

Über die Wirkung des Labs auf Paracaseinkalk.

Von

W. van Dam.

Mit zwei Kurvenzeichnungen.

(Der Redaktion zugegangen am 30. Juni 1909.)

Bei meinen Untersuchungen über den Edamerkäsebereitungsprozess, über welche an anderer Stelle ausführlich berichtet werden soll, bin ich zu Resultaten gelangt, welche auch für die Leser dieser Zeitschrift von Interesse sein möchten.

In einer früheren Arbeit¹⁾ wurde gezeigt, daß das Labenzym in seiner Wirkung stark beeinflusst wird von Wasserstoffionen, und zwar ist die Gerinnungsgeschwindigkeit der Konzentration dieser Ionen proportional. Nach der Auffassung Sawjalows,²⁾ welcher Gewin³⁾ sich auch auf Grund der Untersuchungen van Herwerdens anschließt, ist die Milchgerinnung als eine Folge der anfangenden Caseinverdauung zu betrachten. Von diesem Gesichtspunkte aus wäre also obiges Resultat so zu deuten, daß die Geschwindigkeit der Caseinverdauung durch Lab im Anfang den Wasserstoffionen proportional gesetzt werden kann. Petry hat gefunden, daß die Labwirkung nach dem Gerinnen weitergeht. Es war interessant, zu wissen, wie die Verdauung des Paracaseinkalkes durch das Labenzym von der Konzentration der Wasserstoffionen abhängt. Ich bin in folgender Weise zu Werke gegangen.

¹⁾ Beitrag zur Kenntnis der Labgerinnung. Diese Zeitschrift, Bd. LVIII, S. 295.

²⁾ Zur Frage nach der Identität von Pepsin und Chymosin. Diese Zeitschrift, Bd. XLVI, S. 307.

³⁾ Pepsin und Chymosin. Diese Zeitschrift, Bd. LIV, S. 32.

5 l scharf zentrifugierte frische Milch wurden bei $\pm 30^{\circ} \text{C}$. mit Lab versetzt; nach einer Viertelstunde trat Gerinnung ein. Die Masse wurde nun sogleich in 20 l kaltes Wasser gegossen, nach dem Absitzen wurde dekantiert und von neuem 20 l Wasser zugegeben. Nach sechsmaliger Wiederholung dieser Operation, wobei möglichst schnell gearbeitet wurde, filtrierte ich durch Nesseltuch und verrieb die Masse mit Alkohol. Nach Filtrieren und Abwaschen mit 96 %igem Alkohol auf dem Saugtrichter wurde das erhaltene Produkt in Äther gebracht und schließlich gründlich mit Äther gewaschen. Bei sorgfältiger Arbeit wird ein staubfeines Präparat erhalten, das also aus Paracaseinkalk mit den unlöslichen Milchphosphaten zusammengesetzt ist. Mit diesem Pulver wurde folgender Versuch gemacht.

Acht weite, innen paraffinierte Reagierröhren wurden mit derselben Menge des Präparates beschickt (4 g auf jedes Rohr). Vier der Gläser wurden dann mit 35 ccm CO_2 -freier verdünnter Salzsäure in steigenden Konzentrationen und 80 mg Thymol versetzt und in einem großen Thermostaten bei 25°C . sehr langsam rotiert während 24 Stunden; dann wurde jedem Rohr 5 ccm Lab (van Hasselt) zugesetzt und von neuem 42 Stunden lang geschüttelt. Gleichzeitig wurden die vier andern Gläser, welche von Anfang an mit denselben Salzsäurelösungen und Thymol rotiert waren, mit 5 ccm Lab, das aber durch dreistündiges Erhitzen getötet war, versetzt und ebenfalls bei 25°C . geschüttelt; diese dienten also als Kontrollröhren. Nach 66 Stunden im ganzen also wurden die Lösungen filtriert und im Filtrate der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt und die Wasserstoffionenkonzentration gemessen. Das Resultat gibt Tabelle I.

Tabelle I.

	$\text{C}_\text{H} \times 10^5$	N (ccm $\frac{1}{10}$ -n-Säure)	N im Kontrollrohr	Verdaut
1.	0,105	12,2	1,7	10,5
2.	0,33	20,2	2,4	17,8
3.	0,78	27,6	3,2	24,4
4.	1,36	28,9	2,6	26,3

Graphisch dargestellt liefert diese Tabelle Kurve 1.

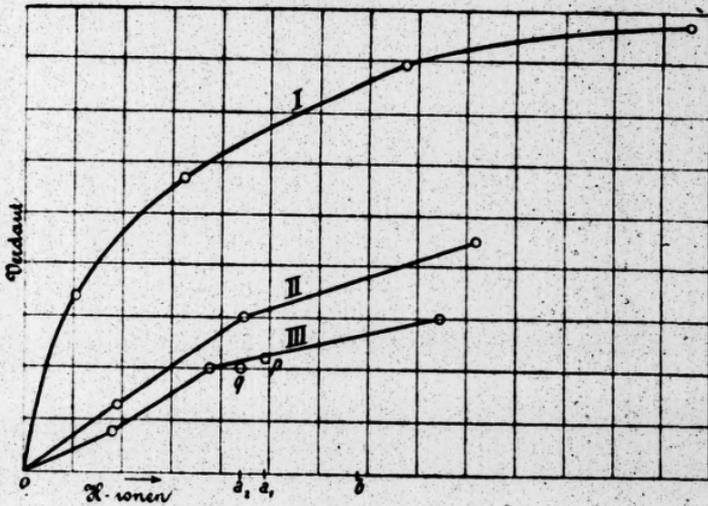


Fig. 1.

Man sieht auch hier die Labwirkung stark zunehmen bei steigender Wasserstoffionenkonzentration. Bei den höheren Konzentrationen läuft die Kurve der Abszisse fast parallel. Das ist wohl dem Umstande zuzuschreiben, daß für 4 schon 58,2 % des Gesamteiweißes in lösliche Form übergeführt worden war; die hemmende Wirkung der Zersetzungsprodukte erklärt vollkommen die Krümmung nach der X-Achse. So wurde für 3 gefunden, nachdem noch 24 Stunden länger geschüttelt wurde, 28,3 ccm $\frac{1}{10}$ -n-Säure. Die Labwirkung hatte also fast ganz nachgelassen. Eine Abschwächung des Enzyms hatte nicht stattgefunden in diesen sauren Medien.

Durch dieses Resultat wurde ich dazu gebracht, den Versuch zu wiederholen mit weniger Lab, und zwar so, daß viel weniger Casein verdaut wurde, um die störende Wirkung der Zersetzungsprodukte möglichst auszuschalten. Weiter wurde Milchsäure statt Salzsäure verwendet. Auf 40 ccm Flüssigkeit wurden 0,6 ccm Lab zugegeben. Tabelle II gibt die gefundenen Zahlen.

Bei II₃ waren 30 %, bei III₃ 20 % des Caseins verdaut. Die Kurven II und III in der Figur geben das Resultat an. Die Ordinaten zeigen die Verdauung in Prozenten des Gesamt-

Tabelle II.

	$C_H \times 10^5$	N (in $\frac{1}{10}$ -n-Säure)	N im Kontrollrohr	Verdaut	
II.	1.	0,19	15,8	5,4	10,4
	2.	0,45	28,5	4,2	24,3
	3.	0,92	40,6	4,6	36,0
III.	1.	0,18	17,3	8,3	9
	2.	0,38	33,15	9,5	23,65
	3.	0,85	42	7,6	34,4

eiweißes. Die Abweichung von der Geraden ist in diesen Fällen schon bedeutend geringer als in Kurve I; immerhin zeigt sich bei II₃ und III₃ schon der Einfluß der Reaktionsprodukte. Ich glaube jedoch auf Grund dieser Resultate zu dem Schluß berechtigt zu sein:

Die verdauende Wirkung des Labenzymys dem Paracaseinkalk gegenüber ist der Wasserstoffionen-konzentration der Lösung proportional.

Es kann allerdings gegen diese Versuche eingewendet werden, daß die feste Phase in den verschiedenen Röhren nicht dieselbe war. Es wäre denkbar, daß im Falle der höchsten Säurekonzentration das Lab einwirkte auf aus dem Paracaseinkalke in Freiheit gesetztes Paracasein, während in den andern Röhren das nicht der Fall war. In folgender Weise habe ich zeigen können, daß die gefundene Verschiedenheit in der Stärke der Verdauung nur von der H-Ionenkonzentration abhängt. In zwei Röhren a und b wurden, wie oben angegeben wurde. 4 g des Präparats eingefüllt und mit derselben Menge Milchsäure (40 ccm, wie bei Versuch III) während 24 Stunden im Thermostaten bei 25° C. geschüttelt. Aus Rohr a wurde dann nach dem Absitzen die Hälfte der Flüssigkeit vorsichtig herauspipettiert und durch vollkommen CO₂-freies Wasser ersetzt. Dadurch wurde also der Gehalt an H-Ionen kleiner, es mußte sich ein anderes Lösungsgleichgewicht einstellen als in b. Beide Röhren wurden dann mit Lab versetzt (0,6 ccm pro 40 ccm, wie in III), und nachdem wieder 24 Stunden geschüttelt

war, in beiden filtrierten Lösungen die H-Ionenkonzentration bestimmt und in Lösung a auch der Stickstoff. Wäre obige Voraussetzung richtig, so hätte man erwarten können, daß Punkt p in der Zeichnung, welcher das Resultat dieses Versuchs angibt, außerhalb Kurve III liege; das ist aber innerhalb der Versuchsfehlergrenzen nicht der Fall. Bei einem zweiten Versuch wurde zweimal die Hälfte der Flüssigkeit durch Wasser ersetzt. Punkt q gibt das Resultat.

Hier folgen die gefundenen Werte.

Tabelle III.

In den Figuren bezeichnet mit	$C_H \times 10^5$	N (in $\frac{1}{10}$ -n-Säure)	Verdaut
a ₁	0,49	34,8	26,5
a ₂	0,44	32,8	24,5
b	0,68	—	—

Weiter könnte noch bemerkt werden, daß es möglich sei, daß die Konzentration der H-Ionen sich während des Versuchs erheblich ändert, die Bestimmung dieser Konzentration am Ende des Versuchs also kein richtiges Maß für den Gehalt dieser Ionen während des Versuchs wäre. Wie aus folgenden Zahlen hervorgeht, vermehrt sich zwar der Gehalt an H-Ionen ein wenig, aber in so geringem Maße, daß dadurch der Charakter obenstehender Kurven keineswegs geändert wird.

C_H nach 2 Stunden Labewirkung — $0,335 \times 10^{-5}$.

C_H » 24 » » — $0,351 \times 10^{-5}$.

Stellt man sich mit Sawjalow, Pekelharing, Gewin u. a. auf den Standpunkt der Identität vom Lab und Pepsin, und betrachtet man also die Milchgerinnung als eine Folge der Caseinverdauung, so hätte man kaum ein anderes Resultat erwarten können. Bei den Versuchen über die Milchgerinnung wurde die Zeit bestimmt, welche zur Fortschreitung der Caseinverdauung bis zu einem bestimmten Betrage, und zwar bei nahezu konstanter Caseinkonzentration, nötig war. Bei obigen Versuchen wurde die verdaute Menge des Caseins in einer be-

stimmten Zeit gemessen. In beiden Fällen wurde also die Verdauungsgeschwindigkeit gemessen, und diese wird von den H-Ionen in obengenannter Weise beeinflußt.

Der unitarischen Auffassung sind bekanntlich die Resultate Hammarstens¹⁾ gegenüber zu stellen. Dieser Forscher hat gezeigt, daß man durch Erwärmen von Kalbsmageninfusion mit 0,2% iger HCl bei bestimmter Konzentration eine Lösung erhält, welche kräftig proteolytisch, nicht aber milchgerinnend wirkt, während durch Behandlung mit MgCO₃ die Infusion eine Flüssigkeit liefert, welche stark labende, aber sehr schwach proteolytische Eigenschaften hat. In Hinsicht auf dieses noch immer strittige Problem war die folgende Frage vollkommen berechtigt: Welches Enzym ist es, das bei meinen Versuchen mit Labextrakt lösend auf das Paracasein gewirkt hat? Nach der Auffassung Hammarstens wäre hier in erster Linie an dem Labpräparate beigemengtes Pepsin zu denken. Wie aus den Tabellen I—III ersichtlich, war die Reaktion der Flüssigkeiten schwach sauer, eine Pepsinwirkung also nicht ausgeschlossen.

Petry²⁾ hat gefunden, daß die Labwirkung nicht bei der Paracaseinbildung stehen bleibt; auf Grund seiner Untersuchungen sagt er aber: «Das Labferment verdankt somit seine verdauende Kraft keiner Beimengung eines der bisher bekannten Fermente, sondern einem neuen proteolytischen Agens, welches sich gegen die ersteren durch seine strenge Spezifität für das Casein scharf charakterisiert.»

Frl. van Herwerden³⁾ kam, unabhängig von Petry, zu demselben Resultate, stimmt aber der Meinung nicht bei, daß es sich hier um ein Enzym handle, das spezifisch für Casein sei, und andere Eiweißverbindungen nicht zersetze. Das Hauptgewicht haben aber diese beiden Forscher gelegt auf die Bestimmung der Natur der entstehenden Zersetzungsprodukte, ohne die Labwirkung quantitativ studieren zu wollen.

Zur Lösung obengenannter Frage wurden nun die hier

¹⁾ Zur Frage nach der Identität der Pepsin- und Chymosinwirkung. Diese Zeitschrift, Bd. LVI, S. 18.

²⁾ Hofmeisters Beiträge, Bd. VIII, S. 356.

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. LII, S. 184.

zu beschreibenden Versuche gemacht. Erstens sagte ich mir: wenn das dem Lab beige gemengte Pepsin die Ursache der Verdauung ist, ist es unwahrscheinlich, daß Milchgerinnung und Verdauung bei verschiedenen Extrakten parallel gehen. Um dies zu prüfen, wählte ich mir drei Proben von verschiedener Herkunft, nämlich 1. Käselabpulver Hansen, 2. Labessenz einer hiesigen, kleineren Fabrik und 3. ein sehr schlechtes Präparat, das damals zufällig der Kontrollabteilung der Versuchsstation zugesandt war. 25 ccm Milch wurden mit 1 ccm Lablösung (1 : 20) versetzt, und die Gerinnungszeit bestimmt (bei 37,5° C). Die Stärke der Verdauung wurde in derselben Weise wie oben angegeben bestimmt. In je einer von 6 paraffinierten Röhren wurden 3 g Paracaseinkalkpräparat gewogen, mit 30 ccm $\frac{1}{20}$ -n-HCl versetzt und 24 Stunden im Thermostaten bei 25° C geschüttelt; dann wurde auf jedes Rohr 0,45 ccm Lablösung gegeben von den Proben 1, 2 und 3. Die Kontrollröhren erhielten die gleichen Mengen Lab, welche zuvor abgetötet waren durch Erhitzen im Wasserbad. Nachdem wieder 24 Stunden geschüttelt war, wurde filtriert, und im Filtrate der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt. Tabelle IV gibt das Resultat.

Tabelle IV.

	T (in Sek.)	$C_H \times 10^5$	N (in $\frac{1}{10}$ -n-Säure)	N (Kontrollrohr)	Verdaut	
					(Gef.)	(Ber.)
1.	111	0,565	16,7	3,4	12,8	13,3
2.	100	0,544	18,73	4,0	14,73	14,7
3.	149	0,544	13,95	3,6	10,35	9,9

In der letzten Kolumne sind die Werte der Verdauung angegeben, die aus den Gerinnungszeiten berechnet sind, in der Voraussetzung, daß die Geschwindigkeit der Gerinnung derjenigen der Verdauung parallel geht. Bedenkt man hierbei, daß die Versuchsanordnung ziemlich kompliziert ist, dann ist die Übereinstimmung für die berechneten und gefundenen Zahlen eine ganz befriedigende zu nennen, und ich schließe daraus, daß es nicht wahrscheinlich ist, daß die Verdauung auf Rechnung

des dem Lab beigemenkten Pepsins zu stellen ist. Nimmt man zwei verschiedene Enzyme an, so muß man dem Chymosin das Vermögen zuschreiben, den Käse in lösliche Verbindungen umzuwandeln, wie das schon von Frl. van Herwerden für gelöstes Casein nachgewiesen wurde. Daß man es hier mit einem noch unbekanntem Enzym zu tun hat, wie Petry meint, ist ebenfalls unwahrscheinlich; es wäre doch als ein Zufall zu betrachten, wenn dieses Enzym in den verschiedenen Labessenzen sich in ganz demselben Verhältnisse vorfand, als das Chymosin.

Jetzt war es angebracht, die mitgeteilten Verdauungsversuche zu wiederholen mit nach Hammarsten bereiteten Enzymlösungen, in welchen durch $MgCO_3$ -Behandlung das Pepsin und durch Salzsäuredigestion das Chymosin abgeschwächt war. Dabei diente als Ausgangsmaterial sowohl durch Dialyse von Kochsalz befreites Labpulver von Hansen, als von mir selbst bereitete Kalbsmageninfusion.

1. Labpulver.

20 g Labpulver wurden in \pm 180 ccm Wasser gelöst und gegen fließendes Regenwasser dialysiert. In der Verdünnung 1 : 20 gab 1 ccm der Lösung mit 5 ccm Milch bei $37,5^\circ C$. die Gerinnungszeit 58". Die Chymosinkonzentration war also genügend, um von der Behandlung mit $MgCO_3$ ein gutes Resultat zu erwarten.¹⁾

120 ccm der ganz klaren Lösung wurden mit 1,2 g $MgCO_3$ während 5 Minuten bei Zimmertemperatur geschüttelt, schnell filtriert und diese Operation noch zweimal wiederholt. 10 ccm des Filtrats brauchten dann 1,5 ccm $\frac{1}{10}$ -n-Salzsäure zur Neutralisation. In der Verdünnung 1 : 1 (nach Zusatz von 8,5 ccm Wasser also) wurde für 1 : 10 Milch die Flüssigkeit in 72" dickgelegt, während ein Mettsches Röhrchen bei 0,2%iger HCl-Konzentration in derselben Verdünnung in 18 Stunden intakt blieb. Die ursprüngliche Lösung verdaute 2,3 mm. In der Verdünnung 1 : 4 wurde von der ursprünglichen Lösung bei

¹⁾ Hammarsten, Zur Frage nach der Identität der Pepsin- und Chymosinwirkung. Diese Zeitschr., Bd. LVI, (1908), S. 53.

0,1 %iger HCl eine Fibrinflocke in 2 Stunden verdaut, während die andere Flüssigkeit 18 Stunden brauchte, um etwa $\frac{2}{3}$ der Flocke zu lösen. Das Verhältnis der Gerinnungszeiten war 35" : 207". (Bei der Bestimmung wurde natürlich darauf geachtet, daß in beiden Fällen der Mg-Gehalt derselbe war.)

Ganz in Übereinstimmung mit dem Befund Hammarstens also hatte ich eine Flüssigkeit erhalten, welche noch kräftig labend, aber nicht, resp. sehr schwach verdauend wirkte auf Hühnereiweiß und Fibrin. Die immerhin schwierige Reinigung mittels Cholesterins habe ich unterlassen; der geringe Pepsingehalt konnte für meinen Zweck vernachlässigt werden. Tabelle V gibt das Resultat der Einwirkung dieser Enzymlösungen auf mein Paracaseinkalkpräparat. Es versteht sich, daß auch hier alle Röhren auf denselben Mg-Gehalt gebracht wurden.¹⁾ Übrigens wurde wie oben verfahren.

Tabelle V.

	T (Sek.)	$C_H \times 10^5$	N (in $\frac{1}{10}$ - n-Säure)	N(Kontroll- rohr)	Verdaut (Gef.)	(Ber.)
1. Ursprüngl. Lösung	54	0,50	24,4	4,5	19,9	19,9
2. Mit $MgCO_3$ beh.	328		8,1		3,6	3,3

Auch hier sehen wir die völlige Parallelität von Gerinnungs- und Verdauungsgeschwindigkeit für die beiden Lösungen; es geht daraus hervor, daß das Pepsin der unveränderten Lösung bei der in diesem Versuche obwaltenden Wasserstoffionen-konzentration ohne merkliche Wirkung ist.

Zur Darstellung einer chymosinarmen Pepsinlösung wurde mit verdünnteren Flüssigkeiten gearbeitet, wie Hammarsten²⁾ angegeben hat. 2 g Labpulver wurden in 200 ccm 0,2%iger

¹⁾ Dabei wurde so verfahren, daß ein Teil der einen Lösung gemischt wurde mit einem Teile der anderen Lösung, deren Enzym aber zuvor durch Erwärmen getötet wurde. Beim Kontrollrohr war natürlich das Gemisch abgetötet.

²⁾ l. c.

HCl gelöst; ein Teil bei 38° C. während 48 Stunden digeriert, der Rest kühl aufbewahrt. Nach der Erwärmung waren die Gerinnungszeiten 47" und 3³/₄ Stunden. Nach Mett 0,8 und 0,5 mm¹⁾ in 48 Stunden. Für die Verdauung des Paracaseins wurde gefunden 21,55 ccm ¹/₁₀-n-Säure für die nicht erwärmte, und 0,8 ccm für die erwärmte Lösung. Obwohl dieser Versuch nicht sehr schlagend ist, dem geringen Pepsingehalte der Lösungen zufolge kann doch gefolgert werden, daß auch in diesem Falle die verdauende Wirkung dem Chymosin zugeschrieben werden muß; von Pepsinwirkung kann nicht die Rede sein.

2. Kalbsmageninfusion.

Zwei Mägen von Saugkälbern wurden ganz frisch in Arbeit genommen. Nach gründlicher Reinigung mit Wasser wurde die Drüsenschicht abgeschabt und die Masse mit 0,2%iger HCl bei 4—6° C. während 24 Stunden extrahiert. Beim Filtrieren wurde eine ganz klare Lösung erhalten, welche jedoch ein wenig fadenziehend sich zeigte.

100 ccm der Lösung wurden mit NaHCO₃ fast neutralisiert, nach dem Auspumpen der Kohlensäure mit 1 g MgCO₃ während 5 Minuten geschüttelt, filtriert, von neuem mit 1 g MgCO₃ geschüttelt, und das zweite Filtrat sofort mit soviel Salzsäure versetzt, daß bei der Verdünnung 1 : 1 die Säurekonzentration 0,1% war. Die ursprüngliche, nicht mit MgCO₃ behandelte Lösung wurde so weit verdünnt mit Salzsäure und erhitzter Mg-haltiger Lösung, daß Mg-Gehalt und Gerinnungszeit ungefähr gleich waren.

Mit Mg behandelt: 164".	Fibrinverdauung 2 ¹ / ₂ Stunden.	Mett —0 mm
Ursprüngl. Lösung: 155".	40 Minuten.	—2 "
		in 48 Stunden.

Das Resultat der MgCO₃-Behandlung ist also in Übereinstimmung mit Hammarstens Angaben. Auch für diese Lösungen wurde die caseinverdauende Wirkung wieder bestimmt.

Tabelle VI zeigt die gefundenen Zahlen:

¹⁾ Die Röhren waren in diesem Fall schwer ablesbar.

Tabelle VI.

	T (Sek.)	$C_H \times 10^5$	N (in $\frac{1}{10}$ - n-Säure)	N (Kontroll- rohr)	Verdaut (Gef.)	(Ber.)
1. Ursprüngl. Lösung	52	0,57	18,7	4,2	14,5	14,5
2. Mit $MgCO_3$ beh.	311		7,1		2,9	2,4

Auch hier also Parallelität für Gerinnung und Verdauung.

Die ursprüngliche Lösung wurde mit 0,2%iger HCl passend verdünnt, und die Hälfte bei 37° C. in den Thermostaten gestellt. Nach 48 Stunden Gerinnung in 12 Minuten gegen 109 Sekunden für die nicht erwärmte Lösung. Weitere Erhitzung auf 40—45° C. während 8 Stunden: in 4 Stunden Gerinnung. Nach Mett in 22 Stunden 5,4 und 3,6 mm.

Beide Lösungen, mit dem Paracaseinpräparate 24 Stunden bei 25° C. geschüttelt, lieferten die Zahlen von Tabelle VII.

Tabelle VII.

	T	$C_H \times 10^5$	N (in $\frac{1}{10}$ -n- Säure)	N (Kontroll- rohr)	Ver- daut
1. Ursprüngl. Lösung	100"	0,25	13,8	2,5	11,3
2. Erwärmte	4 Std.		3,1		0,6

Die hier gefundene Verdauung von 0,6 ccm bei der relativ niedrigen Wasserstoffionenkonzentration $0,25 \times 10^{-5}$ n. für die chymosinarme Lösung brachte mich dazu, den Versuch zu wiederholen bei bedeutend höherem Säuregrade. Es war nämlich denkbar, daß bei diesen Lösungen, welche eine kräftig proteolytische Wirkung nach Mett zeigten, also reich an Pepsin waren, die Pepsinwirkung in meinen Versuchen mit Käse mit ins Spiel käme. Wäre das der Fall, so könnte man einen größeren Einfluß erwarten, je nachdem das Reaktionsmedium mehr Wasserstoffionen enthält.

Tabelle VIII.

	T	$C_H \times 10^5$	N (in $\frac{1}{10}$ -n-Säure)	N(Kontrollrohr)	Verdaut
1. Ursprüngl. Lösung	100''	> 1,4	30,2	3,0	27,2
2. Erwärmte	4 Std.		4,9		1,9

Die erwärmte Lösung hat hier zwar ein wenig verdauend gewirkt, der Betrag ist aber so klein, daß daraus nicht auf Pepsinwirkung geschlossen werden kann. Schließlich habe ich den Versuch wiederholt bei 37,5° C. Tabelle IX gibt das Resultat.

Tabelle IX.

	T	$C_H \times 10^5$	N (in $\frac{1}{10}$ -n-Säure)	N(Kontrollrohr)	Verdaut
1. Ursprüngl. Lösung	100''	> 1,4	19,3	3,3	16,0
2. Erwärmte	4 Std.		4,2		0,9

Auffallend ist, daß in allen drei untersuchten Fällen die erwärmte Lösung noch verdauend gewirkt hat, und zwar zeigt sich das Verhältnis der verdauten Mengen für die beiden Lösungen ziemlich konstant. Nicht unwahrscheinlich hat man es hier zu tun mit Spuren von Glaesners Pseudopepsin,¹⁾ das von Pekelharing²⁾ in der großen Gruppe der autolytischen Enzyme untergebracht und nicht als ein Sekret der Magendrüsen betrachtet wird, obwohl es sich im Schleimhautgewebe vorfindet.

Schließlich will ich noch einen Versuch anführen zur Bestimmung des Einflusses des Kochsalzes auf die Verdauung. Wie schon anfangs bemerkt wurde, bildet das oben Mitgeteilte einen Teil der Untersuchungen, welche ich anstellte zur Lösung einiger Fragen, die für den Käseerigungsprozeß wichtig sind. Daher war es wünschenswert zu untersuchen, wie der Ver-

¹⁾ Hofmeisters Beiträge, Bd. I, S. 1.

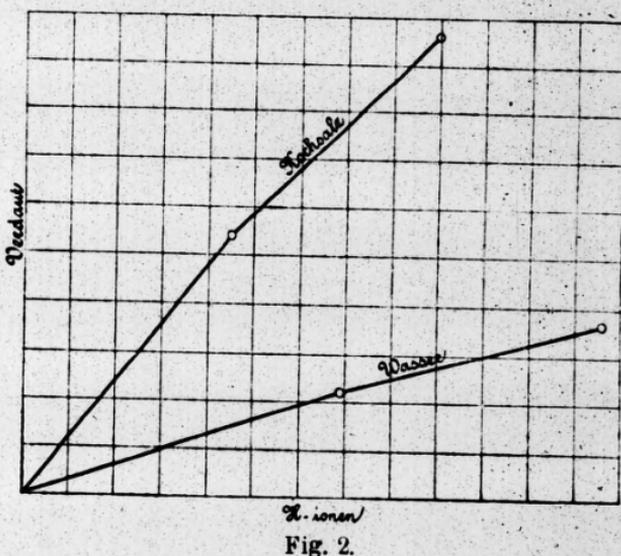
²⁾ Arch. d. Sc. biol., Bd. XI, Suppl. S. 36.

dauungsprozeß des Caseins durch Lab, vom Kochsalz beeinflusst wird. Tabelle X zeigt die Zahlen für eine 5%ige NaCl-Lösung der wässrigen Lösung gegenüber.¹⁾

Tabelle X.

	$C_H \times 10^5$	N (in $\frac{1}{10}$ -n-Säure)	N (Kontrollrohr)	Verdaut
5% NaCl	0,27	32,4	7,2	25,2
	0,60	51,9	6,6	45,3
Wasser	0,46	15,3	4,2	11,1
	0,84	22,8	4,3	18,5

Figur 2 stellt das Resultat graphisch vor.



Es führt also das Kochsalz eine starke Beschleunigung des Verdauungsprozesses herbei, während die Gerinnungszeit verlängert wird. Dies scheint also nicht im Einklang mit Sawjalows Auffassung zu sein, nach welcher eine schnellere Verdauung frühere Gerinnung zur Folge haben soll. Man kann sich aber die Sache ganz einfach wie folgt denken. Das Paracasein löst sich in NaCl besser als in Wasser, wie auch aus

¹⁾ Die Kochsalzlösung konnte nicht klar filtriert werden. Bei diesem Versuch wurden die Lösungen in kleinen Röhrchen zentrifugiert (± 4000 Touren pro Minute).

den Ziffern für die Kontrollröhren hervorgeht. Wirkt also das Enzym auf gelöstes Paracasein, so ist in der Kochsalzlösung die aktive Masse größer und damit auch die Verdauungsgeschwindigkeit. Das zersetzte Paracasein kann man sich in jedem Momente durch neu gelöstes Präparat ersetzt denken. Beim Gerinnungsversuch aber bleibt durch NaCl-Zusatz die Caseinkonzentration ungeändert, die Löslichkeit des sich bildenden Paracaseins wird aber größer und damit die Gerinnungszeit verlängert. Es ist klar, daß diese Auffassung einen direkten Einfluß des Salzes auf die Enzymwirkung nicht ausschließt. Meine Untersuchungen gehen augenblicklich in andere Richtung, ich glaube aber, daß durch Versuche, in der oben beschriebenen Weise ausgeführt mit verschiedenen Salzen, ein wenig Licht gebracht werden kann in die Frage nach der Salzwirkung bei der Milchgerinnung. Eine nähere Prüfung in dieser Richtung scheint mir sehr wünschenswert.

Wie stellen sich nun meine Beobachtungen zur Frage nach der Identität von Pepsin und Chymosin? 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 als das für Pepsin der Fall zu sein scheint bei Alkalisierung,¹⁾ 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.

Aus meinen Untersuchungen geht deutlich hervor, daß bei der Wasserstoffionenkonzentration $> 1 \cdot 4 \times 10^{-5}$ n. die Pepsinwirkung, wenn sie überhaupt da ist, äußerst gering ist. Sawjalows Ansicht möchte ich vorläufig so abändern: Die

¹⁾ Tichomirow, Diese Zeitschrift, Bd. LV.

Milchgerinnung ist die Folge der Verdauung des Caseins durch Chymosin

Man könnte einwenden, daß aus obigen Versuchen nicht folgt, daß bei den in der Milch obwaltenden Konzentrationen der H-Ionen das Casein verdaut wird. Folgende Zahlen zeigen, daß dies wohl der Fall ist.

0,5 ccm Labessenz in 30 ccm Wasser wurden bei 25° C. während 50 Stunden geschüttelt mit 3 g Paracaseinkalk.

$C_H = 0,073 \times 10^{-6}$. 16,4 ccm $\frac{1}{10}$ -n-Säure gegen 10 ccm für das Kontrollrohr, also 6,4 ccm verdaut.

Die H-Ionenkonzentration war hier also kleiner als für Milch ($0,10 - 0,34 \times 10^{-6}$).

Schließlich will ich noch bemerken, daß die in den verschiedenen Versuchsreihen hergestellten H-Ionenkonzentrationen nicht willkürlich gewählt sind. Von der Tatsache ausgehend, daß ein reifender Käse betrachtet werden kann als ein zweiphasiges System, habe ich damit ein Konzentrationselement zusammengestellt, aus dessen elektromotorischer Kraft die Wasserstoffionenkonzentration im Käse berechnet wurde. Die Resultate dieser Messungen sind sehr befriedigend. Im Durchschnitt wurde gefunden $\pm 0,9 \times 10^{-5}$ normal; dieser Wert liegt also im Gebiete meiner oben angeführten Messungen. Ich gehe hier nicht in Besonderheiten ein auf die Schlüsse, zu welchen meine Beobachtungen führen bezüglich des KäserEIFungsprozesses; es sei nur bemerkt, daß sie eine ganz einfache Erklärung liefern für die Lösung des Caseins, «die Vorstufe der Reifung», wie es v. Freudenreich hat genannt.

Bekanntlich meinten Babcock und Russell,¹⁾ daß dabei die Galaktase der Milch die Hauptrolle spielte. Noch abgesehen davon, daß es fraglich ist, ob in der Milch überhaupt ein proteolytisches Enzym vorkommt,²⁾ ist es sehr leicht, zu zeigen, daß ein solches Enzym in der EdamerkäserEIFung keine bedeutende Rolle spielt. Fast jeder Kontrollkäse in den zahlreichen Versuchen Boekhouts und Ott de Vries³⁾ über die

¹⁾ Zentralbl. f. Bakter., II. Abteilung, Bd. VI, 1900.

²⁾ Vgl. z. B. Raudnitz, Ergebnisse d. Physiologie, Bd. II, 1903.

³⁾ Zentralbl. f. Bakter., II. Abteilung, Bd. VII, 1901.

Käsereifung bildet dafür den Beweis. Auch Orla Jensen¹⁾ ist der Meinung, daß die Galaktase für die Reifung der Emmentalerkäse von keiner Bedeutung sein kann. v. Freudenreich²⁾ wurde bei seinen Untersuchungen zum Schlusse geführt, die Milchsäurefermente, denen er fast die ganze Reifung der Emmentalerkäse zuschreibt, seien die Ursache der Lösung des Caseins. Dieser Forscher hat nämlich nachgewiesen, daß durch Impfen erhitzter Milch mit Milchsäurebakterien unter gewissen Umständen das Casein in lösliche Form übergeführt werden kann. Meiner Ansicht nach ist damit gar nicht bewiesen, daß dasselbe in der Käsemasse der Fall ist, wo die Umstände wieder ganz andere sind. Eben darum habe ich bei meinen Versuchen einen wichtigen Faktor, die Acidität des Mediums, genau präzisiert.

Der Vorschlag Jensens,³⁾ das «neue Enzym» Petrys Casease zu nennen, wird nach dem oben Gesagten hinfällig.

Zusammenfassung.

Es wurde gefunden:

Die Verdauung des Paracaseins durch Lab wird vom Gehalte an Wasserstoffionen des Mediums beeinflusst und zwar hat sich ergeben, daß die Verdauungsgeschwindigkeit dem H-Ionengehalte proportional ist, wie es früher für die Gerinnungsgeschwindigkeit gefunden wurde.

Wenn man bei gleicher Acidität verschiedene Labpräparate auf Paracaseinkalk wirken läßt, gehen Verdauungs- und Gerinnungsgeschwindigkeit vollkommen parallel. Dasselbe ist der Fall für eine Lablösung oder nach Hammarsten bereitete Kalbsmageninfusion, in welcher das Pepsin durch $MgCO_3$ -Behandlung abgeschwächt ist. Hieraus kann geschlossen werden, daß bei den in meinen Lösungen obwaltenden H-Ionenkonzentrationen (bis 1×10^{-5} n.) von Pepsinwirkung nicht die Rede ist. Das Paracasein wird nur vom Chymosin gelöst. Es liegt

¹⁾ Jahrb. d. Schweiz, 1901.

²⁾ Zentralbl. f. Bakter., Bd. III, S. 231. S. a. Jahrb. d. Schweiz. Bd. XI.

³⁾ Jahrb. d. Schweiz, 1907.

kein Grund vor, mit Petry ein unbekanntes für Casein spezifisches Enzym im Labe anzunehmen.

Wird in der Kalbsmageninfusion durch Digerieren mit 0,2%iger HCl das Chymosin zerstört, so findet man auch das Vermögen, Käse zu verdauen, fast vollständig aufgehoben, selbst bei der Acidität $> 1,4 \times 10^{-5}$ normal. Bei 0,2%iger HCl wurde Hühnereiweiß von dieser Lösung kräftig verdaut. Obwohl meine Resultate vollkommen übereinstimmen mit der unitarischen Auffassung in der Pepsin-Chymosinfrage, kann auf Identität nicht geschlossen werden, so lange letztere Tatsache nicht erklärt worden ist.

Kochsalz beschleunigt die Verdauung des Paracaseins durch Chymosin. Dies wurde in Übereinstimmung gefunden mit der Verzögerung der Milchgerinnung durch dieses Salz.

Schließlich wurde darauf hingewiesen, daß obenstehende Resultate wohl die einfachste Erklärung liefern für das Löslichwerden des Paracaseins während der Käsereifung.

Reichslandw. Versuchsstation Hoorn, 28. Juni 1909.
