⁾ zuerst beobachtet hat und durch die Annahme einer schädlichen Wirkung der Hydroxylionen der Milch erklärt. Die labende Wirkung von Kalbsmagenenzym, welches nicht diese Empfindlichkeit gegen gewöhnliche Kuhmilch zeigt, kann deshalb bei Anwendung von solcher Milch nicht mit der Wirkung einer verdünnten Pepsinlösung verglichen werden. Hebt man dagegen diese Wirkung der Hydroxylionen durch Zusatz von Säure zu der Milch auf, so kann die früher bei Körpertemperatur unwirksame Pepsinlösung nunmehr auch bei dieser Temperatur wirken, und zwar rascher als bei niedrigerer Temperatur. Um einen Vergleich zwischen der labenden Wirkung der Pepsinlösungen und der Lösungen von Kalbsmagenenzymen zu ermöglichen, habe ich deshalb Milch verwendet, die mit $n/10$ -HCl (gewöhnlich 7 ccm auf je 100 ccm Milch) versetzt worden war. Außerdem habe ich auch den Vergleich bei verschiedenen Temperaturen gemacht. Selbst unter diesen Verhältnissen wird

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. 64 (1910) und Bd. 79 (1912).

aber aus Gründen, auf die ich hier nicht des näheren eingehen kann, der Vergleich etwas unsicher. Man erhält also keine ganz genaue, sondern nur eine ungefähre Vorstellung von der relativen labenden Kraft der beiden Lösungen; aber immer kann man sehen, ob die eine Lösung wesentlich kräftiger als die andere labend wird. Belege hierfür werden die folgenden Versuche liefern.

Die Albumosenbestimmung geschah nach denselben Prinzipien wie in den Versuchen mit Alkalileguminat.

Nach diesen vorausgeschickten Bemerkungen dürfte ich direkt einige Versuche als Beispiele anführen können.

Versuch 7. Die Leguminatlösung war mit 2,36 ccm n_{10} -HCl = 8,6 mg HCl auf je 1 g α -Legumin dargestellt worden und enthielt 3,38 % Legumin. Diese Lösung wurde nicht auf höhere Temperatur erhitzt.

Als Pepsinlösung diente ein Pepsin von Merck, welches erst, in Salzsäure von 0,2 % HCl gelöst, mehrere Tage gegen Wasser mit 0,2 % HCl dialysiert worden war. Es wurde dann durch Sättigung mit Ammoniumsulfat gefällt, ausgepresst, wieder in Säure (0,2 % HCl) gelöst und mehrere Tage gegen angesäuertes Wasser zur Entfernung von allem Sulfat dialysiert. Darauf wurde der größte Teil der Säure mit n_{10} -NaOH neutralisiert und dann mit Wasser verdünnt. Die Lösung enthielt nun 0,0053 % HCl, 0,0250 % organische Substanz und 0,0234 % NaCl.

Die Lablösung war eine aus Kalbsmageninfusion nach der Neutralisationsmethode dargestellte Enzymlösung, die zur Herabsetzung der Pepsinwirkung $2\frac{1}{2}$ Minuten bei Zimmertemperatur (mit 0,008 % NaOH) alkalisiert worden war. Sie enthielt (nach der Neutralisation mit n_{10} -HCl) 0,031 % organische Substanz und 0,011 % NaCl. Ein Teil sowohl der Pepsin- wie der Lablösung wurde bis auf 92° C. erhitzt und als Pw, bzw. Lw bezeichnet. Es wurden ferner gleiche Volumina $Lw + P = P_1$ und $Pw + L = L_1$ gemischt und teils zu der Pepsinprobe und teils zu der Milchprobe verwendet. Von Pw und Lw wurden auch gleiche Volumina gemischt, teils zur Kontrollflüssigkeit K und teils zur Verdünnungsflüssigkeit.

Die Pepsinprobe nach Mett ergab folgendes Resultat. Nach 20 Stunden $P_1 = 3$ mm, $L_1 = 0,0$; nach 44 Stunden $P_1 = 7,6$ mm, $L_1 = 0,0$. Bei der Karminfibrin-Pepsinprobe wirkte P_1 — mit K zu $\frac{1}{125}$ verdünnt — etwas kräftiger als L_1 und diese letztere Lösung wirkte also jedenfalls schwächer als eine Pepsinlösung 1 : 1 000 000.

Milchprobe mit gewöhnlicher Milch bei 30° C. $P_1 = 62$ — 64 Min., $L_1 = 6$ Min. = 1 : 10; bei 38° C. P_1 keine Gerinnung in 3 Stunden, $L_1 = 145$ Sekunden.

Mit angesäuerter Milch (7 ccm n_{10} -HCl auf je 100 ccm Milch) bei 30° C. $P_1 = 125$ Sek. $L_1 = 55$ Sek. = 1 : 2,3; bei 38° C. $P_1 = 60$ Sek. und $L_1 = 28$ Sek. = 1 : 2,1. Mittel 1 : 2,2.

Die Relation der beiden Enzymwirkungen war also: für Pepsin $P_1 = 125$ und $L_1 = 1$; für Chymosin $P_1 = 1$ und $L_1 = 2,2$.

Es wurden folgende drei Proben angeordnet: K = 30 ccm Leguminatlösung und 15 ccm Pw + 15 ccm Lw; $P_1 = 30$ ccm Leguminat und 15 ccm Lw + 15 ccm P; $L_1 = 30$ ccm Leguminat und 15 ccm Pw + 15 ccm L. Temp. 38° C. und Versuchsdauer $2\frac{1}{2}$ Stunden. 2,2 ccm n_{10} -Lauge zur Fällung. Menge der löslichen Stoffe in je 50 ccm Filtrat: K = 0,032, $P_1 = 0,061$ und $L_1 = 0,166$ oder auf die Gesamtflüssigkeit berechnet, K = 0,040, $P_1 = 0,076$ und $L_1 = 0,207$. Nach Abzug von den festen Stoffen in K waren also die Albumosenmengen in $P_1 = 0,036$ und in $L_1 = 0,167$ oder in Prozenten von dem Legumin (1,014 g) = bezw. 3,5 und 16,5%.

Das Ergebnis dieses Versuches ersieht man am einfachsten aus der folgenden Zusammenstellung.

	Pepsin	Chymosin	Albumosen
P_1	> 125	1	0,036
L_1	1	2,2	0,167.

Trotzdem die Pepsinlösung 125 mal so kräftig verdauend wie die Lablösung wirkte, war die von der Pepsinlösung in $2\frac{1}{2}$ Stunden gebildete Albumosenmenge nur 0,036 g, während die Lablösung in derselben Zeit 0,167 g Albumosen gebildet hatte. Da die ursprüngliche Pepsinlösung 1 : 4000 und die mit dem gleichen Volumen erhitzter Lablösung verdünnte Lösung (P_1) also gleich 1 : 8000 war, wirkte die Lablösung L_1 jedenfalls schwächer als eine Pepsinlösung von 1 : 1 000 000. Die viel reichlichere Albumosenbildung in L_1 kann also nicht von einer Pepsinwirkung herrühren, und der Versuch zeigt also, daß das Chymosin aus Legumin bei diesem niedrigen Säuregrade Albumose gebildet hat. Da die Pepsinlösung ebenfalls, wenn auch schwächer, labend auf Milch wirkte, kann die Albumosenbildung in P_1 recht wohl von der Chymosinwirkung der Pepsinlösung herrühren, und es ist also fraglich, ob hier überhaupt eine Pepsinwirkung stattgefunden hat, ob nicht vielmehr das Pepsin bei diesem niedrigen Säuregrade unwirksam gewesen ist. Der Versuch zeigt übrigens, ebenso wie die folgenden, daß die mangelnde Parallelität der zwei Enzymwirkungen auch bei Anwendung von Legumin als Substrat zum Vorschein kommt.

Versuch 8. Die Acidleguminatlösung (b-Legumin) war mit 2,5 ccm n_{10} -HCl = rund 9 mg HCl auf 1 g Legumin dargestellt worden und enthielt 2,2% Legumin. Sie war auf etwa 92° C. erhitzt worden.

Die Lablösung war eine durch rasche und kräftige Dialyse gegen Wasser gereinigte Lösung von Hansens Labpulver. Sie war während zwei Minuten wie gewöhnlich alkalisiert worden und enthielt nach der Neutralisation 0,034% organische Stoffe und rund 0,011% NaCl.

Die Pepsinlösung war nicht wie in dem Versuche 7 gereinigt worden. Sie war einfach eine klar filtrierte, neutral reagierende Lösung von Mercks Pepsin mit 0,005% festen Stoffen = 1 : 20 000. Von jeder Lösung wurde ein Teil zur Vernichtung der Enzyme erhitzt und dann wie in dem vorigen Versuche die 3 Lösungen K, P₁ und L₁ bereitet. Diese Lösungen enthielten also je 0,025% feste Stoffe und der Gehalt an Rohpepsin in P₁ war 1 : 40 000.

Die Lablösung L₁ wirkte gut auf gewöhnliche Milch, indem sie dieselbe im Laufe von 30 Sekunden bei 38° C. labte. Die Pepsinlösung wirkte dagegen nur schwach labend, selbst auf angesäuerte Milch und es konnte, wie gewöhnlich in solchen Fällen, keine konstante Relation zwischen der Labwirkung beider Lösungen bei verschiedenen Temperaturen festgestellt werden. Nur so viel war sicher, daß die Lösung L₁ viel stärker, wenigstens 20mal stärker als die Lösung P₁ wirkte.

Dagegen wirkte die letztere stärker verdauend. Sie war wirksam bei der Mettschen Probe, 2 mm in 20 Stunden, und verdaute fein koaguliertes Eiweiß, während die Lösung L₁ in dieser Hinsicht unwirksam war. Zur Prüfung der verdauenden Wirkung auf koaguliertes Eiweiß wurde folgender Versuch ausgeführt. Das feuchte, fein koagulierte Eiweiß enthielt 27% Eiweiß und 73% Wasser und auf je 100 ccm Flüssigkeit kamen in jeder Probe 2,5 g feuchtes = 0,675 wasserfreies Eiweiß. Die Probe A enthielt nur Verdauungssalzsäure von 0,3% HCl, Probe B enthielt die Lösung P₁ mit 0,3% HCl und C die Lösung L₁, ebenfalls mit 0,3% HCl. Nach 7 Stunden bei 35–36° war alles verdaut in B. Nach 30 Stunden wurde der Versuch unterbrochen, und es wurden nun (nach Abzug des bei der Neutralisation gebildeten Kochsalzes) in A 0,038 und in C 0,039 g feste Stoffe gefunden. Die Lablösung hatte also gar nichts verdaut und war also als praktisch pepsinfrei anzusehen. Da keine sichere Relation der Labwirkung festgestellt werden konnte, wurde die Pepsin-Karminfibrinprobe nicht ausgeführt.

Die Versuchsanordnung war im übrigen dieselbe wie in dem vorigen Versuche; also: K = 30 ccm Leguminatlösung und 15 ccm Pw + 15 ccm Lw, P₁ = 30 ccm Leguminat und 15 ccm Lw + 15 ccm P, L₁ = 30 ccm Leguminat und 15 ccm Pw + 15 ccm L. Temp. 38–38,5° C. Die Probe L₁ wurde rasch verändert, mehr opalisierend, weißlich, und nach 1 Stunde 25 Minuten trat in ihr eine Fällung auf. K und P₁ waren nicht merkbar verändert. Der Versuch wurde nun unterbrochen und wie gewöhnlich behandelt. Die Mengen der nicht koagulablen festen Stoffe in 50 ccm Filtrat waren in K = 0,046, in P₁ = 0,0485 und in L₁ = 0,149 g. Auf die gesamte Versuchsflüssigkeit (61,5 ccm) berechnet ist dies resp. rund 0,057.

0,060 und 0,183 g. Nach Abzug der festen Stoffe in K ist dies also in $P_1 = 0,003$ und in $L_1 = 0,126 \text{ g} = 19\%$ von dem Legumin.

In diesem Versuche konnte nicht die Relation der Enzymwirkungen hinreichend gut festgestellt werden. Sicher war es aber, daß die Lablösung viel kräftiger, etwa 20mal kräftiger, als die Pepsinlösung die Milch labte, während erstere Lösung praktisch als pepsinfrei anzusehen war. In 30 Stunden hatte sie nämlich nicht mehr von dem feinkoagulierten Eiweiß als die entsprechende Kontrollsäure gelöst, und da diese Lösung in 30 Sekunden die Milch labte und also eine kräftige Chymosinwirkung zeigte, liegt hierin eine weitere Bestätigung meiner früheren Beobachtungen,¹⁾ daß das Chymosin nicht koaguliertes Hühnereiweiß bei Gegenwart von Säure verdaut. Nun hatte diese Lablösung in 85 Minuten bei 38—38,5° C. 0,126 g Albumose gebildet, während die Pepsinlösung in derselben Zeit nur 0,003 g Albumose gebildet hatte. Dieser Versuch beweist also nach meiner Ansicht, daß das Chymosin bei einem niedrigen Säuregrad, bei welchem das Pepsin unwirksam ist, gelöstes Legumin recht kräftig verdaut.

Die bisher mitgeteilten Versuche sind mit käuflichem Pepsin ausgeführt worden, und es dürfte deshalb angemessen sein, einen Versuch, in welchem die beiden Enzyme vom Kalbe stammten, hier anzuführen.

Versuch 9. Eine Acidleguminatlösung, die mit 3,6 ccm n_{10} -HCl = 13 mg HCl auf je 1 g α -Legumin bereitet war und genau 2% Legumin enthielt. Sie war auf 92° C. erhitzt worden.

Die Lablösung war eine, nach der Neutralisationsmethode dargestellte, 1 Minute mit Alkali behandelte Enzymlösung, die nach der Neutralisation mit n_{10} -HCl 0,020% organische Stoffe und rund 0,011% NaCl enthielt.

Das Pepsin stammte aus der A-Fraktion eines NaCl-Schleimhautgemenges vom Kalb und war nach dem in einem vorigen Aufsatz²⁾ angegebenen Verfahren dargestellt worden. Die einzige Abweichung bestand darin, daß die Fällung nicht erst getrocknet, sondern direkt feucht, mit verdünnter Salzsäure (0,2% HCl) behandelt und dann gegen angesäuertes Wasser dialysiert wurde. Nach Verdünnung mit Wasser ent-

¹⁾ Vgl. Diese Zeitschr., Bd. 94, S. 319 f. (1915).

²⁾ Vgl. Mitteilung II, Diese Zeitschr., Bd. 94, S. 104 (1915).

hielt sie 0,020% feste Stoffe und 0,001% HCl. Es wurde dann wie in den vorigen zwei Versuchen verfahren.

Da beide Lösungen in diesem Falle Kalbschymosin enthielten, konnte zu der Milchprobe gewöhnliche Milch benutzt werden. Die Gerinnungszeiten waren bei 32° C.: $P_1 = 16$ Min. 30 Sek. und $L_1 = 5$ Min. 30 Sek. = 1 : 3; bei 38° C. $P_1 = 10$ Min. und $L_1 = 3$ Min. = 1 : 3,3, also 1 : 3,15.

Bei der Mettschen Probe war P_1 positiv, L_1 negativ. Die Pepsinrelation nach der Karminfibrin-Pepsinprobe: P_1 $\frac{1}{50}$ etwas kräftiger als L_1 . Die Enzymrelationen $P_1 : L_1$ waren also für Pepsin = 50 : 1 und für Chymosin 1 : 3,15.

Die drei Proben K, P_1 und L_1 wie in den vorigen Versuchen mit je 30 ccm Leguminatlösung. Temp. 38°. Nach 80 Minuten trat in L_1 eine Fällung auf und der Versuch wurde unterbrochen. Die Menge der nicht koagulablen Stoffe, auf die ganze Versuchsflüssigkeit berechnet, war in K = 0,085, in P_1 = 0,167 und in L_1 0,226 g. Die Mengen der gebildeten Albumosen waren also in P_1 = 0,082 und in L_1 0,141 g, bzw. 13,7 und 23,5% von dem Legumin.

In diesem Versuche mit Kalbsenzymen war ein Vergleich der relativen Enzymmengen gut ausführbar und das Versuchsergebnis war folgendes:

	Pepsin	Chymosin	Albumose
P_1	50	1	0,082
L_1	1	3,15	0,141.

Die in 80 Minuten gebildete Albumosenmenge war also in der pepsinärmeren und chymosinreicheren Probe bedeutend größer als in der pepsinreicheren, und das Versuchsergebnis ist also derselben Art wie in den anderen Versuchen. Da in diesem Falle beide Lösungen dasselbe Chymosin enthielten, ist es auch erlaubt, einen Vergleich zwischen den gebildeten Albumosenmengen und den Enzymmengen zu machen. Es zeigt sich dann, daß die Quadrate der Albumosenmengen wie 1 : 2,96 oder rund wie 1 : 3, also fast genau wie die Chymosinmengen 1 : 3,15 und nicht wie die Pepsinmengen 50 : 1 sich verhalten. Daß auch in diesem Falle eine Chymosinverdauung des Legumins stattgefunden hat, dürfte wohl also nicht zu bezweifeln sein.

Da die Pepsinlösungen, wie bekannt, immer auch Chymosinwirkung zeigen, ist es leicht erklärlich, daß auch in den Proben mit solchen Lösungen eine, wenn auch geringe, Albumosenbildung stattfindet. Je konzentrierter die Pepsin-

lösung ist, um so stärker kommt auch die Chymosinwirkung zur Geltung, und es ist deshalb ohne weiteres klar, daß man, um deutliche Resultate zu erhalten, mit nicht zu konzentrierten Pepsinlösungen arbeiten soll. Nun kann man durch Verdünnung mit Wasser Pepsinlösungen erhalten, die auf Milch kaum oder jedenfalls nur sehr schwach wirken, während sie in saurer Lösung koaguliertes Hühnereiweiß verdauen, und man könnte erwarten, daß in Versuchen mit solchen Lösungen die Chymosinwirkung der Pepsinlösungen auf Acidleguminat fast wegfallen würde. Ich habe deshalb auch einen solchen Versuch ausgeführt und da er nach demselben Schema wie die obigen, mehr detailliert beschriebenen angestellt wurde, führe ich hier nur die wesentlichsten Data an.

Zu dem Versuche diente eine Lösung von Acid-b-Leguminat. Die neutrale Pepsinlösung (Merck), welche Milch bei 38° rasch koagulierte, wurde mit Wasser so stark verdünnt, daß sie auf dieselbe Milch sowohl bei 38 wie bei 30° im Laufe von 2 Stunden unwirksam war. Sie verdaute dagegen bei Gegenwart von $0,2\%$ HCl koaguliertes Hühnereiweiß (Mettsche Probe) und bei der Karminfibrinprobe wirkte sie etwa 40mal kräftiger als die durch Alkalieinwirkung sehr pepsinschwach gemachte, auf Milch gut wirkende Chymosinlösung. Das Resultat einer 4-stündigen Einwirkung beider Lösungen auf das Leguminat bei $38-39^{\circ}$ war folgendes. Die Pepsinlösung hatte $0,002$ und die Chymosinlösung $0,178$ g Albumosen gebildet. Das Pepsin war also unwirksam gewesen.

Da die mit Alkali behandelten Enzymlösungen sehr gut milchkoagulierend wirken, während sie in saurer Lösung auf koaguliertes Hühnereiweiß oder gekochtes Fibrin unwirksam sind und auf rohes Fibrin nur schwach — oft schwächer als Pepsinlösungen $1:5$ à 10 Millionen — wirken, habe ich diese Lösungen als fast pepsinfreie oder praktisch pepsinfreie Chymosinlösungen bezeichnet.

Hiergegen könnte man indessen von unitarischer Seite einwenden, daß die milchkoagulierende Wirkung dieser Lösungen trotzdem vielleicht von Pepsin herrühre, dessen Wirkung auf Eiweiß in saurer Lösung durch besondere, infolge der Alkalieinwirkung entstandene Hemmungsstoffe verhindert

werde. Dieser zu erwartenden Einwendung gegenüber hatte ich in einem früheren Aufsätze (Mitteilung III) die Aufmerksamkeit darauf gelenkt, daß diese Lösungen kräftiger auf Casein in saurer als in neutraler Lösung wirken, was jedenfalls nicht für die Annahme von besonderen, nur in saurer Lösung hemmend wirkenden Stoffen spricht.

Gegen diesen Wahrscheinlichkeitsbeweis für die Abwesenheit besonderer, nur in saurer Lösung hemmend wirkender Stoffe in den alkalisierten Enzymlösungen hat indessen Pekelharing¹⁾ neulich insofern eine Einwendung gemacht, als er in seinem letzten Aufsätze in dieser Angelegenheit sagt: «Darf man aber die Wirkung des Enzyms auf Casein mit derjenigen, bei viel stärker saurer Reaktion, auf Fibrin oder Hühner-eiweiß gleich setzen? Ich glaube, daß die Untersuchungen von Van Dam zu einer verneinenden Antwort auf diese Frage Veranlassung geben».

Daß man die Wirkung der Enzyme auf Casein nicht mit derjenigen auf Fibrin oder Hühnereiweiß, bei viel stärker saurer Reaktion, gleich setzen darf, darüber bin ich natürlich mit Pekelharing völlig einverstanden, und für diesen meinen Standpunkt wird man wohl in meinen früheren Aufsätzen wiederholt Belege finden. Ich gehe sogar einen Schritt weiter als Pekelharing, indem ich behaupte, daß es ganz unzulässig sein würde, diese Wirkungen gleich zu setzen. Nach meiner Ansicht ist nämlich die Wirkung auf koaguliertes Hühnereiweiß oder Fibrin bei höheren Säuregraden eine reine Pepsinwirkung, während die Wirkung auf Casein bei niedrigeren Säuregraden, je nach der Acidität des Gemenges und der Beschaffenheit der Enzymlösungen, eine Chymosin- oder eine kombinierte Chymosin- und Pepsinwirkung ist.

Wenn ich nun trotzdem die bessere Verdauung des Caseins bei saurer als bei neutraler Reaktion als einen Grund gegen die Annahme von besonderen, nur bei saurer Reaktion hemmend wirkenden Stoffen angeführt habe, so hatte dies folgende Ursache. Ich hatte meine Enzymlösungen mit Hühnereiweiß oder Fibrin bei den für die Verdauung dieser Stoffe günstigsten

¹⁾ Archiv f. die ges. Physiologie, Bd. 167, S. 254 (1917).

Säuregraden geprüft, und wenn das Ausbleiben einer Pepsinverdauung unter diesen günstigen Verhältnissen von so kräftig hemmend wirkenden Stoffen herrühren sollte, daß sie die Pepsinwirkung vollständig verhinderten, konnte man wohl erwarten, daß sie nicht ohne Einwirkung auf die Verdauung auch anderer Eiweißstoffe, z. B. des Caseins, sein würden. Da ich nun aber fand, daß bei Gegenwart von Säure statt einer eventuellen Verlangsamung eine Beschleunigung der Caseinhydrolyse stattfand, indem etwa doppelt so viel Albumosen bei saurer Reaktion gebildet wurden, fand ich es unmöglich, die Unwirksamkeit meiner Enzymlösungen auf Hühnereiweiß und Fibrin durch die Annahme von nur in saurer Lösung wirkenden Hemmungsstoffen zu erklären.

Gegen diese Beweisführung könnte man nun allerdings auch andere Einwendungen machen, statt aber dieselben hier zu diskutieren, will ich einfach auf die oben mitgeteilten Versuche hinweisen. Sie zeigen nämlich, daß gerade diejenigen Enzymlösungen, welche die hypothetischen, die Pepsinverdauung hemmenden Stoffe enthalten sollten, in schwach saurer Lösung das Legumin verdauen, während die Pepsinlösungen, welche sowohl Hühnereiweiß wie Fibrin verdauen und folglich solche Hemmungsstoffe nicht enthalten, unter ganz denselben Versuchsbedingungen auf das Legumin unwirksam sind oder auf dasselbe — der Chymosinwirkung entsprechend — nur schwach einwirken.

Natürlich kann man von unitarischem Standpunkt diese Versuchsergebnisse durch die gekünstelte Annahme erklären, daß die Pepsinlösungen immer Hemmungsstoffe enthalten, die nicht bei stark, sondern nur bei schwach saurer Reaktion wirken, während die Chymosinlösungen umgekehrt Stoffe enthalten, die nicht bei schwach, sondern nur bei stark saurer Reaktion die Pepsinwirkung hemmen. Ich erkläre dagegen die Unwirksamkeit der Pepsinlösungen auf Acidleguminat in Übereinstimmung mit der gang und gäbe Ansicht, daß das Pepsin ein Enzym ist, dessen Wirkung von einer gewissen Grenze ab mit abnehmender Wasserstoffionenkonzentration abnimmt und welches bei neutraler oder sehr schwach saurer Reaktion unwirksam ist. Steht man auf diesem Standpunkte,

so dürfte es wohl kaum möglich sein, die Wirkung der Chymosinlösungen auf das Acidleguminat — mit der Unwirksamkeit der Pepsinlösungen verglichen — als eine Pepsinwirkung aufzufassen. Ich betrachte sie auch als eine besondere Enzymwirkung, als Chymosinwirkung.

Trotzdem ich die Annahme von besonderen Hemmungsstoffen in den alkalibehandelten Enzymlösungen als ganz unbegründet erachte, habe ich natürlich auch Versuche mit Enzymlösungen, die nicht mit Alkali behandelt worden sind, ausgeführt. Da ich in der Folge einige solche, teils bei Zimmertemperatur und teils nach einer anderen Versuchsanordnung (als die bisher beschriebene) ausgeführten Versuche etwas ausführlicher beschreiben werde, dürfte es wohl überflüssig sein, einige nach dem obigen Prinzip ausgeführte Versuche mit nicht alkalibehandelten Enzymlösungen hier anzuführen.

Die bisher mitgeteilten Versuche wurden alle bei Brutttemperatur ausgeführt, und da es hier nur um Enzyme von Warmblütern sich handelt, dürfte es wohl auch weniger wichtig sein, die Enzymwirkungen bei niedrigeren Temperaturen zu prüfen. Eine Schädigung der Enzyme in diesen sauren Lösungen bei einer Versuchsdauer von höchstens 4 Stunden ist wohl auch kaum zu befürchten. Um aber dem Vorwurfe, daß ich diese Möglichkeit nicht berücksichtigt habe, zu entgehen, und da die Wirkungsweise der Enzyme bei niedrigeren Temperaturen ebenfalls ein gewisses Interesse hat, habe ich auch einige Versuche bei Zimmertemperatur ausgeführt und will hier ein paar solche mitteilen.

Versuch 10. Die Acidleguminatlösung, mit 3 ccm n_{10} -HCl = rund 11 mg HCl auf je 1 g α -Legumin bereitet, enthielt 3,02% Legumin und war auf 92° C. erwärmt worden. Keine Reaktion auf Kongo.

Die Pepsinlösung P stammte von einem käuflichen Pepsin (Pepsin. absol. Jensen & Langebeck Petersen, Kopenhagen) her und war durch wiederholte kräftige Dialyse in saurer Lösung gereinigt worden. Sie wurde dann mit Wasser zu dem Säuregrade 0,0016 und einem Gehalte von 0,04% festen Stoffen verdünnt. Die andere Enzymlösung L war aus Kalbsmageninfusion nach der Neutralisationsmethode erhalten und 2 Minuten wie gewöhnlich mit Alkali behandelt. Sie war neutral und enthielt ebenfalls 0,04% organische Stoffe nebst rund 0,011% NaCl. Es wurden wie in den vorhergehenden Versuchen die Lösungen K_1 , P₁ und L₁ bereitet.

Die Milchprobe (Milch mit $n/10$ -HCl, 7 : 100) gab für die Temperaturen 23° und 30° C. die Werte $P_1 = 200$ Sek. und L_1 60 Sek. = Relation 1 : 3,3 resp. $P_1 = 75$ Sek. und L_1 15—20 Sek. = Relation 1 : 3,75 à 5. Die Pepsinprobe nach Mett bei 34 — 35° C. ergab für P_1 in 20 Stunden 5 mm und für L_1 in 44 Stunden 0 mm. Bei der Karminfibrin-Pepsinprobe erwies sich P_1 mit L_w zu $1/300$ verdünnt etwas kräftiger als L_1 und diese letztere Lösung wirkte also schwächer als eine Pepsinlösung 1 : 1 000 000. Die Relation der Enzymwirkungen von P_1 und L_1 war also für Pepsin = 200 : 1 und für Chymosin 1 : 3,3 à 4,4.

Die 3 Proben enthielten je 30 ccm Leguminatlösung mit je 30 ccm von resp. K, P_1 und L_1 . Sie blieben von dem einen Tage zu dem anderen $19\frac{1}{2}$ Stunden bei 13 — 15° C. stehen. Probe L_1 war nun zu einer zusammenhängenden, lockeren Masse mit ausgepreßter, wasserheller Flüssigkeit geronnen. Die zwei anderen waren flüssig, nicht wesentlich verändert. Die Mengen der gebildeten Albumosen, auf die gesamte Versuchsflüssigkeit berechnet, waren in $P_1 = 0,147$ und in $L_1 = 0,301$ g.

Das Resultat dieses Versuches kann übersichtlich in folgender Weise zusammengestellt werden.

	Pepsin	Chymosin	Albumosen
P_1	> 200	1	0,147 g
L_1	1	3,3—4,4	0,301 g

Trotzdem die Pepsinlösung mindestens 200mal kräftiger verdauend als L_1 bei höherem Säuregrad wirkte, hatte die erstere Lösung bei Abwesenheit von freier Säure bei 13 — 15° C. nicht halb so viel Albumosen wie die äußerst pepsinarme, aber chymosinreichere Lösung L_1 gebildet. Da die Pepsinlösung, wie aus den detaillierten Angaben ersichtlich ist, nicht nur gut verdauend, sondern auch recht gut milchkoagulierend wirkte, ist es sehr wahrscheinlich, daß die Albumosenbildung mittels der Pepsinlösung auch in diesem Falle von der Chymosinwirkung dieser Lösung herrührte. Da die Enzymlösung L_1 schwächer verdauend auf Fibrin als eine Pepsinlösung 1 : 1 000 000 wirkte, ist es offenbar, daß die Albumosenbildung mittels dieser Lösung (L_1) von dem Chymosin und nicht von den Pepsinspuren herrührte.

Da der folgende Versuch mit b-Legumin in allem Wesentlichen wie der nun beschriebene angeordnet war, dürfte eine etwas weniger detaillierte Beschreibung genügend sein.

Versuch 11. Acidleguminatlösung mit 1,88% b-Legumin und 5,3 ccm $n/10$ -HCl = 19 mg HCl auf je 1 g Legumin. Reagierte höchstens

sehr schwach auf Kongo. Wurde nicht auf höhere Temperatur als gegen $+ 50^{\circ}$ C. erwärmt.

Durch Dialyse, Fällung mit Ammoniumsulfat und neue Dialyse gereinigtes Pepsin (Merck). Durch Dialyse gereinigte, nicht alkalisierte Lösung von Hansens Labpulver. Beide Lösungen 1 : 5000. Relation der Enzymwirkungen: $P_1 : L_1$ für Pepsin = $> 100 : 1$ und für Chymosin = $1 : 4$. Je 30 ccm Leguminat- und Enzymlösung in jeder Probe. Versuchsdauer 20 Stunden bei $+ 10^{\circ}$ C. Fällung in keiner der 3 Proben. Albumosenmengen in $P_1 = 0,029$ und in $L_1 = 0,248$ g.

Das Versuchsergebnis, nach demselben Prinzip wie im vorigen Versuche zusammengestellt, war also folgendes:

	Pepsin	Chymosin	Albumosen
P	> 100	1	0,029
L	1	4	0,248.

Die Resultate sind so augenfällig, daß sie keiner mehr eingehenden Besprechung bedürftig sind. Zu erwähnen ist vielleicht, daß die Pepsinlösung in 20 Stunden bei $34-35^{\circ}$ 4 mm und die Lablösung 0 mm verdaut hatte. Trotz dieser nicht schwachen Pepsinwirkung waren nur 0,029 g Albumosen gebildet worden. Zu erwähnen ist ferner, daß in diesem Versuche keine Fällung in der Probe L auftrat, was vielleicht davon abhängt, daß die Leguminatlösung in diesem Falle nicht auf höhere Temperatur erwärmt worden war. In dem oben erwähnten Versuche 7, zu welchem eine nicht erhitzte Leguminatlösung verwendet wurde, trat nämlich ebenfalls keine Fällung auf, während in den Versuchen 8, 9 und 10 mit auf 92° C. erhitzten Acidleguminatlösungen Fällungen in den chymosinreicheren Proben auftraten. Da ich indessen noch keine Versuche mit einer und derselben, teils gekochten und teils ungekochten Acidleguminatlösung und derselben Enzymlösung ausgeführt habe, wage ich nichts Bestimmtes hierüber zu sagen.

Das wesentlichste Resultat der nun mitgeteilten 2 Versuche ist jedenfalls, daß die verschiedene Wirkung des Pepsins und Chymosins auf Acidleguminate ebensogut bei einer Temperatur von $10-15^{\circ}$ C. wie bei Körpertemperatur sich kundgibt und daß es gleichgültig ist, ob man die Enzymlösung mit Alkali behandelt hat oder nicht.

Da sowohl die mit nicht alkalisierten Enzymlösungen wie die bei niedrigerer Temperatur ausgeführten Versuche ähnliche

Resultate wie die Versuche mit alkalisierten Enzymlösungen bei Körpertemperatur ergeben haben, sehe ich hierin eine weitere Stütze für meine oben ausgesprochene Ansicht, daß es hier um zwei verschiedene Enzymwirkungen, die an eine verschiedene Reaktion des Mediums gebunden sind, sich handelt. Wenn diese Ansicht richtig ist, hat man aber zu erwarten, daß bei Änderung dieser Reaktion und bei Gegenwart von freier Säure die relative Intensität der Enzymwirkungen sich ändern und die Pepsinwirkung besser zur Geltung kommen wird.

Aus dem Grunde habe ich auch Versuche ausgeführt, in welchen ich dieselben Enzymlösungen gleichzeitig bei derselben Temperatur auf dieselbe Acidleguminatlösung einwirken ließ, in der einen Reihe bei Abwesenheit von freier Säure und in der anderen bei Gegenwart einer bekannten Menge freier Chlorwasserstoffsäure. Ich lasse hier ein paar solche Versuche folgen.

Versuch 12. Acidleguminatlösung mit 3,2 ccm n_{10} -HCl = 11,7 mg HCl auf je 1 g α -Legumin bereitet. Die Lösung enthielt 2,2% Legumin und war auf $+ 92^\circ$ C. erhitzt worden.

Pepsinlösung aus Merck's Pepsin, gereinigt durch Dialyse der sauren (0,2% HCl) Lösung, Fällung durch Sättigung mit Ammoniumsulfat und neue Dialyse gegen schwach angesäuertes Wasser. Die Lösung enthielt 0,033% Pepsin = rund 1 : 3000 und 0,005% HCl. Die Lablösung stammte von einem käuflichen Labpulver (von Glad in Kopenhagen). Der nach Entfernung aller löslichen Stoffe durch Dialyse gegen Wasser zurückgebliebene ungelöste Rest wurde mit salzsäurehaltigem Wasser (0,1% HCl) extrahiert, mit Wasser zu dem Gehalte von 0,005% HCl verdünnt und nicht mit Alkali behandelt. Der Gehalt an festen Stoffen = 0,042%. Wie in früher beschriebenen Versuchen wurden durch Erhitzen zur Vernichtung der Enzymwirkungen Lösungen Pw und Lw und dann weiter $Lw + P \bar{a}a = P_1$ und $Pw + L \bar{a}a = L_1$ bereitet. Verdauungsprobe nach Mett: $P_1 = 4,5$ mm in 20 Stunden; $L_1 = 0$ mm in 44 Stunden. Bei der Karminfibrin-Pepsinprobe P_1 $1/50$ etwas kräftiger als L_1 . Milchprobe mit gewöhnlicher Milch: bei 38° C. P_1 unwirksam während 3 Stunden; bei $27,5^\circ$ $P_1 = 36$ Min. und $L_1 = 6\frac{1}{2}$ Min. = 1 : 5,7. Mit angesäuerter Milch (7 ccm n_{10} -HCl : 100 Milch) bei 38° C. $P_1 = 62''$, $L_1 = 12'' = 1 : 5,2$; bei 25° C. $P_1 = 180''$ und $L_1 = 40'' = 1 : 4,5$. Die Enzymrelationen waren also: $P_1 : L_1$ für Pepsin = 50 : 1 und für Chymosin = 1 : 4,5—5,7.

Es wurden zwei verschiedene Versuchsreihen, A und B, mit je 3 Proben, die 30 ccm Leguminatlösung und je 30 ccm resp. von K , P_1 und L_1 enthielten, angeordnet. Die zwei Reihen unterschieden sich nur

dadurch voneinander, daß jede Probe der Reihe B 2 ccm Salzsäure von 2%, also 0,065% zugesetzte HCl enthielt. Die Versuchsdauer war 20 Stunden bei + 10 à 12° C. Zur Neutralisation und Ausfällung des unverdauten Legumins erforderte jede Probe der Reihe A 2,4 ccm und der Reihe B 13,3 ccm $n/_{10}$ -Lauge.

Die Menge der festen Stoffe in 50 ccm Filtrat der Proben A war in K 0,032, in P_1 0,052 und in L_1 0,245 g. Auf das Gesamtvolumen der Versuchsflüssigkeit, 62,4 ccm, ist dies resp. 0,040, 0,065 und 0,306 g und die Albumosenmengen nach Abzug der festen Stoffe in K also: in P_1 = 0,025 und in L_1 0,266 g bzw. 3,8 und 40,3% von dem Legumin. Die Mengen der festen Stoffe in 60 ccm Filtrat in der Reihe B waren: in K = 0,089, in P_1 = 0,481 und in L_1 = 0,333. Auf das Gesamtvolumen nach der Neutralisation (= 73,3 ccm) also resp. 0,109, 0,588 und 0,407 g. Die Albumosenmengen waren also in P_1 = 0,479 und in L_1 0,298 g, bzw. 72,6 und 45,2% von dem Legumin.

Versuch 13. Dieser Versuch wurde nach ganz demselben Prinzipie wie der vorige ausgeführt und kann deshalb etwas weniger detailliert beschrieben werden. 2%ige Acidleguminatlösung mit 4,58 ccm $n/_{10}$ -HCl = 16,7 mg HCl auf je 1 g b-Legumin bereitet. Dasselbe gereinigte Pepsin wie im vorigen Versuche; Stärke der Lösung 1 : 5000. Durch Dialyse gereinigte, nicht mit Alkali behandelte Lösung von Hansens Labpulver 1 : 2500. P_1 digerierte: Mett = 2,8 mm in 20 Stunden, L_1 = 0 mm. P_1 $1/_{30}$ wirkte ein wenig kräftiger als L_1 . Milchprobe mit angesäuerter Milch: bei 26° P_1 = 495", L_1 = 55" = 1 : 9; bei 37,5° P_1 = 185" und L_1 = 15" = 1 : 12. Jede Probe der Reihe B enthielt 0,080% HCl. Versuchsdauer 20 Stunden bei + 11° C. Die Albumosenmengen in Reihe A waren: P_1 = 0,010 und L_1 = 0,247 oder resp. 1,6 und 41,16% von dem Legumin. In der Reihe B waren sie: P_1 = 0,401 und L_1 = 0,277, resp. 66,85 und 46,16% von dem Legumin.

Der Übersichtlichkeit halber mache ich die folgende Zusammenstellung der beiden Versuche. Die Zahlen in den beiden Kolonnen «Kongo negativ» und «freie HCl» bedeuten die absoluten Mengen der gefundenen Albumosen und dieselben Werte in Prozenten von dem Legumin. Der erste Versuch ist mit a- und der zweite mit b-Legumin ausgeführt worden. Die Menge der zugesetzten freien HCl war in Versuch 12 = 0,065 und in Versuch 13 = 0,080% HCl.

	Pepsin	Chymosin	Kongo negativ	Freie HCl
Nr. 12	50	1	0,025 g = 3,8 %	0,479 g = 72,6 %
	1	4,5—5,8	0,266 > = 40,3 %	0,298 > = 45,15 %
Nr. 13	30	1	0,010 > = 1,6 %	0,401 > = 66,85 %
	1	9—12	0,247 > = 41,16 %	0,277 > = 46,16 %

Die Versuchsergebnisse sind so schlagend, daß sie keiner ausführlichen Besprechung bedürfen. Bei Abwesenheit von freier HCl wirkte in beiden Fällen die chymosinreichere Flüssigkeit viel kräftiger als die pepsinreichere, und die letztere wirkte so schwach, daß wohl nicht von einer Pepsinwirkung die Rede sein kann. Bei Gegenwart von freier HCl war das Verhalten dagegen ein umgekehrtes, indem hier die pepsinreichere Flüssigkeit, trotz der für die Pepsinwirkung weniger günstigen, niedrigen Temperatur, 10—12° C., eine viel kräftigere Wirkung zeigte.

Es ist zweifelsohne etwas auffallend, daß die Zunahme der Albumosenmengen in den chymosinreicheren Proben bei Gegenwart von freier Säure eine verhältnismäßig recht kleine ist, nämlich nur etwa 5% gegenüber den bei Abwesenheit von freier Säure gebildeten viel reichlicheren Mengen. Dies deutet darauf hin, daß der optimale Säuregrad für die Chymosinwirkung ein wesentlich niedriger als für die Pepsinwirkung ist, und für diese Auffassung sprechen sowohl einige Caseinversuche, z. B. Nr. 29 und 30 der Tabelle V (Mitteilung IV), wie auch der folgende Versuch.

Versuch 14. 2% ige Acidleguminatlösung mit 4 ccm n_{10} -HCl = 14,6 mg HCl auf je 1 g b-Legumin bereitet. Durch Dialyse gereinigte Pepsinlösung (Jensen & Langebeck Petersen, Kopenhagen) 1 : 5000. Alkalisierete Enzymlösung vom Kalbsmagen 1 : 5000 (+ 0,011% NaCl). Relation der Enzymwirkungen: $P_1 : L_1$, für Pepsin = 200 : 1 und für Chymosin = 1 : 4. Versuchsanordnung ganz dieselbe wie in den zwei vorigen Versuchen. Gehalt an freier HCl in Reihe B. = 0,065%. Temp. 30,5°. Versuch unterbrochen mit Reihe A nach 2 $\frac{1}{2}$ und mit B nach 2 Stunden. Albumosenmengen in Reihe A waren: $P_1 = 0,019 \text{ g} = 3,16\%$ und $L_1 0,221 = 36,8\%$. In der Reihe B waren die entsprechenden Werte $0,444 = 74\%$ und $0,110 = 18,3\%$.

Das Versuchsergebnis, tabellarisch zusammengestellt, war also :

Pepsin	Chymosin	Kongo negativ	Freie HCl (0,065%)
200	1	0,019 g = 3,16%	0,444 = 74 %
1	4	0,221 > = 36,83%	0,110 = 18,3%.

Dieser Versuch zeigt also ebenfalls sehr schlagend, wie verschieden die beiden Enzyme bei verschiedenen Säuregraden sich verhalten und wie man den Vorgang durch Zusatz von freier Salzsäure umkehren kann. In diesem Versuche ist aber

die Albumosenbildung mittels der chymosinreicheren Lösung bedeutend niedriger bei dem höheren als bei dem niedrigen Säuregrade. Dies kann nicht einfach daher rühren, daß die Versuchsdauer für die Proben mit freier Säure nur 2 Stunden und für die Proben mit negativer Kongoreaktion bei derselben Temperatur $2\frac{1}{2}$ Stunden war, denn der Unterschied in den Albumosenmengen ist zu groß. Dieser Versuch unterscheidet sich von den zwei nächst vorangehenden in zwei Hinsichten. Die Temperatur war in diesem Falle $30,5^{\circ}$ C., in den anderen dagegen $10-12^{\circ}$ C., und die Labwirkung war ferner in diesem Versuche eine verhältnismäßig schwache. Die Lablösung koagulierte nämlich (nicht angesäuerte) Milch bei $38,5$ C. erst nach $2\frac{1}{2}$ Minuten und bei $29,5$ à 30° C. erst nach 10 Minuten. Es ist möglich, daß bei dem höheren Säuregrade die Wirkung dieser schwachen Enzymlösung weniger gut als bei einer niedrigeren zur Geltung kam. Auf Grund der Erfahrungen, die ich in Versuchen mit Casein und einem anderen Eiweißstoffe, dem Muskelsyntonin, gemacht habe, bin ich jedoch überzeugt, daß die relativ geringere Albumosenbildung bei höheren Säuregraden in allen 3 Versuchen daher rührt, daß das Säureoptimum für das Chymosin bei bedeutend niedrigeren Säuregraden als für das Pepsin liegt.

Es scheint mir auch sehr wichtig zu sein, die Wirkung des Chymosins auf verschiedene Eiweißstoffe bei verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen zu prüfen. Früher konnte dies nicht geschehen, indem die Chymosinlösungen regelmäßig etwas Pepsin enthielten. Seitdem man aber durch schwache Alkaliwirkung auf Enzymlösungen (vom Kalb) oder auf dialysierte gereinigte Lösungen von käuflichem Labpulver kräftig milchkoagulierende Lösungen darstellen kann, die peptisch fast unwirksam sind, scheinen mir solche Untersuchungen nicht unausführbar zu sein. Bevor ich zu solchen Untersuchungen übergang, wollte ich jedoch erst das Verhalten einiger anderen Eiweißstoffe zu den beiden Enzymwirkungen prüfen.

Durch die in diesem Aufsätze mitgeteilten Untersuchungen glaube ich nachgewiesen zu haben, daß das Chymosin kein

auf Casein spezifisch wirkendes Enzym ist, indem es auch Alkalileguminat, besonders die gekochten Lösungen desselben unter Albumosenbildung hydrolysiert. Das Chymosin wirkt ebenfalls, und zwar noch kräftiger, hydrolysierend auf Acidleguminat bei Gegenwart von so wenig Säure, daß die viel pepsinreicheren Lösungen unter denselben Verhältnissen unwirksam sind oder, ihrer schwachen Chymosinwirkung entsprechend, nur sehr schwach wirken.

Ich kann diese Versuchsergebnisse nicht mit der unitarischen Auffassung von der Identität der beiden Enzyme, Pepsin und Chymosin, in Einklang bringen, während sie nach der dualistischen Auffassung dagegen ohne weiteres verständlich sind. Ich kenne auch fortwährend keine Beobachtung auf diesem Gebiete, welche nicht mit der letztgenannten Auffassung sich vereinbaren läßt. Nach dem, was ich oben (S. 136 u. 137) von den hypothetischen Hemmungsstoffen, welche die aufgehobene Parallelität erklären würden, gesagt habe, dürfte es wohl auch kaum nötig sein, meine Stellung zu dieser Frage noch weiter zu entwickeln. Meine Erklärung der erhaltenen Versuchsergebnisse ist deshalb einfach die, daß es hier um zwei verschiedene Enzyme sich handelt, die allerdings nahe verwandt sein dürften, deren Wirkungen aber an eine verschiedene Reaktion des Mediums gebunden sind.

Diese ungleiche Wirkung der Pepsin- und Chymosinlösungen gilt allerdings, nach meinen bisher veröffentlichten Untersuchungen, nur für das Casein und das Legumin. Meine fortgesetzten Untersuchungen haben indessen gezeigt, daß auch das Muskelsyntonin in saurer Lösung in ganz ähnlicher Weise zu den Enzymlösungen sich verhält, und es kann wohl kaum einem Zweifel unterliegen, daß auch andere gelöste Eiweißstoffe ein ähnliches Verhalten zeigen werden. Ich finde es deshalb auch sehr wahrscheinlich, daß diejenige «Pepsindigestion», die man an anderen gelösten Eiweißstoffen bei sog. «Salzsäuredefizit» beobachtet hat, keine reine Pepsindigestion, sondern in höherem oder niedrigerem Grade eine Chymosindigestion gewesen ist.

Wenn meine Annahme von zwei verschiedenen, an eine verschiedene Reaktion des Mediums gebundenen Enzymwir-

kungen des Magensaftes richtig wäre, könnte man sich die Aufgabe dieser zwei Enzyme in folgender Weise vorstellen. Das Pepsin ist allerdings das kräftigste proteolytische Enzym des Magensaftes; neben ihm wirkt aber unter besonderen Verhältnissen auch das Chymosin. Das letztere wirkt nämlich bei denjenigen niedrigen Säuregraden, bei welchen das Pepsin unwirksam ist, und durch das gleichzeitige Vorkommen dieser beiden, nahe verwandten proteolytischen Enzyme wird folglich die Eiweißverdauung im Magen bei allen Säuregraden gesichert.

Die Absonderung eines milchkoagulierenden Enzyms auch bei solchen Tieren, die nie im Leben Milch als Nahrung erhalten, würde nach einer solchen Vorstellung nicht länger etwas Befremdendes oder Rätselhaftes darbieten. Die Milchkoagulation durch Lab wäre nämlich nur ein spezieller Fall von Chymosinwirkung und in physiologischer Hinsicht nicht der wichtigste. Die Wirkung des Chymosins auf Casein — wie auf das Legumin und möglicherweise auch andere lösliche Eiweißstoffe — bei neutraler Reaktion könnte nämlich in der Natur dieser Eiweißstoffe — etwa wie die Proteolyse des Caseins durch Erepsin — begründet sein. Die milchkoagulierende Wirkung des Chymosins, welche der Mensch infolge ihrer großen wirtschaftlichen Bedeutung als das Wesentliche betrachtet hat, wäre — von der Säuglingsperiode abgesehen — nach dieser Ansicht etwas für die Tierwelt im großen und ganzen ganz Nebensächliches gegenüber der Hauptaufgabe des Chymosins, ein bei der Eiweißverdauung im Magen mit dem Pepsin zusammenwirkendes Enzym zu sein.

Man könnte ferner, in Übereinstimmung mit der Ansicht von Nencki und Sieber, sich vorstellen, daß bei allen Tieren mit saurem Magensaft — Neugeborenen wie Erwachsenen — im Grunde dasselbe Enzym, nämlich ein Enzymmolekül mit zwei Gruppen von Seitenketten, die eine mit Chymosin- und die andere mit Pepsinwirkung abgesondert werde. Bei den neugeborenen Säugetieren wäre aber die Anzahl der Chymosinseitenketten viel größer als bei den erwachsenen, und sie nähme mit dem Alter ab, sodaß zuletzt nur typisches Pepsin mit schwächerer Chymosinwirkung zurückbliebe. Übrigens ist

natürlich auch die Möglichkeit nicht ausgeschlossen, daß während des Wachstums der Tiere die Chymosingruppen etwas veränderte Eigenschaften annehmen können, was ebenfalls die schwächer labende Wirkung des Pepsins erwachsener Tiere bedingen könnte.

Das eben von der etwaigen physiologischen Bedeutung des Chymosins für die Magenverdauung Gesagte ist in erster Linie als eine Arbeitshypothese zu betrachten. Als solche scheint sie mir aber berechtigt zu sein, und sie ist jedenfalls ein Ausgangspunkt meiner fortgesetzten Untersuchungen über die Wirkung der Magenenzyme auf anderes Eiweiß und Fleisch gewesen.

Upsala, Januar 1918.
