

# Studien über Chymosin- und Pepsinwirkung.

## I. Mitteilung.

### Die Gerinnungsgeschwindigkeit als Maß der Chymosinmenge

Von

**Olof Hammarsten.**

(Der Redaktion zugegangen am 15. Juni 1914.)

In den letzten Jahren habe ich meine Untersuchungen über Pepsin- und Chymosinwirkung fortgesetzt. Ich habe dabei meistens mit reinen Caseinlösungen gearbeitet und namentlich die Art und Menge der unter verschiedenen Verhältnissen, insbesondere bei verschiedenem Säuregrade, entstehenden Produkte untersucht. Hierbei schien es mir von ganz besonderem Interesse zu sein, die fraglichen Produkte bei aufgehobener Parallelität der beiden Enzymwirkungen zu studieren, und ich habe dementsprechend wiederholt Lösungen von starker Pepsin- und schwacher Chymosinwirkung mit solchen, die umgekehrt starke Chymosin- und schwache Pepsinwirkung zeigten, verglichen.

Nun kann man bekanntlich die Parallelität der beiden Enzymwirkungen leicht in verschiedener Weise aufheben; um aber den Grad der mangelnden Parallelität zu bestimmen, ist man auf der einen Seite auf die Pepsinproben und auf der anderen auf die Milchgerinnungsprobe hingewiesen. Man kann also noch nicht die Versuche mit Milch gänzlich entbehren, und aus dem Grunde war ich wiederholt genötigt, Gerinnungsversuche mit Milch auszuführen. Hierbei stieß ich indessen auf so unerwartete Verhältnisse bezüglich des sogenannten Zeitgesetzes, daß ich mich veranlaßt sah, meine Hauptuntersuchungen einige Zeit ruhen zu lassen, bis ich das sogenannte Zeitgesetz in einigen Hinsichten hatte prüfen können.

Es ist eine längstbekannte Tatsache, daß bei Gerinnungsversuchen mit sehr kleinen Enzymmengen, also bei längerer Versuchsdauer, eine zerstörende Einwirkung der Bruttemperatur auf das Lab hervortritt.<sup>1)</sup> Van Dam<sup>2)</sup> erklärt dies durch die Annahme, daß die Hydroxylionen der Milch auf das Enzym schädlich wirken und dasselbe sogar vernichten können. Dies soll wenigstens bei Gegenwart von sehr kleinen Enzymmengen geschehen, und stärker in dem Maße, wie die Temperatur höher ist. Infolge dieser vernichtenden Wirkung der Hydroxylionen auf die Enzymmoleküle soll bei Gegenwart von nur wenig Enzym die Gerinnungszeit bei Körpertemperatur kein sicheres Maß der Enzymmenge sein. Wenn man zwei Enzymlösungen von wesentlich verschiedener Stärke mit derselben Milch prüft, kann dementsprechend die Relation zwischen den Gerinnungszeiten eine ganz andere bei niedrigerer Temperatur als bei Körpertemperatur werden, und nach van Dam kann sogar die fermentärmere Lösung absolut rascher, also in kürzerer Zeit, bei niedriger als bei höherer Temperatur wirken. Um diese Verhältnisse zu beleuchten, erlaube ich mir, den van Dam mitgeteilten Versuch mit Kalbsmageninfusion als Beispiel anzuführen.

Zu dem Versuche diente teils die zur teilweisen Zerstörung des Enzyms nach meinem Verfahren einige Zeit erwärmte und teils die nicht erwärmte, also unveränderte Infusion. Das Resultat war folgendes:

Bei 37° C.		Bei 25,5°	
Nicht erwärmt:	75 Sekunden	Nicht erwärmt:	166 Sekunden
Erwärmt:	4 Stunden	Erwärmt:	99 Minuten

Die Relation zwischen den Gerinnungszeiten war also bei 37° C. = 75 : 14400 = 1 : 192 und bei 25,5° C. = 166 : 5940 = 1 : 36. Nach den Koagulationszeiten zu urteilen, erwies sich also die erwärmte Infusion bei 25,5° C. etwa 5 mal so reich an Enzym als bei 37° C. Auffallenderweise gerann auch die Probe mit erwärmter Infusion absolut rascher, d. h. in kürzerer

<sup>1)</sup> Man vgl. hierüber unter anderen E. Fuld, Hofmeisters Beiträge, Bd. 2, 1902, S. 169.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 64, 1910, S. 316.

Zeit (99 Min.) bei  $25,5^{\circ}$  C. als bei  $37^{\circ}$  C. (240 Min.), während sonst die Gerinnung bei niedrigerer Temperatur regelmäßig absolut langsamer als bei höherer verläuft.

Diese Beobachtungen von van Dam und seine Ansicht über die schädliche Wirkung der Hydroxylionen der Milch haben mich veranlaßt, sowohl bei Wiederholung einiger älterer Versuche mit Milch und sauren Infusionen wie auch bei der Ausführung neuerer Versuche, die Chymosinwirkung durch Milchversuche sowohl bei Körpertemperatur wie bei niedrigeren Temperaturgraden zu prüfen. Hierbei bin ich zu Resultaten gekommen, welche zeigen, daß die Verhältnisse mehr verwickelt sind, als man auf Grund der Annahme von van Dam glauben sollte.

Die obigen Versuche von van Dam wurden teils mit sauren Lösungen von gereinigtem Schweinsenzym und teils mit einer sauren Kalbsmageninfusion ausgeführt. Nun soll aber nach Gewin und van Dam<sup>1)</sup> das gereinigte Schweinsenzym in seiner Wirkung nicht dem Zeitgesetze folgen, und die mit solchem Enzym ausgeführten Versuche können also nicht für das Verhalten des Kalbsenzym maßgebend sein. Der Versuch von van Dam mit Kalbsmageninfusion betraf dagegen teils die normale und teils die durch vorgängige Erwärmung veränderte Infusion, in welcher die Parallelität zwischen Pepsin- und Chymosinwirkung dermaßen aufgehoben war, daß für die Pepsinverdauung nach Mett die Relation 1:4,8 und für die Gerinnungszeiten die Relation  $1:\pm 20$  gefunden wurde. Da hier also die Wirkungen einer normalen und einer veränderten Infusion verglichen wurden, kann man keine allgemein gültigen Schlüsse aus diesem Versuche ziehen. Es war vorerst notwendig zu wissen, wie eine und dieselbe normale Infusion in verschieden starker Verdünnung bei verschiedenen Temperaturen wirkt, denn erst wenn man die wirkliche Relation zwischen den Enzymmengen in zwei Infusionen kennt, ist es möglich zu sagen, ob die bei höherer oder die bei niedrigerer Temperatur beobachteten Gerinnungszeiten dem wahren Enzygehalte am besten entsprechen.

<sup>1)</sup> Vgl. van Dam, l. c., S. 324.

In dieser Hinsicht findet man bei Fuld<sup>1)</sup> die Ansicht ausgesprochen, «daß auch unterhalb von 15° die Wirkungsgeschwindigkeit des Labs seiner Masse direkt proportional ist, daß diese Proportion auch für beliebig kleine Labdosen und beliebig lange Zeiten keine Einschränkung erfährt und daß die bei Brutwärme beobachteten, abweichenden Resultate ihre natürliche und zureichende Erklärung finden in der bereits von Hammarsten entdeckten, oftmals bestätigten Zerstörung des Labs durch längere Einwirkung einer solchen Temperatur».

Nach Fuld würde also das Zeitgesetz volle Geltung sogar bei Temperaturen unter 15° C. haben, und selbst bei beliebig kleinen Labmengen würde man wohl also bei niedrigeren Temperaturen mehr zuverlässige Resultate bezüglich der Bestimmung der Labmengen als bei Brutwärme erhalten. In den Versuchen, welche Fuld zugunsten seiner Ansicht anführt, trotzdem sie eigentlich zu einem anderen Zwecke angestellt waren, kann ich indessen keine Beweise für dieselbe finden, und meine später anzuführenden Versuche stehen alle in dem grellsten Widerspruche zu derselben. In demselben Aufsätze führt Fuld auch einen Versuch an, welcher gegen seine Ansicht spricht. Nach dem Zeitgesetze soll bekanntlich das Produkt von Labmenge und Gerinnungszeit eine Konstante sein, und er hat nun in einem Versuche (Vers. 8, S. 184) diese Konstante bei verschiedenen Temperaturen und etwas verschiedenen Enzymmengen bestimmt. Zwischen 30 und 44° C. fand er nun in der Tat dieses Produkt konstant. Bei 25,05° schwankte es ein wenig, zwischen 51 und 56, und bei 20° war es inkonstant.

Abgesehen von diesem Versuche von Fuld und dem oben erwähnten Versuche von van Dam habe ich in der mir zugänglichen Literatur keine Angaben über die Einwirkung von verschiedenen Temperaturen auf das Zeitgesetz bei verschiedenem Enzymgehalte (Kalbsenzym) gefunden, und ich fand es deshalb notwendig, diese Frage zu prüfen.

Schon meine ersten Versuche in dieser Richtung ergaben indessen ganz unerwartete Resultate, indem sie zeigten, daß die Gerinnung bei niedrigeren Temperaturen dem Zeitgesetze

<sup>1)</sup> Hofmeisters Beiträge, Bd. 2, 1902, S. 177.

nicht horcht und daß man, wenn man die Enzymmengen aus den Gerinnungszeiten bei niedrigeren Temperaturen (auch bei Zimmertemperatur) berechnet, regelmäßig zu hohe Zahlen im Vergleiche zu den nach dem Verdünnungsgrade zu erwartenden erhält. Da dies vielleicht etwas unwahrscheinlich klingt, will ich schon hier, bevor ich zu den mehr detaillierten Versuchen übergehe, die Resultate einiger orientierenden Versuche als Beispiele anführen.

Eine saure, durch Dialyse gegen destilliertes Wasser neutral gewordene Kalbsmageninfusion, welche 0,075% feste Stoffe enthielt, wurde mit Chlorwasserstoffsäure auf den Säuregrad 0,2% HCl gebracht. Von dieser Infusion wurde 1 Volumen mit 5 Volumen Chlorwasserstoffsäure von 0,2% HCl verdünnt, sodaß beide Lösungen denselben Säuregrad, aber die Enzymmengen bezw. 1 und  $\frac{1}{6}$  hatten. In den Gerinnungsversuchen kam, wie in allen in diesem Aufsätze mitgeteilten Versuchen, 1 ccm Enzymlösung auf je 10 ccm Milch. Die Gerinnungszeiten bei den verschiedenen Temperaturen waren folgende:

	16,5° C.	24° C.	38° C.
1	24 Min.	105 Sek.	unbestimmbar < 15 Sek.
$\frac{1}{6}$	56 >	430 >	60 >

Bei 38° C. wirkte die Lösung 1 so rasch, daß ich die Zeit nicht feststellen konnte, allem Anscheine nach war aber die Relation hier ziemlich nahe 6 : 1. Bei 24° war sie dagegen gleich 4,1 : 1 und bei 16,5° gleich 2,3 : 1. Geht man von den Gerinnungszeiten aus und berechnet den Enzymgehalt nach dem Zeitgesetze, so findet man also sowohl bei 24° wie besonders bei 16,5° einen fehlerhaften und zwar einen zu hohen Enzymgehalt in der verdünnten Lösung.

Ein anderes Beispiel ist folgendes. Hier wurde eine Infusion mit 0,2% HCl und 0,070% festen Stoffen mit Salzsäure von 0,2% verdünnt, sodaß die Enzymmengen resp. 1,  $\frac{1}{4}$  und  $\frac{1}{16}$  waren. Die Gerinnungszeiten waren folgende:

	20° C.	Produkt p. t.	39° C.	Produkt p. t.
1	20 Min.	20	unbestimmbar	—
$\frac{1}{4}$	33 >	8,3	30 Sek.	30
$\frac{1}{16}$	51 >	3,2	120 >	30

Bei 39° C. folgten also die beiden Enzymlösungen  $\frac{1}{4}$  und  $\frac{1}{16}$  dem Zeitgesetze, während dies bei 20° C. garnicht der Fall war. Das Produkt Enzymmenge  $\times$  Gerinnungszeit war bei 39° C. eine Konstante, während es bei 20° vollständig inkonstant war. Berechnet man die relativen Enzymmengen aus den bei 20° C. beobachteten Gerinnungszeiten, so kommt man zu dem kolossal fehlerhaften Resultate, daß in der unverdünnten und der am stärksten verdünnten Infusion die Enzymmengen wie 2,55 : 1 statt wie 16 : 1 sich verhielten.

Daß die Gerinnungszeiten bei höherer Temperatur, 37 bis 40° C., abnorm verlängert werden können, ist leicht verständlich infolge der Empfindlichkeit des Chymosins gegen höhere Temperaturen. Die Annahme von van Dam, daß die Hydroxylionen der Milch hierbei als schädigendes Agens wirken, ist auch eine sehr zusagende. Daß aber die Gerinnungszeiten bei niedrigerer Temperatur zwar absolut verlängert sind, aber relativ so stark abgekürzt werden können, daß z. B. eine auf  $\frac{1}{16}$  verdünnte Lösung bei 20° C. die Gerinnung in derselben Zeit hervorbringt, die man bei Verdünnung auf nur  $\frac{1}{2}$ — $\frac{1}{3}$  zu erwarten hätte, ist dagegen so auffallend und schwerverständlich, daß ich erst an der Richtigkeit meiner Beobachtungen zweifelte. Aus diesem Grunde und da es klar ist, daß die obigen Beobachtungen, wenn sie bei fortgesetzter Prüfung weitere Bestätigung finden würden, für die Anordnung gewisser Arten von Gerinnungsversuchen, namentlich für die Feststellung des Grades von aufgehobener Parallelität zwischen Chymosin- und Pepsinwirkung, von großer Bedeutung sein mußten, entschloß ich mich dazu, diese Frage zum Gegenstand einer besonderen Untersuchung zu machen.

Die oben als Beispiele mitgeteilten Versuchsergebnisse beziehen sich nur auf saure Infusionen, und es war deshalb notwendig, auch mit neutralen Infusionen zu arbeiten. Es ist ferner zu beachten, daß, wenn man eine saure Infusion mit Salzsäure von entsprechender Stärke oder eine neutrale mit Wasser verdünnt, der Gehalt an festen Stoffen mit steigender Verdünnung immer mehr abnimmt, und daß dies vielleicht nicht ohne Einwirkung auf das Resultat ist. Es war also

wünschenswert, die Einwirkung von Verdünnung mit der durch Erhitzen unwirksam gemachten neutralen oder sauren Infusion statt Verdünnung mit Wasser oder Säure zu prüfen. Man könnte ferner denken, daß die Entfernung gewisser Bestandteile einer Infusion durch Dialyse derselben nicht ohne Einfluß wäre, um so mehr als, wie ich gefunden habe, die Relation zwischen Pepsin- und Chymosinwirkung bei der Dialyse gegen destilliertes Wasser eine andere als bei Dialyse gegen Wasserleitungswasser wird.

Es war also notwendig, die Versuchsanordnung in verschiedener Weise zu variieren; der Übersichtlichkeit halber verteile ich aber die Versuche auf zwei Hauptgruppen, die mit neutralen und die mit sauren Infusionen. Immer ging ich von sauren Kalbsmageninfusionen aus, die in der von mir bei früheren Gelegenheiten angegebenen Weise bereitet waren. Ich will nur hinzufügen, daß ich, infolge der schädigenden Einwirkung der Verdauung auf die Chymosinwirkung, die Infusionen immer in einem kalten Zimmer unter Vermeidung jeder Erwärmung auf Bruttemperatur bereitet habe.

### I. Versuche mit neutralen Infusionen.

Man kann die Neutralisation in zweifacher Weise ausführen, nämlich durch Neutralisation mit verdünntem Alkali und durch Dialyse gegen destilliertes Wasser (bei Gegenwart von Toluol), bis die Infusion neutral geworden ist. Neutralisation mit  $\text{CaCO}_3$  ist ausgeschlossen, weil das hierbei gebildete  $\text{CaCl}_2$  bei den folgenden Verdünnungen das Resultat der Versuche zu sehr stört. Gegen die Neutralisation mit  $\text{NaOH}$  hat man von einigen Seiten eingewendet, daß das Alkali schädigend auf das Enzym einwirken sollte. Dies gilt aber wenigstens nicht für das Kalbsenzym, denn solche neutralisierte Infusionen (mit Toluol versetzt) können nach der Erfahrung von mir und auch von Hedin ihre milchkoagulierende Wirkung monatelang bewahren. Übrigens war es, gerade mit Rücksicht auf die von einigen Seiten behauptete schädliche Wirkung von der Neutralisation mit Alkali, von Interesse, die Wirkung sowohl

der durch Dialyse wie der durch Alkalizusatz neutralisierten Infusionen zu studieren.

Eine durch Alkali neutralisierte, klar filtrierte, aber nicht dialysierte Infusion, welche also sowohl NaCl wie Eiweiß enthält, trübt sich beim Sieden oder bei anhaltendem Erhitzen auf zwischen 80 und 90° und setzt dann allmählich einen Niederschlag ab, welcher die Versuche kompliziert und am besten abfiltriert wird. Die erhitzte Infusion hat folglich eine andere Konzentration als die ursprüngliche und eignet sich also nicht als Verdünnungsmittel derselben. Aus dem Grunde habe ich auch in den Versuchen mit durch Alkalizusatz neutralisierten Infusionen als Verdünnungsmittel nur destilliertes Wasser benutzt. Die neutralisierten, verdünnten wie unverdünnten Lösungen wurden stets mit Toluol versetzt; durch Kontrollversuche ohne Toluolzusatz habe ich mich aber davon überzeugt, daß das Toluol keine besondere Wirkung ausübte.

Bei rascher Gerinnung gesteht die Milch bekanntlich fast wie mit einem Schlage zu einer festen Masse, und der Zeitpunkt der Gerinnung ist in diesem Falle, wenn die Gerinnung nicht zu rasch verläuft, leicht zu bestimmen. Bei Gegenwart von nur kleinen Enzymmengen und bei niedriger Temperatur gerinnt die Milch langsamer, und bevor sie fest wird, kann man ein Stadium beobachten, wo sie eine mehr dickflüssige, feinkörnige Masse darstellt, die bei leisen Bewegungen des Rohres als eine feinkörnige Masse längs der Wand des Rohres herabfließt. Dann wird sie breiig, grobkörnig und nach noch einiger Zeit wird sie fest oder zeigt jedenfalls (bei sehr langsamer Gerinnung) große, kompakte Klumpen. In solchen Fällen ist es, wenigstens für mich, nicht möglich, den Zeitpunkt der Gerinnung genau festzustellen, und als Gerinnungsmoment habe ich deshalb den Zeitpunkt gewählt, wo die Milch eine griesige Masse darstellt, welche nach leisen Bewegungen des Rohres als grobkörnige oder flockige Klümpchen der Wand des Rohres anhaftet. Die von mir in den folgenden Tabellen angegebenen langen Gerinnungszeiten sind also nicht exakt; auf der anderen Seite ist aber in diesen Fällen eine Fehlbestimmung von 5 bis 10 Minuten oder sogar mehr meistens ganz ohne Belang.

Übrigens habe ich selbstverständlich bei langsamer Gerinnung mich immer davon überzeugt, daß eine Gerinnung durch Säurebildung ausgeschlossen war.

In der folgenden Tabelle I habe ich drei Versuche mit durch Alkalizusatz neutralisierten Infusionen zusammengestellt. Der Enzymgehalt der unverdünnten Lösung ist als 1 bezeichnet und die verschiedenen Verdünnungsgrade sind ohne weiteres verständlich. Wie oben bemerkt, kam immer 1 ccm Infusion auf je 10 ccm Milch. Beob. bedeutet die beobachtete Gerinnungszeit und Ber. die aus der Gerinnungsgeschwindigkeit der Probe 1 und den bekannten Verdünnungsgraden zu berechnende Gerinnungszeit. Prod. p. t. ist das Produkt von Enzymmengen p. und Gerinnungszeit t. Die neutralisierte und filtrierte Infusion von dem Enzymgehalte 1 enthielt im Versuche 1: NaCl 0,099% und übrige Stoffe 0,110%. Im Versuche 2 waren die entsprechenden Zahlen 0,056 und 0,138%, und im Versuche 3 bezw. 0,160 und 0,315%.

Tabelle 1.

Versuch	Temp. 20° C.			Temp. 26,5° C.			Temp. 39,5° C.			
	Beob. Min.	Ber. Min.	Prod. p. t.	Beob. Min.	Ber. Min.	Prod. p. t.	Beob. Min.	Ber. Min.	Prod. p. t.	
Enzymgehalt 1	55	—	55	8	—	8	1,5	—	1,5	
	1/4	92	220	23	21	32	5,3	5,5	6	1,4
	1/16	120	880	7,5	41	128	2,6	22	24	1,4
	1/64	350	3520	5,5	113	512	1,8	81	96	1,3
Versuch	Temp. 20° C.			Temp. 26,5° C.			Temp. 39,5° C.			
	Beob. Min.	Ber. Min.	Prod. p. t.	Beob. Min.	Ber. Min.	Prod. p. t.	Beob. Min.	Ber. Min.	Prod. p. t.	
Enzymgehalt 2	1	54	—	54	10	—	10	3,5	—	3,5
	1/2	70	108	35	15	20	7,5	7	7	3,5
	1/4	88	216	22	28	40	7,0	14	14	3,5
	1/8	129	432	16,1	50	80	6,3	28	28	3,5
	1/16	183	864	11,4	87	160	5,4	56	56	3,5
	1/32	275	1728	8,6	141	320	4,4	114	112	3,6

Versuch	Temp. 20° C.			Temp. 26,5° C.			Temp. 38,5° C.			
	Beob.	Ber.	Prod.	Beob.	Ber.	Prod.	Beob.	Ber.	Prod.	
	Min.	Min.	p. t.	Min.	Min.	p. t.	Min.	Min.	p. t.	
3										
Enzymgehalt	1	35	—	35	5	—	5	0,5	—	0,5
	$\frac{1}{4}$	58	140	14,5	9	20	2,3	2	2	0,5
	$\frac{1}{16}$	82	560	5,1	20	80	1,3	7,5	8	0,47
	$\frac{1}{64}$	136	2240	2,1	52	320	0,81	29	32	0,45
	$\frac{1}{256}$	290	8960	1,1	134	1280	0,53	108	128	0,42

Aus der Tabelle ersieht man, daß bei 38,5 bzw. 39,5° C. die Gerinnung in den Versuchen 1 und 3 ziemlich genau und in dem Versuche 2 genau dem Zeitgesetze folgt. Ganz anders liegen aber die Verhältnisse bei niedrigeren Temperaturen. Hier sind die Abweichungen von dem Zeitgesetze sehr bedeutend, und zwar bedeutender bei 20° als bei 26,5°. Dies ersieht man sowohl bei einem Vergleiche der berechneten mit den beobachteten Gerinnungszeiten wie bei einer Betrachtung des Produktes p. t. Bei Bruttemperatur ist dieses Produkt eine Konstante oder annähernd eine solche, während es bei den niedrigeren Temperaturen eine stetig abnehmende Zahl ist. Bei einem bestimmten Enzymgehalte der Lösung nimmt die absolute Gerinnungszeit mit abnehmender Temperatur zu, die relative Gerinnungszeit dagegen ab. So sind z. B. in dem Versuche 2 bei dem Enzymgehalte  $\frac{1}{16}$  die absoluten Gerinnungszeiten bei den Temperaturen 39,5°, 26,5° und 20° C. resp. 56, 87 und 183 Minuten. Dagegen ist die Gerinnungszeit bei 39,5° gerade 16, bei 26,5° nur 8,7 und bei 20° C. nur gegen  $3\frac{1}{2}$  mal so lang wie bei dem Enzymgehalte 1. Wollte man aus den gefundenen Gerinnungszeiten den Enzymgehalt bei der stärksten Verdünnung, verglichen mit dem Enzymgehalte 1, berechnen, so würde man im Versuche 1 bei 26,5° die Zahl  $\frac{1}{14}$  und bei 20° die Zahl  $\frac{1}{6,4}$  statt  $\frac{1}{64}$  finden. Im Versuche 2 findet man bei 26,5° die Zahl  $\frac{1}{14}$  und bei 20° die Zahl  $\frac{1}{5}$  statt  $\frac{1}{32}$  und im Versuch 3 resp.  $\frac{1}{27}$  und rund  $\frac{1}{8}$  statt  $\frac{1}{256}$ .

Bei Bruttemperatur erhält man viel bessere Zahlen, nämlich im Versuch 2 fast die richtige Zahl  $\frac{1}{32}$ , im Versuch 1 die Zahl  $\frac{1}{54}$  statt  $\frac{1}{64}$  und in Versuch 3 die Zahl  $\frac{1}{216}$  statt  $\frac{1}{256}$ . Die

Gerinnungszeiten bei Bruttemperatur gaben also eine richtige oder jedenfalls eine viel richtigere Vorstellung von den wahren Enzymmengen als die bei niedrigeren Temperaturen beobachteten Gerinnungszeiten, welche eine ganz fehlerhafte Vorstellung von den Enzymmengen in den verdünntesten Lösungen gaben. Bemerkenswert ist es, daß eine schädigende Wirkung der hohen Temperatur, 38,5—39,5°, auf die kleinen Enzymmengen in den verdünntesten Lösungen in diesen Versuchen nicht zum Vorschein kam. Im Gegenteil trat in den Versuchen 1 und 3 bei Bruttemperatur die Gerinnung in den enzymärmsten Proben sogar etwas früher auf, als man zu erwarten hätte. Ähnliches habe ich, wie die folgenden Tabellen zeigen werden, auch in anderen Versuchen beobachtet, während in andern Fällen die hemmende Wirkung der Bruttemperatur stark zum Vorschein kam.

Eine saure Kalbsmageninfusion, von dem Säuregrade 0,2—0,25 % HCl, kann durch Dialyse in Pergamentpapier-schläuchen gegen hinreichend viel destilliertes Wasser und bei 2maligem Wechseln während des Tages im Laufe von 2—3mal 24 Stunden neutral werden, wenn man nicht zu viel Infusion in den Schläuchen hat. Während der Dialyse scheidet sich regelmäßig eine Fällung aus, die ich abfiltrierte. Diese Fällung ist reich an Enzym, so daß die dialysierte und filtrierte, neutrale Infusion regelmäßig schwächer wirkt als die einfach neutralisierte Infusion. Diese Abschwächung betrifft nicht in gleich hohem Grade die Enzymwirkungen, und man kann in dieser Weise, wie Rakoczy<sup>1)</sup> gezeigt hat, die Parallelität der Pepsin- und Chymosinwirkung aufheben. Eine durch Dialyse neutral gemachte Infusion ist regelmäßig arm an festen Stoffen, 0,03—0,08%, und sie kann, ohne sich zu trüben oder in anderer Weise sichtbar sich zu verändern, zum Sieden erhitzt werden. Dementsprechend kann eine solche, durch Erhitzen unwirksam gemachte Infusion als Verdünnungsmittel statt Wasser dienen. Ich erhitze gewöhnlich die Infusion 20 Minuten bei 83—87° C. in einem geschlossenen Gefäße, um die Verdunstung von Wasser zu verhindern, und kontrollierte die

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

Unwirksamkeit der erhitzten Infusion mit Milch. Um Wiederholungen zu vermeiden, erwähne ich schon hier, daß ich die sauren Infusionen (vgl. unten) in derselben Weise unwirksam machte.

In den in der Tabelle 2 zusammengestellten Versuchen wurde also die unverdünnte neutrale Infusion auf der einen Seite mit Wasser und auf der anderen mit der unwirksamen Infusion gleich stark verdünnt. Die Gerinnungszeiten der mit Wasser verdünnten Proben findet man unter **W** Beob. und diejenigen der mit unwirksamer Infusion verdünnten unter **J** Beob. angegeben. Im übrigen dürfte die Tabelle ohne weiteres verständlich sein. Der Gehalt an festen Stoffen in der unverdünnten Infusion (Enzymgehalt 1) war im Versuche 1 = 0,045 ‰, in Nr. 2 = 0,028 ‰, in Nr. 3 = 0,047 ‰ und in Nr. 4 = 0,060 ‰.

Tabelle 2.

Ver- such	Temp. 20° C.				Temp. 26,5° C.				Temp. 38° C.					
	<b>W</b>		<b>J</b>		Prod.	<b>W</b>		<b>J</b>		Prod.	<b>W</b>		<b>J</b>	
	Beob. Min.	Ber. Min.	Beob. Min.	Beob. Min.		Beob. Min.	Ber. Min.	Beob. Min.	Ber. Min.		Beob. Min.	Ber. Min.	Beob. Min.	Ber. Min.
1	49	—	49	49	7	—	7	7	1	—	1	1,0		
<sup>1</sup> / <sub>4</sub>	74	196	74	18,5	10	28	10	2,5	3	4	3	0,75		
<sup>1</sup> / <sub>16</sub>	104	784	100	6,4	22	112	20	1,4	10,5	16	9,5	0,6		
<sup>1</sup> / <sub>64</sub>	172	3136	162	2,7—2,5	62	448	54	0,97—0,94	38	64	32	0,6—0,5		
Ver- such	Temp. 20° C.				Temp. 26,5° C.				Temp. 39° C.					
	<b>W</b>		<b>J</b>		Prod.	<b>W</b>		<b>J</b>		Prod.	<b>W</b>		<b>J</b>	
	Beob. Min.	Ber. Min.	Beob. Min.	Beob. Min.		Beob. Min.	Ber. Min.	Beob. Min.	Ber. Min.		Beob. Min.	Ber. Min.	Beob. Min.	Ber. Min.
1	113	—	113	113	12	—	12	12	3,5	—	3,5	3,5		
<sup>1</sup> / <sub>2</sub>	136	226	139	68	21	24	21	10,5	7	7	7	3,5		
<sup>1</sup> / <sub>4</sub>	168	452	170	41	33	48	34	8,4	15	14	15	3,75		
<sup>1</sup> / <sub>8</sub>	220	904	218	27,5	59	96	60	7,4	34	28	34	4,25		
<sup>1</sup> / <sub>16</sub>	304	1808	305	19,0	104	192	107	6,6	71	56	72	4,5		

Ver- such	Temp. 20° C.				Temp. 26° C.				Temp. 40° C.			
	W Beob. Min.	Ber. Min.	J Beob. Min.	Prod. p. t.	W Beob. Min.	Ber. Min.	J Beob. Min.	Prod. p. t.	W Beob. Min.	Ber. Min.	J Beob. Min.	Prod. p. t.
3	19	—	19	19	4	—	4	4	1,5	—	1,5	1,5
1/4	29	76	29	7,25	10	16	10	2,5	5	6	5	1,25
1/16	66	304	66	4,15	31	64	31	1,9	19	24	19	1,19
1/64	180	1216	180	2,8	96	256	96	1,5	85	96	85	1,3

  

Ver- such	Temp. 20° C.				Temp. 26,5° C.				Temp. 38° C.			
	W Beob. Min.	Ber. Min.	J Beob. Min.	Prod. p. t.	W Beob. Min.	Ber. Min.	J Beob. Min.	Prod. p. t.	W Beob. Min.	Ber. Min.	J Beob. Min.	Prod. p. t.
1	35	—	35	35	5	—	5	5	Nicht bestimmt			
1/4	52	140	52	13	8	20	8	2	1,25	—	1,25	1,25
1/16	72	560	72	4,5	13	80	13	0,81	4,5	5	4,5	1,13
1/64	108	2240	108	1,7	35	320	34	0,55	17	20	17	1,06
1/256	240	8960	236	0,9	108	1280	103	0,4	84	80	69	1,3-1,08

Das Hauptresultat, welches bei dieser Versuchsanordnung dasselbe, wie bei Neutralisation mit Alkali war, ist ohne weiteres aus der Tabelle ersichtlich. Außerdem enthält aber die Tabelle einige andere Beobachtungsergebnisse, die ich etwas besprechen muß.

In allen, in diesem Aufsätze besprochenen Versuchen wurde zu 10 ccm der vorerwärmten Milch 1 ccm der Enzymlösung (von Zimmertemperatur) zugesetzt und dann möglichst genau gemischt. Es ist klar, daß bei solcher Versuchsanordnung die bei sehr rascher Gerinnung beobachteten Gerinnungszeiten nicht ganz exakt sein können, trotzdem sie mit einer Rennuhr bestimmt wurden. Zwei oder mehrere Doppelbestimmungen geben nicht immer ganz dasselbe Resultat, und man muß die Mittelzahl nehmen. Aber selbst in den Fällen, wo zwei Bestimmungen dieselbe Zahl liefern, ist ein Fehler von mehreren Sekunden nicht ausgeschlossen, und hierdurch werden die berechneten Gerinnungszeiten leicht fehlerhaft. Dies gilt natürlich nicht nur für die Versuche in den Tabellen 1 und 2,

sondern für meine Versuche überhaupt. Es wäre deshalb besser, als Ausgangspunkt der berechneten Gerinnungszeiten nicht die kürzeste Gerinnungszeit, sondern die nächstfolgende zu nehmen. Verfährt man in dieser Weise, so erhält man z. B. im Versuche 3, Tabelle 2, für die Enzymmengen  $\frac{1}{16}$  und  $\frac{1}{64}$  die berechneten Gerinnungszeiten 20 und 80 statt 24 und 96 Minuten, und dies ändert das Endresultat dahin, daß die für  $\frac{1}{64}$  gefundene Zeit (85 Minuten) ein wenig länger als die berechnete Zeit (80 Minuten) wird, während in der Tabelle umgekehrt die beobachtete Gerinnungszeit kürzer als die berechnete (96 Minuten) ist. Ich betrachte also diese kürzesten Gerinnungszeiten als etwas unzuverlässig, mußte sie aber so, wie ich sie gefunden habe, in die Tabellen aufnehmen. Für die Hauptfrage ist es gleichgültig, welchen Ausgangspunkt der Berechnung man wählt, denn das Hauptresultat wird dasselbe. Die Gerinnung gehorcht dem Zeitgesetze viel besser bei Brutttemperatur als bei niedrigeren Temperaturen, und die bei jener Temperatur beobachteten Gerinnungszeiten gestatten eine viel richtigere Berechnung der vorhandenen Enzymmengen als die bei niedriger Temperatur beobachteten.

Der Versuch 1 ist wieder ein Beispiel solcher Fälle, in welchen die Gerinnung bei Brutttemperatur sogar bei recht starker Verdünnung der Enzymlösung ( $E \frac{1}{64}$ ) rascher, als man zu erwarten hätte, verläuft. Dieses Resultat wird nicht verändert, wenn man statt der Gerinnungszeit 1 Minute die Zeit 3 Minuten (bei  $E \frac{1}{4}$ ) als Ausgangspunkt der Gerinnung wählt und also für  $E \frac{1}{64}$  die Zeit 48 statt 64 Minuten berechnet. Da es von Interesse war, zu sehen, ob dieses Verhältnis bei höherer Temperatur sich ändern würde, prüfte ich auch diese Infusion mit Milch bei  $45^{\circ}$  C. Das Resultat war folgendes:

Temp. $45^{\circ}$ C.	W beob.	Ber.	J beob.
$E \frac{1}{4}$	2,5 Min.	—	2,5 Min.
> $\frac{1}{16}$	11 >	10 Min.	10 >
> $\frac{1}{64}$	90 >	40 >	64 >

Hier fand also ein entgegengesetztes Verhalten statt, indem die Gerinnung bei  $E \frac{1}{64}$  stark gehemmt wurde. Der Versuch wurde am folgenden Tage mit anderer Milch wiederholt,

aber mit demselben Resultate, mit der Abweichung jedoch, daß die absoluten Zeiten etwas kürzer waren. In diesem Zusammenhange erlaube ich mir hinzuzufügen, daß ich in vielen Fällen dieselbe Infusion (und dies gilt sowohl für die neutralen wie die sauren Infusionen) mit verschiedener Milch geprüft habe. Die absoluten Gerinnungszeiten wurden hierbei allerdings etwas verändert, eine Änderung des Hauptresultates habe ich aber nie beobachtet. Daß die zu demselben Versuche gehörenden, bei den verschiedenen Temperaturen ausgeführten Versuchsreihen gleichzeitig und mit derselben Milch angestellt wurden, ist wohl so selbstverständlich, daß es kaum einer Erwähnung bedürftig ist.

Bezüglich einer ungleichen Wirkung von Verdünnung mit Wasser und mit unwirksamer Infusion zeigen die Versuche kein konstantes Verhalten. In den Versuchen 2 und 3 ist überhaupt kein sicherer Unterschied merkbar. Im Versuche 4 findet man bei dem niedrigsten Enzymgehalte  $E^{1/256}$  einen unwesentlichen Unterschied, der indessen bei  $38^{\circ} C.$  stark hervortritt. Die mit Wasser verdünnte Infusion bewirkt nämlich eine verzögerte Gerinnung, namentlich im Vergleiche mit der Gerinnung bei  $E^{1/64}$ , während die mit Infusion verdünnte bei einem ähnlichen Vergleiche dem Gesetze folgt und übrigens in etwas zu kurzer Zeit gerinnt. Eine Ungleichheit in derselben Richtung zeigt auch Versuch 1, und diese Ungleichheit kam besonders bei  $45^{\circ} C.$  stark zum Vorschein. Sonst scheint es, als wäre es für neutrale Infusionen, wenn die Verdünnung nicht zu weit geht, ziemlich gleichgültig, ob sie mit Wasser oder mit unwirksamer Infusion verdünnt werden.

## II. Versuche mit sauren Infusionen.

Bei der Darstellung dieser Infusionen kamen 4 verschiedene Methoden zur Anwendung. In einigen Fällen habe ich eine behufs anderer Zwecke neutralisierte, filtrierte und mit Wasser etwas verdünnte Infusion mit Salzsäure auf den gewünschten Säuregrad gebracht. Da eine solche, chlornatriumhaltige Infusion beim Erhitzen sich trübt, eignet sie sich nicht als Verdünnungsflüssigkeit, und aus dem Grunde habe ich nur

ein paar solche Versuche ausgeführt. Da sie zu ganz demselben Hauptergebnisse wie alle anderen führten, finde ich es überflüssig, dieselben hier besonders anzuführen.

Die zweite Methode bestand einfach darin, daß ich die Infusion erst mit Säure von demselben Säuregrade so stark verdünnte, daß sie beim Sieden oder langdauernden Erhitzen weder koagulierte noch sich trübte. Infolge der außerordentlich kräftigen Wirkung der sauren Infusionen konnte eine solche Verdünnung meistens ohne zu starke Herabsetzung der Enzymwirkung geschehen. Die dritte Methode bestand darin, daß ich die saure Infusion gegen eine Säure von etwa derselben Stärke mehrere Tage dialysieren ließ. Diese Infusionen ließen sich auch ohne Trübung erhitzen und konnten also als Verdünnungsflüssigkeit dienen. Der Säuregrad sowohl der wirksamen wie der durch Erhitzen unwirksam gemachten Infusion wurde, mit empfindlichem Lackmuspapier als Indikator, durch Titration mit  $n/10$ -Lauge bestimmt, und eine Salzsäure von genau demselben Säuregrade bereitet. Die ursprüngliche Infusion wurde also teils mit Säure, in den Tabellen mit **S**, und teils mit unwirksamer Infusion, in den Tabellen mit **J** bezeichnet, in den gewünschten Verhältnissen verdünnt. Die 4. Methode werde ich weiter unten besprechen. Unter den von mir mit nach der Methode 2 bereiteten Infusionen angestellten 5 Versuchen sind als Beispiele 3 in der Tabelle 3 zusammengestellt worden. Da die Tabelle ohne weiteres verständlich sein dürfte, will ich nur bezüglich der Beschaffenheit der Infusionen folgendes bemerken. Die unverdünnte Infusion hatte im Versuche 1 den Säuregrad 0,192% HCl und 0,303% feste, organische Stoffe. Die entsprechenden Zahlen für die Infusion des Versuches 2 waren 0,186% HCl und 0,182% org. Stoffe und für die Infusion im Versuche 3 ebenfalls 0,186% HCl und 0,172% org. Stoffe (siehe nebenstehende Tabelle).

Das Hauptresultat war also bei Versuchen mit diesen sauren Infusionen dasselbe wie in den Versuchen mit neutralen Infusionen, und ich brauche also nicht auf dasselbe weiter einzugehen. In dem Versuche 2 bei 20° C. und E  $1/1024$ , wo die Gerinnungszeit 8 Stunden war, hatte die amphotere

Tabelle 3.

Ver- such 1	Temp. 18 - 19° C.				Temp. 27° C.				Temp. 38° C.			
	S Beob. Min.	Ber. Min.	J Beob. Min.	Prod. p. t.	S Beob. Min.	Ber. Min.	J Beob. Min.	Prod. p. t.	S Beob. Min.	Ber. Min.	J Beob. Min.	Prod. p. t.
1	14	—	14	14	Nicht bestimmt.				—	—	—	—
<sup>1</sup> / <sub>4</sub>	32	56	32	8	1	—	1	1	Nicht bestimmt.			
<sup>1</sup> / <sub>16</sub>	73	224	74	1,4	3	4	3	0,75	1	—	1	1
<sup>1</sup> / <sub>64</sub>	101	896	100	1,52	6,5	16	8	0,4 - 0,5	3	4	4,5	0,75 - 1,125
<sup>1</sup> / <sub>256</sub>	140	3584	144	0,55	21	64	29	0,32 - 0,45	11	16	22	0,69 - 1,38
<sup>1</sup> / <sub>1024</sub>	280	14336	298	0,27 - 0,29	82	256	112	0,32 - 0,45	54	64	102	0,84 - 1,6
Ver- such 2	Temp. 20° C.				Temp. 26,5° C.				Temp. 38° C.			
	S Beob. Min.	Ber. Min.	J Beob. Min.	Prod. p. t.	S Beob. Min.	Ber. Min.	J Beob. Min.	Prod. p. t.	S Beob. Min.	Ber. Min.	J Beob. Min.	Prod. p. t.
1	3,5	—	3,5	3,5	Nicht bestimmt.				—	—	—	—
<sup>1</sup> / <sub>4</sub>	5	14	5	1,25	1,5	—	1,5	1,5	Nicht bestimmt.			
<sup>1</sup> / <sub>16</sub>	11	56	11	0,69	3,5	6	3,5	0,88	1,5	—	1,5	1,5
<sup>1</sup> / <sub>64</sub>	30	224	29	0,47	11,5	24	11	0,68	5,5	6	5,5	1,4
<sup>1</sup> / <sub>256</sub>	106	896	68	0,41 - 0,26	43	96	28	0,67 - 0,44	22	24	17	1,4 - 1,1
<sup>1</sup> / <sub>1024</sub>	480	3584	120	0,47 - 0,12	188	384	61	0,73 - 0,24	120	96	52	1,9 - 0,8
Ver- such 3	Temp. 20° C.				Temp. 27,5° C.				Temp. 38,5° C.			
	S Beob. Min.	Ber. Min.	J Beob. Min.	Prod. p. t.	S Beob. Min.	Ber. Min.	J Beob. Min.	Prod. p. t.	S Beob. Min.	Ber. Min.	J Beob. Min.	Prod. p. t.
1	2,5	—	2,5	2,5	Nicht bestimmt.				—	—	—	—
<sup>1</sup> / <sub>4</sub>	7	10	7,5	1,8	1	—	1	1	Nicht bestimmt.			
<sup>1</sup> / <sub>16</sub>	15	40	15	0,94	3	4	3	0,75	1,5	—	1,5	1,5
<sup>1</sup> / <sub>64</sub>	27	160	27	0,42	9	16	9	0,56	5	6	5	1,25
<sup>1</sup> / <sub>256</sub>	72	640	73	0,28	27	64	28	0,44	19	24	19	1,19
<sup>1</sup> / <sub>1024</sub>	220	2560	220	0,21	109	256	107	0,42	67	96	68	1,06

Reaktion etwas abgenommen und eine beginnende Säurebildung war wohl also eingetreten. In den anderen Versuchen mit langen Gerinnungszeiten hatte dagegen keine sicher merkbare Änderung der Reaktion stattgefunden, und das geronnene Milchgemenge färbte rotes Lackmuspapier anscheinend ebenso stark blauviolett wie die frische Milch. Gegenwart oder Abwesenheit von Tolnol änderte nicht das Hauptresultat, was

übrigens auch von den folgenden Versuchsreihen mit sauren Infusionen gilt.

Bezüglich der ungleichen Wirkung von Verdünnung mit Säure oder mit saurer, unwirksamer Infusion zeigen auch diese Versuche, daß es bei Gegenwart von größeren oder mittleren Enzymmengen ohne wesentlichen Belang ist, ob man mit Säure oder mit der unwirksamen, sauren Infusion verdünnt. Bei Gegenwart von kleinen Enzymmengen, in den obigen Versuchen  $1/_{286}$  bis  $1/_{1024}$ , können dagegen die Verhältnisse wechseln. Im Versuche 3 ist kein Unterschied vorhanden, während sowohl bei höherer wie bei niedrigerer Temperatur die mit Säure verdünnten Proben im Versuche 1 rascher und im Versuche 2 umgekehrt langsamer als die mit Infusion verdünnten wirkten. Ich habe noch 2 andere Versuche nach demselben Plane ausgeführt und der eine verhielt sich wie Versuch 1, der andere wie Versuch 2. Von den 5 Versuchen zeigte also einer keinen Unterschied, von den übrigen zeigten 2 eine kräftigere Wirkung der mit Säure und 2 eine kräftigere der mit Infusion verdünnten Proben. Für die stärkere Wirkung der mit Säure verdünnten 2 Proben in 2 Versuchen könnte die Erklärung möglicherweise darin liegen, daß diese Infusionen die an Eiweiß reichsten waren. Sie enthielten nämlich 0,303, bzw. 0,357% feste, organische Stoffe. Die Verdünnungssäure zeigte allerdings genau denselben Säuregrad (bei Titration mit Lackmuspapier als Indikator) als die unwirksame Infusion; in der letzteren war aber ein Teil der Säure nicht als freie Säure, sondern als sauer reagierende Säureeweißverbindung vorhanden, und die mit dieser Infusion stark verdünnten Proben enthielten also weniger freie Säure als die mit Säure verdünnten. Hierdurch könnte die etwas kräftigere Wirkung der letzteren erklärt werden. Da aber ein ähnlicher Unterschied in dem Gehalte an freier Säure, wenn auch in geringerem Grade, auch bei Anwendung von eiweißärmeren Infusionen zur Geltung kommt, würde man eigentlich überall eine etwas kräftigere Wirkung der mit Säure verdünnten Proben zu erwarten haben, und die kräftigere Wirkung der mit Infusion verdünnten Proben in 2 Versuchen ist deshalb vorläufig nicht zu erklären. Da ich auch bei anderer Versuchs-

anordnung ein ähnliches Resultat erhalten habe, komme ich später zu dieser Frage zurück.

In der folgenden Tabelle 4 habe ich 3 mit nach der Methode 3, also durch Dialyse gegen angesäuertes Wasser, dargestellten Infusionen ausgeführte Versuche zusammengestellt. Der Säuregrad der Infusionen war in den 3 Versuchen bezw. 0,135; 0,197 und 0,192% HCl und der Gehalt an festen Stoffen bezw. 0,084, 0,114 und 0,090%.

Tabelle 4.

Ver- such 1	Temp. 20° C.				Temp. 27° C.				Temp. 38° C.			
	S Beob. Min.	Ber. Min.	J Beob. Min.	Prod. p. t.	S Beob. Min.	Ber. Min.	J Beob. Min.	Prod. p. t.	S Beob. Min.	Ber. Min.	J Beob. Min.	Prod. p. t.
1	7	—	7	7	Nicht bestimmt				—	—	—	—
Enzymgehalt 1/4	12	28	12	3	2	—	2	2	Nicht bestimmt			
1/16	21	112	21	1,3	5	8	5	1,25	1,5	—	1,5	1,5
1/64	41	448	40	0,7	13	32	13	0,8	6	6	6	1,5
1/256	109	1792	108	0,42	45	128	45	0,7	25	24	25	1,56
1/1024	350	7168	350	0,34	158	512	160	0,6	124	96	124	1,94
Ver- such 2	Temp. 20° C.				Temp. 26,5° C.				Temp. 39° C.			
	S Beob. Min.	Ber. Min.	J Beob. Min.	Prod. p. t.	S Beob. Min.	Ber. Min.	J Beob. Min.	Prod. p. t.	S Beob. Min.	Ber. Min.	J Beob. Min.	Prod. p. t.
1	2	—	2	2	Nicht bestimmt				—	—	—	—
Enzymgehalt 1/4	5	8	5	1,25	1	—	1	1	Nicht bestimmt			
1/16	15	32	15	0,94	3	4	3	0,75	1,5	—	1,5	1,5
1/64	27	128	27	0,42	11	16	11	0,69	4,5	6	4,5	1,125
1/256	80	512	82	0,31	37	64	39	0,59	18	24	22	1,12—1,4
1/1024	250	2048	340	0,24—0,33	160	256	168	0,62	118	96	132	1,85—2,06
Ver- such 3	Temp. 20° C.				Temp. 27,5—28° C.				Temp. 38° C.			
	S Beob. Min.	Ber. Min.	J Beob. Min.	Prod. p. t.	S Beob. Min.	Ber. Min.	J Beob. Min.	Prod. p. t.	S Beob. Min.	Ber. Min.	J Beob. Min.	Prod. p. t.
1	2,5	—	2,5	2,5	Nicht bestimmt				—	—	—	—
Enzymgehalt 1/4	6,5	10	6,5	1,63	1,5	—	1,5	1,5	Nicht bestimmt			
1/16	18	40	18	1,13	3,5	6	3,5	0,88	1,5	—	1,5	1,5
1/64	35	160	35	0,55	11	24	11	0,69	6	6	6	1,5
1/256	124	640	86	0,48—0,34	54	96	40	0,84—0,62	28	24	24	1,7—1,5
1/1024	>7 St.	2560	350	? — 0,34	>6 St.	384	170	? — 0,66	>6 St.	96	140	? — 2,18

Die durch Dialyse gegen angesäuertes Wasser gereinigten Infusionen gaben also, wie die Tabelle zeigt, dasselbe Hauptresultat wie alle die vorher geprüften. Besonders deutlich tritt in dieser Tabelle in allen 3 Versuchen die hemmende Wirkung der Bruttemperatur bei sehr niedrigem Enzymgehalt ( $E^{1/1024}$ ) zutage. In solchen Fällen war auch die Milch nicht durch und durch geronnen, sondern sie enthielt schließlich nur große Käseklumpen in einer milchähnlichen Flüssigkeit, nachdem vorher erst kleinere und dann größere Körnchen oder Klümpchen sich gebildet hatten. Von einem bestimmten Gerinnungsmomente konnte hier garnicht die Rede sein; und da es auch hier schwieriger als in den meisten anderen Fällen war, von einem bestimmten Aussehen der Proben auszugehen, nahm ich in dieser und einigen anderen Versuchen derselben Art als Gerinnungszeit die Mittelzahl zwischen dem ersten, ganz sicheren Anfange der Gerinnung und dem Auftreten der großen Käseklumpen an. Sowohl bei  $26-28^{\circ}$  wie bei  $20^{\circ}$  C. war der Gerinnungsvorgang mehr typisch und die Gerinnungszeit ließ sich viel leichter feststellen.

Zu den Versuchen der Tabelle 2 dienten, wie man oben (S. 156) findet, die durch Dialyse gegen destilliertes Wasser neutral gemachten Infusionen, welche teils mit Wasser und teils mit derselben, durch Erhitzen unwirksam gemachten Infusion verdünnt worden waren. Es schien mir nun von Interesse zu sein, das Verhalten dieser, vorher bei neutraler Reaktion untersuchten Infusionen auch bei saurer Reaktion zu prüfen. Aus dem Grunde wurden alle zu einem Versuche (in der Tabelle 2) benutzten Infusionen mit genau derselben Menge Salzsäure, 0,2% HCl, versetzt und mit Milch geprüft. Die Resultate sind in der Tabelle 5 enthalten. Es handelt sich also hier um dieselben Lösungen wie in der Tabelle 2, nur angesäuert, und dies war die vierte Methode, die ich zur Gewinnung von sauren Infusionen verwendete. Trotzdem alle Proben hier sauer reagierten, bezeichne ich wie in Tabelle 2 die mit Wasser verdünnten mit **W**, und die mit Infusion verdünnten mit **J**.

Tabelle 5.

Ver- such	Temp. 20° C.				Temp. 26° C.				Temp. 37° C.			
	W Beob. Min.	Ber. Min.	J Beob. Min.	Prod. p. t.	W Beob. Min.	Ber. Min.	J Beob. Min.	Prod. p. t.	W Beob. Min.	Ber. Min.	J Beob. Min.	Prod. p. t.
1	2,5	—	2,5	2,5	Nicht bestimmt				Nicht bestimmt			
1/4	6	10	5	1,5—1,25	2,5	—	—	2,5 —2,0	1	—	1	1
1/16	17	40	15	1	8	10	7	2,0 —1,75	4	4	4	1
1/64	57	160	45	0,9—0,7	28	40	23	1,75—1,4	18	16	14	1,2—0,87
Ver- such	Temp. 20° C.				Temp. 26,5° C.				Temp. 39° C.			
	W Beob. Min.	Ber. Min.	J Beob. Min.	Prod. p. t.	W Beob. Min.	Ber. Min.	J Beob. Min.	p. t. Prod.	W Beob. Min.	Ber. Min.	J Beob. Min.	Prod. p. t.
1	14	—	14	14	4	—	4	4	1,5	—	1,5	1,5
1/2	25	28	25	12,5	7	8	7	3,5	2,5	3	2,5	1,25
1/4	39	56	39	9,75	13	16	13	3,25	5	6	5	1,25
1/8	72	112	73	9,1	25	32	25	3,1	11	12	11	1,37
1/16	127	224	129	8	45	64	46	2,9	24	24	24	1,5
Ver- such	Temp. 20° C.				Temp. 26° C.				Temp. 39° C.			
	W Beob. Min.	Ber. Min.	J Beob. Min.	Prod. p. t.	W Beob. Min.	Ber. Min.	J Beob. Min.	Prod. p. t.	W Beob. Min.	Ber. Min.	J Beob. Min.	Prod. p. t.
1	10	—	10	10	2	—	2	2	Nicht bestimmt			
1/4	17	40	17	4,25	6	8	6	1,5	2,5	—	2,5	2,5
1/16	39	160	39	2,4	18	32	18	1,1	10	10	10	2,5
1/64	130	640	127	2,03—1,98	70	128	66	1,09—1,03	42	40	38	2,6—2,4
Ver- such	Temp. 20° C.				Temp. 27° C.				Temp. 38—39° C.			
	W Beob. Min.	Ber. Min.	J Beob. Min.	Prod. p. t.	W Beob. Min.	Ber. Min.	J Beob. Min.	Prod. p. t.	W Beob. Min.	Ber. Min.	J Beob. Min.	Prod. p. t.
1	3	—	3	3	Nicht bestimmt				—	—	—	—
1/4	6	12	6	1,5	1,25	—	1,25	1,25	Nicht bestimmt			
1/16	14	48	14	0,87	4	5	4	1,00	2	—	2	2
1/64	33	192	33	0,52	14	20	13	0,87	7	8	7	1,75
1/256	193	768	102	0,76—0,40	63	80	47	0,98—0,73	35	32	27	2,19—1,7
1/1024	>600	3072	430	? —0,42	290	320	180	1,13—0,70	220	128	148	3,4 —2,3

Diese, ohne weiteres verständliche Tabelle ist wohl, namentlich wenn sie mit den vorigen verglichen wird, keiner besonderen Besprechung bedürftig. Zu bemerken ist vielleicht,

daß in Versuch 4 die Gerinnung auch bei 38—39° C. große Abweichungen von dem Zeitgesetze zeigte. Das wesentlichste Interesse bietet wohl ein Vergleich mit der Tabelle 2 dar, weil es in beiden Tabellen um ganz dieselben Lösungen sich handelte. Man findet dann in den Versuchen 2 und 3 keine wesentlichen Unterschiede zwischen der Wirkung von Verdünnung mit Wasser und mit Infusion, denn ein Unterschied von 3—4 Minuten (im Versuche 3) ist ohne wesentlichen Belang. Will man aber diesen Unterschied berücksichtigen, so findet man, daß er von derselben Art wie in den Versuchen 1 und 4 ist. Hier, wie in den entsprechenden Versuchen der Tabelle 2, wirken nämlich die mit unwirksamer Infusion verdünnten Lösungen kräftiger als die mit Wasser bzw. Säure verdünnten. Der Unterschied tritt besonders stark im Versuche 4, Tabelle 5, bei der Verdünnung  $E = 1/1024$  hervor.

Diese kräftigere Wirkung der mit Infusion verdünnten Lösungen ist um so auffallender, als man das Gegenteil zu erwarten hätte, wenn es die Hydroxylionen der Milch sind, welche die Wirkung des Enzyms schwächen oder vernichten. Alle Proben waren hier mit ganz derselben Menge Säure, bis zu 0,2% HCl, versetzt worden, und die mit Infusion verdünnten müßten also etwas weniger freie Säure als die anderen enthalten. Bei dem Verdünnungsgrade  $1/1024$  (Vers. 4) enthielt nämlich die mit Infusion verdünnte Lösung 0,060% Protein-stoffe, die mit Wasser verdünnte dagegen nur 0,000058%. Da ich nun nicht allein in diesen Versuchen, sondern auch in vielen anderen eine schwächere Wirkung der mit Säure als der mit Infusion verdünnten Lösungen beobachtet habe, bin ich zu der Annahme geneigt, daß der etwas verschiedene Gehalt an freier Säure hier ohne wesentliche Bedeutung ist, und daß der Grund darin liegt, daß die durch Erhitzen unwirksam gemachten Infusionen organische Stoffe enthalten, welche entweder die Wirkung des Enzyms beschleunigen oder schützend auf dasselbe einwirken. Das etwas wechselnde Verhalten der verschiedenen Infusionen könnte dann möglicherweise daher rühren, daß diese, vielleicht erst während des Erhitzens gebildeten Stoffe nicht immer vorhanden oder nicht in hinreichender Menge zugegen sind.

Ich habe übrigens diese Frage nicht zum Gegenstand einer weiteren Untersuchung gemacht, weil sie mich zu weit von meinem eigentlichen Thema führen würde, und weil eine solche Untersuchung für mich nicht notwendig war. Da die Versuche mit reinen Caseinlösungen, wenn die Enzymmengen sehr klein sind, zu langsam verlaufen und nicht ganz deutliche Resultate geben, arbeite ich nicht mit so großen Differenzen in dem Chymosingehalte wie 1 :  $\frac{1}{64}$  : und für kleinere Verdünnungen ist es praktisch gleichgültig, ob man mit Säure oder Infusion verdünnt. Dies war für mich genügend zu wissen, weil es gewisse Versuchsanordnungen gibt, wo es aus besonderen Gründen unbedingt notwendig ist, mit Infusion zu verdünnen. Die Frage von der ungleichen Wirkung der Verdünnung mit Wasser, resp. Säure, oder mit Infusion bei Gegenwart von kleinen Enzymmengen ist also einer fortgesetzten Prüfung bedürftig.

Die Hauptfrage, ob die Gerinnung bei niedriger Temperatur dem Zeitgesetze ebenso gut oder besser folgt als bei Bruttemperatur, ist nach meinen obigen Untersuchungen entschieden verneinend zu beantworten, und namentlich gilt dies, wenn man die bei 20° C. erhaltenen Resultate in Betracht zieht. Auch für die Temperatur 26—27° C. gilt dies als Regel. Dementsprechend geben auch die bei niedrigerer Temperatur beobachteten Gerinnungszeiten kein sichereres Maß der Enzymmenge als die bei Bruttemperatur beobachteten. Es findet vielmehr das Gegenteil statt, wenn man von den sehr schwachen Enzymlösungen absieht, welche bekanntlich auch bei Brutwärme sehr unzuverlässige Zahlen geben.

Das nun Gesagte gilt natürlicherweise zunächst nur für die hier angewandte Versuchsanordnung, Verdünnung einer Enzymlösung in bekannten Verhältnissen mit Wasser, unwirksamer Infusion oder verdünnter Säure. Es folgt nämlich nicht ohne weiteres, daß das Resultat dasselbe wird, wenn man die Enzymmenge in dem einen Teile einer Infusion in anderer Weise, z. B. durch Erwärmen, wesentlich herabsetzt, eine Frage, zu der ich hoffentlich ein anderes Mal zurückkommen werde.

Wie man ersieht, habe ich nur bei drei verschiedenen

Temperaturen, nämlich  $20^{\circ}$ ,  $26-27^{\circ}$  und  $37-40^{\circ}$  C. gearbeitet. Der Grund hierzu war der, daß es mir unmöglich war, eine noch größere Anzahl von Versuchen gleichzeitig zu überwachen. Natürlich würde eine noch größere Anzahl von Versuchen wünschenswert gewesen sein, namentlich um eine etwaige Optimumtemperatur herausfinden zu können. Ich glaube aber kaum, daß es eine solche, für alle Infusionen und alle Milch gültige Temperatur gibt. Wenigstens habe ich mehrmals gesehen, daß die eine Infusion in ihrer Wirkung dem Zeitgesetze bei z. B.  $38^{\circ}$  C. besser als die andere Infusion, mit derselben Milch geprüft, folgte. Ich habe auch Fälle beobachtet, wo eine Infusion oberhalb  $40^{\circ}$  C. besser als unterhalb dieser Temperatur dem Zeitgesetze in ihrer Wirkung folgte, während gewöhnlich das Entgegengesetzte der Fall war.

Die alte, in neuerer Zeit von van Dam hervorgehobene Beobachtung, daß die bei Bruttemperatur und Gegenwart von nur sehr kleinen Enzymmengen beobachteten Gerinnungszeiten zu fehlerhaften Schlüssen bezüglich des Enzymgehaltes führen können, ist unzweifelhaft richtig; aber ebenso sicher ist es, daß die bei niedriger Temperatur beobachteten Zeiten zu groben und sogar viel größeren Fehlern in umgekehrter Richtung Veranlassung geben können. Die von van Dam gemachte Erfahrung, daß eine enzymarme Lösung bei niedrigerer Temperatur sogar absolut rascher als bei höherer die Gerinnung hervorrufen kann, habe ich beim Arbeiten mit frischen, normalen Infusionen in keinem Falle bestätigt gefunden. Dagegen habe ich bei Verwendung einer alten, der Selbstverdauung unterworfenen Infusion einen solchen Fall beobachtet.

Für die von mir in allen Versuchen ohne Ausnahme gemachte Beobachtung, daß die verdünnten Infusionen bei niedrigerer Temperatur, insbesondere bei  $20^{\circ}$  C., relativ viel kräftiger als bei Bruttemperatur wirken, kann ich keine befriedigende Erklärung geben. An den Wegfall eines bei Bruttemperatur zur Geltung kommenden hemmenden Einflusses ist wohl kaum zu denken, denn in dem Falle würde die Gerinnung bei niedriger Temperatur dem Zeitgesetze besser als bei Bruttemperatur folgen, während gerade das Gegenteil zutrifft. Eher

könnte man sich vorstellen, daß bei der Verdünnung eine Substanz gebildet oder abgespaltet wird, welche die Gerinnung befördert, und als solche Substanz hätte man wohl in erster Linie das Enzym selbst zu bezeichnen. Man könnte nämlich annehmen, daß in einer Infusion das Enzym teils frei und teils als eine bei der Verdünnung sich zerlegende, man könnte der Kürze halber sagen, dissoziabile Substanz sich vorfände, deren Dissoziationsgrad von dem Verdünnungsgrade und der Temperatur abhängig sei. Wenn die Dissoziation bei etwa Bruttemperatur vollständig oder fast vollständig zurückginge oder verhindert würde, mußte bei dieser Temperatur die Gerinnung bei verschiedenen Verdünnungen genau oder ziemlich genau dem Zeitgesetze folgen. Ebenso mußte, wenn die Dissoziation mit zunehmender Temperatur abnähme, die Übereinstimmung mit dem Zeitgesetze etwas besser bei 26—27° C. als bei 20° C. sein, was alles in der Tat zutrifft. Über die Ursache der beobachteten Abweichungen der Gerinnung von dem Zeitgesetze bei verschiedenen Temperaturen können jedoch erst fortgesetzte Untersuchungen Aufschlüsse geben.

Die nun mitgeteilten Untersuchungen beziehen sich nur auf die Chymosinwirkung, d. h. auf die Milchgerinnung. Wie verhält sich nun in dieser Hinsicht die Pepsinwirkung? Wenn die beiden Wirkungen, wie einige Forscher annehmen, identisch sind, könnte man erwarten, daß auch die Pepsinwirkung anders bei niedriger als bei höherer Temperatur verlaufen würde. Aus dem Grunde habe ich auch mehrere der sauren Infusionen in den Konzentrationen  $E = 1, \frac{1}{4}, \frac{1}{16}$  teils bei Zimmertemperatur und teils bei Bruttemperatur nach Mett geprüft. Das Resultat entsprach nicht der obigen Erwartung, denn die Verdauung folgte dem Quadratwurzelgesetze ebenso gut bei etwa 18° C. wie bei Bruttemperatur. Da indessen die Mettsche Methode bei Zimmertemperatur nicht immer scharfe Resultate gibt, ist es notwendig, diese Frage nach anderen, feineren Methoden weiter zu prüfen.