

Zur Frage nach der Identität von Pepsin und Chymosin.

Von
W. van Dam.

(Der Redaktion zugegangen am 4. Januar 1910.)

In einer vorhergehenden Mitteilung¹⁾ habe ich die Wirkung des Labs auf Paracaseinkalk besprochen. Damals schrieb ich: «Es ist ohne weiteres klar, daß meine Resultate sich vollkommen vereinbaren lassen mit der unitarischen Auffassung, sie lassen aber den Befund Hammarstens über die Abschwächung des Chymosins durch Erwärmen mit Salzsäure völlig unberührt. So lange nicht gezeigt worden ist, daß in der mit Salzsäure digerierten Lösung die Fähigkeit, Milch zur Gerinnung zu bringen, nur verdeckt, nicht aber verschwunden ist, etwa in derselben Weise, wie das für Pepsin der Fall zu sein scheint bei Alkalisierung, hat man nicht das Recht, Pepsin und Chymosin als identisch zu betrachten. Im nächsten Winter hoffe ich ein paar Versuche ausführen zu können mit einem Präparate, das mir in liebenswürdigster Weise von Prof. Pekelharing zugesagt wurde». Ich erlaube mir in den folgenden Seiten die Resultate mitzuteilen, die meine Untersuchungen mit von Prof. Pekelharing bereitetem und mir in großer Menge zur Verfügung gestellten Schweinsenzym geliefert haben.

Erstens habe ich dann geprüft, ob sich das Schweinsenzym beim Digerieren mit 0,2%iger Salzsäure in der von Hammarsten für diese Versuche angegebenen Konzentration anders verhält als die Kalbsmageninfusionen. Gewin,²⁾ auf dessen Arbeit ich noch zurückkommen werde im Zusammenhang mit den Untersuchungen Hammarstens und Schmidt-

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. LXI, S. 147.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. LIV, S. 32.

Nielsens über diesen Gegenstand, hat bei derartigen Versuchen Parallelität gefunden für Verdauung und Gerinnung, aber nur bis zu einer gewissen Konzentration, wie Hammarsten¹⁾ in seiner Kritik auf Gewins Arbeit hervorhebt. Ich arbeitete wie folgt:

145 mg des Pulvers wurden bei Zimmertemperatur gelöst in 50 ccm HCl 0,2^o/_o: nach + 4 Stunden wurde noch eine halbe Stunde auf 37^o C. nachgewärmt und die filtrierte Lösung, die für die Digestion nach Hammarsten noch viel zu stark sich zeigte, mit 2 Teilen HCl 0,2^o/_o verdünnt. Von $\frac{1}{3}$ ccm dieser Lösung, mit $\frac{2}{3}$ ccm Wasser verdünnt, wurden 10 ccm Milch bei 37^o C. in 70'' koaguliert. Ein Teil der Lösung wurde während 18 Stunden bei 42^o C. im Thermostaten gehalten: Gerinnung in 3 $\frac{1}{2}$ Minuten gegen 70 Sekunden für die nicht erwärmte Lösung. Nach weiterer Erwärmung während 6 $\frac{1}{2}$ Stunden auf 44—46^o C.: 170 und 52 Sek. Nach Mett wurden verdaut in 2 Stunden 40 Minuten 6 und 5 mm. Weiter erwärmt während 17 Stunden bei 42^o C., nachdem aber erst mit Salzsäure 0,2^o/_o verdünnt war 1 : 2. Dann wurde gefunden 155 und 43 Sekunden für 1 : 20 Milch.²⁾ Nach weiteren 12 Stunden bei 47—48^o C. und wieder 10 Stunden bei 42^o C.: nach 6 $\frac{1}{2}$ Stunden keine Gerinnung gegen 60 Sekunden für die nicht erhitzt gewesene Lösung. Eine Fibrinflocke wurde in 25 und 10 Minuten gelöst; nach Mett wurden in 2 $\frac{1}{2}$ Stunden 4,2 und 2,7 mm verdaut.

Man sieht also, daß man auch für dieses Präparat schließlich eine Lösung erhält, die nicht gerinnend, aber sehr kräftig proteolytisch wirkt; es ist nur eine längere Erhitzungsdauer als für die Kalbsmageninfusionen nötig.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. LVI, S. 18.

²⁾ Bei meinen Versuchen habe ich weiter immer 1 ccm mit 20 ccm Milch vermischt. Durch diesen Zusatz wird die Wasserstoffionenkonzentration der Milch nur so wenig erhöht, wie aus meinen Untersuchungen über die Labgerinnung (diese Zeitschrift, Bd. LVIII, S. 295) zu entnehmen ist, daß man innerhalb der Grenzen, die für normale Milch gefunden wurden, bleibt. Ich arbeitete nämlich immer mit Mischmilch von 20—30 Kühen.

Mit diesen Lösungen wurde dann nach der früher von mir erwähnten Methode die Verdauung des Paracaseins bestimmt. 4 g meines Paracaseinkalbspräparates wurden bei 25° C. mit verdünnter Salzsäure und den Enzymlösungen langsam rotiert. Tabelle I gibt das Resultat.

Tabelle I.

	T	$C_H \times 10^5$	N in $\frac{1}{10}$ -n-Säure	N (Kontrollrohr)	Verdaut
1. Urspr. Lösung .	60''		24,6		21,6
2. Erw. .	> 6½ Std.	0,72	8,4	3,0	5,4

Die Zahlen von Tabelle II wurden erhalten bei der doppelten Enzymkonzentration.

Tabelle II.

	$C_H \times 10^5$	N (in $\frac{1}{10}$ -n-Säure)	N (Kontrollrohr)	Verdaut
1. Urspr. Lösung .		34,5		32,2
2. Erw. .	0,58	12,6	2,3	10,3

Schließlich machte ich noch einen Versuch mit reinem Paracasein (also ohne die neutralisierenden Phosphate) in 0,3-n-HCl. 2 g Paracasein wurden mit 40 ccm 0,3-n-HCl vermischt und während 24 Stunden mit 1 ccm der Lösungen langsam geschüttelt. Tabelle III gibt das Resultat.

Tabelle III.

	Acidität	N (in $\frac{1}{10}$ -n-Säure)	N (im Kontrollrohr)	Verdaut
1. Urspr. Lösung .		22,0		19,6
2. Erw. .	0,3 norm.	10,8	2,4	8,4

Bei Betrachtung dieser Tabelle fällt es zunächst auf, daß hier, im Gegensatz zu dem Resultate, das die Kalbsmagen-

infusion lieferte, die erwärmte, nicht gerinnend wirkende Enzymlösung noch deutlich verdauend gewirkt hat; weiter sieht man, daß in Tabelle I das Verhältnis der Verdauung für die nicht erwärmte Lösung zur digerierten 21,6:5,4 ist. Bei der doppelten Enzymkonzentration wurde gefunden 32,2:10,3, während in der sehr sauren Lösung 19,6:8,4 gefunden wurde, ein Verhältnis, das ziemlich gut stimmt mit dem bei der Mettschen Probe gefundenen: $(4,2)^2 : (2,7)^2 = 17,6 : 7,3$.

Anfangs hielt ich dieses Resultat für ein neues Argument für die dualistische Auffassung. Man konnte sich nämlich vorstellen, daß bei der höheren Acidität das Pepsin ganz normal, bei dem geringeren Säuregrade weniger verdaute und infolgedessen in diesem Falle das Verhältnis für die Verdauung kleiner gefunden wurde. Wie später erwähnt werden wird, liegt die Sache ganz anders. Jedenfalls aber mußte ich aus der Tatsache, daß die nicht gerinnend wirkende, erwärmte Lösung kräftig Käsestoff verdaute bei $0,72 \times 10^{-5}$ -n-H, schließen, daß der aus meinen ersten Versuchen über den Gegenstand gemachte Schluß, das Pepsin wirke bei dieser Konzentration nicht auf den Käsestoff, unrichtig ist. Aber wie soll man sich dann darüber klar werden, daß ich für die verschiedenen Labextrakte, die ich untersuchte, vollkommene Parallelität fand für Verdauung und Gerinnung, während auch die Kalbsmageninfusion so gut wie keinen Käsestoff löste?

Die folgenden Versuche geben, wie ich anfangs meinte, die Antwort auf diese Frage. Vergleicht man die Stärke der Verdauung nach Mett durch das Schweinsenzym mit derjenigen des Kalbsenzym, so findet man bei gleicher Labungsstärke für erstere eine weit stärkere Verdauung.¹⁾

Ich legte mir nun folgende Frage vor: Wie verhält sich

¹⁾ Die Frage nach der Ursache dieser Erscheinung kann für die Lösung des fraglichen Punktes vorläufig außer Betracht bleiben. Stellt man sich auf den dualistischen Standpunkt, dann enthält also das Präparat vom Schweine viel Pepsin; nach der unitarischen Auffassung ist die geringe Verdauung von Hühnereiweiß (im Vergleich mit dem Schweinsenzym) durch die Kalbsmageninfusion den Verunreinigungen der letzten zuzuschreiben.

eine erwärmte chymosinfreie Kalbsmageninfusion in ihrer Wirkung auf Paracasein im Vergleich mit einer erwärmten Schweinspepsinlösung, die aber vorher so stark mit HCl 0,2% verdünnt worden ist, daß für beide Lösungen die Verdauung nach Mett die gleiche ist? Ich bereitete einen neuen Vorrat Kalbsmagenextrakt, dessen einer Teil wieder so lange mit HCl 0,2% erhitzt wurde, daß das Verhältnis der Gerinnungszeiten für die erwärmte und frische Lösung war $3\frac{3}{4}$ Stunden zu 80". Nach Mett wurde dann in 16 Stunden 5,5 mm verdaut (die nicht erwärmte Lösung hatte den ganzen Inhalt des Röhrchens gelöst). Tabelle IV gibt die Zahlen, die bei der Caseinverdauung gefunden wurden.

Tabelle IV.

	T	$C_H > 10^5$	N (in $\frac{1}{10}$ -n- Säure)	N (Kontroll- rohr)	Verdaut
1. Urspr. Lösung .	80"		29,3		19,0
2. Erw. .	$3\frac{3}{4}$ Std.	0,72	12,4	10,3	2,1

Es wurde also so ziemlich dasselbe Resultat wie früher gefunden; die erwärmte Lösung hat auch hier wieder ein wenig verdaut. Ich verdünnte nun die erwärmte Schweinsenzymlösung so weit mit HCl 0,2%, daß die Verdauung derjenigen des erhitzten Kalbsmagenextraktes gleich kam, d. h. 2,7 mm, gegen 2,5 mm für die Kalbsmageninfusion in 7—8 Stunden. Diese beiden Lösungen wurden mit Paracaseinkalk geschüttelt, und zwar in bedeutend höherer Konzentration als in Tabelle IV, um mehr Käsestoff gelöst zu erhalten. Weil hier mit zwei verschiedenen Enzymen gearbeitet wurde, müßten auch zwei Kontrollröhren angesetzt werden. Tabelle V gibt die Resultate.

Das Schweinsenzym hat etwas weniger Casein verdaut als die Kalbsmageninfusion, während nach Mett das umgekehrte gefunden wird. Der Unterschied ist aber nicht sehr bedeutend und ich meinte hieraus folgern zu können, daß die in meiner letzten Arbeit erwähnte Auffassung nicht richtig ist. Ich glaube die schwach verdauende Wirkung der erwärmten Kalbsmagen-

Tabelle V.

	$C_{II} \times 10^5$	N (in $\frac{1}{10}$ -n-Säure)	N (Kontrollrohr)	Verdaut	Mett
Schwein . . .	0,72 ¹⁾	14,1	7,4	6,7	2,7
Kalb		16,6	9,4	7,2	2,5

infusion nicht dem Pseudopepsin zuschreiben zu müssen, wie ich es damals für möglich hielt, sondern dem Pepsin. Gleichzeitig lehren aber Tabelle IV und V, daß die Pepsinwirkung der Chymosinwirkung gegenüber in den Hintergrund tritt. Bei den Labessenzen des Handels findet man sehr oft keine oder nur äußerst geringe Verdauung nach Mett: das erklärt die von mir gefundene vollkommene Parallelität für Gerinnung und Verdauung des Käsestoffs für drei von mir untersuchte Präparate. Jedoch wird man unten sehen, daß die Verdauungsversuche mit den mit HCl digerierten Lösungen nicht erlauben, einen Schluß auf die Menge des verdauenden Enzyms zu machen.

Wie schon oben erwähnt wurde, schien mir die Tatsache, daß gereinigtes Schweinsenzym beim Digerieren mit HCl 0,2% sich ebenso verhielt als die nach Hammarsten bereiteten Kalbsmageninfusionen, eine Stütze für die dualistische Auffassung. Hier waren nämlich die Verunreinigungen nicht zur Erklärung eines Verdecktseins der labenden Wirkung heranzuziehen. Die einzige Möglichkeit schien zu sein, wie Prof. Pekelharing in einer Korrespondenz über die Angelegenheit bemerkte, daß beim Vernichten eines Teils des Enzyms während der Erhitzung Stoffe gebildet wurden, die auf die Gerinnung störend wirkten. Um dies zu prüfen, habe ich versucht, das erwärmte Enzym von diesen Stoffen durch erneute Reinigung zu befreien. Hier folgt die Beschreibung des Versuchs in extenso.

360 mg des Enzympulvers wurden vorsichtig in 780 ccm HCl 0,2% gelöst und in der oben erwähnten Weise das Chymosin abgeschwächt bis zur Gerinnungszeit $\frac{1}{4}$ Stunden 50 Minuten. Die nicht erwärmte Lösung gerann bei derselben Tem-

¹⁾ Nicht direkt bestimmt, aber dieselbe Menge Säure als in Tabelle IV zugegeben.

peratur (37° C.) in 86". Verdauung nach Mett in $2\frac{3}{4}$ Stunden: 2,0 und 3,8 mm. Die erwärmte Flüssigkeit (etwa 700 ccm) wurde nun in einem Dialysierschlauch während 24 Stunden gegen Regenwasser dialysiert; dabei trübte sich die Lösung, die Reaktion gegen Lackmus war schwach sauer. Es wurde 30—40% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, das zuvor durch Umkrystallisieren von Spuren Eisen befreit worden war, in Substanz der Lösung zugesetzt. Nach 2 24 Stunden wurde die klare Lösung abgegossen und der entstandene Niederschlag filtriert, zwischen Filtrierpapier ausgedrückt, in 15 ccm HCl 0,2% gelöst und 2×24 Stunden gegen wiederholt (10—14mal) gewechselte Salzsäure 0,2% in einem Dialysierhülschen dialysiert. Durch passende Verdünnung mit HCl 0,2% wurde die labende Wirkung, die die Lösung in hohem Maße zeigte, derjenigen der ursprünglichen, nicht erwärmten Lösung gleich gemacht: 122" und 118". Nach Mett verdauten die beiden Lösungen gleich stark: 4,0 mm in 3 Stunden.

Aus diesem Versuch ziehe ich den Schluß, daß durch die Erwärmung mit Salzsäure das labende Enzym nicht vernichtet wird, sondern durch Beimischungen oder irgend welche Veränderung in seiner koagulierenden Wirkung gehemmt wird.

In Hinsicht auf die Wichtigkeit dieses Resultats für die Frage nach der Identität von Pepsin und Chymosin wiederholte ich den Versuch mit einer neuen Sendung Enzym. Bei der Bestimmung der Stärke dieses Präparats beobachtete ich nun folgendes. 15 mg wurden in 15 ccm HCl 0,2% gelöst und 1 Teil mit 2 Teilen Wasser verdünnt; 1 ccm dieser sauren Lösung koagulierte 10 ccm Milch bei 37° C. in 65". Als ich aber 1 ccm mit 20 ccm Milch vermischte, trat nach 10 Minuten noch keine Gerinnung ein. Dieser enorme Unterschied konnte nicht erklärt werden durch die größere H-Ionenkonzentration im ersten Falle, und wie mir schien, auch dadurch nicht, daß im ersten Falle das Pepsin in Wirkung trat. Aus Gewins Arbeit ging hervor, daß das gereinigte Schweinsenzym außerordentlich empfindlich ist für Alkali, und es wurde von diesem Autor ausdrücklich hervorgehoben, daß auch neutrale Reaktion das Enzym schädigt. Nun sagte ich mir, die Milch enthält

Hydroxytionen. Ist es vielleicht möglich, daß bei der Temperatur von 37°C ., bei welcher gewöhnlich gearbeitet wird, diese geringe Quantität genügt, um das Enzym während des Gerinnungsversuchs teilweise zu zerstören? Wäre dies der Fall, so könnte man auch den großen Einfluß von nur sehr wenig Salzsäure verstehen, denn eben in der Nähe des neutralen Punktes (wie ich früher zeigte, ist die Milch gewöhnlich nur äußerst schwach sauer) verursacht eine sehr kleine Quantität Säure eine große relative Verminderung der OH-Ionen. Ich sagte mir dann weiter, wenn dem so ist, so muß die zerstörende Wirkung der Milch um so stärker sein, je nachdem die Temperatur höher ist. Bestimmt man also das Verhältnis der Gerinnungszeiten für zwei Proben Milch, deren Wasserstoff- bzw. Hydroxytionenkonzentration nur ein wenig verschieden ist, so muß man bei verschiedenen Temperaturen nicht dasselbe Verhältnis finden.

1 ccm der Lösung (15 mg pro 15 ccm HCl 0,2%) wurde im einen Fall mit 2 ccm HCl 0,2% im anderen mit 1 ccm dieser Säure und 1 ccm Wasser verdünnt. Von diesen Flüssigkeiten, die also 0,2% und 0,13% HCl enthielten, wurden die Gerinnungszeiten (1 : 20 Milch) bei $37,5^{\circ}\text{C}$. und $25,5^{\circ}\text{C}$. bestimmt.

Bei $37,5^{\circ}\text{C}$. 97" für die erste, gegen 220" für die zweite Enzymlösung.
 „ $25,5^{\circ}$ 5'20" „ „ „ „ 6'54"

Der Versuch ist schlagend und ich kann das Resultat nicht anders erklären als durch die Zerstörung des Enzyms in der Milch bei höherer Temperatur.

Ein zweiter Versuch, wobei auch einmal mit 2 Teilen Wasser verdünnt wurde, gab:

- | | | |
|--|------------|------|
| 1. 1 ccm (von der Lösung 1 + 2 Teile HCl 0,2%) | + 20 Milch | 46" |
| 2. 1 " (" " " 1 + 1 HCl 0,2% + 1 Wasser) | + 20 | 79" |
| 3. 1 " (" " " 1 + 2 Wasser) | + 20 | 178" |

Dasselbe bei $25,5^{\circ}\text{C}$.: 1. 156", 2. 201" und 3. 273".

Daß hier die mit 2 Teilen Wasser verdünnte Lösung in 4–5 Minuten gerann, während mit anderer Milch in 10 Minuten noch keine Gerinnung eintrat, ist vielleicht so zu erklären, daß der (potentielle) Säuregrad zu 19,2 gefunden wurde gegen 16,0 im ersten Fall.

Beim gereinigten Schweinsenzym ist die bei Bruttemperatur gefundene Gerinnungszeit kein Maß für das koagulierende Enzym, wenn nicht in ziemlich konzentrierter Lösung gearbeitet wird.

Gewin hat gezeigt,¹⁾ daß das gereinigte Schweinsenzym dem Zeitgesetz nicht folgt. Bedenkt man, daß die Zersetzung des Enzyms relativ stärker ist bei geringerer Konzentration, so ist dieses Resultat, ganz wie man es erwarten konnte. Ich führe folgendes Beispiel an, um den Einfluß der Temperatur auch hier zu zeigen. 1 : 20 Milch.

	23° C.	37° C.
Unverdünnt	3' 15"	42"
5 mal verdünnt (mit HCl 0,2%)	16' 34"	17'.

Bei 23° C. folgt das Enzym dem Zeitgesetz in großer Annäherung, bei 37° C. zeigt sich die Gerinnungszeit infolge der teilweisen Zerstörung derjenigen bei 23° C. ungefähr gleich. Weiter erwähnt Gewin die Tatsache, daß durch Digerieren mit Salzsäure das Enzym noch empfindlicher wird dem Alkali gegenüber. Es war nach obigem also wahrscheinlich, daß ich bei meinem auf S. 317 erwähnten Versuche durch Erhitzen mit HCl 0,2% nur scheinbar eine chymosinfreie Lösung erhalten hatte, denn die Gerinnungszeit wurde bei 37° C. bestimmt. Folgende Bestimmung, mit dem Rest der Flüssigkeiten ausgeführt, zeigt dies sehr deutlich.

	Bei 37,5° C.	Bei 30° C.
Nicht erwärmt	35"	Nicht erwärmt 55"
Erwärmt	> 6 Stunden.	Erwärmt 8'.

Nur scheinbar war also die labende Wirkung vernichtet, und es kann angenommen werden, daß auch in der Lösung, aus der ich durch Dialyse und Fällung das gereinigte Enzym erhielt, noch reichlich koagulierendes Enzym sich vorfand.

Bei Wiederholung dieses Versuchs wurde nun die Lösung so lange erhitzt, daß die Gerinnungszeiten bei 25,5° C. 91" für die nicht- und 31' für die erwärmte Lösung waren. Bei 37,5° C. fand ich dann 33" und > 6 Stunden. Nach Mett 5,2 und 2,3 mm. Beim Versetzen mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ zeigte sich deutlich, daß hier viel mehr Enzym vernichtet war als beim

¹⁾ Gewin, l. c.

ersten Versuch, was nach der längeren Erhitzung, und auch nach den Zahlen nach Mett, zu erwarten war. Der Niederschlag blieb nämlich in der $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung suspendiert: beim Filtrieren wurde jedoch ein vollkommen klares Filtrat erhalten, das schwache Biuretreaktion zeigte. Nach dem Lösen, Dialysieren und passender Verdünnung wurde gefunden:

Ursprüngl. Lösung	64", nach Mett 4,0 mm.
Erw. und gereinigte Lösung	68" 4,3

Auch hier zeigt sich die mit dem gereinigten Enzym dargestellte Lösung fast vollkommen identisch mit der ursprünglichen Flüssigkeit.

Man könnte noch meinen, die Vernichtung während des Gerinnungsversuchs bei höherer Temperatur sei für die erwärmte Lösung nur auf die Verdünnung infolge der teilweisen Zersetzung beim Digerieren mit Salzsäure zurückzuführen. Aus folgendem Versuch geht deutlich hervor, daß die Erwärmung das Enzym empfindlicher macht gegen die Wirkung der OH-Ionen der Milch.

Eine Lösung des gereinigten Enzyms wurde so lange digeriert, daß bei 30°C . die Gerinnungszeiten waren 61" und 9' 35". Bei 23°C . wurde dann gefunden 2' 46" und 14'. Ich verdünnte dann die nicht erwärmte Flüssigkeit so weit, daß die Zeit bei 23°C . 14' 50" war, also ungefähr dieselbe wie für die erwärmte Lösung. Bei 30°C . wurde dann aber bei dieser Verdünnung die Milch in 7' 45" zur Gerinnung gebracht, und ich schließe daraus, daß die erwärmte Lösung mehr geschädigt wird als die nicht erwärmte, ganz so wie es nach Gewins Untersuchungen zu erwarten war.

Durch Reinigen verliert das Enzym aber wieder diese größere Empfindlichkeit, wie aus obigen Versuchen hervorgeht.

Es leuchtet ein, daß durch diese Ergebnisse die Tatsache, daß man durch Digerieren mit Salzsäure eine Lösung erhalten kann, die stark verdauend, nicht aber gerinnend wirkt, nicht mehr als Argument beigebracht werden kann für die Dualität, jedenfalls nicht bei Lösungen von Schweinsenzym. Weil aber Hammarsten nur in Kalbsmagenextrakt typisches Chymosin annimmt, und weiter weil viele einander widersprechende Be-

obachtungen durch verschiedene Forscher eine sehr einfache Aufklärung finden würden, wenn die für das erwärmte Schweinsenzym beobachtete Erscheinung auch für das Kalbspräparat gefunden würde, so habe ich eine nach Hammarsten bereitete Kalbsmageninfusion in dieser Richtung geprüft.

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

Aus diesem einfachen Versuch ist ersichtlich, daß dieselbe Erscheinung sich beim Kalbsenzym zeigt, aber weniger ausgesprochen. Auf Grund der Zahl 166'' für die nicht erwärmte Lösung bei 25,5° C. hätte man für die erwärmte

Flüssigkeit die Zeit $\frac{166}{75} \times 4 \text{ Stunden} = 8\frac{4}{5} \text{ Stunden}$ erwarten

können. Nach 99 Minuten trat aber sehr deutlich Gerinnung ein. War aber bei 25,5° C. die schädigende Wirkung der OH-Ionen der Milch ganz aufgehoben? Um dies zu prüfen, ließ ich das Enzym bei 0° C. einwirken. Zu diesem Zwecke wurden einige dünnwandige Reagierröhrchen mit 10 ccm Milch gefüllt und in Eis abgekühlt. Nach einer Viertelstunde wurde mit 0,5 ccm der Enzymlösung vermischt und nach gemessenen Zeiten ein Röhrchen in das Wasserbad von 37° C. übergebracht und die Zeit bestimmt, nach welcher Gerinnung eintrat. Für die nicht erhitzte Enzymlösung wurde der Versuch gleichzeitig ausgeführt, aber erst wurde mit HCl 0,2% verdünnt 1 : 10, damit die Gerinnungszeit bei höherer Temperatur so lang ausfiel, daß die Zeit für die Erwärmung der Milchenzymmischung von 0° auf 37° C. noch klein genannt werden konnte. Die Methode ist natürlich weniger genau als die direkte Bestimmung: wie man sieht, handelt es sich aber um so große Differenzen, daß die Zahlen zur Orientierung sehr gut geeignet sind.

Die Mischung stand bei 0° C.:		Dann Gerinnung nach:
Die nicht erwärmte Lösung 1:10.	40'	11'
	71'	10' 10''
	140'	3' 27''
	185'	2' 18''
	235'	1' 6''
	310'	43''
Die erwärmte Lösung	375'	1' 25''

Nach 375 Minuten war also die Milch so weit umgesetzt durch das erwärmte Enzym, daß in 1' 25" Gerinnung eintrat. Die nicht erwärmte Lösung in 235 Minuten so weit, daß in 1' 6" Gerinnung eintrat.¹⁾ Für die nicht verdünnte Lösung wäre das nach 23,5 Minuten. Nach diesen Zahlen beurteilt, wäre das Verhältnis für das koagulierende Enzym in der erwärmten und nicht erwärmten Lösung: $23,5 : 375 = 1 : 16$.

Bei 37,5° C. gemessen ist es: $75 : 4 \times 60 \times 60 = 1 : 192$.

Schließlich bemerke ich noch, daß die Verdauung nach Mett 1,5 und 3,3 mm war, also das Verhältnis 1 : 4,8.

Ein zweiter Versuch lieferte das Verhältnis 1 : 22 für die Gerinnungszeiten. Wie schon erwähnt wurde, ist die Methode nicht genau, man kann aber mit Sicherheit aus diesem Versuch schließen, daß beim erwärmten Kalbsenzym sich dieselbe Erscheinung zeigt, die oben für das Schweinsenzym gefunden wurde.

Die Bestimmung der Gerinnungszeit bei Brutttemperatur für nach Hammarsten bereitete erwärmte Kalbsmageninfusionen gibt kein Maß für das in diesen Lösungen enthaltene koagulierende Enzym. Beim Digerieren mit Salzsäure von Kalbsmageninfusionen wird es nur scheinbar vernichtet.

Wie schlagend mir die Versuche Hammarstens im Anfang auch erschienen sind, unter diesen Umständen muß ich denselben die beweisende Kraft für die Dualität absprechen. Allerdings besteht noch ein großer Unterschied zwischen dem Verhältnis 1 : 4,8 nach Mett und 1 : + 20 für die Gerinnungszeiten. Dazu will ich aber bemerken, daß es nicht unmöglich, ja selbst wahrscheinlich ist, daß auch bei 0° C. das erwärmte Enzym nicht vollkommen intakt bleibt. Weitere Untersuchungen müssen lehren, ob es möglich sein wird, vollkommene Parallelität zu erreichen.

¹⁾ Man bedenke dabei, daß der Versuch immer zum Nachteil der erwärmten Lösung ausfallen muß. Während der Erwärmung der Mischung wird das Enzym in der letzteren viel stärker zersetzt als in der nicht erwärmten Flüssigkeit.

Schließlich erlaube ich mir, ganz kurz die Resultate anderer Forscher zu besprechen.

In seiner letzten ausführlichen Abhandlung über den in Frage stehenden Punkt hat Hammarsten noch Versuche mitgeteilt mit Infusionen von Pferde-, Hühner- und Hechtmägen, wobei die erhaltenen Resultate als starker Beweis gelten konnten für die Nichtidentität der Enzyme. Jetzt glaube ich diese Beobachtungen so erklären zu müssen, daß diese Infusionen in neutraler Milch schnell geschädigt werden und zwar desto schneller, je größer die Verdünnung ist. Um dies zu prüfen, könnte man z. B. vergleichende Versuche bei 25° und 37° C. machen: ich vermute, daß man zu merkwürdigen Resultaten kommen wird. Auch die Resultate Pawlows mit Hundemagensaft scheinen mir darauf hinzuweisen, daß bei den Gerinnungsversuchen in neutraler Lösung das Enzym zerstört wird und infolgedessen bei Verdünnung die Gerinnungszeit viel schneller zunimmt, als es der Verdünnung entspricht. Auch dies scheint mir der Mühe näherer Prüfung wert.

Ich komme jetzt zur Kritik Hammarstens (Seite 70 seiner zitierten Arbeit) auf Gewins Arbeit. Erstens weist jener Autor darauf hin, daß ein Vergleich zwischen seinen Untersuchungen und denjenigen von Gewin nicht statthaft ist, weil letzterer mit konzentrierter, Hammarsten dagegen mit mehr verdünnter Lösung arbeitete. Dann wird bemerkt, daß bei den Versuchen Gewins ebenso gut die Parallelität für Gerinnung und Verdauung aufhört, wenn die Konzentration beim Digerieren mit Salzsäure kleiner geworden ist. Auch Gewin hatte dies natürlich konstatiert, meinte aber, man sei hier an der Grenze angekommen, wo die Enzymlösung zu schwach wird, um im Verhältnis 2 : 8 mit genügender Genauigkeit Milch zur Gerinnung zu bringen, zur Vergleichung dieses Ergebnisses mit demjenigen der Digestionsprobe. Zur gleichen Zeit fangen die beiden Proben an, verschiedene Zeitdauer aufzuweisen.*¹⁾

Gegen diesen Passus bemerkt Hammarsten, daß man Gerinnungen in 1—4 Minuten, um die es sich hier handelt, noch

¹⁾ Spatierung von mir.

ganz genau ausführen kann und zwar schärfer als bei Zeiten von 10 bis 40 Sekunden. Dieser Ansicht schließe ich mich an, und ich kann dabei noch bemerken, daß ich durch noch nicht veröffentlichte Untersuchungen, in welchen der mittlere Fehler in der Bestimmung der Zeit als Funktion dieser Zeit bestimmt wurde, als meist günstige Gerinnungszeit + 3 Minuten gefunden habe. Die Sache liegt, wie ich glaube, so, daß beim Digerieren nach einer bestimmten Zeit die oben gefundene Wirkung der Milch sich bei der Gerinnung geltend macht und dies erklärte auch, warum die Gerinnungszeiten der zwei Proben unter sich verschieden ausfielen, denn es kommt dabei ein sehr unsicheres Moment mit ins Spiel. Daß Gewin bei seinen Untersuchungen die oben beschriebene schädliche Wirkung der Milch nicht beobachtet hat, schreibe ich dem zu, daß er im allgemeinen mit konzentrierten Enzymlösungen gearbeitet hat. Weiter macht Hammarsten interessante Bemerkungen über Gewins Resultate, die einander zum Teil widersprechen. Ich entnehme der Arbeit Hammarstens den Auszug aus Gewins Tabelle II, nach welcher die Proteolyse in 5 Tagen auf $\frac{1}{5}$ herabgegangen ist, während nach Stab 9 die Chymosinwirkung auf $\frac{1}{2}$, nach Stab 10 dagegen auf $\frac{1}{21}$ herabgegangen ist.

Datum	9	10	11.
	Saure Lösung		
	1 ccm + 1 ccm Wasser Gerinnung in Sek.	0,2 ccm + 1,8 ccm Wasser Gerinnung in Min.	$4\frac{1}{2}$ ccm + $5\frac{1}{2}$ ccm Wasser, 0,2% HCl Proteolyse
1. Mai	5	$1\frac{2}{3}$	32,49
6. »	10	34—37	6,76
Abnahme	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{21}$	$\frac{1}{4,8}$

Hierüber schreibt Hammarsten:

«Ein Blick auf den obigen Auszug aus der Tabelle II zeigt, daß der Unterschied zwischen den Lösungen (Stab 9 und 10) nur in einer ungleich starken Verdünnung mit Wasser besteht. Man sieht also, daß ein und dieselbe Lösung, wenn sie reicher

an Enzym und Säure ist, eine bedeutend geringere Abnahme der Chymosinwirkung anzeigt, als wenn sie ärmer an Enzym und Säure ist, und demselben Verhalten begegnet man auch in der Tabelle III».

Nach den Ergebnissen meiner Untersuchungen konnte man hier für Stab 9 und 10 nicht dasselbe Verhältnis erwarten. Bei der größeren Verdünnung von Enzym und Säure in Stab 10 wird offenbar am 6. Mai das Enzym während des Gerinnungsversuchs schon stark geschädigt und dies erklärt die Abnahme auf $\frac{1}{21}$, während die Zerstörung in dem mehr sauren Medium nicht oder viel weniger stattfindet.

Warum nach der Gerinnung in mehr saurer Lösung die Abnahme nur auf $\frac{1}{2}$ gefunden wurde, nach Mett aber auf $\frac{1}{4,8}$, ist mir nicht verständlich; ich halte es aber für möglich, daß bei so kurzen Gerinnungszeiten (5 und 10 Sekunden) erhebliche prozentische Fehler gemacht werden. Auch andere Widersprüche in Gewins Zahlen, die von Hammarsten hervorgehoben wurden, finden in demselben Umstande ihre Erklärung.

Bei näherer Betrachtung von Gewins Versuchen findet man Beobachtungen, die sich sehr gut erklären lassen durch meine Resultate. Er hat z. B. gefunden (Seite 45 und 46), daß das Kalbsenzym bei 64maliger Verdünnung Abweichungen von dem Zeitgesetz zu zeigen anfing, während das Schweinsenzym schon bei 4maliger Verdünnung abnormale Zahlen gab. Wurde statt mit Wasser mit Chlorcalciumlösung verdünnt, so wurde noch bei 32maliger Verdünnung diesem Gesetze Genüge geleistet; bei saurer Reaktion noch bei 128maliger Verdünnung. Er schreibt: «Beurteilt nach der Wirkung bei saurer Reaktion, war die Lösung des Schweinsenzyms doppelt so stark als diejenige des Kalbsenzyms. Wurde bei dieser Reaktion so weit verdünnt, daß die Gerinnungszeit auf 10 Sekunden kam, so labte bei neutraler Reaktion das Kalbsenzym in 160—170 Sekunden, das Schweinsenzym aber erst in mehr als einer Stunde. Man kann also sagen, daß das Schweinsenzym durch Neutralisation mit Alkali mehr geschädigt wird als das Kalbsenzym.»

Obwohl es feststeht, daß dies der Fall ist, scheint mir doch darin nicht die einzige Ursache der Erscheinung gelegen zu sein. Ich glaube vielmehr, daß in den neutralen Milchenzymmischungen das Schweinsenzym stark, in der mit Chlorcalcium versetzten infolge der Vermehrung der H-Ionenkonzentration weniger stark und in den sauren Lösungen nicht oder sehr wenig zersetzt wird. Weiter glaube ich auch, daß der verschiedene Einfluß von CaCl_2 auf Bangs Parachymosin (Schweinsenzym) und Chymosin erklärt werden kann durch die Vermehrung des reellen Säuregrads der Milch beim Hinzufügen von CaCl_2 , wie ich früher gefunden habe; beim Parachymosin wird dann nämlich die Zersetzung des Enzyms während der Gerinnungsversuche kleiner sein, ein Umstand, der beim Chymosin (Kalbspräparat) nicht in Betracht kommt.

Weiter muß ich noch die bekannten Versuche Schmidt-Nielsens¹⁾ erwähnen. Dieser Forscher hat eine Versuchsanordnung gewählt, durch welche die Dualität der Enzymwirkungen in sehr schlagender Weise zutage gebracht zu werden schien. Er erwärmte bekanntlich eine Kalbsmageninfusion so lange, daß sie ihre labende Wirkung in neutraler Milch größtenteils verloren hatte (Gerinnung in 4—6 Stunden). Dann verdünnte er den nicht erwärmten Teil so weit, daß Milch in derselben Zeit zur Gerinnung kam. Wiederholte er dann die Gerinnungsversuche, nachdem der Milch 0,4‰ HCl zugesetzt war, so zeigte sich, daß für die verdünnte Enzymlösung die Gerinnungszeit z. B. von 355 auf 215 Minuten fiel, für die digerierte aber von 370 auf 6 Minuten. Schmidt-Nielsen gibt diese Erklärung, daß beim Digerieren hauptsächlich das Chymosin vernichtet wird, das Pepsin nur wenig. In neutraler Lösung wirkt das Pepsin nicht, in der sauren Milch aber wirkt das Pepsin, und dies würde auch eine Fällung zur Folge haben. In der verdünnten, nicht digerierten Lösung ist auch das Pepsin so verdünnt, daß man nicht eine so viel schnellere Gerinnung erwarten könnte. Die geringere Pepsinkonzentration letzterer Lösung wurde durch sehr viel

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLVIII, S. 92.

langsamere Fibrinverdauung gezeigt. Gewin gibt wörtlich folgende Auffassung: «in der digerierten Lösung wird das Enzym durch Neutralisieren abgeschwächt, durch darauffolgendes Ansäuern wird aber ein Teil behalten, der imstande ist, eine Fibrinflocke in ziemlich kurzer Zeit zu lösen, während in der nicht digerierten Lösung das Enzym durch Neutralisieren weniger geschädigt wird und labende und proteolytische Wirkung durch Verdünnen in gleichem Maße abnehmen». Hammarsten zeigte aber, daß auch bei bloßer Verdünnung mit Wasser der sauren Enzymlösungen ein solches Resultat erhalten wird; weil dieser Forscher keine Zahlen gibt für die Gerinnung von angesäuerter Milch, habe ich Schmidt-Nielsens Versuch wiederholt und dabei selbst die Verdünnung mit Wasser unterlassen. Es wurde 1 ccm der sauren Enzymlösung (0,2% HCl) mit 25 ccm Milch gemischt. Lösung A ist die erwärmte, Lösung B die nicht erwärmte, aber verdünnte Lösung. Bei der «sauren Milchgerinnung» enthielt die Milch-Enzymmischung im ganzen 0,64‰ HCl.

Tabelle VI.

	Lösung A	Lösung B
1. Neutrale Milchkoagulation	315'	310'
Saure	2' 43"	35'
2. Neutrale Milchkoagulation	250'	240'
Saure	3' 22"	50'

In 2 war bei der sauren Milchkoagulation im ganzen 0,5‰ HCl zugesetzt.

Wie sich das ganze Bild ändert, wenn der Versuch statt bei 37° C. bei 26° C. ausgeführt wird, zeigt folgende Messung. (Dieselbe Milch von 2, ebenfalls mit 0,5‰ HCl angesäuert).

Tabelle VII.

	Lösung A	Lösung B
Neutrale Milchkoagulation	< 105'	330'
Saure	11' 45"	91'

In diesen Versuchen wurde also gar nicht neutralisiert und doch ist das Resultat dem Befunde Schmidt-Nielsens sehr ähnlich. Daraus ist also zu schließen, daß nicht die Neutralisation vor der Mischung mit Milch die Ursache der Erscheinung ist, wie Gewin meinte. Ich erkläre mir die Sache wieder einfach so, daß das Enzym der erwärmten Lösung bei neutraler Milchkoagulation fast ganz zerstört wird, das verdünnte, nicht erwärmte in weit geringerem Maße. Durch die hinzugesetzte Salzsäure wird die OH-Ionenkonzentration so bedeutend herabgedrückt, daß auch das erwärmte Enzym nicht oder fast nicht geschädigt wird, was sich durch die ganz kurzen Gerinnungszeiten kund gibt.

Auch die anscheinend so schlagenden Versuche Schmidt-Nielsens haben also, wie mir scheint, ihre beweisende Kraft verloren. Schließlich erinnere ich an die Untersuchungen Sawitschs,¹⁾ die mir jetzt von ganz besonderem Interesse erscheinen. Erstens hat dieser Forscher für Magensaft eines Hundes fast vollkommene Parallelität für Gerinnung und Verdauung gefunden. Die Versuchsanordnung war eine solche, daß eventuelle Zerstörung des Enzyms durch die Hydroxylionen der Milch darum nicht störend auf die Resultate einwirken konnte, weil gearbeitet wurde mit Lösungen von derselben Enzymkonzentration, nach der Koagulation gemessen, und somit die Zersetzung des Enzyms in den zu vergleichenden Lösungen die gleiche war. Zweitens hat er den Saft digeriert mit Salzsäure, findet aber dann nicht ein Auseinandergehen der beiden Wirkungen. Ich halte es für möglich, daß infolge der Neutralisation mit NaHCO_3 soviel Kohlensäure gelöst bleibt, daß bei der Mischung 1 : 5 Milch die H-Ionen noch so zunehmen, daß das Enzym fast nicht zersetzt wird; darüber könnte aber erst eine nähere Untersuchung entscheiden. Bei der Besprechung der Versuche Schmidt-Nielsens glaubt Sawitsch diese Resultate in derselben Weise als Gewin erklären zu müssen und er führt zu diesem Zwecke ein paar Versuche an, aus denen hervorgehen soll, daß das Auseinander-

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. LV, S. 4.

gehen der beiden Wirkungen sehr wohl der Neutralisation zugeschrieben werden kann. Ich muß gestehen, daß diese Versuche nicht sehr überzeugend auf mich gewirkt haben, denn die gefundenen Unterschiede sind sehr klein im Vergleich mit den von Schmidt-Nielsen gefundenen. Wie ich aber erwähnte, ist diese Erklärung nicht stichhaltig, denn bei Vermeidung der Neutralisation findet man dasselbe. Interessant ist aber, daß Sawitsch das Auseinandergehen der beiden Wirkungen infolge Neutralisation mit NaOH und NaHCO₃ aufheben konnte durch Hinzufügen großer Mengen Chlorcalcium. Dadurch wird die H-Ionenkonzentration bedeutend gesteigert und es wäre wünschenswert, zu untersuchen, ob nicht auch hier der bisher nicht beachtete Einfluß der OH-Ionen der Milch eine Rolle spielt. Die Tatsache, daß der mit NaOH neutralisierte Saft ohne CaCl₂ stark von dem Zeitgesetz abweicht (Tabelle VII seiner Arbeit), spricht stark dafür. Auch Tabelle VI weist darauf hin.

Wenn ich nun schließlich alle die von den verschiedenen Forschern erhaltenen Resultate zusammenstelle, so sehe ich keinen Grund mehr, um zwischen einem verdauenden und gerinnenden Enzym im Magensaft zu unterscheiden, eine Auffassung, zu welcher die schönen Untersuchungen Hammarstens früher notwendig führen mußten.

Jetzt scheint mir die einfachere Vorstellung, das Chymosin und Pepsin seien identisch, die am meisten begründete. Ich bin weit davon entfernt, diese interessante Enzymfrage als erledigt zu betrachten; schon die Tatsache allein, daß das von Hammarsten mittels Cholesterin dargestellte Chymosin noch nicht auf Verdauung geprüft wurde (nach Reinigen natürlich), würde eine solche Auffassung nicht gestatten. In einer solchen «Trennung» von Chymosin und Pepsin ohne weiteres einen Beweis für die Dualität zu sehen, davon kann, wie ich glaube, nunmehr nicht die Rede sein. Und wenn ich mich nun frage, was die nächste Aufgabe sein wird in diesem so verwickelten Probleme, so scheint mir das Studium, qualitativ und quantitativ, von dem Einflusse der äußeren Umstände (Art und Menge der Verunreinigungen, Alkalität, Temperatur usw.) auf dieses empfindliche Enzym — Untersuchungen also, wie sie von Gewin

aufgenommen sind — am meisten aussichtsvoll. Ich kann nämlich der Ansicht Hammarstens nicht beitreten, es sei besser, mit Kalbsmageninfusionen zu arbeiten als mit Enzymlösungen, nach Pekelharing bereitet. Vergleicht man den Gehalt an Trockensubstanz der letzteren, bei gleich starker labender Wirkung, mit den Zahlen von Hammarsten, so springt der enorme Unterschied ins Auge. So lange die Frage einen gewissermaßen praktischen Hintergrund hatte, die Wirkung des Magensaftes als solche kennen zu lernen, war die Arbeitsweise Hammarstens mehr gerechtfertigt, für den rein wissenschaftlichen Zweck tut man meiner Meinung nach besser, mit möglichst gereinigten Lösungen anzufangen.

Schließlich möchte ich auch hier Herrn Prof. Pekelharing meinen verbindlichsten Dank abstaten für die Freundlichkeit, mir große Mengen gereinigtes Pepsin zur Verfügung zu stellen.

Zusammenfassung.

Es wurde gefunden:

1. Gereinigtes Schweinsenzym liefert beim Digerieren mit HCl 0,2% eine Lösung, die nicht gerinnend und kräftig verdaulich auf Hühnereiweiß wirkt.

2. Die erwärmte Lösung verdaute, bei $0,7 \times 10^{-5}$ -n-H, kräftig Casein. Als Ursache dafür, daß früher bei erwärmten Kalbsmageninfusionen nur geringe Verdauung des Caseins gefunden wurde, zeigte sich die Tatsache, daß in den Kalbsmageninfusionen die Pepsinwirkung überhaupt eine geringere war. Für Handelslab ist sie meistens äußerst gering, was die früher gefundene vollkommene Parallelität für Caseinverdauung und Gerinnung erklärt.

3. Durch Reinigen der erhitzten, nicht labenden Schweinspepsinlösung (Dialyse und Fällung mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) wurde eine Enzymlösung erhalten, die mit der nicht erwärmten Lösung vollkommen identisch war; das koagulierende Enzym war also nur scheinbar vernichtet bei der Digestion.

4. Das gereinigte Schweinspepsin wird während des Gerinnungsversuchs durch die Hydroxylionen der Milch stark ge-

schädigt. Mit HCl 0,2% digeriertes Enzym ist noch bedeutend empfindlicher in dieser Hinsicht. Sobald die Temperatur höher ist, wird es mehr geschädigt. So wurde z. B. gefunden:

Bei 37,5° C.		Bei 30° C.	
Nicht erwärmt,	Gerinnung in 35''.	Nicht erwärmt	55''.
Erwärmt,	6 Stunden.	Erwärmt	8'.

Für das Schweinsenzym ist also die Gerinnungszeit bei Bruttemperatur kein zuverlässiges Maß für das koagulierende Ferment.

5. Für nach Hammarsten bereitete Kalbsmageninfusion wurde dasselbe gefunden. Nach den Gerinnungsversuchen bei 37° C. wurde für die nicht erwärmte und die digerierte Lösung das Verhältnis des Enzyms zu 1 : 192, bei 0° C. zu 1 : + 20 gefunden.

Nach Mett fand ich dann 1 : 4,8.

Die langen Gerinnungszeiten der erwärmten Kalbsmageninfusionen sind der Zersetzung des Enzyms durch die Hydroxylionen der Milch zuzuschreiben.

6. Mehrere Widersprüche in den Resultaten verschiedener Forscher finden eine einfache Erklärung in dieser bisher nicht genügend beachteten Erscheinung.

7. So wird der bekannte Versuch Schmidt-Nielsens auch ganz einfach dadurch erklärt, daß die erwärmten Lösungen bei «neutraler Koagulation» stark zerstört werden, bei «saurer Koagulation» dagegen nicht infolge der bedeutenden Verminderung der OH-Ionen in der Milch. Es wurde weiter gezeigt, daß die Erscheinung nicht auf Schädigung durch die Neutralisation zurückgeführt werden kann, denn auch ohne Neutralisation findet man ein starkes Auseinandergehen der beiden Wirkungen.

8. Es liegt kein Grund mehr vor, zu unterscheiden zwischen proteolytischem und koagulierendem Enzym im Magensaft. Nur den äußeren Umständen zufolge tritt bald die eine, bald die andere Wirkung in den Vordergrund, wie es von Pawlow, Pikelharing, Gewin u. a. angenommen wird.

Hoorn, Dezember 1909. Reichslandw. Versuchstation.